

Screeningsonderzoek naar teken-gebonden ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland



**Jos Wolters
December 2008- april 2009**

Screeningsonderzoek naar teken-gebonden ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland

**Deel 2 van het complete Screeningsonderzoek
binnen het Wildlife-project**

Auteur: Jos Wolters
Stagelocatie: Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD),
Departement Infectieziekten en Immunologie,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
Stageperiode: 8 december 2008 - 20 april 2009
Begeleiding: Prof. Dr. F. Jongejan, Dr. M.J.L. Kik,
Drs. A.M. Nijhof, J.A. Balk

Foto voorpagina: Reegeit met teken op de hals
(foto:Erik van Til)

Samenvatting:

Het doel van dit screeningsonderzoek is om na te gaan wat de reservoirrol voor tekengebonden ziekten is van wilde hoefdieren (reeën, edelherten, damherten, moeflons en wilde zwijnen) in Nederland. Teken en bloedsamples van 26 reeën, 21 damherten, 11 edelherten, 5 wilde zwijnen, 1 moeflon en 1 das zijn opgestuurd naar het UCTD door wildbeheerders uit vijf onderzoeksgebieden. De teken zijn gedetermineerd op soort en stadium. Het DNA van 172 teken en 56 bloedsamples zijn onderzocht op de aanwezigheid van verschillende pathogenen (*Babesia/Theileria*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Rickettsia* en *Nicolleia*) door middel van PCR (Polymerase Chain Reaction) en RLB (Reverse Line Blot). Bij enkele teken en bloedsamples zijn kloneringsreacties uitgevoerd. Van 5 reeën zijn de sectiegegevens van het pathologisch onderzoek gebruikt.

De onderzoeksresultaten wezen uit dat van de 172 teken, 168 stuks behoorden tot de soort *Ixodes ricinus*; 4 teken afkomstig van een das waren van het soort *Ixodes hexagonus*. Van de 172 teken waren er 4 nimfen, 168 stuks behoorden tot het adulte stadium.

Onderzoeksresultaten van de RLB lieten de volgende besmettingspercentages in teken zien: *Babesia/Theileria*: 1,2% (*B. catch-all*), *Borrelia*: 2,9% (*B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu lato*, *B. garinii*), *Bartonella*: 9,3%, (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Ehrlichia/Anaplasma*: 20,9% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *E. schotti*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 6,9% (*R. catch-all*, *R. helvetica*), *Nicolleia*: 9,9% (*N. catch-all*).

De betrokken diersoorten vervullen een reservoirrol voor: *Babesia/Theileria*: reeën: 29% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. canis*, *B. divergens*) edelherten: 27% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. divergens*), damherten: 14% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. divergens*), *Bartonella*: reeën: 29% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), edelherten: 55% (*B. catch-all*), *Ehrlichia/Anaplasma*: reeën: 24% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *A. phagocytophilum*) edelherten: 27% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *A. phagocytophilum*), damherten: 24% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*).

Babesia/Theileria lijken niet efficiënt over te dragen vanuit bloed op de teken. *Borrelia* is niet aangetoond in de het bloed van wilde hoefdieren; de rol van antilichamen en de voorkeur voor een lage zuurstofsaturatie spelen hierin hoogstwaarschijnlijk een rol. *Rickettsia* en *Nicolleia* zijn niet aangetoond in bloed; wilde hoefdieren lijken dus geen reservoirrol te vervullen voor deze pathogenen. In een moeflon werd in een bloedsample *Bartonella* en in een teek *Ehrlichia/Anaplasma* aangetoond. In 5 bloedsamples van wilde zwijnen en 4 teken van een das werden geen teken-gebonden pathogenen aangetoond.

Op het gebied van pathologisch onderzoek kunnen nog geen duidelijke conclusies worden getrokken wat betreft teken-gebonden ziekten.

