

Het voorkomen van pathogenen in *Rhipicephalus sanguineus* teken afkomstig van honden uit Kalamata in Griekenland



Naam: Carley van der Velden (C.E.L.F.)
Studentennummer: 3260097
Locatie: Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD)
Departement Infectieziekten en Immunologie
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
Stageperiode: September 2011 – November 2011
Begeleiders: Prof. Frans Jongejan
Ing. Michiel Wijnveld

Inhoudsopgave

1. Samenvatting	4
2. Inleiding	5
3. <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Rickettsia</i> spp. en <i>Babesia</i> spp.	6
3.1. <i>Ehrlichia canis</i>	6
3.2. <i>Rickettsia</i> spp.	7
3.3. <i>Babesia</i> spp.	8
4. Materiaal en methoden	9
4.1. Teken	9
4.2. DNA extractie	9
4.3. Larven DNA extractie	10
4.4. Polymerase chain reaction (PCR)	10
4.5. Agarose gel elektroforese	11
4.6. Reverse line blot (RLB) hybridisatie	11
5. Resultaten	13
5.1. <i>Babesia</i> catch-all 1 teken	13
5.2. <i>Theileria/Babesia</i> catch-all, <i>equi-like</i> teken	13
5.3. <i>E. canis</i> , <i>E. ruminantium</i> , <i>E. sp omatjenne</i>	14
5.4. Het resultaat van Nikitas	14
5.5. Het resultaat van dierenarts Nikos Sinamis	15
5.6. Het resultaat van dierenarts Christine	16
5.7. Het resultaat van de larven kolonie	16
6. Discussie	19
6.1. <i>Babesia</i> catch-all 1 en <i>Theileria/Babesia</i> catch-all, <i>equi-like</i> teken	19
6.2. Teken van Nikitas	20
6.3. Teken van dierenarts Nikos Sinamis	20
6.4. Teken van dierenarts Christine	20
6.5. Larven kolonie	21
7. Conclusie	22
8. Dankwoord	22
9. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nimfen uit Zuid-Afrika	23
10. Referenties	28
11. Bijlagen	30
11.1. Bijlagen – RLBs	30

1. Samenvatting

Het doel van dit onderzoek was om te kijken welke pathogenen voorkomen in *Rhipicephalus sanguineus* teken uit Griekenland. Gekeken is naar het voorkomen van pathogenen, zoals *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* en *Rickettsia* spp., die ernstige ziekten kunnen veroorzaken. Hiervoor zijn 234 teken *R. sanguineus* uit Griekenland onderzocht, met als hoofdlocatie de farm Nikitas. Met behulp van DNA extractie, polymerase chain reaction (PCR) en reverse line blot (RLB) zijn de pathogenen zichtbaar gemaakt. Bij dit onderzoek zijn in meerdere *R. sanguineus* teken *E. canis* en *Rickettsia* spp. gevonden. Bovendien is gekeken naar de mogelijkheid om pathogeen-vrije *R. sanguineus* teken in het laboratorium op te kweken. Hiervoor zijn de eerste laboratorium generatie larven getest op de aan- of afwezigheid van *Rickettsia* spp..

2. Inleiding

Rhipicephalus sanguineus, de bruine hondenteek, is een drie gastheren teek die zich hoofdzakelijk voedt op honden. Dit betekent dat in elk actief stadium (larve, nimf en adult) een gastheer wordt gezocht om zich daarop te voeden, waarna ze zich weer laten vallen op de grond en vervellen naar een volgend stadium. *R. sanguineus* is een vector waarvan bekend is dat deze meerdere pathogenen kan overdragen. Soms komt het voor dat *R. sanguineus* zich op andere gastheren voeden, inclusief de mens [Dantas-Torres, 2008]. Ook in Griekenland zijn hier gevallen van bekend en dit maakt het mogelijk dat de teken de pathogenen ook op de mens kan overdragen en ernstige ziekten kan veroorzaken [Papa et al, 2011]. De teek komt wereldwijd voor, voornamelijk in subtropische gebieden [Dantas-Torres, 2008]. In Nederland is deze teek niet endemisch, maar wordt wel incidenteel binnenshuis gevonden. Door de ideale omstandigheden binnenshuis en in hondenkennels kunnen de teken hier gedurende het hele jaar overleven en hun cyclus (vier ontwikkelingsstadia: ei, larve, nimf en adult) voltooiën [Bodaan et al, 2007; Dantas-Torres, 2008]. In dit onderzoek worden *R. sanguineus* teken uit Griekenland onderzocht, omdat er nog niet veel onderzoek naar is gedaan en er dus vrij weinig bekend is over wat voor soort pathogenen deze teken met zich meedragen. De hypothese is dat deze teken, net als eerder onderzochte *R. sanguineus* teken, pathogenen bij zich dragen, zoals *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. en *Rickettsia* spp. [Bodaan et al, 2007].

Het doel van dit onderzoek is om te kijken welke pathogenen voorkomen in *R. sanguineus* teken uit Griekenland. Gekeken wordt naar de prevalentie van de mogelijke pathogenen, zoals *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. en *Rickettsia* spp..

Dit is van belang, omdat deze teken mogelijk pathogenen kunnen overdragen die kunnen leiden tot ernstige ziektes bij de hond, maar mogelijk ook bij de mens. Ook kan er door het reizen met honden naar endemische gebieden de teek worden meegenomen en introductie plaatsvinden in niet endemische gebieden. Ook is het belangrijk om dierenartsen bewust te maken van het risico dat een hond deze ziektes kan oplopen, waarbij een goede anamnese dus zeer belangrijk kan zijn. Bovendien is gekeken naar de mogelijkheid om pathogeen-vrije *R. sanguineus* teken in het laboratorium op te kweken.

3. Ehrlichia canis, Rickettsia spp. en Babesia spp.

3.1. Ehrlichia canis

E. canis is een gram negatieve obligaat intracellulaire bacterie en veroorzaakt de ziekte canine monocytair ehrlichiose (CME), ook wel bekend als tropical canine pancytopenie. *E. canis* parasiteert voornamelijk de monocyten en macrofagen. *R. sanguineus* teken, de primaire vector van *E. canis*, voeden zich voornamelijk op honden. En tijdens elke voedingsfase kunnen de teken worden geïnfecteerd en de bacterie overbrengen. De overdracht van *E. canis* door *R. sanguineus* nimfen en adulten gebeurt transtadieel [Stich et al, 2008; Little et al, 2007]. De *R. sanguineus* mannetjes kunnen *E. canis* ook intrastadieel overdragen, wat betekent dat ze dus ook meerdere honden kunnen infecteren. Er vindt geen transvariële transmissie plaats [Bremer et al, 2005; Little, 2010; Stich et al 2007].

Het CME ziektebeeld uit zich in drie fases: een acute, subklinische of de chronische fase [Harrus et al, 2011, Stich et al, 2008]. De acute fase wordt gekenmerkt door: hoge koorts, depressie, lethargie, anorexia, lymphadenomegaly, splemegalie en hemorragische tendensen. Ook oogafwijkingen en neurologische verschijnselen kunnen voorkomen. Tijdens de subklinische fase zijn er geen duidelijk klinische verschijnselen. Sommige honden kunnen na subklinische fase overgaan naar de chronische fase, waarbij de symptomen vergelijkbaar zijn met de acute fase, alleen dan heftiger. Bleke slijmvliezen, zwakte, bloedingen en significant gewichtsverlies komen vaak voor in deze fase.

Om de diagnose CME te stellen is het voor dierenartsen belangrijk om een goede anamnese af te nemen. Een anamnese waar naar voren komt dat een hond woont of is meegereisd naar een endemisch gebied in combinatie met de verschijnselen moet worden verdacht van CME. Vervolgens kunnen er diagnostische technieken, zoals hematologie, cytologie, serologie en isolatie, worden gebruikt voor een diagnose. Maar een definitieve diagnose, van een *E. canis* infectie, kan alleen worden gesteld met behulp van moleculaire technieken.

De prognose voor de chronische fase is slecht en loopt vaak fataal af. Van een acute of subklinische fase herstellen de meeste honden na behandeling met doxycycline of andere tetracyclines, als de juiste doseringen worden gebruikt en men op tijd is [Harrus et al, 2011].

Naast *E. canis* is er in een onderzoek gevonden dat *E. chaffeensis* ook door *R. sanguineus* kan worden overgedragen [Ndip et al, 2010].

3.2. *Rickettsia* spp.

Rickettsia is een genus die bestaat uit een grote groep van gram-negatieve obligaate intracellulaire bacteriën die zich alleen in eukaryote gastheercellen (meestal endotheelcellen) kan vermenigvuldigen. De *Rickettsia* soorten die door teken worden overgebracht behoren tot de spotted fever group (SPG) [Bermúdez et al, 2011]. Bekend is dat *R. sanguineus* teken vectoren zijn voor pathogenen *Rickettsia conorii* en *Rickettsia rickettsii*. De transmissie van *Rickettsia* spp. kan transovarieel verlopen en verloopt van larve tot en met de adulte fase. Ook via het paren vindt overdracht van *Rickettsia* spp. plaats.

De ziekte Rocky Mountain spotted fever (RMSF) wordt veroorzaakt door *R. rickettsii*, dit is een zeer ernstige ziekte die fataal kan aflopen voor de mens en hond, zeker als er niet op tijd behandeld wordt. Verschijnselen die voorkomen bij de mens zijn: het plotseling ontstaan van koorts, hevige hoofdpijn en gegeneraliseerde malaise. Ook wordt er vaak spierpijn, misselijkheid, braken en fotofobie gezien. Bij de meerderheid van de patiënten is binnen twee weken na infectie het klassieke beeld aanwezig: koorts, hoofdpijn en gegeneraliseerde maculopapulaire uitslag. Sommige mensen krijgen niet de typische huiduitslag. Bij honden zijn verschijnselen aanwezig, zoals koorts, lethargie, braken en anorexia. Als de ziekte vordert kunnen oogbeschadigingen, bloedstoornissen, pijn in gewrichten en neurologische afwijkingen voorkomen. De diagnose kan worden gesteld door middel van directe visualisatie van de pathogeen, celkweek isolatie, PCR en serologie. Zowel bij mens als de hond wordt de ziekte behandeld met doxycycline [Nicholson et al, 2010].

De ziekte Mediterrarean spotted fever (MSF) wordt veroorzaakt door *R. conorii*. Tache noir, een zwarte ulceruze korst, is een verschijnsel dat ontstaat op de plek waar de teek gebeten heeft. Andere veel voorkomende verschijnselen die bij mensen kunnen voorkomen zijn koorts, dat gepaard gaat met uitslag bij de handpalmen en voetzolen. Bij ernstige vormen van MSF komen klinische verschijnselen voor, zoals purpura en neurologische afwijkingen. De ziekte kan fataal aflopen voor de mens. De ziekte wordt hoofdzakelijk met doxycycline behandeld [Botelho-Nevers et al, 2011]. Er is maar weinig bekend over de klinische verschijnselen bij de hond. Bij honden die experimenteel zijn geïnfecteerd met *R. conorii* verliep de infectie asymptomatisch, maar bij een paar honden zijn acute koortsachtige verschijnselen gevonden [Harrus et al, 2007].

In Griekenland worden er elk jaar meerdere klinische SPG rickettsiose gevallen gerapporteerd. Bij onderzoeken die tot nu zijn gedaan in Griekenland zijn er teken met *Rickettsia* spp. gevonden, maar deze konden toen nog niet verder worden geïdentificeerd. Er

is echter wel een *Rickettsia* spp. gevonden in vrouwelijke *R. sanguineus* teken, die genotypisch dicht in de buurt komt van *R. massiliae* [Babalis et al, 1994]. In een recenter artikel is ook *R. conorii* geïsoleerd uit de *R. sanguineus* teek [Psaroulaki et al, 2003].

3.3. Babesia spp.

Bekend is dat *R. sanguineus* verschillende *Babesia* soorten kan overdragen, zoals *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli* en mogelijk ook *B. caballii* [Bodaan et al, 2007; Dantas-Torres et al, 2008; Dantas-Torres et al, 2006]. Adulten teken raken geïnfecteerd tijdens het voeden op een geïnfecteerde gastheer. Er vindt transovariele transmissie plaats, waardoor de volgende generatie geïnfecteerd is en de ziekte kan worden overgedragen op een hond, tijdens het voeden [Jongejan, 2001].

Canine babesiose is een levensbedreigende ziekte en wordt veroorzaakt door intraerythrocytische protozoaire parasieten van het genus *Babesia*. Canine babesiose is wereldwijd één van de belangrijkste tekengebonden ziekten van honden. De meeste honden vertonen klinische verschijnselen, zoals apathie, anemie, koorts, anorexie en bleke slijmvliezen. De diagnose kan worden gesteld door middel van een microscopisch onderzoek of moleculaire diagnostiek (PCR). Om een diagnose van asymptomatische honden en honden met een chronische infectie vast te stellen wordt gebruik gemaakt van serologische testen. De behandeling bestaat uit het toedienen van diminazene diacetaat en imidocarb dipropionaat, waarbij bijwerkingen kunnen optreden. Wanneer er verdenkingen zijn dat een patiënt aan canine babesiose leidt, gezien de geschiedenis (tekenbeet) en symptomen, moet er gelijk symptomatisch behandeld worden (vloeistoftherapie en bloedtransfusie) [Dantas-Torres et al, 2006].

4. Materiaal en methoden

4.1. Teken

In dit onderzoek zijn 234 *R. sanguineus* afkomstig uit Griekenland onderzocht. Het grootste gedeelte van de teken (216) zijn verzameld bij de farm Nikitas, deze farm ligt net buiten het centrum van Kalamata – Griekenland. De teken zijn verzameld van een grote groep honden en zijn niet apart per hond onderzocht. Los van deze aantallen zijn er ook nog acht levende volgezogen teken (♀) uit Nikitas verzameld om een kolonie te starten. Na het uitkomen van de eieren van deze teken zijn de larven onderzocht.

Zes teken zijn verzameld van een Pitbull (♂) bij dierenarts Nikos Sinamis en in zijn praktijk zijn nog tien teken van meerdere honden verzameld. Ook zijn er nog twee teken onderzocht die door dierenarts Christine van een hond zijn afgehaald. De dierenartsenpraktijk van Christine ligt in het centrum van Kalamata – Griekenland.

Alle teken waren verdeeld over potjes, met 70% alcohol, met verschillende data en stadia. Elke teek is voor gebruik onder een microscoop beoordeeld om de soort en stadium te bevestigen en om het geslacht te bepalen, hierbij heeft elke teek een identificatie nummer gekregen.

De acht levende volgezogen teken zijn elk apart in een batch geplaatst, om eieren te leggen. Elke batch heeft een nummer gekregen, 1,2,3,4,5,6,7 en 8 (zie figuur 2). De volgezogen teken die in batch 1,2,3,4,5,6 en 7 hebben gezeten zijn verzameld op 09-08-11, batch 8 is van 21-09-11.

Naast het onderzoek is er ook nog een batch met *R. sanguineus* nimfen uit Zuid-Afrika onderzocht.

4.2. DNA extractie

Na het bepalen van het stadium en geslacht van de *R. sanguineus* teken wordt DNA extractie uitgevoerd, dit is uitgevoerd aan de hand van de UCTD protocollen (zie bijlagen – UCTD Protocollen) met behulp van de Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel). Het verkregen DNA-sample wordt gebruikt om pathogenen, waarmee de teken kunnen zijn geïnfecteerd, op te sporen.

4.3. Larven DNA extractie

Aangezien larven te klein zijn om het normale protocol van DNA extractie te volgen, is er een andere techniek gebruik om DNA uit de acht larven kolonies te krijgen. Om deze techniek te testen is eerst alleen batch 3 getest.