Abstract:

The goal of this research was to investigate the role of large game animals (roe deer, red deer, fallow deer, mouflon and wild boar) in the Netherlands as a reservoir of tick-transmitted diseases. Ticks and blood samples from 26 roe deer, 21 fallow deer, 11 red deer, 5 wild boars, 1 mouflon and 1 badger have been sent to the UCTD by hunters from five different areas. The species and stadia of the ticks were determined. The DNA of 172 ticks and 56 blood samples were examined on the presence of a couple of different pathogens (*Babesia*, *Borrelia*, *Bartonella*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Rickettsia* and *Nicolleia*) by means of PCR (Polymerase Chain Reaction) and RLB (Reverse Line Blot). The DNA of several ticks and blood samples have been cloned.

Results showed that from 172 ticks, 168 were *Ixodes ricinus*, 4 ticks were *Ixodes hexagonus*. 4 out of 172 ticks were nymphs, 168 ticks were adults.

Results from RLB showed the following rates of infection in ticks: *Babesia/Theileria*: 1,2% (*B. catch-all*), *Borrelia*: 2,9% (*B. afzelii*, *B. burgdorferi sensu lato*, *B. garinii*), *Bartonella*: 9,3%, (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Ehrlichia/Anaplasma*: 20,9% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *E. schotti*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 6,9% (*R. catch-all*, *R. helvetica*), *Nicolleia*: 9,9% (*N. catch-all*).

The results showed the following percentages of infection for the following large game animals: *Babesia/Theileria*: roe deer: 29% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. canis*, *B. divergens*), red deer: 27% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. divergens*), fallow deer: 14% (*Theileria/Babesia catch-all*, *B. catch-all*, *B. divergens*), *Bartonella*: roe deer: 29% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), red deer: 55% (*B. catch-all*), *Ehrlichia/Anaplasma*: roe deer: 24% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *A. phagocytophilum*), red deer: 27% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*, *A. phagocytophilum*), fallow deer: 24% (*Ehrlichia/Anaplasma catch-all*).

Babesia/Theileria does not seem to transfer efficiently from blood to ticks. *Borrelia* was not demonstrated in the blood of the large game animals; most probably due to the role of antibodies and the preference for areas with low oxygen saturations. *Rickettsia* and *Nicolleia* were not demonstrated in blood; large game animals do not appear to form a reservoir for these pathogens. *Bartonella* was demonstrated in blood of a mouflon and *Ehrlichia/Anaplasma* in a tick from this animal. Tick-transmitted pathogens were not demonstrated in blood samples from 5 wild boars and in 4 ticks from a badger.

Conclusions cannot be made regarding results of autopsy by pathological examination.

Inhoudsopgave

Inleiding	7
Teken	7
Ixodes ricinus.....	9
Vector	11
Door teken overgebrachte Protozoa.....	12
Genus <i>Babesia</i>	12
Genus <i>Theileria</i>	13
Door teken overgebrachte Prokaryoten.....	13
Genus <i>Borrelia</i>	13
Genus <i>Bartonella</i>	13
Genus <i>Ehrlichia</i>	14
Genus <i>Anaplasma</i>	14
Genus <i>Rickettsia</i>	14
Risico's voor mens en dier	15
Jachtlocaties	19
Betrokken diersoorten	20
Het Ree.....	20
Het Edelhert.....	20
Het Damhert	21
Het Wild Zwijn.....	22
De Moeflon.....	23
De Das.....	23
Materiaal en Methode	25
Determinatie van teken	25
DNA-extractie	26
PCR (Polymerase Chain Reaction) en gelelectroforese.....	26
RLB (Reverse Line Blot)	28
Kloneren	29
Pathologisch onderzoek	29
Resultaten	30
Teken.....	30
PCR	30
Reverse Line Blot	32
Kloneren	35
Pathologisch onderzoek	36

Discussie	37
Reflectie Resultaten	37
Teken.....	37
PCR en RLB	38
Kloneren	41
Pathologisch Onderzoek.....	41
Reflectie Materiaal en Methoden.....	41
 Conclusie	 42
 Dankwoord	 43
 Literatuurlijst	 44
 Bijlage 1: Tap- en verzendinstructie; Bloedafname en tekenverzameling	 49
Bijlage 2: Protocol DNA extractie (teken en bloed)	50
Bijlage 3: Protocol PCR	51
Bijlage 4: Protocol gelelectroforese	52
Bijlage 5: Protocol RLB	53
Bijlage 6: Test-pathogenen RLB	54
Bijlage 7: Protocol Klonering	55
Bijlage 8: Protocol Zuivering van DNA	56
Bijlage 9: Uitslagen RLB	57

Inleiding

Het Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD) is vorig jaar in september samen met het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) gestart met een project wat zich richt op wildlife in Nederland. Hierbij worden verschillende populaties wilde hoefdieren gescreend op de aanwezigheid van pathogenen welke door teken worden overgedragen. Zo wordt de aanwezigheid van deze pathogenen bij reeën, edelherten, damherten en wilde zwijnen in verschillende gebieden in Nederland in kaart gebracht. Gezien de reservoirfunctie van wild voor teken-gebonden ziekten, is dit van zowel van veterinaire als medische belang.

Dit verslag beschrijft het tweede deel van het complete screeningsonderzoek naar teken-gebonden ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland. Het bevat onderzoeksresultaten van de periode december 2008 tot en met april 2009.

Teken

Teken zijn efficiënte vectoren van een groot aantal protozoa, rickettsiae, bacteriën, virussen en zelfs helminthen. Een aantal van deze pathogenen kunnen infectieuze ziekten zoals borreliose (ziekte van Lyme), ehrlichiose en babesiose kunnen veroorzaken. De verwekkers hiervan kunnen door een tekenbeet worden overgedragen op mensen (zoönose), op landbouwhuisdieren en op gezelschapsdieren. (Kaufhalt et al, 1994)

Teken worden onderverdeeld in twee families: de *Ixodidae* (de harde teken) en de *Argasidae* (de zachte teken). Deze twee soorten zijn van elkaar te onderscheiden doordat bij de *Ixodidae* het capitulum vrij naar voren steekt en van bovenaf zichtbaar is. Bij de *Argasidae* is het capitulum van bovenaf echter niet zichtbaar, aangezien het aan de buikzijde is gelegen. De *Ixodidae* hebben een scutum (een chitineus dorsaal gelegen schild). Dit scutum bedekt bij de mannetjes de gehele dorsale zijde en bij de wijfjes, nimfen en larven alleen het voorste deel van de dorsale zijde. (Jongejan, 2001)



Fig. 1 Een *Ixodes ricinus* (links) en *Dermacentor reticulatus* mannetje (rechts). Het schild bedekt bij adulte mannetjes de gehele rugzijde in tegenstelling tot vrouwelijke adulten, waar het schildje kleiner is en slechts het voorste gedeelte van de rug bedekt. (foto: UCTD)

Over de gehele wereld zijn er ongeveer 870 verschillende soorten teken bekend, waarvan in Noord-West Europa 26 soorten beschreven zijn. De *Ixodidae* (23 soorten) komen in dit gebied in grotere getale en verscheidenheid voor dan de *Argasidae* (3 soorten). (Jongejan, 2001)

De levenscyclus van de *Ixodidae* bedraagt in Nederland twee tot drie jaar en bestaat uit verschillende stadia: eieren, larven (3 paar poten), nimfen en adulten (4 paar poten).

Ieder actief stadium neemt gedurende een aantal dagen eenmaal bloed op bij de gastheer en vervelt hierna tot het volgende stadium (larven en nimfen) of legt eenmaal een groot aantal eitjes en sterft (vrouwtjes).

Bij de *Ixodidae* onderscheidt men:

- één-gastherige teken: beide vervellingen (larve-nimf, nimf-adult) vinden plaats op één en dezelfde gastheer
- twee-gastherige teken: de eerste vervelling (larve-nimf) vindt plaats op het dier, de tweede vervelling (nimf-adult) op de grond
- drie-gastherige teken: beide vervellingen vinden plaats op de grond. Ieder stadium moet dan een nieuwe gastheer zoeken.
- (Jongejan, 2001)

***Ixodes ricinus*:**

Ixodes ricinus is qua aantal en qua rol als vector in (dier)geneeskundig opzicht de belangrijkste soort in Nederland.