Uit batch 3 zijn meerdere larven in één epje met 70% alcohol gedaan, hierna is het epje gecentrifugeerd, zodat de 70% alcohol daarna er zoveel mogelijk kan worden uit gepipetteerd. Nog eenmaal wordt er 70% alcohol toegevoegd en wordt er gevortexed, vervolgens gecentrifugeerd en daarna weer de 70% alcohol d.m.v. pipetteren verwijderd. 180 µl T1 buffer wordt toegevoerd. Om de celwanden van de larven kapot te krijgen wordt het epje drie maal 10 minuten in kokend water en drie maal 10 minuten in de vriezer (-80°C) geplaatst. Het koken en vriezen wordt om en om gedaan. Hierna wordt B3 buffer toegevoegd en het normale UCTD protocol weer gevolgd.

4.4. Polymerase chain reaction (PCR)

Op het verkregen DNA-sample kan polymerase chain reaction (PCR) worden uitgevoerd. Met PCR kunnen specifieke stukjes DNA-streng worden geamplificeerd, zodat er voldoende DNA is om het te analyseren. DNA amplificatie wordt gedaan met behulp van verschillende primers. Er zijn twee primers nodig, een reverse en een forward primer. Voor elk onderzochte pathogenen groep wordt een aparte mastermix gemaakt, deze bestaat uit de twee primers, H₂O, 5x Phire reaction buffer, 10 mM dNTPs en 2U/µl Phire Hot Start II DNA polymerase. In dit onderzoek zijn drie pathogenen groepen (*Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. en *Rickettsia* spp.) onderzocht, hierbij zijn drie primersets gebruikt: *Babesia/Theileria*, *Ehrlichia/Anaplasma* en *Rickettsia* (zie tabel 1).

Primer	Sequence	Orientation	T _m (°C)
RLB-F2	5'-GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G	+	57.9
RLB-R2	5'-Biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT	-	53.7
Ehr-F	5'-GGA ATT CAG AGT TGG ATC MTG GYT CAG	+	61.0
Ehr-R	5'-Biotin-CGG GAT CCC GAG TTT GCC GGG ACT TYT TCT	-	69.5
Rick-F	5'-GAA CGC TAT CGG TAT GCT TAA CAC A	+	66.9
Rick-R	5'-Biotin-CAT CAC TCA CTC GGT ATT GCT GGA	-	69.4

Tabel 1. Sequentie primers

Na het maken van de mastermix, wordt de mastermix (zoals in het protocol beschreven staat) verdeeld over microcentrifuge epjes en worden de DNA-samples hieraan toegevoegd. Ook wordt er een positieve en negatieve controle gemaakt. De microcentrifuge epjes worden vervolgens in het PCR apparaat geplaatst, hierbij wordt een PCR thermocycler programma ingesteld, deze is voor alle drie de onderzochte pathogenen hetzelfde.

4.5. Agarose gel elektroforese

Nadat het PCR programma is afgelopen, worden de positieve en negatieve controle door middel van een gel elektroforese (zie bijlagen – UCTD protocollen) beoordeeld.

Gel elektroforese is een techniek waarbij DNA-fragmenten, door middel van een elektrisch veld, van elkaar kunnen worden gescheiden. Hierdoor gaan de negatieve DNA-fragmenten door de gel heen migreren richting de positieve geladen pool. Verschil in grootte van de DNA-fragmenten bepaald de afstand van migratie, waardoor de DNA-fragmenten worden gescheiden (grotere DNA-fragmenten zullen hierbij minder snel migreren, dan kleinere DNA-fragmenten). In dit onderzoek is gebruik gemaakt van 1,5% agarose gel.

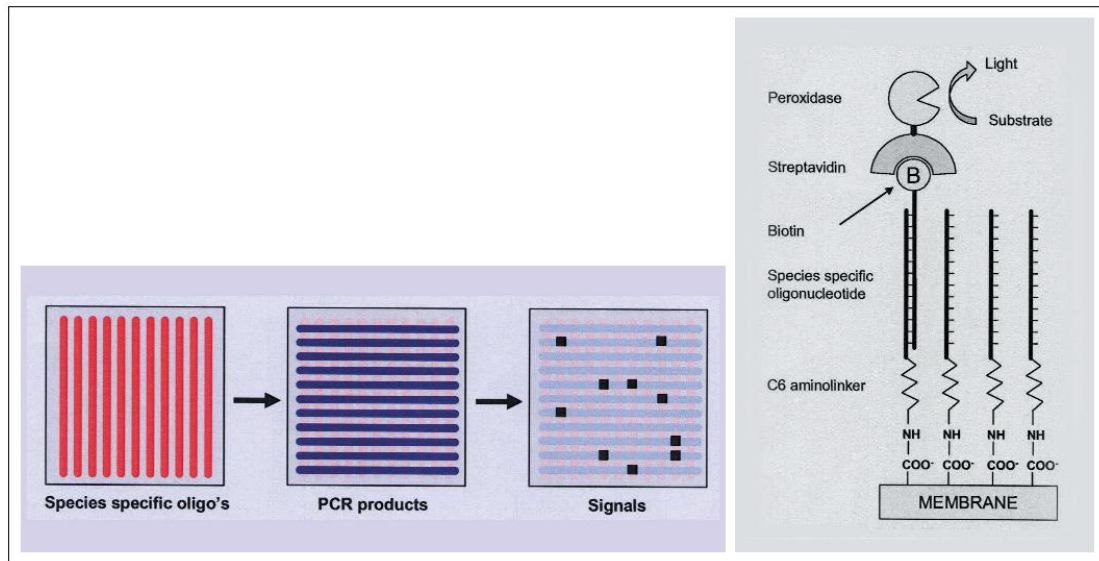
Met deze techniek, gel elektroforese, kan bepaald worden of de PCR naar behoren heeft gewerkt. Mocht het proces niet naar behoren hebben gedaan of contaminatie zijn opgetreden, kan er zo worden voorkomen dat er onnodig verder wordt gegaan met de reverse line blot (RLB) .

4.6. Reverse line blot (RLB) hybridisatie

Na de controle met gel elektroforese, kunnen de PCR-producten worden verdund, hierbij word elk verschillend PCR-product (*Babesia/Theileria*, *Ehrlichia/Anaplasma* en *Rickettsia*) van hetzelfde DNA-sample in één epje gedaan en gebruikt voor de RLB hybridisatie (zie Bijlagen – UCTD protocollen).

RLB wordt gebruikt voor detectie en differentiatie van specifieke pathogenen. Dit wordt gedaan met behulp van een miniblotter en een membraan waarop soortspecifieke oligonucleotide probes zijn aangebracht. Deze probes zijn covalent gebonden aan het membraan met 5' terminal C6-aminolinker. De aangebrachte probes op het membraan worden haaks op de sloten van miniblotter geplaatst. Hierna kunnen de verdunde PCR-producten in de sloten worden gepipetteerd, waardoor de PCR-producten loodrecht op de probes terechtkomen. Er kan op deze manier binding plaatsvinden tussen de PCR-producten en soortspecifieke oligonucleotide. Om de niet gebonden PCR-producten te verwijderen word het membraan gewassen. De gebonden PCR-producten kunnen zichtbaar worden gemaakt door gebruik te maken van het aan de PCR-primer gebonden biotine label. Tijdens het incuberen van het membraan met streptavidine oplossing, wordt peroxidase geconjugeerde streptavidine gebonden aan het biotine label. Vervolgens wordt ECL toegevoegd, dit resulteert in een reactie waarbij licht wordt geproduceerd. Dit licht kan zichtbaar worden gemaakt op een film [Taoufik et al, 2004]. Figuur 1 laat een schematisch overzicht zien van wat hierboven is beschreven.

Om te controleren of het RLB proces goed verloopt worden er twee positieve controles gebruikt (A/E controle en B controle).



Figuur 1. Schematisch het RLB proces [Taoufik et al, 2004]

5. Resultaten

De laatste drie RLBs (RLB: membraan ML6 (02-11-11), ML6 (04-11-11), ML5 (08-11-11), (zie bijlage - RLBs) worden als eerst besproken, omdat dit resultaten zijn van teken die opnieuw zijn onderzocht. Hieruit zal blijken of voorgaande membranen of teken zullen worden meegenomen in het onderzoek of buiten beschouwing worden gelaten. Vervolgens zal er per locatie, waar de teken zijn verzameld, de resultaten worden beschreven.

5.1. *Babesia* catch-all 1 teken

In RLB: membraan ML6 (02-11-11) zijn teek 20, **40**, 43, 51, **68**, **145** en 194 opnieuw onderzocht, omdat deze teken een sterk (dikgedrukte cijfers) of licht signaal gaven voor *Babesia* catch-all 1 . Om te kijken of het *Babesia* catch-all 1 signaal kon worden herhaald zijn deze teken alleen op *Babesia* getest.

Het resultaat hiervan was dat alleen teek **40** nu een licht signaal gaf voor *Babesia* catch-all 1. En teek **145** van signaal is veranderd, van *Babesia* catch-all 1 naar *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like*. De rest van de teken gaven geen signaal.

Vanwege deze resultaten zijn de teken nog maal onderzocht, maar nu alleen de teken die in eerste instantie een sterk signaal (**40**, **68** en **145**) gaven. In RLB: membraan ML6 (04-11-11) is het resultaat te zien. Teek **40** geeft nu een duidelijk resultaat voor *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like*. Teek **68** geeft weer geen signaal en teek **145** geeft nu ook geen signaal. Door de wisselende resultaten zijn deze drie teken nog een keer onderzocht door een ander persoon en met een ander membraan. Bij deze RLB (membraan ML5 (08-11-11)) gaven alle drie de teken geen signaal.

Omdat de resultaten zo wisselend zijn is het niet mogelijk om een betrouwbaar oordeel te geven. Er zal hiernaar verder onderzoek naar moeten worden gedaan. Deze teken zullen daarom niet worden meegenomen in het totaal resultaat.

5.2. *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* teken

In RLB: membraan ML6 (02-11-11) zijn ook teek 195, **198**, **203**, **205**, **207**, **209**, **210**, 211 t/m 215, 230, 231, 232 en 234 opnieuw onderzocht, omdat deze teken onverwacht een sterk (dikgedrukte cijfers) of licht signaal gaven voor *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like*. Om te kijken of het *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* signaal kon worden herhaald zijn deze teken alleen op *Babesia* spp. getest.

Bij teek **203**, **205**, **207**, **209** en 212 kon het signaal herhaald worden, de rest gaf geen signaal. Vervolgens zijn alleen de teken die in eerste instantie een sterk signaal (**198**, **203**,

205, 207, 209, 210) gaven opnieuw herhaald. Het resultaat hiervan (zie RLB: membraan ML6 (04-11-11)) teek **205** een opnieuw een duidelijk signaal geeft en teek **203** een zeer licht signaal geeft, de rest van de teken geven nu geen signaal. Dit is nog eenmaal herhaald door een ander persoon en met een ander membraan. Bij deze RLB (membraan ML5 (08-11-11)) gaven teek **203, 205** en **210** een signaal voor *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* en teek **198, 207** en **209** niet.

Omdat de resultaten zo wisselend zijn is het niet mogelijk om een betrouwbaar oordeel te geven. Er zal hiernaar verder onderzoek naar moeten worden gedaan. Deze teken zullen daarom niet worden meegenomen in het totaal resultaat.

5.3. *E. canis*, *E. ruminantium*, *E. sp omatjenne*

In RLB: membraan ML7 (12-10-11) kwamen een aantal teken (90, 95, 100, 102, 104, 121, 124, en 125) voor die signaal gaven voor *E. canis*, *E. ruminantium*, *E. sp omatjenne*. Twee teken (225 en 32) op RLB: membraan ML6 (31-10-11) vertoonde hetzelfde beeld. Omdat het onwaarschijnlijk is dat *R. Sanguineus* al deze pathogenen bezit, zijn deze opnieuw onderzocht. In RLB: membraan ML6 (04-11-11) en ML5 (08-11-11) zijn al deze teken herhaald onderzocht en geen van de teken gaf een signaal voor, zowel *E. canis*, *E. ruminantium*, als *E. sp omatjenne*.

Het resultaat was twee maal totaal niet herhaalbaar, hieruit is te concluderen dat de resultaten van RLB: membraan ML7 (12-10-11) en ML6 (31-10-11) onbetrouwbaar zijn. De resultaten van deze RLBs worden buiten beschouwing van het onderzoek gelaten.

5.4. Het resultaat van Nikitas

In diagram 1 is een duidelijk totaal overzicht te zien van de resultaten van *R. sanguineus* teken die bij de farm Nikitas zijn verzameld. Hiervoor zijn in totaal 136 teken gebruikt (35♂, 83♀ en 18 nimfen). Deze teken zijn in vier groepen opgedeeld: teken die alleen *E. canis* of alleen *Rickettsia* spp. bevatten, teken die beide *E. canis* en *Rickettsia* spp. bevatten en die geen *E. canis* en *Rickettsia* spp. bevatten. In diagram 2 t/m 5 is te zien per pathogeen de verdeling van het geslacht. Te zien is dat *Rickettsia* spp. vrij veel voorkomt, hierbij werden *R. massiliae*, *R. raoultii* en regelmatig alleen het *R. catch-all* signaal gevonden.