Ixodes ricinus is een drie-gastherige teek. *Ixodes ricinus* is, in tegenstelling tot sommige andere teeksoorten (zoals *Rhipicephalus sanguineus*, die vrijwel alleen op honden voorkomt), niet erg gastheerspecifiek. *Ixodes ricinus* wordt dus op verschillende diersoorten (inclusief de mens) aangetroffen. De onvolwassen stadia larve en nimf, treft men voornamelijk aan op kleinere dieren (zoals muizen en vogels), de volwassen teken meestal op grotere dieren (met name reeën). In een periode van twee tot drie jaar verblijft de teek niet meer dan drie weken op drie verschillende gastheren. De teek verblijft het overgrote deel van de cyclus tussen de bodemvegetatie. *Ixodes ricinus* heeft naast de beschikbaarheid van geschikte gastheren ook een geschikte bodemvegetatie nodig; een dikke strooisellaag met een vochtig microklimaat. Deze vegetatie is voornamelijk aanwezig in gemengde bossen, naald- en loofbossen met een voldoende humusbevattende bodem, verwaarloosde weiden en windsingels. Actieve volwassen nestelen zich iets hoger in de vegetatie, te wachten op een geschikte gastheer.

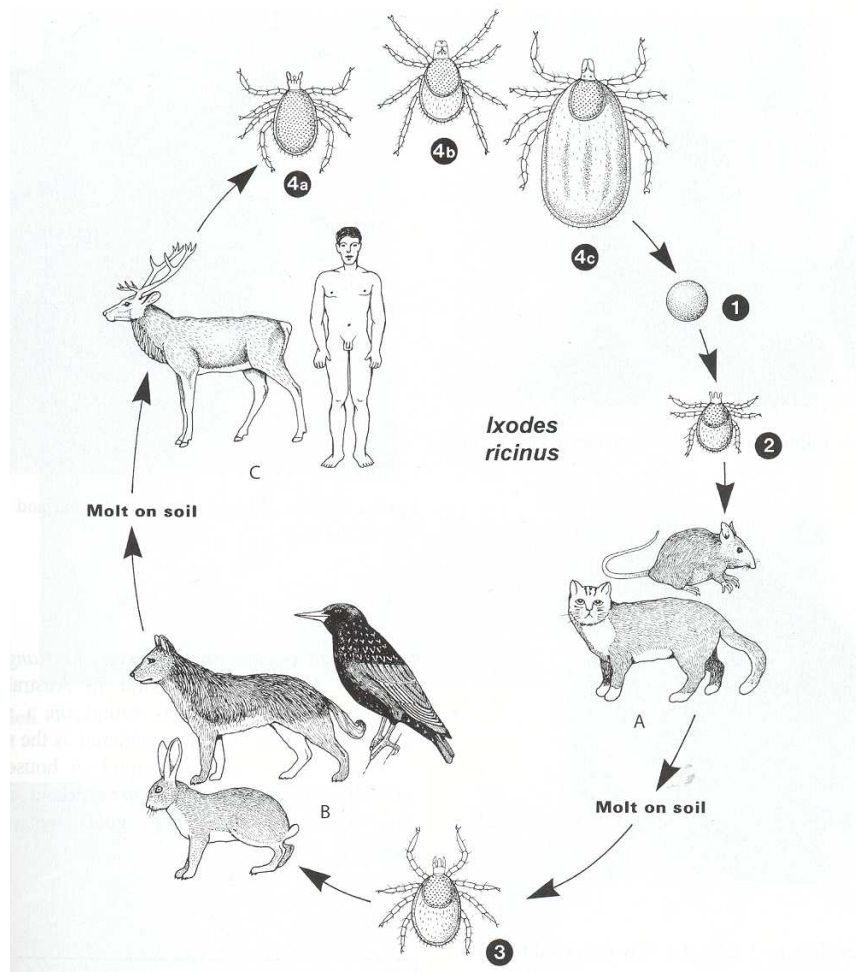


Fig. 2 *Levenscyclus van Ixodes ricinus*

Levenscyclus van *Ixodes ricinus* (Fig. 2):

Volgezogen vrouwtjes (4c) bereiken een lengte tot 1,5 cm en laten zich vallen op de bodem. In een periode van 1 maand leggen ze tot 2000 eitjes.