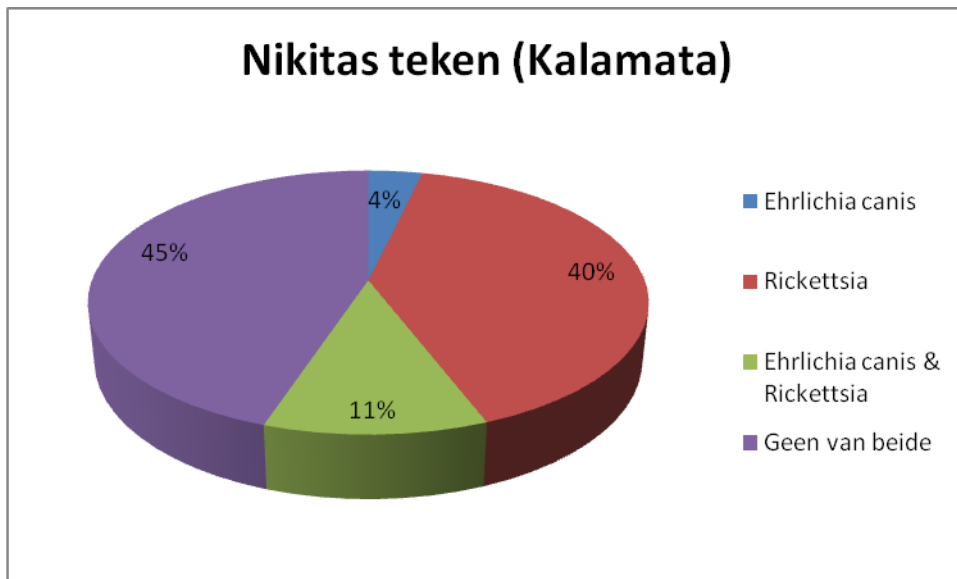


Diagram 1

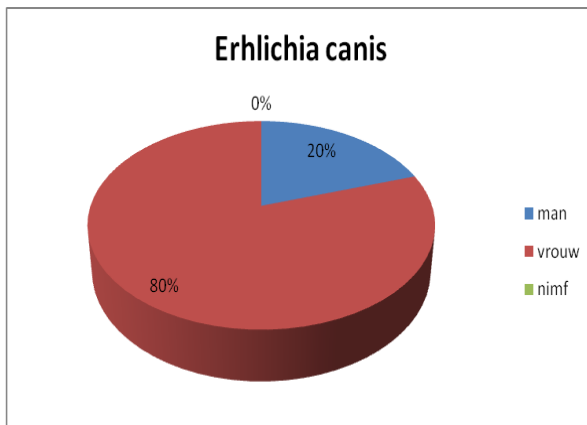


Diagram 2

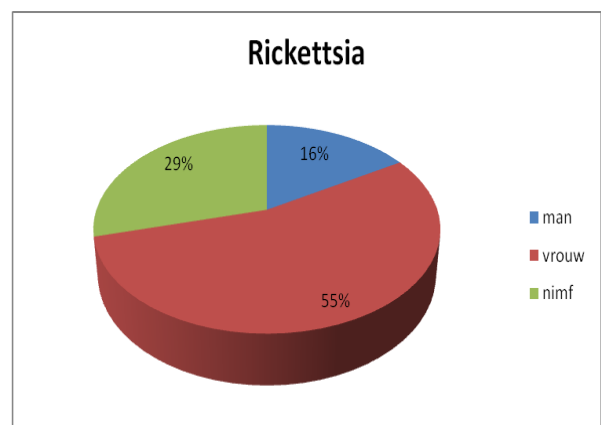


Diagram 3

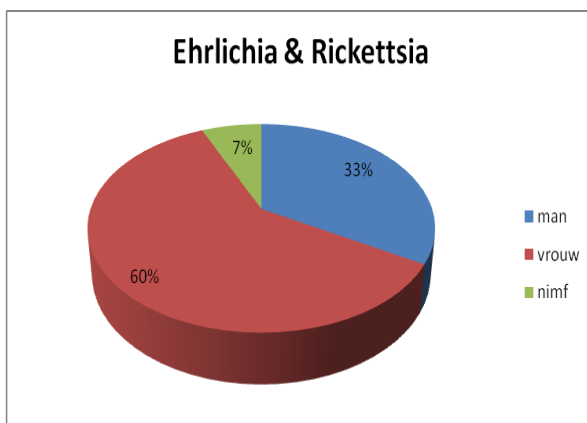


Diagram 4

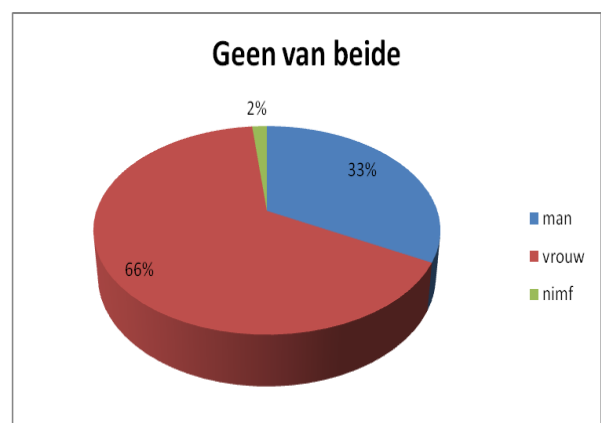


Diagram 5

5.5. Het resultaat van dierenarts Nikos Sinamis

Van de zes teken (2♂, 4♀) van de Pitbull (♂) is er geen een positief resultaat gevonden. Van de andere tien teken (weergegeven in diagram 6,7,8) die van meerdere honden zijn

verzameld zijn er alleen *Rickettsia* spp. positieve teken gevonden. Hierbij waren de vijf positieve teken *R. massiliae* positief.

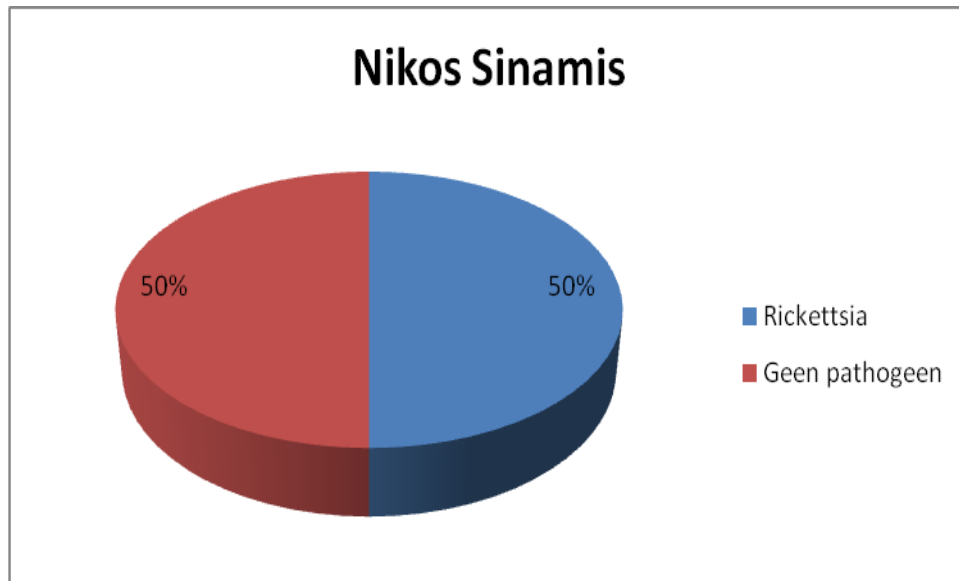


Diagram 6

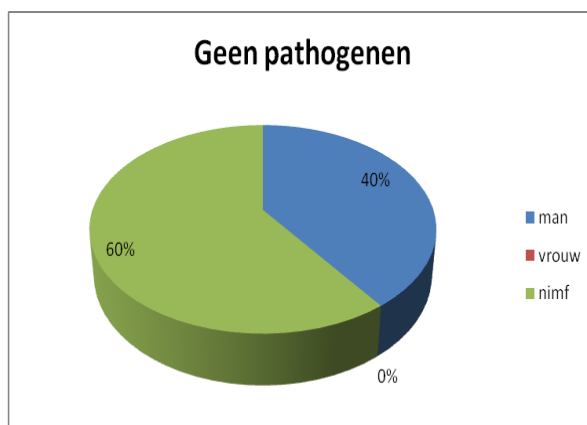


Diagram 7

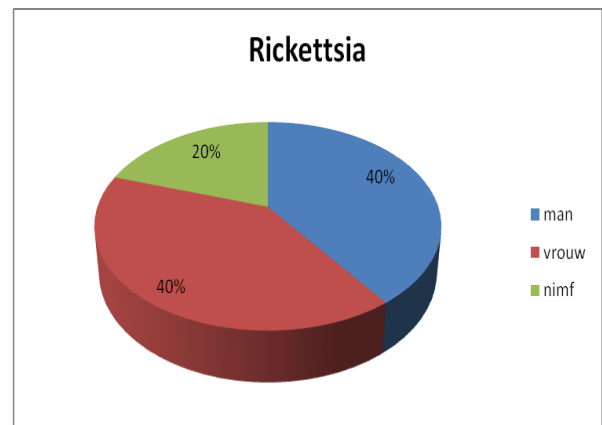


Diagram 8

5.6. Het resultaat van dierenarts Christine

De twee vrouwelijke teken die hier waren verzameld waren beide positief voor *Rickettsia* spp..

5.7. Het resultaat van de larven kolonie

In RLB: membraan ML4 (26-09-11) (zie figuur 2) is het resultaat van batch 3 te zien. Deze batch geeft een duidelijk signaal voor *Ehrlichia canis*, maar geen signaal voor *Rickettsia* spp.. Doordat er wel een signaal is voor *E. canis*, kan er worden geconcludeerd dat de techniek voor DNA extractie heeft gewerkt en dat deze batch *Rickettsia* spp. negatief is.

RLB: membraan ML4 (26-09-11)		RLB: membraan ML7 (07-10-11)						RLB: membraan ML6 (10-11-11)							
	larve 8	larve 1	larve 2	larve 4	larve 5	larve 6	larve 7	larve 1	larve 3	larve 4	larve 5	larve 6	larve 7	larve 8	
Ehrlichia/Anaplasma catch-all															
Anaplasma centrale															
Anaplasma marginale															
Anaplasma phagocytophilum															
Anaplasma phagocytophilum															
Anaplasma phagocytophilum															
Anaplasma phagocytophilum															
Anaplasma bovis															
Ehrlichia canis															
Ehrlichia chaffeensis															
Ehrlichia ruminantium															
Ehrlichia sp om atjenne															
Neoehrlichia mikurensis															
Theileria/Babesia catch-all															
Babesia catch-all 1															
Babesia catch-all 2															
Babesia felis															
Babesia divergens															
Babesia microti															
Babesia bigemina															
Babesia bovis															
Babesia rossi															
Babesia canis 1															
Babesia canis 2															
Babesia vogeli															
Babesia major															
Babesia bicornis															
Babesia caballi															
Babesia catch-all 1															
Babesia caballi catch-all 2															
Babesia venatorum (sp EU1)															
Borrelia burgdorferi sensu lato															
Borrelia burgdorferi sensu stricto															
Borrelia garinii															
Borrelia afzelii															
Borrelia valaisiana															
Theileria equi															
Theileria equi-like															
Rickettsia catch-all															
Rickettsia conorii															
Rickettsia Helvetica															
Rickettsia massiliae															
Rickettsia raoulti															

Figuur 2. Resultaten *R. sanguineus* larven kolonie.

Nu duidelijk is dat techniek voor DNA extractie werkt zijn batch 1,2,4,5,6,7 en 8 ook op dezelfde manier behandeld. Vervolgens zijn batch 1,2,4,5,6 en 7 onderzocht, batch 8 is hier niet bij meegenomen, omdat deze op een latere datum is verzameld en dus nog geen larven bevat. Het resultaat van batch 1,2,4,5,6 en 7 is te zien in RLB: membraan ML7 (07-10-11) (zie figuur 2). Batch 1, 4 en 7 zijn *Rickettsia* spp. positief en batch 5 en 6 *Rickettsia* spp. negatief. Batch 2 geeft resultaat waarbij niet zeker is te zeggen of deze *Rickettsia* spp. positief of *Rickettsia* spp. negatief is.

Nu er onderscheid is gemaakt tussen *Rickettsia* spp. positief en *Rickettsia* spp. negatief kunnen er twee poules worden gemaakt. Poule *Rickettsia* spp. positief: batch 1 + 4 + 7 en poule *Rickettsia* spp. negatief: batch 3 + 5 + 6. Deze twee poules zijn apart geplaatst op konijnenoren, om de larven te voeden. Batch 2 is hierbij dus niet meegenomen. Poule *Rickettsia* spp. positief is geplaatst op konijn 17 en poule *Rickettsia* spp. negatief is geplaatst op konijn 11. Het is van belang dat de *Rickettsia* spp. negatieve kolonie altijd voeding krijgt van een *Rickettsia* spp. negatief konijn.

Na plaatsing op de konijnenoren (op 07-11-11) zijn van elke batch larven overgehouden om nogmaals te onderzoeken of de resultaten kloppen. Hierbij is batch 2 niet meegenomen en batch 8 dit keer wel. Het resultaat is te zien in RLB: membraan ML6 (10-11-11) (zie figuur 2). Batch 1, 6 en 8 zijn *Rickettsia* spp. positief en batch 3, 4, 5 en 7 *Rickettsia* spp. negatief.

In onderstaand schema 1 is een duidelijk overzicht van de resultaten die hierboven zijn beschreven. Er is te zien dat het tweede resultaat niet helemaal overeen komt met het eerste resultaat. In de *Rickettsia* spp. positieve poule blijft de poule positief besmet, maar in de *Rickettsia* spp. negatieve is batch 6 nu positief en kan daardoor poule *Rickettsia* spp. negatief positief maken.

	Poule R. +			Poule R. -				
Batch	1	4	7	3	5	6	2	8
<i>Rickettsia</i> spp. 1ste resultaat	+	+	+	-	-	-	X	X
<i>Rickettsia</i> spp. 2de resultaat	+	-	-	-	-	+	X	+

Schema 1

6. Discussie

6.1. *Babesia* catch-all 1 en *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* teken

De resultaten van de *Babesia* catch-all 1 en *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* teken zijn zeer discutabel. De resultaten zijn zo wisselt dat hiernaar verder onderzoek moet worden gedaan. Er moet worden onderzocht of de resultaten herhaalbaar zijn.

Mogelijk kan het zijn dat de *Babesia* catch-all 1 teken wel positief zijn voor een pathogeen, maar dat de pathogeen erg lijkt op een *Babesia* sequence dit zou kunnen verklaren waarom het signaal van teek **40** en **145** *Babesia* catch-all 1 naar *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* is veranderd of dat bij herhaling er geen signaal wordt gegeven.

Dit kan ook voor de *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* teken gelden, waardoor er soms wel een signaal wordt gegeven en soms niet. Het is belangrijk dat de *Theileria/Babesia* catch-all, *equi-like* teken opnieuw worden onderzocht om er zeker van te zijn of ze de pathogeen wel of niet meedragen. Hoewel het zelden voorkomt dat *R. sanguineus* teken een andere gastheer dan een hond zal bijten, is het bekend dat *R. sanguineus* teken *Theileria equi* kunnen overdragen (Dantas-Torres, 2008). En op de farm Nikitas worden er naast honden ook paarden gehouden, wat de kans mogelijk maakt.

Ook kan het zijn dat er tijdens het proces iets fout is gegaan. Bij RLB: membraan ML6 (02-11-11) is opgevallen dat de normaal doorgetrokken lijn achter *Neohrlichia mikurensis* hier onderbroken is. Het kan zijn dat hier de peroxidase geconjugeerde streptavidine niet goed heeft gebonden aan het biotine label, waardoor signalen niet zichtbaar kunnen worden gemaakt door ECL. En bij RLB: membraan ML6 (04-11-11) heeft het controle-sample *B. vogeli* het niet naar behoren gedaan. Dit kan gebeuren doordat tijdens het wassen van het membraan te hoge temperaturen zijn gebruikt. Het wassen zorgt ervoor dat niet gebonden PCR-producten worden verwijderd van het membraan, met te hoge temperaturen kunnen ook de gebonden PCR-producten van het membraan worden gewassen. Ook moet er gedacht worden aan het steeds opnieuw invriezen van de DNA-samples. Steeds nadat het DNA-sample is gebruikt is het weer terug in de vriezer geplaatst, door het herhaaldelijk invriezen en ontdooien kan DNA af worden gebroken of schade geven. Dit kan ervoor zorgen dat signalen niet kunnen worden herhaald.

De teken zullen opnieuw moeten worden onderzocht om een juiste conclusie te kunnen trekken of deze teken pathogenen bevatten of niet. Hierbij kan rekening worden gehouden met de bovenstaande mogelijke verklaringen.

6.2. Teken van Nikitas

Het resultaat overzicht laat zien dat meer dan de helft (55%) van de *R. sanguineus* teken besmet is met *Rickettsia* spp., *E. canis* of met beide pathogenen. Dit percentage is vrij hoog. Dit kan komen doordat de teken zijn verzameld van groep honden van één en dezelfde farm. Zijn er honden besmet en er wordt van een besmette hond veel teken afgehaald dan is de prevalentie percentage natuurlijk al snel vrij hoog. Zeker met de hoeveelheid teken die zijn onderzocht, omdat deze in dit onderzoek vrij laag is. Omdat het in dit onderzoek gaat om wat voor pathogenen er in de Griekse *R. sanguineus* voorkomt, is prevalentie percentage en het aantal teken hier van minder groot belang, omdat de resultaten er duidelijk zijn. In het vervolg onderzoek kan het prevalentie percentage wel nauwkeuriger worden bepaald door per hond en meer locaties te onderzoeken. Het aantal teken is ook van belang om de prevalentie percentage te bepalen en mogelijk meer pathogenen te ontdekken.