6-potige larven komen uit de eitjes na 3-36 weken (afhankelijk van de temperatuur). De larven kruipen hoog in de bodemvegetatie, waar zij zich hechten aan passerende gastheren (A) (voornamelijk kleine zoogdieren, maar ook vogels en mensen)

Gevoede larven laten zich vallen op de bodem en vervellen tot 8-potige nimfen. Nimfen hechten zich voornamelijk aan grotere zoogdieren (B) en voeden zich gedurende 4-7 dagen voordat ze op de grond vallen. De nimfen vervellen in 2-8 maanden tot het adulte stadium (4a, 4b, 4c). Veelal in het voorjaar zijn de adulten te vinden op grotere zoogdieren als reeën, herten en de mens (C). Met name de vrouwtjes zuigen dan bloed gedurende 5-14 dagen. Deze gehele cyclus is temperatuursafhankelijk en duurt in Europa 2-3 jaar.

(Mehlhorn, 2008)

De larven, nimfen en adulten van *Ixodes ricinus* zijn voornamelijk actief in het voorjaar en het najaar. Hierbij zijn twee activiteitspieken aanwezig wanneer een continue vochtige humuslaag ontbreekt; in de maand mei en een tweede piek in september. In de wintermaanden vertoont *Ixodes ricinus* nauwelijks tot geen activiteit.

Binnen de *Ixodidae* wordt in Nederland naast *Ixodes ricinus* tevens *Ixodes hexagonus* waargenomen. Deze tekensoort is aanwezig op 90% van alle egels, maar komt ook voor op honden, dassen en marters. (Mehlhorn, 2008) Daarnaast komt de recentelijk geïntroduceerde soort *Dermacentor reticulatus* zeer lokaal voor, maar wel in grote aantallen. Tot dusver is deze soort op 6 verschillende locaties in Nederland gevonden. (Bodaan et al, 2007)



Fig. 3 Een ongevoed *Ixodes hexagonus* vrouwtje. Door het transparante schild van deze tekensoort is het donkergekleurde darmkanaal goed zichtbaar. Deze teken voeden zich voornamelijk op egels en zijn tijdens dit onderzoek op een das aangetroffen. (foto: UCTD)

Vector:

Naast dat teken een ontsteking kunnen veroorzaken op de plaats van de tekenbeet, of dat de gastheer veel bloed kan verliezen (bij grote aantallen teken) kunnen teken infectieuze pathogenen overbrengen naar de gastheer. De teek fungeert dan als vector. Teken kunnen, dankzij hun enorm oprekbare huid, vele malen hun eigen lichaamsgewicht aan bloed opnemen.



Fig. 4 Teken vrouwtjes kunnen een enorme hoeveelheid bloed opnemen dankzij hun rekbare huid, links een ongevoed vrouwtje, rechts een volgezogen exemplaar. (foto: UCTD)

Teken brengen pathogenen over, anders dan bij insecten, door herhaalde overbrenging van het pathogeen, met vermeerdering van het pathogeen in de teek. De overdracht kan *transstadieel* zijn, wat inhoudt dat het ene stadium zich infecteert en het volgende stadium de ziekte overbrengt. Soms kan de larve zich infecteren en de ziekte zelfs nog als volwassen teek overbrengen. Bij sommige pathogenen (bv. *Babesia*) bestaat *transvariële* transmissie, waarbij het pathogeen via het ovarium en de eieren overgaat op de volgende generatie teken. Hierdoor kan een groot percentage van de tekenpopulatie het pathogeen overbrengen op de gastheer.