Het is ook duidelijk dat in alle drie de stadia (♂,♀ en nimf) positieve signalen voor *E. canis* en *Rickettsia* spp. is gevonden. Alleen bij de nimfen is er geen nimf gevonden, waarbij het besmet is met alleen *E. canis*. Mogelijk kan dit wel gevonden worden als er grotere aantallen worden onderzocht.

Teken die alleen een signaal gaven voor *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all, waren als negatief gerekend voor *E. canis* en *Rickettsia* spp. Het signaal kan wijzen naar de aanwezigheid van een nog niet nader gespecificeerde *Ehrlichia* spp. Of *Anaplasma* spp.. Dit zou dus verder onderzocht kunnen worden en de resultaten kunnen beïnvloeden.

6.3. Teken van dierenarts Nikos Sinamis

Duidelijk voor de Pitbull hond is dat hij niet is geïnfecteerd, omdat in alle zes de teken geen pathogenen zijn gevonden. Interessant is wel dat de andere tien teken ook *Rickettsia* spp. positieve teken zijn gevonden in alle drie de stadia (♂,♀ en nimf). De vijf negatieve teken gaven allemaal wel een signaal voor *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all. Dus in deze paar teken van een andere locatie dan Nikitas zijn toch overeenkomstige resultaten gevonden. Alleen is hier geen *E. canis* signaal gevonden.

6.4. Teken van dierenarts Christine

De twee teken die zijn verzameld bij dierenarts Christine waren beiden positief voor *Rickettsia* spp.. Het is interessant dat ook weer op een andere locatie positieve *Rickettsia* spp. teken zijn gevonden.

6.5. Larven kolonie

Gekeken is naar de mogelijkheid om pathogeen-vrije *R. sanguineus* teken in het laboratorium op te kweken. Vanwege de resultaten is er besloten om de eerste laboratorium generatie larven in te delen op de aan- of afwezigheid van *Rickettsia* spp..

Het is niet duidelijk waarom het eerste resultaat zo verschild met het tweede resultaat. Het enige wat gedaan kan worden is dat poule *Rickettsia* spp. negatief opnieuw wordt onderzocht, als de larven van het konijn zijn afgehaald. Dit is zinvol, omdat bij de plaatsing van de larven op konijnenoren is opgevallen dat in batch 6 veel larven dood waren.

Op maandag middag 07-11-11 zijn de larven op de konijnenoren geplaatst. De eerste volgezogen larven zijn op donderdag 10-11-11 eraf gehaald, de rest van de larven zijn er de volgende dag (11-11-11) ervan af gehaald. De larven hebben dus drie tot vier dagen voeding gehad.

Het onderzoek moet vanaf hier worden vervolgd.

7. Conclusie

R. sanguineus speelt een belangrijke bij de overdracht van *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. (*R. conorii* en *R. rickettsii*) en *Babesia* spp. (*B. canis*, *B. gibsoni* en *B. vogeli*). En veroorzaken bij hond en mens ernstige ziekten. Het doel van dit onderzoek was om ook in Griekenland te onderzoeken met welke pathogenen deze *R. sanguineus* zijn geïnfecteerd. En uit de resultaten is duidelijk gebleken dat meerdere *R. sanguineus* (♂,♀ en nimf) teken positief zijn voor *E. canis* (4%), *Rickettsia* spp. (40%) en beide (11%), hierbij is *Rickettsia* spp. ook bij verschillende locaties aangetoond. Het is duidelijk dat er bij meerdere teken nog onduidelijkheid bestaat en veel discussie punten naar voren komen. Deze teken zullen verder moeten worden onderzocht. In dit onderzoek zijn te weinig teken onderzocht en te veel resultaten niet meegenomen in het totaaloverzicht, dat er nu nog geen duidelijke prevalentie van de pathogenen in *R. sanguineus* teek uit Griekenland kan worden bepaald. Om meer over de prevalentie te kunnen zeggen, moet er een groter aantal teken van verschillende locaties en per hond worden onderzocht. Om de rol van de verschillende teken stadia voor wat betreft de transmissie van *E.canis* en *Rickettsia* spp. nader in kaart te kunnen brengen is het noodzakelijk om de dynamiek van de teken populatie in 2012 nader te vervolgen en om de relatie te leggen met de infecties in de teken maar ook in de honden die als gastheer optreden voor *R.sanguineus* in dit gebied in Griekenland.

8. Dankwoord

Ik wil graag Prof. Dr. F. Jongejan bedanken dat ik mijn onderzoeksstage bij het UCTD heb mogen volgen en voor de begeleiding. Michiel Wijnveld wil ik bedanken voor de begeleiding op het lab. En natuurlijk wil ik Milou en Nathanie bedanken voor de gezelligheid.

9. *Rhipicephalus sanguineus* nimfen uit Zuid-Afrika

Onderzocht zijn *R. sanguineus* nimfen uit Zuid-Afrika. Er werd verwacht dat deze nimfen *Babesia vogeli* zouden bevatten.

Voor dit onderzoek zijn vijf samples genomen uit dezelfde batch (CC3AFF), elk sample bevat twintig nimfen. Hiervan is eenmaal DNA extractie van gedaan, bij herhaling van de RLB is wel steeds opnieuw PCR gedaan. Na elk gebruik voor de PCR zijn de DNA samples weer in de vriezer geplaatst. In de onderstaande RLBs zijn deze samples in elke RLB benoemd met nummer 1-5.

In het eerste resultaat van RLB: membraan ML6 (31-10-11) is te zien dat alle vijf de samples duidelijk *Theileria/Babesia catch all - equi like* signaal geven. Ook is er te zien dat alle vijf de samples geen signaal geven voor *B. vogeli*, dit komt niet overeen met de verwachting. Om te bevestigen of het resultaat klopt is opnieuw een RLB gedaan van deze samples. Hierbij zijn ook twee controle samples (*B. vogeli* en *B. canis*) toegevoegd om te kijken of de RLB goed is verlopen.

In het nieuwe resultaat van RLB: membraan ML 6 (02-11-11) is te zien dat alleen sample 2 een licht signaal geeft voor *Theileria/Babesia catch all - equi like* en de rest van de samples dit keer helemaal geen signaal geeft, terwijl de controle samples beide een duidelijk signaal geven. Weer wordt gezien dat alle vijf de samples geen signaal geven voor *B. vogeli*. Wat opviel in deze RLB was dat de normaal doorgetrokken lijn achter *Neohrlichia mikurensis* hier onderbroken is. Een verklaring hiervoor kan zijn dat hier de peroxidase geconjugeerde streptavidine niet goed heeft gebonden aan het biotine label, waardoor signalen niet zichtbaar kunnen worden gemaakt door ECL.

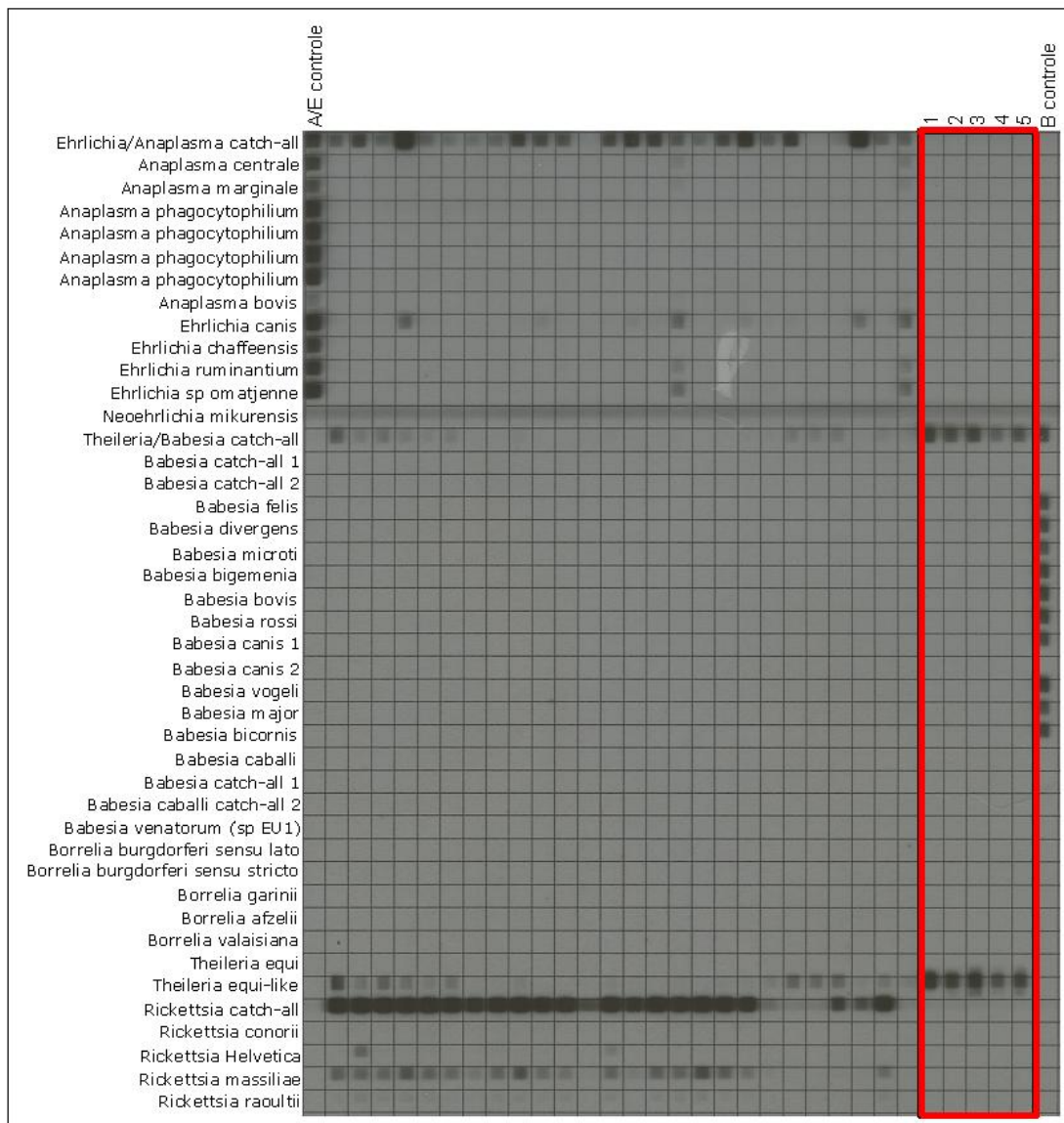
In het derde resultaat RLB: membraan ML6 (04-11-11) zijn weer gelijke resultaten gevonden als bij de eerste RLB (RLB: membraan ML6 (31-10-11)), maar hier geeft de controle sample van *B. vogeli* geen duidelijk signaal. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat tijdens het wassen van het membraan te hoge temperaturen zijn gebruikt. Het wassen zorgt ervoor dat niet gebonden PCR-producten worden verwijderd van het membraan, met te hoge temperaturen kunnen ook de gebonden PCR-producten van het membraan worden gewassen. Toch wordt ook bij dit membraan voor alle vijf de samples geen signaal voor *B. vogeli* gevonden.

Nog eenmaal is er een RLB uitgevoerd nu door een ander persoon en met een ander membraan. Uit dit laatste membraan, RLB: membraan ML5 (08-11-11), is af te lezen dat de controles duidelijk een signaal geven, maar dat alleen sample 1 een licht signaal voor *Theileria/Babesia catch all - equi like* geeft. Ook hier weer geven alle vijf de samples geen

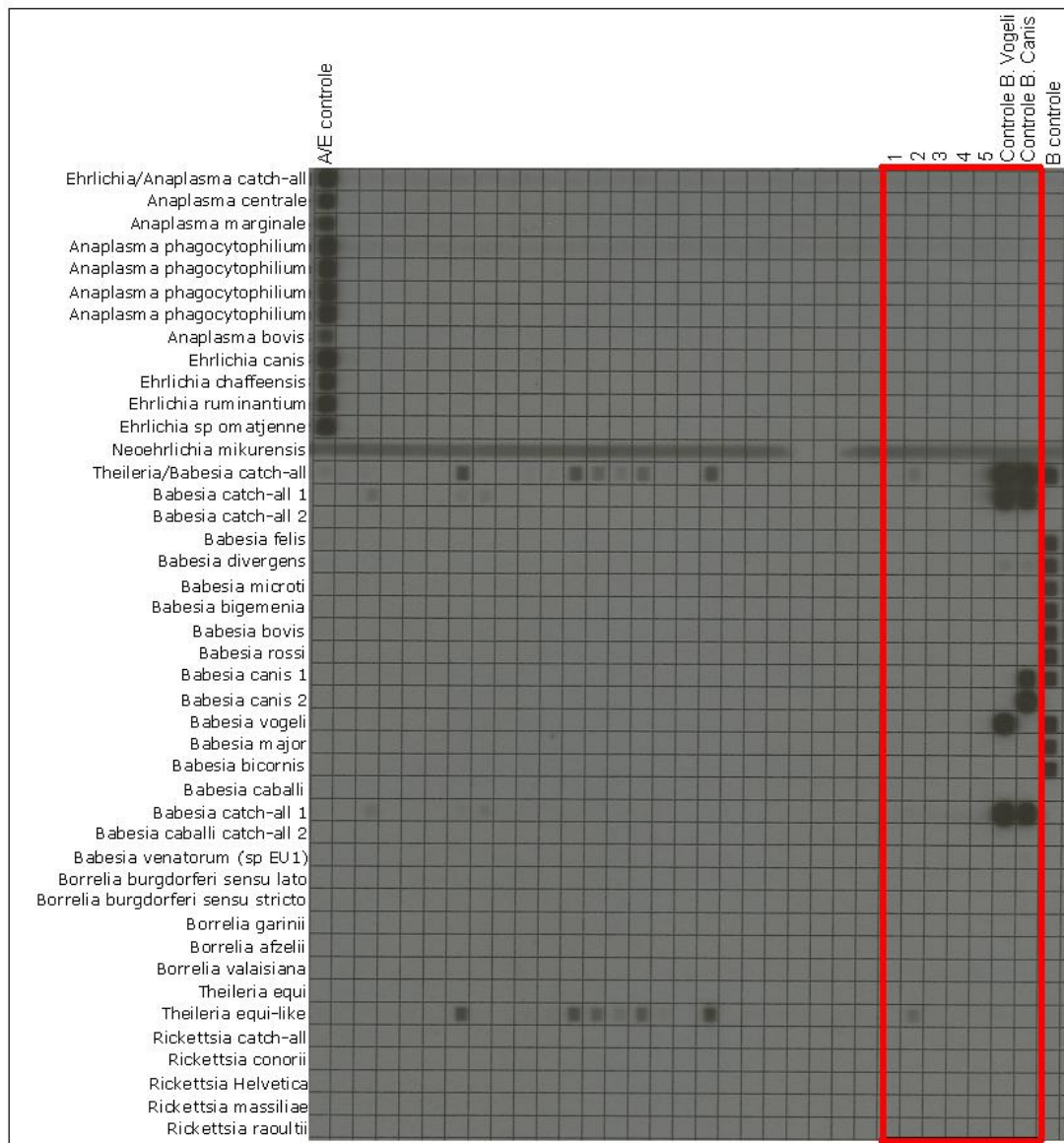
signaal voor *B. vogeli*. Ter controle of de PCR goed is verlopen zijn de positieve en negatieve controles door middel van een gel elektroforese beoordeeld, hierbij gaf de *Rickettsia* negatieve controle een positief signaal en wordt daarmee als gecontamineerd beschouwd. Dit verklaart de positieve *Rickettsia* spp. signalen bij sample 1-5 en de twee controle samples, wat bij de voorgaande RLB membranen niet gevonden is.

Er werd verwacht dat deze *R. sanguineus* nimfen *B. vogeli* zouden bevatten. Ondanks dat alle vier de RLBs verschillende resultaten laten zien, geven de RLBs geen van allen een positief signaal voor *B. vogeli* voor de samples 1-5. Hieruit kan worden geconcludeerd dat deze *R. sanguineus* nimfen in ieder geval geen *B. vogeli* bevatten.

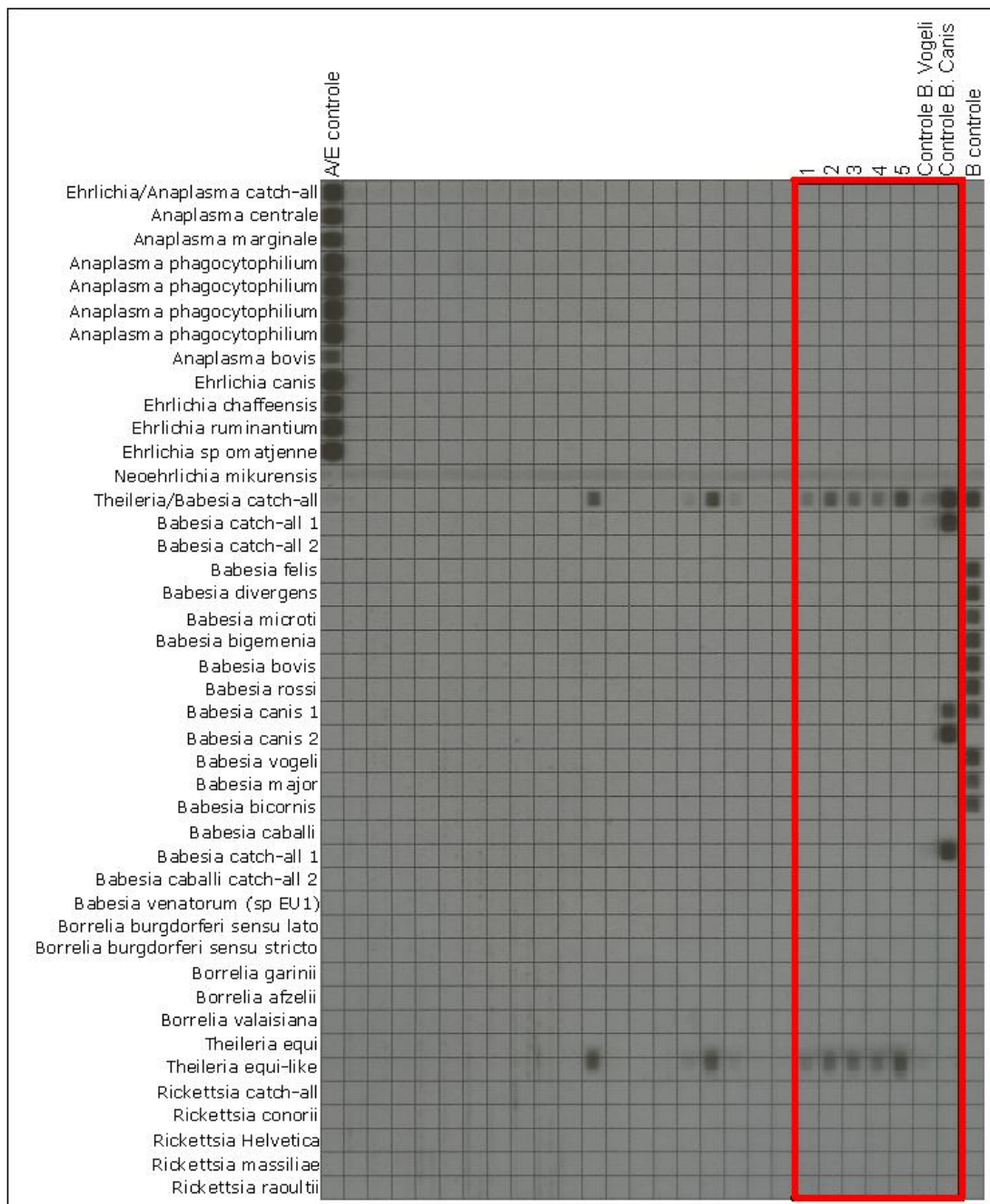
RLB: membraan ML6 (31-10-11)



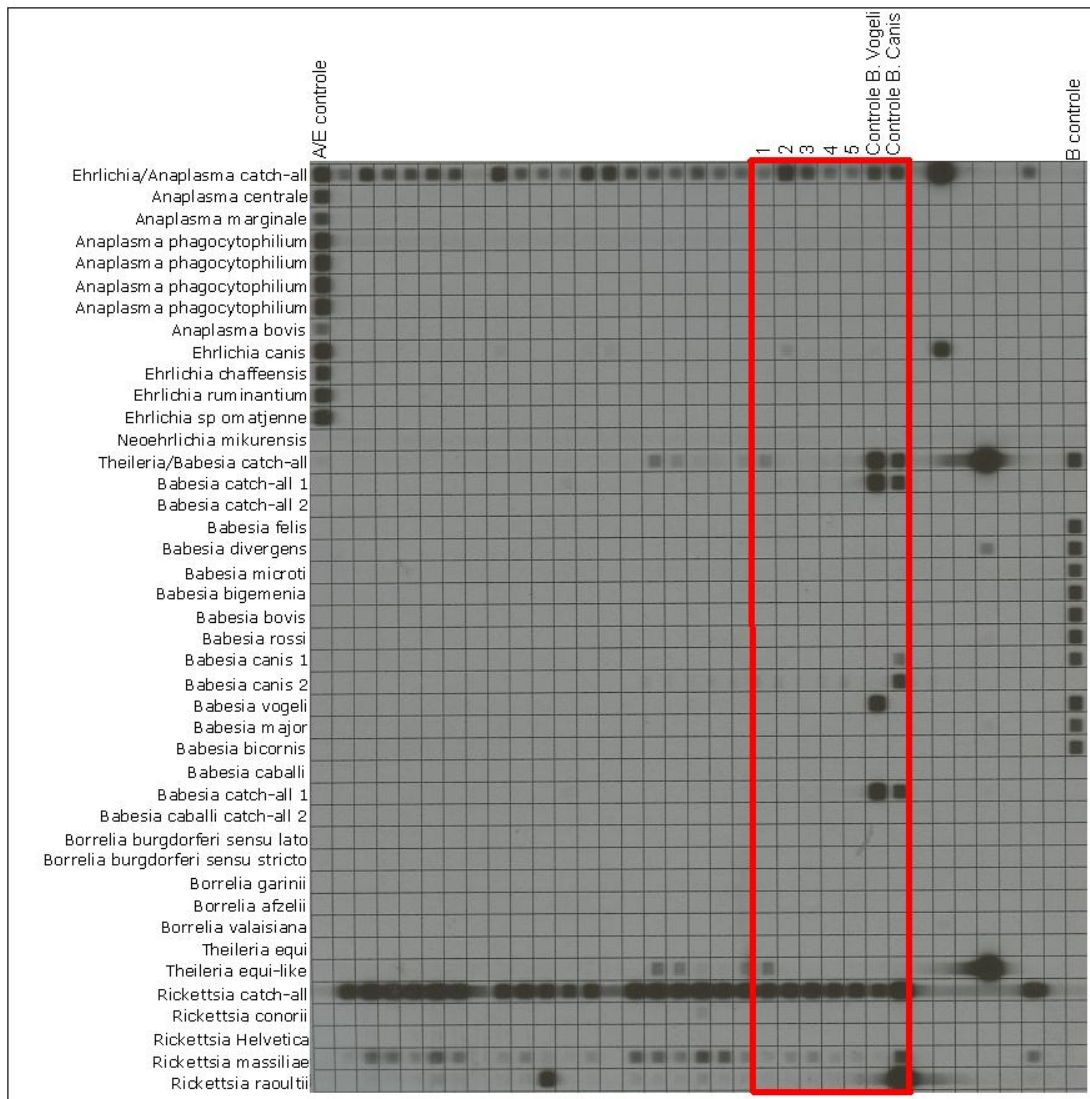
RLB: membraan ML 6 (02-11-11)



RLB: membraan ML6 (04-11-11)



RLB: membraan ML5 (08-11-11)



10. Referenties

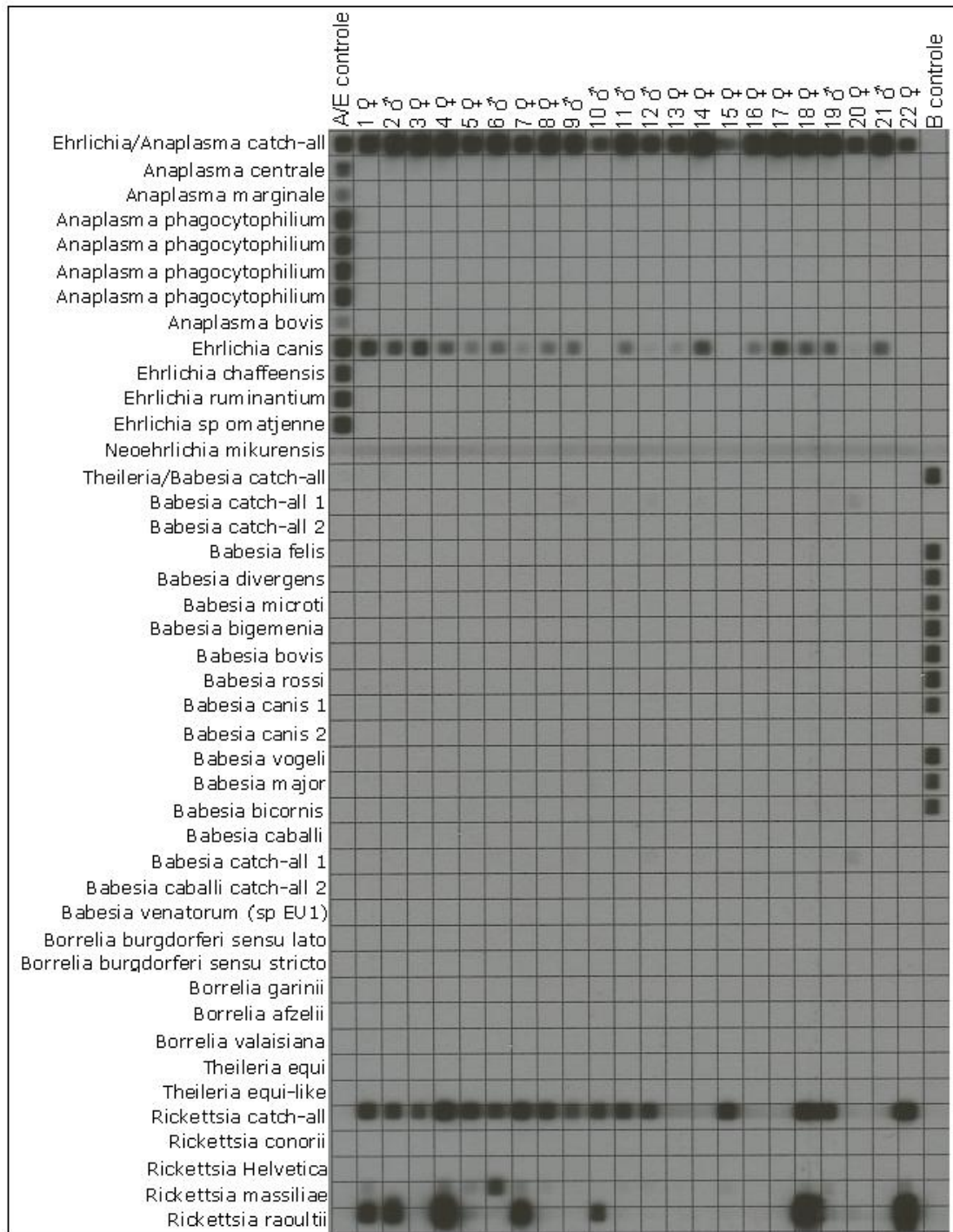
- Babalis T., Tselentis Y., Roux V., Psaroulaki A. and Raoult D. – Isolation and identification of Rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks – Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994; 50(3):365-372
- Bermúdez C.S.B., Zaldívar A.Y., Spolidorio M.G., Moraes-Filho J., Miranda R.J., Caballero C.M., Mendoza Y. and Labruna M.B. - Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá - Veterinary Parasitology April 2011; 177(1-2): 134-138
- Bodaan C., Nijhof A.M., Postigo M., Nieuwenhuijs H., Opsteegh M., Franssen L, Jebbink F., Jansen S. and Jongejan F. - Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren in Nederland – Tijdschrift voor Diergeneeskunde Juli 2007; 132(13):517-523
- Botelho-Nevers E., Roveery C., Richet H. and Raoult D. - Analysis of risk factors for malignant mediterranean spotted fever indicates that fluoroquinolone treatment has a deleterious effect. – Journal of Antimicrobial Chemotherapy Augustus 2011; 66(8):1821-1830
- Bremer W.G., Scheafer J.J., Wagner E.R., Ewing S.A., Rikihisa Y., Needham G.R., Jittapalapong S., Moore D.L. and Stich R.W. – Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus* – Veterinary Parasitology 131 (2005) 95-105
- Dantas-Torres F. – The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. – Veterinary Parasitology 152 (2008) 173-185
- Dantas-Torres F. and Figueredo L.A. - Canine babesiosis: A Brazilian perspective – Veterinary Parasitology November 2006; 141(3-4):197-203
- Harrus S., Lior Y., Ephros M., Grisarso-Soen G., Keysary A., Strenger C., Jongejan F. , Waner T. and Baneth G. - *Rickettsia conorii* in humans and dogs: A seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel - American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Juli 2007; 77(1): 133-135
- Harrus S. and Wener T. - Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. - The Veterinary Journal Maart 2011; 187(3):292-296.
- Jongejan F. – Diergeneeskundig Memorandum 48e jaargang no. 1 – 2001 ISSN: 0417-4631
- Little S.E. - Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats – Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice November 2010; 40(6):1121-1140

- Little S.E., Hostetler J. and Kocan K.M. – Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co housed dogs during active feeding – Vet. Parasitol. 150 (2007), pp. 139-145.
- Ndip L.M., Ndip R.N., Esemu S.N., Walker D.H. and McBride J.W. - Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon - Experimental and Applied Acarology 2010 50(2):163–168
- Nicholson W.L., Allen K.E., McQuiston J.H., Breitschwerdt E.B. and Little S.E. - The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people – April 2010; 26(4):205-212
- Papa A., Chaligiannis I., Xanthopoulou K., Papaioakim M., Papanastasiou S. and Sotiraki S. - Ticks Parasitizing Humans in Greece - Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2011; 11(5)
- Psaroulaki A., Spyridaki I., Ioannidis A., Babalis T., Gikas A. and Tselentis Y. - First Isolation and Identification of *Rickettsia conorii* from Ticks Collected in the Region of Fokida in Central Greece – Journal of Clinical Microbiology Juli 2003; 41(7):3317-3319
- Stich R.W., Schaefer J.J., Bremer W.G., Needham G.R., Jittapalapong S. – Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, Ehrlichia canis. – Vet Parasitol. 2008 Dec 20; 158(4):256-73.
- Taoufik A., Nijhof A., Hamidjaja R. and Jongejan F. - Reverse line blot hybridisation in the detection of tick-borne diseases. – Bti September 2004.