De meest relevante pathogenen die teken kunnen overbrengen zijn:

Protozoa:

Genus *Babesia*

Genus *Theileria*

Prokaryoten:

Genus *Bartonella*

Genus *Borrelia*

Genus *Anaplasma*

Genus *Ehrlichia*

Genus *Rickettsia*

De ziektes en pathogenen die door *I. ricinus* en *I. hexagonus* kunnen worden overgebracht zijn:

I. ricinus (Linnaeus, 1758):

- Tick-borne Encephalitis (TBE) bij mens en dier (inclusief Louping ill virus bij schapen) (Tick-borne Encephalitis Virus)
- Lyme borreliose (*Borrelia burgdorferi s.l.*)
- Babesiose bij runderen and sporadisch bij de mens (*Babesia divergens*);
- Human babesiose (*Babesia microti*)
- Tick-borne fever bij runderen en human granulocytische ehrlichiose (*Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*);
Rickettsia helvetica

I. hexagonus (Leach, 1815):

- Lyme borreliose (*Borrelia burgdorferi s.l.*)

(Jongejan, Uilenberg, 2009)

Door teken overgebrachte Protozoa

Genus *Babesia*

Protozoaire *Babesia*-parasieten ontwikkelen zich door middel tweedeling in de erythrocyten van de gastheer. De adulte teken zuigen geïnfecteerd bloed bij de gastheer. De protozoa gaan vervolgens via het ovarium en het ei over op de volgende generatie teken. In de speekselklieren vindt de sporogonie plaats. Deze volgende generatie teken brengen vervolgens de infectieuze sporozoieten met het speeksel over op de volgende gastheer.

De infectie komt voor bij de meeste zoogdieren. Ziekteverschijnselen treden echter voornamelijk op wanneer het oudere dieren betreft die voor het eerst worden geïnfecteerd.

De meest relevante *Babesia*-soorten zijn:

Babesia canis: dit pathogeen komt voornamelijk voor in Zuid-Europa, maar de afgelopen jaren zijn er diverse gevallen van babesiose bij honden gediagnosticeerd in de Benelux. In Nederland is dit in de meeste gevallen te wijten import uit Frankrijk. *Babesia canis* wordt door de tekensoorten *Dermacentor reticulatus* en *Dermacentor marginatus* overgedragen.

Babesia divergens: Bij rund is dit de meest belangrijke soort. Deze bloedparasiet veroorzaakt bij runderen verschijnselen als koorts, lusteloosheid, splenomegalie, hemoglobinurie, icterus, hemolytische anemie en daling van de melkgift. Infectie van runderen met *B. divergens* geschiedt dikwijls mild of wordt geheel niet opgemerkt. *Babesia divergens* wordt transovarieel overgedragen door de tekensoort *Ixodes ricinus*. Bij de mens kan *B. divergens* levensbedreigende ziekteverschijnselen veroorzaken bij individuen na een splenectomie. *Babesia capreoli* lijkt moleculair gezien veel op *Babesia divergens*. Deze parasiet heeft ook *I. ricinus* als vector en is voor het eerst in Nederlandse reeën aangetoond.

(Dorrestein et al, 1996)

Babesia microti: het DNA van dit pathogeen is enige jaren geleden gevonden in Nederlandse *I. ricinus*-teken. (De Vos et al, 2000) *B. microti* heeft een reservoir in knaagdieren en kan met name ziekteverschijnselen veroorzaken bij mensen zonder milt. *Babesia rossi*: is afkomstig uit Afrika en is zeer pathogeen voor honden. Sporadisch veroorzaakt het importgevallen in Nederland. De symptomen komen overeen met die van *B. canis*. *Babesia vogeli*: deze vorm van babesiose komt voor in de (sub)tropen en wordt overgebracht door de tekensoort *Rhipicephalus sanguineus*. Dit pathogeen kan zich in Nederland niet handhaven in de vrije natuur, maar wel in verwarmde huizen en kennels.

Genus *Theileria*

Dit pathogeen lijkt moleculair gezien veel op *Babesia*. Het verschil is echter dat *Theileria*-parasieten alleen transstadieel door de teken worden overgebracht (en dus niet transovarieel). Een ander verschil is dat de parasiet drie stadia in de gastheer heeft, waarvan een stadium in de erythrocyten en twee stadia in lymfocyten. *Theileria*-soorten komen voor bij herkauwers, paarden (*Theileria equi*), honden en mensen.