11. Bijlagen

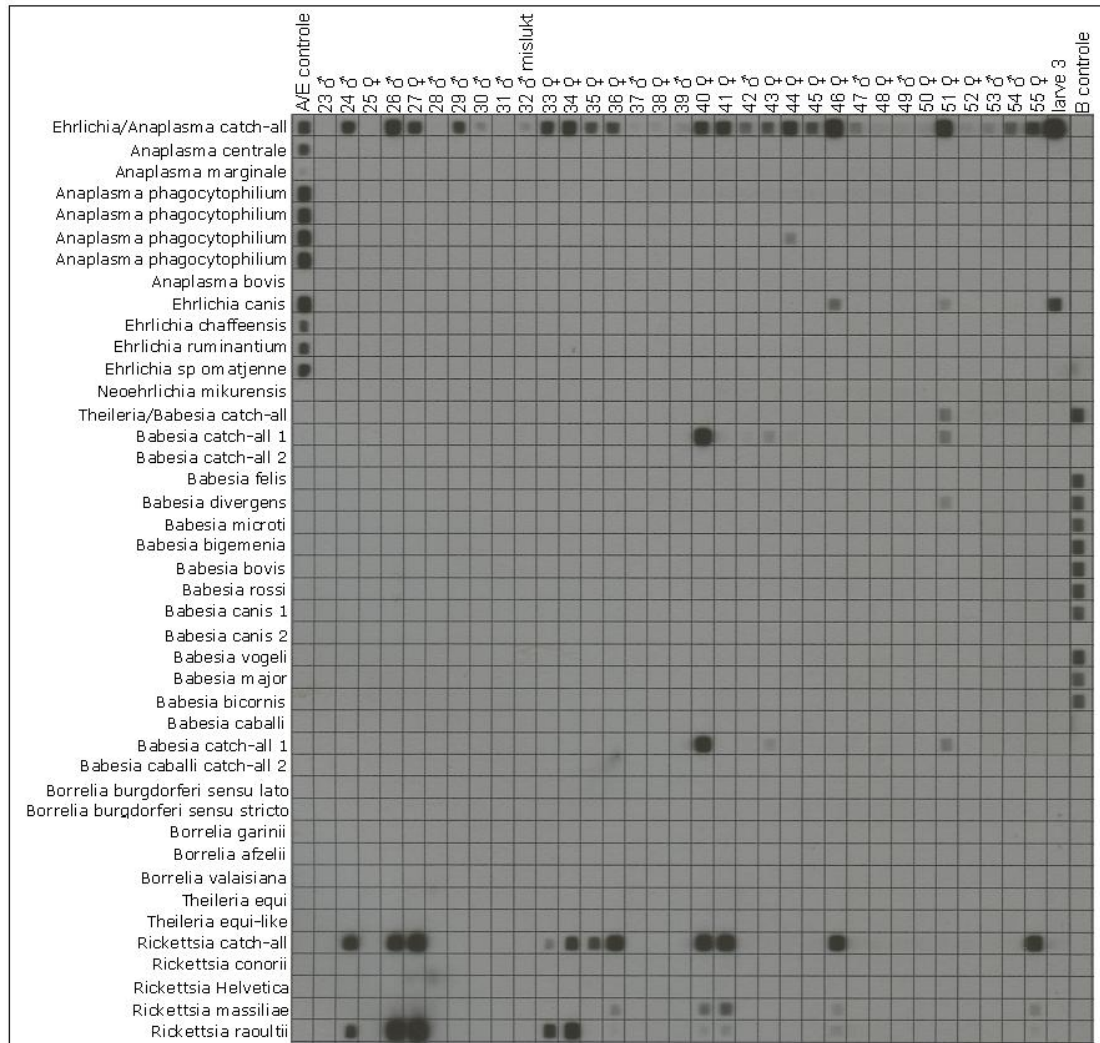
11.1. Bijlagen - RLBs

RLB: membraan ML7 (15-09-11)



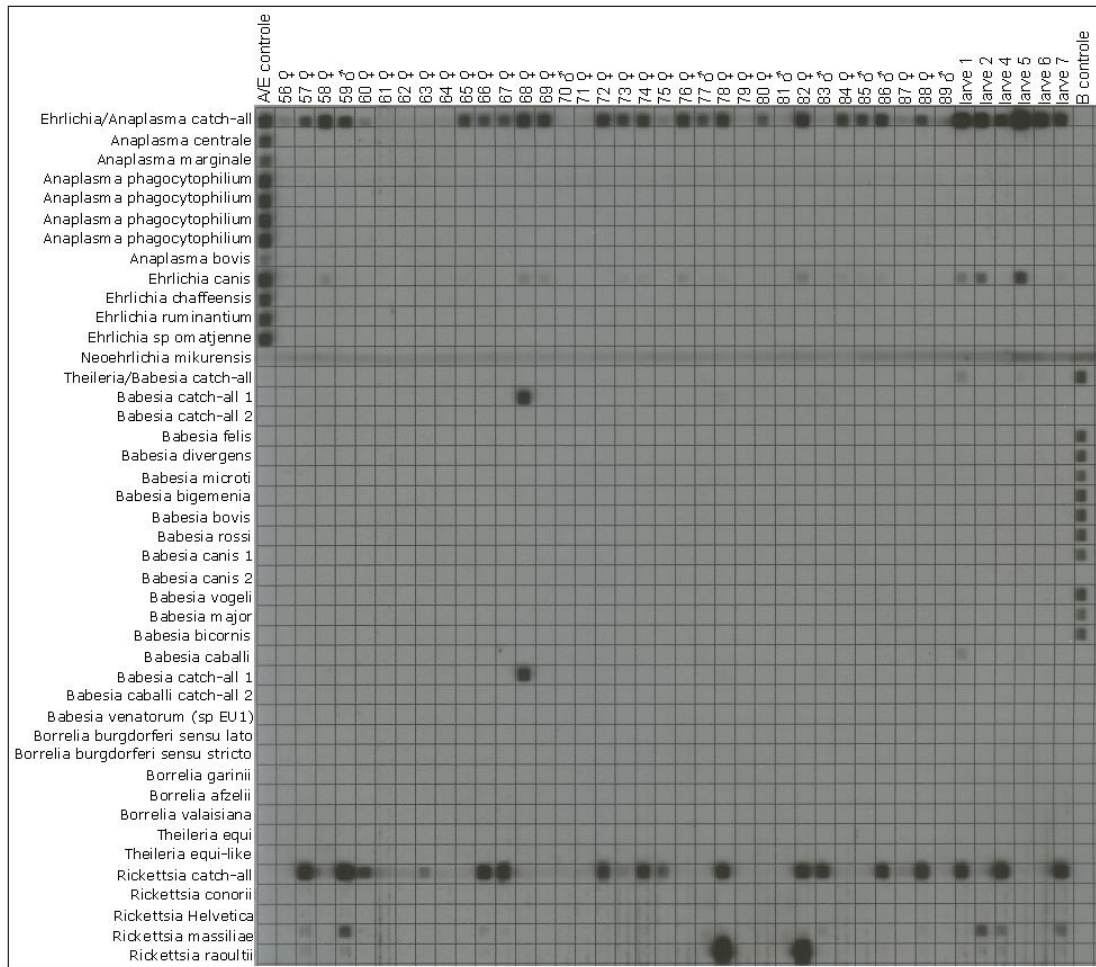
1 t/m 22 → adulten teken verzameld van honden bij Nikitas (Kalamata) (12-08-11).

RLB: membraan ML4 (26-09-11)



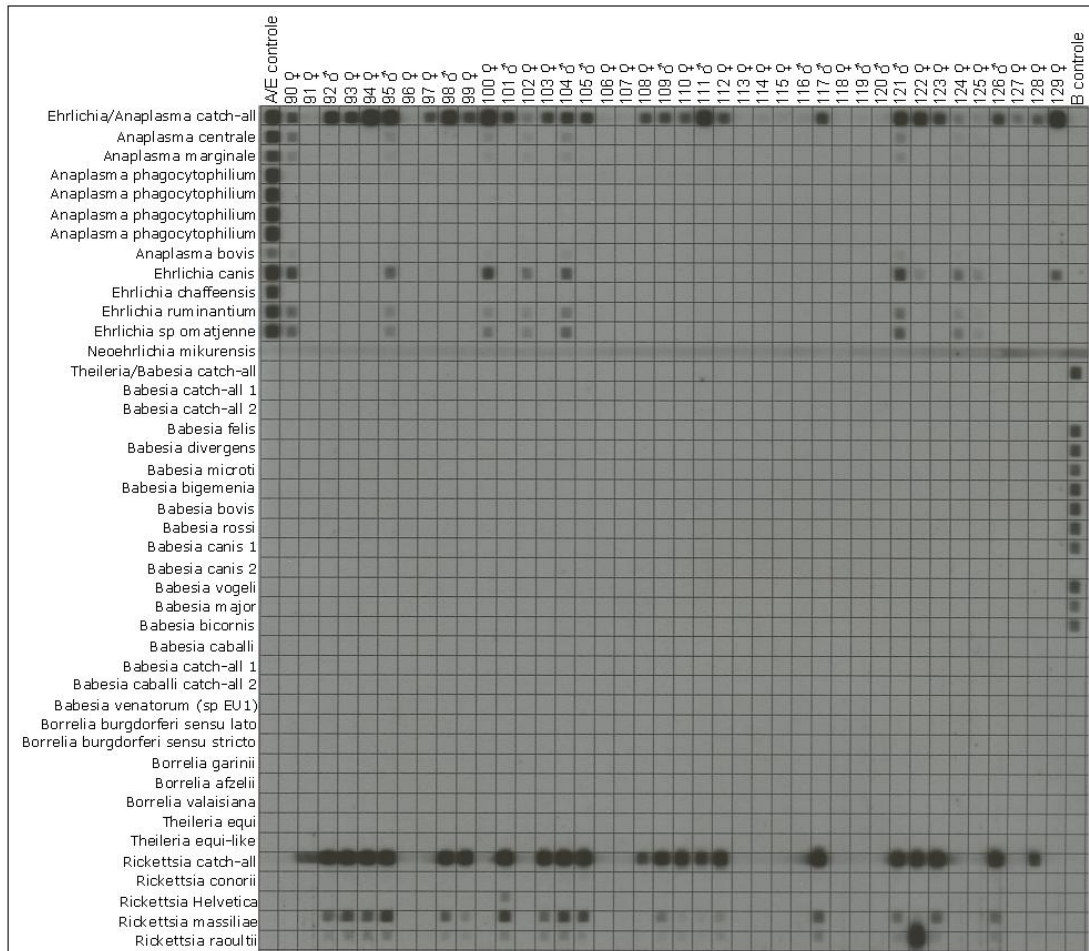
23 t/m 55 → adulten teken verzameld van honden bij Nikitas (Kalamata) (12-08-11). 32 is later opnieuw gedaan.

RLB: membraan ML7 (07-10-11)



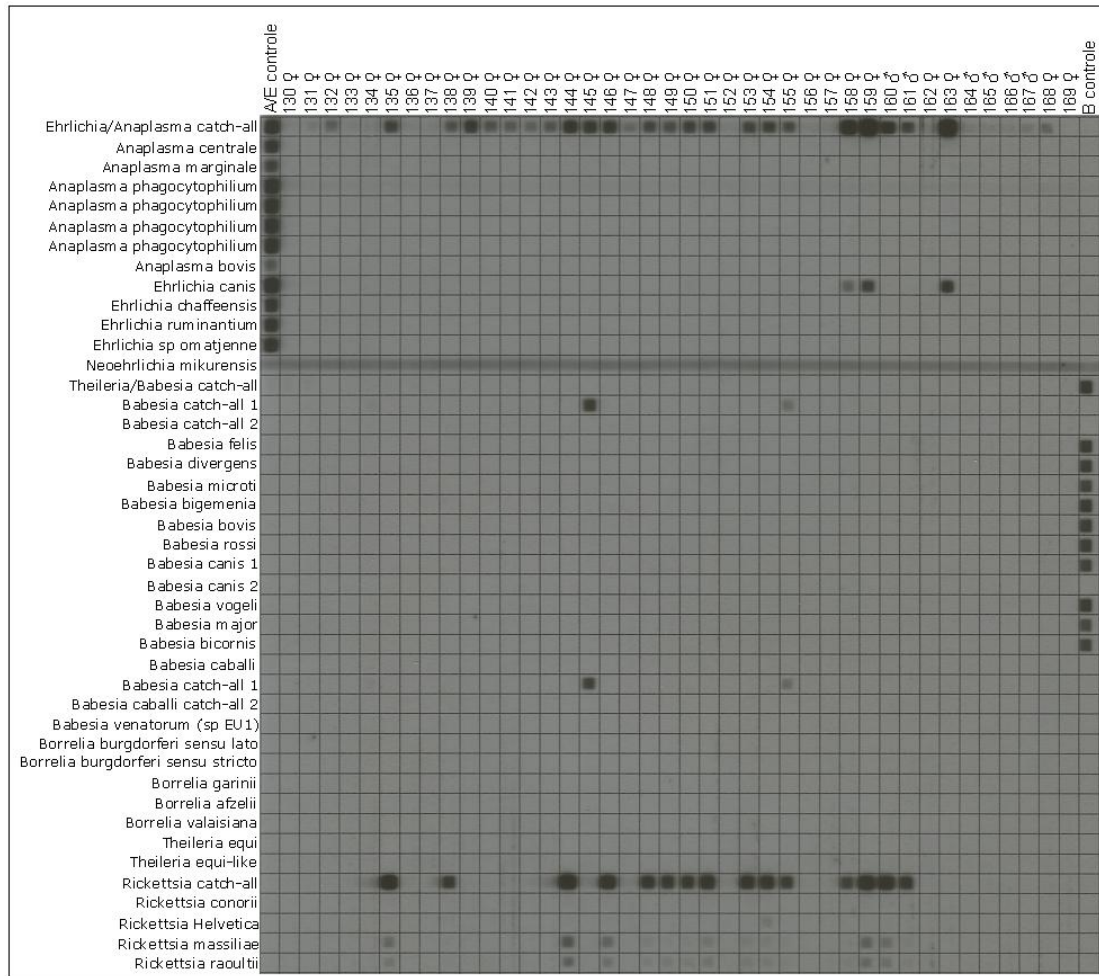
56 t/m 89 → *adulten teken verzameld van honden bij Nikitas (Kalamata) (12-08-11).*

RLB: membraan ML7 (12-10-11)



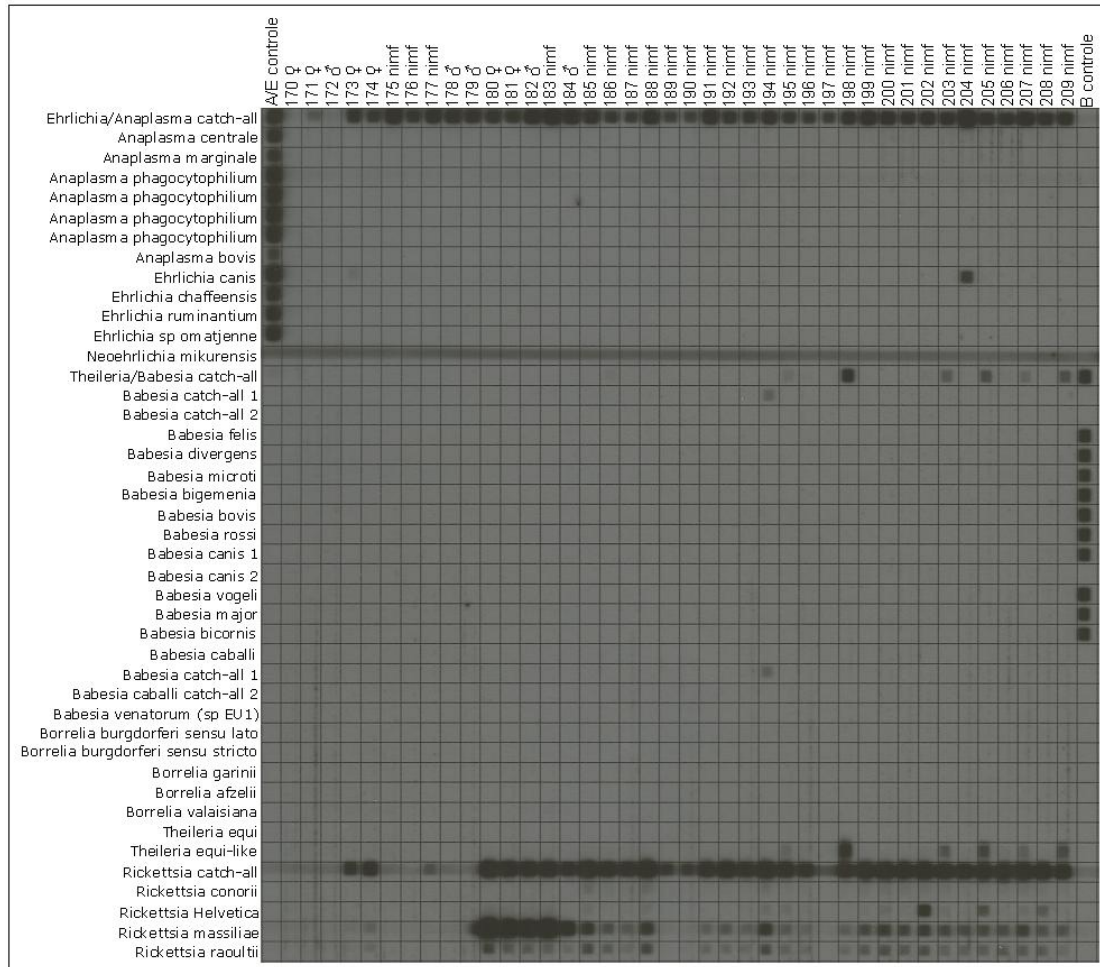
90 t/m 129 → adulten teken verzameld van honden bij Nikitas (Kalamata) (12-08-11).

RLB: membraan ML6 (24-10-11)



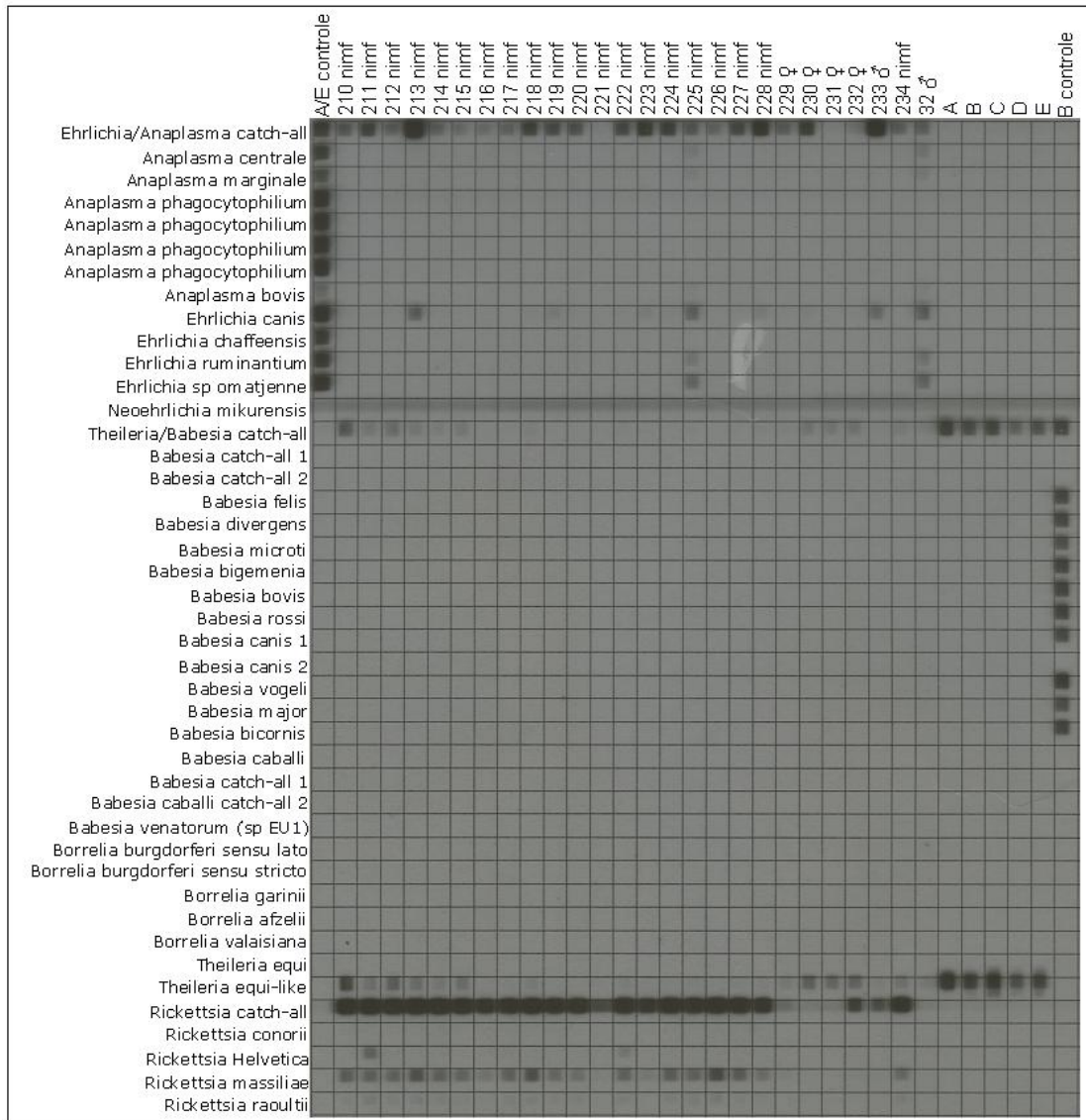
130 t/m 166 → *adulten teken verzameld van honden bij Nikitas (Kalamata) (12-08-11)*. 167 t/m 169 *adulten teken verzameld van een hond (Pitbull ♂) bij dierenarts Nikos Sinamis*.

RLB: membraan ML6 (25-10-11)



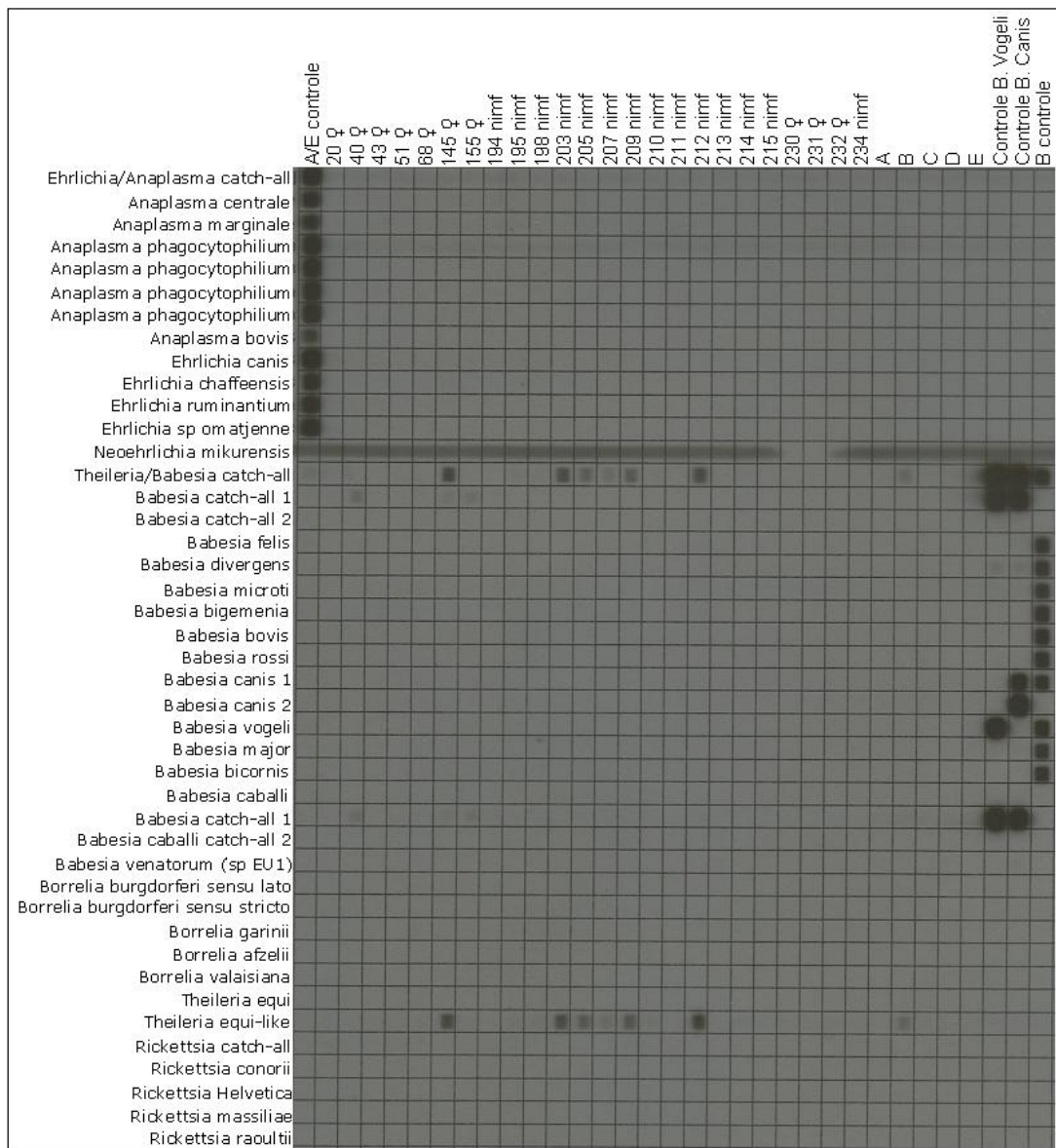
170 t/m 172 adulten teken verzameld van een hond (Pitbull ♂) bij dierenarts Nikos Sinamis. 173 en 174 adulten teken verzameld bij dierenarts Christine (centrum Kalamata). 175 t/m 184 adulten teken en nimfen verzameld bij dierenarts Nikos Sinamis (01-09-11). 185 t/m 201 nimfen verzameld bij Nikitas (Kalamata)(01-09-11). 202 t/m 209 de niet vervelde nimfen uit stoof 1 verzameld bij Nikitas (Kalmata) (21-09-11).

RLB: membraan ML6 (31-10-11)



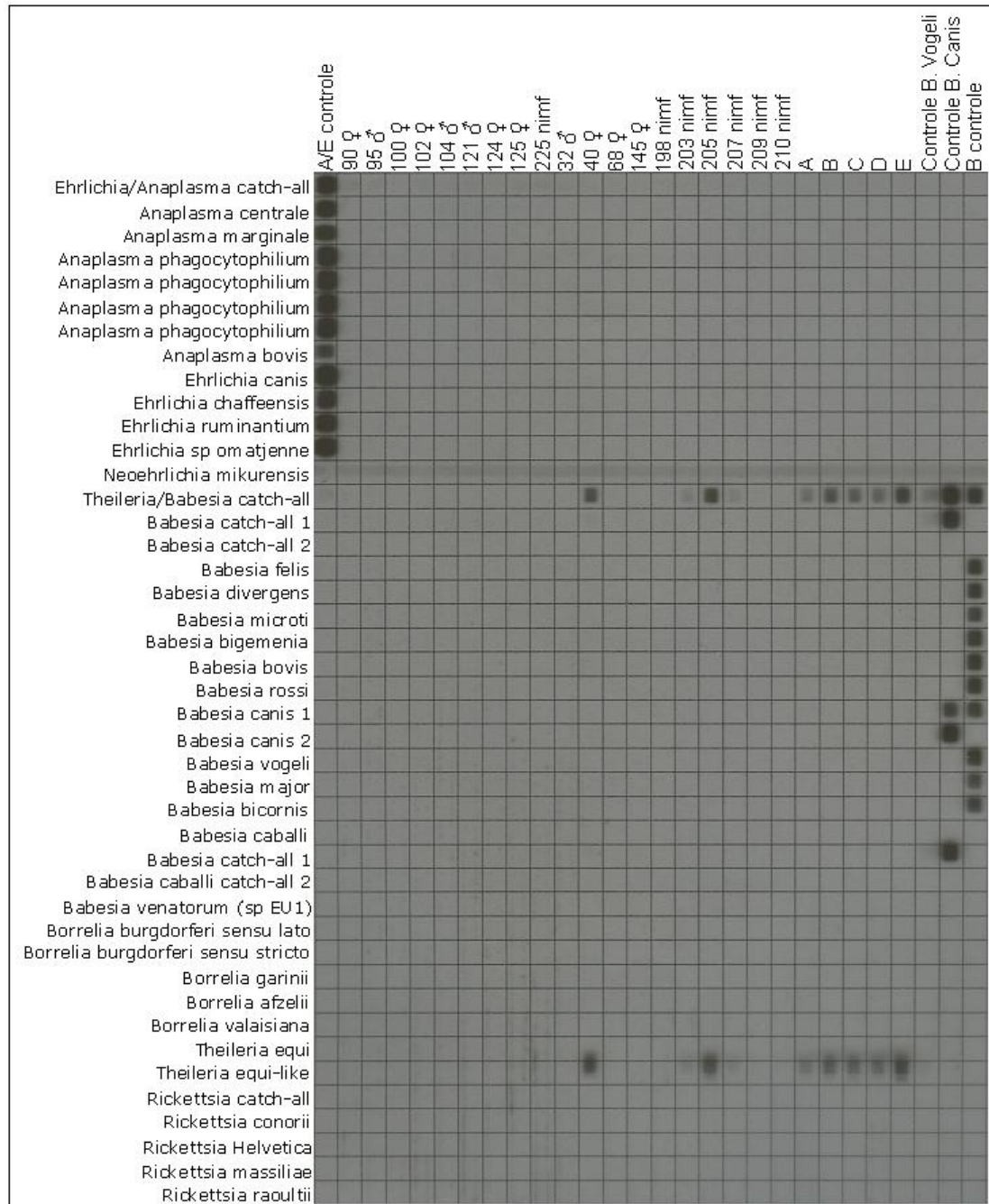
210 t/m 214 de niet vervelde nimfen uit stoof 1 verzameld bij Nikitas (Kalamata) (21-09-11).
 215-228 de niet vervelde nimfen die tussen de al wel vervelde nimfen zaten, uit stoof 1
 verzameld bij Nikitas (Kalamata) (21-09-11). 229-233 adulten teken verzameld bij Nikitas
 (Kalamata) (21-09-11). 234 nimf verzameld bij Nikitas (Kalamata)(21-09-11).

RLB: membraan ML 6 (02-11-11)



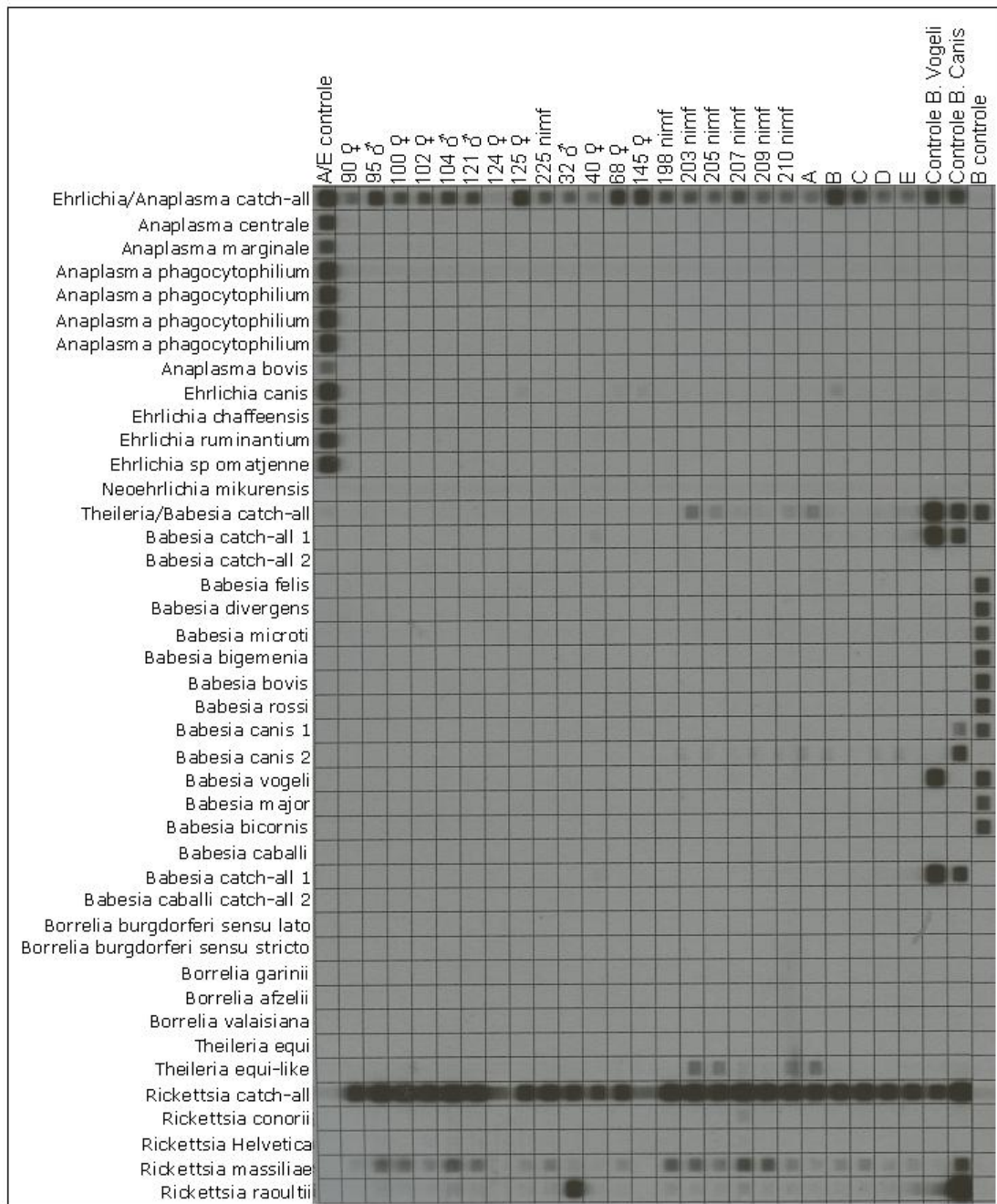
Teken herhaald onderzocht. A t/m E = 1 t/m 5 bij het onderzoek van Rhipicephalus sanguineus nimfen uit Zuid-Afrika

RLB: membraan ML6 (04-11-11)



Teken herhaald onderzocht. A t/m E = 1 t/m 5 bij het onderzoek van Rhipicephalus sanguineus nimfen uit Zuid-Afrika

RLB: membraan ML5 (08-11-11)



Teken herhaald onderzocht. A t/m E = 1 t/m 5 bij het onderzoek van Rhipicephalus sanguineus nimfen uit Zuid-Afrika

11.2. Bijlagen – UCTD protocollen

DNA isolatie uit de teek

In de T1 en B3 buffer kan neerslag gevormd zijn als deze lang niet gebruikt zijn. Verwarm deze buffers in een waterbad tussen de 50-70°C tot de neerslag opgelost is.

Zet tevens een waterbad aan op 56°C en een hitteblok op 70°C. Voorverwarm de BE buffer op 70°C.

Voor je begint, verwijder de blender delen en was deze in een buis met gedemineraliseerd water, vervolgens in 70% alcohol en hierna weer in gedemineraliseerd water. Droog de onderdelen en zet de blender weer in elkaar. Vul tevens het sonificatie bad met gedemineraliseerd water.

1. Was de teek in het sonificatie bad gedurende 20-30 seconden, controleer eventueel onder de microscoop of de teek schoon getrild is.
2. Stop vervolgens de individuele teek in een epje welke ruim wordt aangevuld met 70% alcohol en vortex de teek gedurende 5 tot 10 seconden.
3. Was de pincet eerst in 70% alcohol en vervolgens in gedemineraliseerd water.
4. Haal de teek uit het epje, het epje kan vervolgens gesloten in de gele bak weg gegooid worden, en laat deze enkele tellen drogen op een tissue of filter papier.
5. Wanneer de teek droog is, plaats deze dan op een rond filter papier en snij hem voorzichtig met het scalpel mesje in 2, of als het een grotere teek is in 4, stukjes. Neem voor elke teek een schone plek op het filter.
6. Doe deze stukjes teek in een 2 ml epje en voeg hier 180µl T1 buffer aan toe en label dit epje correct. (Schrijf het nummer van het buisje op, met toevoeging van een letter als er meerdere teken in het buisje zaten en schrijf ook de datum van de DNA isolatie op.)
 - a. Blender de teek tot er nog maar zeer kleine stukjes over zijn.
 - b. Verwijder de blender onderdelen en was deze in gedemineraliseerd water, vervolgens in 70% alcohol en hierna weer in gedemineraliseerd water.
 - c. Droog de onder delen en zet de blender weer in elkaar.

Was de pincet, net zoals bij stap b, na de teek uit het sonificatie bad gehaald te hebben en na het in het epje doen van de gesneden tekenstukjes.
(Ververs om de 5 teken de twee buizen met gedemineraliseerd water en de 70% alcohol)
7. Voeg 25µl proteinase K toe en vortex. (Proteinase K ligt in de vriezer.)
8. Incubeer vervolgens 1 tot 3 uur bij 56°C. Vortex elk uur. De duur van deze incubatie is afhankelijk van hoe snel de teek afgebroken wordt, maar duurt meestal 3 uur.
 - a. Als het hitte blok nog niet aan staat op 70°C, doe dit dan voor het laatste uur incuberen en voorverwarm de BE buffer.
9. Voeg 200µl B3 buffer toe.
10. Incubeer vervolgens 10 tot 15 minuten bij 70°C. Draai de epjes vervolgens kort af in de centrifuge zodat de epjes weer vrij zijn van condensvorming.
11. Voeg 210µl 100% alcohol toe en vortex.
12. Centrifugeer 2 minuten op 11.000 x g.
13. Breng het supernatant over naar een nucleospin kolom en centrifugeer 1 minuut op 11,000 x g . Verwijder de doorgelopen vloeistof. (Voorkom dat stukjes teek, mee genomen worden op de kolom. Label de kolom correct.)
14. Voeg 500µl BW buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.

15. Voeg 600µl B5 buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.
16. Centrifugeer vervolgens nog een keer 1 minuut op 11.000 x g.
17. Plaats de kolom in een nieuwe, steriele, 1,5ml epje. Label dit epje correct. (TeekID + Datum.)
18. Pipetteer vervolgens 100µl voorverwarmde BE buffer direct op het membraan en incubeer gedurende 1 minuut.
19. Centrifugeer 1 minuut op 8.000 x g en vervolgens nog 1 minuut op 11.000 x g.
20. Bewaar het verkregen DNA monster bij -20.

Leeg na afloop het sonificatie bad en desinfecteer het bad met 70% alcohol.

PCR ter behoeve van de Reverse Line Blot (RLB) Hybridisatie

De verkregen DNA monsters kunnen vervolgens gebruikt worden in een aantal bepalingen waaronder de RLB. Hierbij moet een of meerdere PCRs gedaan worden met verschillende PCR primer paren zodat er specifieke DNA fragmenten ontstaan welke aangetoond kunnen worden middels de RLB. Voor deze PCR wordt er 1 master mix gemaakt, deze bevat de totale hoeveelheid PCR reagens voor alle te PCR-en monsters +1 positieve controle en 1 negatieve controle. Dus aantal DNA monsters + 2.

Deze master mix wordt door het vermenigvuldigen van onderstaande onderdelen met het aantal PCR monsters en dit te pipeteren in 1 epje.

Volledige Mix voor 1 reactie:

12,5 µl	2x Phire hotstart II mastermix, thaw & vortex before use
9 µl	H ₂ O
0.5 µl	F primer (20 pmol/ul)
0.5 µl	R primer (20 pmol/ul)
γ µl (meestal 2,5ul)	cDNA or DNA

Eind volume per PCR reactie: 25 µl (22.5 µl mix + 2.5 µl PCR product)

Het te gebruiken PCR programma is afhankelijk van de primers, vraag dan ook welk programma gebruikt moet worden als dit nog niet duidelijk is. (Ze staan al geprogrammeerd op het PCR apparaat.) De verkregen PCR producten worden vervolgens middels gel elektroforese beoordeeld of de PCR naar behoren heeft gewerkt.

Agarose gel elektroforese

- Om 1 liter 1x TEA te verkrijgen moet de een deel van de 50x TEA stockoplossing verdund worden (20ml 50x TAE aanvullen tot 1000 met Milli-Q water)
- Weeg vervolgens 1,125 gram agarose af en voeg hier 75ml 1x TEA aan toe en verwarm vervolgens de oplossing in een magnetron tot dat de agarose gesmolten is.
- Laat de oplossing afkoelen tot ongeveer 60 °C en voeg 2,5µl van de (10mg/ml) Ethidiumbromide oplossing toe. **LET OP! Ethidiumbromide is carcinogeen! Draag handschoenen!**
- Plak van de elektroforese tray beide kanten af met tape, zodat de gel niet kan gaan lekken, en plaats de kam.
- Giet voorzichtig de gel. (Eventuele luchtballen kunnen verwijderd worden met een pipet punt.)
- Wanneer de gel gestold is kan de kam voorzichtig verwijderd worden en de tray in het elektroforese apparaat gezet worden.
- Vul indien nodig de 1x TAE niveau aan tot de volledige gel onder een klein laagje buffer staat.

PCR product voorbereiden op de elektroforese

Pipetteer 1µl 6x loadingbuffer in een 0,2ml epje of in een welletje van een 96 wells plaat. Voeg hier 5 µl PCR product aan toe.

Pipetteer vervolgens voorzichtig het PCR product in een slotje. De loadingbuffer bevat een hogere dichtheid dan de TEA buffer, hierdoor zal je PCR product + loadingbuffer naar onderen zakken in het slotje. Echter, wanneer te vlug gepipetteerd wordt bestaat de kans dat het slotje “overstroomt” en je PCR product niet in het slotje blijft.

Pipetteer vervolgens 5 µl van de DNA ladder aansluitend of voorafgaand aan je PCR monsters. (1 per “rij” slotjes die gebruikt worden.)

Run vervolgens de gel gedurende 30-45minuten.

Vervolgens kan de gel, indien de producten vergenoeg door de gel heen gemigreerd zijn, bekeken worden onder UV licht en tevens kan er een foto van de gel gemaakt worden. (De DNA ladder bevat kleurstoffen welke als referentie dienen tijdens het elektroforeren. Aan de hand van deze kleur fracties kan er bepaald worden of er lang genoeg geëlectroforeert is. Wanneer de fragmenten erg langzaam migreren door de gel, kan het zijn dat de buffer te vaak gebruikt is en dient deze vervangen te worden. Giet de oude buffer in het afvalvat waar duidelijk “EtBr Waste” opgeschreven staat.)

Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie

Controleer of een PCR beschikbaar is, en schrijf je in voor de tijd dat de PCR gebruikt zal worden. (Tijd begin, tijd eind – Naam. Bij een overnacht PCR kan er O/N geschreven worden als eind tijd.)

1. Combineer en verdun de verkregen PCR producten in een 1,5 epje. Neem van elk PCR product 10 µl en vul dit aan tot een totaal volume van 160 µl met 2x SSPE/0,1% SDS. (B.V. 10 µl Anaplasma/Ehrlichia PCR + 10 µl Babesia/Theileria PCR + 140 µl 2x SSPE/0,1%SDS. De verdunning van de PCR producten kan ook de dag voor de RLB gedaan worden, de verdunde monsters kunnen vervolgens bewaard worden in de koude kamer.)

2. Denatureer de verdunde PCR producten gedurende 10 minuten bij 100°C op een heating block en koel vervolgens de epjes meteen op ijs. Centrifugeer, short spin, de epjes kort nadat ze zijn afgekoeld.
3. Incubeer tijdens de denaturatie van de PCR producten het RLB membraan gedurende 5 minuten in ±100ml 2x SSPE/0,1%SDS bij kamertemperatuur onder zacht schudden.
4. Plaats het membraan op een ondersteunend kussen in de miniblotter, met de sloten van de miniblotter haaks op de aangebrachte probes op het membraan.
5. Verwijder de buffer uit de sloten van de miniblotter met behulp van vacuüm.
6. Pipetteer vervolgens de PCR verdunde producten in de sloten. (De sloten kunnen 150 µl bevatten dus je houdt 10 µl van de 160 µl over. Deze overmaat is zodat de gehele slot gevuld kan worden ZONDER luchtbellens. Wanneer luchtbellens ontstaan, zuig met behulp van de pipet het monster weer op en pipetteer opnieuw tot dat er geen luchtbellens meer in de slot aanwezig zijn.)
7. Laat de PCR producten gedurende 60 minuten hybridiseren bij 42°C in de stoof zonder te schudden.
8. Zet alvast 30ml 2x SSPE/0,5%SDS in een tube in de stoof bij 42°C om op temperatuur te komen.
9. Verwijder de monsters met behulp van vacuüm.
10. Was het membraan 2x met ±100ml voorverwarmde 2x SSPE/0,5% SDS gedurende 10 minuten bij 50°C onder rustig schudden in het waterbad.
11. Incubeer het membraan met 30 ml 2x SSPE/0,5% SDS + 5 µl streptavidine gedurende 30 minuten bij 42 in de stoof onder rustig schudden. Zet het waterbad op alvast op 42°C met de 2x SSPE/0,5%SDS zodat beide op de juiste temperatuur komen.
12. Was het membraan 2x met ±100ml 2x SSPE/0,5% SDS gedurende 10 minuten bij 42°C onder rustig schudden.
13. Was het membraan 2x met ±100ml 2x SSPE gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur onder rustig schudden.
14. Verwijder de 2x SSPE.
15. Spreid 10ml ECL (5ml ECL1 + 5ml ECL2, koude kamer) over het membraan door met de hand de bak heen en weer te bewegen tot het volledige membraan bedekt is met ECL.
16. Plaats het membraan tussen 2 overhead sheets of tussen keuken folie, voorkom luchtbellens.
17. Plaats het membraan in de foto cassette.
18. Ga naar de donkere kamer op de 5^e verdieping en plaats de x-ray film op het membraan. (Markeer hoeken zodat het uiteindelijk makkelijker oriënteren is.)
19. Belicht de x-ray gedurende 10 minuten.
20. Ontwikkel de foto met behulp van het ontwikkelingsapparaat.

RLB membraan strippen

Plaats de 1% SDS oplossing in het waterbad en laat beide opwarmen tot 80°C.

1. Was de gebruikte membraan 2x met 1% SDS oplossing gedurende 30 minuten bij 80°C onder rustig schudden.
2. Wanneer er gedurende langere tijd geen gebruik gemaakt wordt van het membraan volgt nog 1x wassen van het membraan met 20mM EDTA oplossing gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur.
3. Berg het membraan op in de sealbag en voeg ±2ml 20mM EDTA toe.