(Jongejan, 2001)

Door teken overgebrachte Prokaryoten

Genus *Borrelia*

Borrelia is een Gram-negatieve spiraalvormige bacterie en valt onder de spirocheten. De belangrijkste *Borrelia*-soort is *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Dit pathogeen is veroorzaker van Lyme borreliose en wordt in Europa overgedragen door nimfen en volwassen stadia van Ixodes teken. De bacterie kan op basis van zijn genotypering en fenotypische eigenschappen worden ingedeeld in tien verschillende species waarvan *Borrelia afzelii* en *Borrelia garinii* het meest voorkomen in West-Europa.

Borreliose bij de mens: Lyme borreliose is een multisystemische infectieziekte bij de mens. Het heeft een reservoir in verschillende zoogdiersoorten, zoals muizen, egels, eekhoorns, vossen en ook in verschillende soorten vogels. Op deze dieren zuigen de onvolwassen Ixodes-teken het besmette bloed. Het klinisch beeld van Lyme borreliose kan sterk variëren van symptoomloos tot neurologische complicaties, hartgeleidingsstoornissen en artritis. De ernst van de symptomen is afhankelijk van de variatie van het voorkomen van de verschillende *Borrelia*-species. Een typisch kenmerk voor Lyme borreliose is een typische huidafwijking: het erythema migrans. Deze ringvormige huidaandoening treedt binnen een maand op, na de beet van de geïnfecteerde teek.

Borreliose bij de hond: infecties met *B. burgdorfi* komen waarschijnlijk frequent voor in Nederland. Vaak zijn honden wel seropositief bevonden, zonder duidelijke ziekteverschijnselen. De verschijnselen zijn koorts, kreupelheid, slechte eetlust en lusteloosheid. De diagnose wordt bij honden in een later stadium gesteld dan bij de mens; doordat de erythema migrans niet voorkomt of door de vacht niet goed zichtbaar is. Ook is het vaak niet duidelijk of de hond door een teek of meerdere teken is gebeten.

Borreliose bij het paard: de belangrijkste ziekteverschijnselen zijn sloomheid, polyarthritis, keratitis, endocarditis en dermatitis. Het ziektebeeld kan erg variabel zijn, hetgeen de diagnose bemoeilijkt. Bij paarden is bij Lyme borreliose meestal een erythema migrans aanwezig.

(Jongejan, 2001)

Genus *Bartonella*

Bartonella sp. zijn facultatief intracellulaire, Gramnegatieve bacteriën. Deze bacteriën kunnen de erythrocyten, macrofagen en endotheelcellen van de gastheer infecteren, met ernstige gevolgen voor mens en dier. *B. henselae* veroorzaakt kattekrabziekte en wordt tevens geassocieerd met andere aandoeningen als oculaire infecties en endocarditis. Geïnfecteerde mensen en honden met *Bartonella* kunnen verlamingsverschijnselen, endocarditis, granulomateuze lymfadenitis en Peliosis hepatis (met bloed gevulde holten in de lever) ontwikkelen. (Breitschwerdt et al, 2000)

Katten vormen het belangrijkste reservoir voor *B. henselae*. De bacteriën worden voornamelijk overgedragen door kattenvlooien. Persisterende infecties in andere gedomesticeerde en ook wilde dieren kunnen resulteren in een substantieel reservoir voor *Bartonella*. De prevalentie van bacteriemie kan variëren van 50 tot 95% in populaties katten,

herten, reeën en runderen. (Cotté et al, 2008). In West-Europa wordt *Ixodes ricinus* als een nieuwe belangrijke potentiële vector gezien. DNA van *B. henselae* is gevonden in teken afkomstig van honden. (Podsiadly et al, 2007)

Gezien de reservoirrollen die de verschillende diersoorten kunnen vervullen en de verschillende insecten die betrokken zijn bij de overdracht van *Bartonella* sp. kan blootstelling aan deze insecten door mensen en dieren gezondheidsrisico's met zich meebrengen.

(Breitschwerdt et al, 2000)

Genus Ehrlichia

Het genus *Ehrlichia* bevat ook obligaat intracellulaire bacteriën, welke groeien in leukocyten en endotheelcellen.

Ehrlichia canis: een Gram-negatieve obligaat intracellulaire parasiet van monocyten. De vector is de tekensoort *R.sanguineus*. De acute fase van het ziektebeeld manifesteert zich met verschijnselen als koorts, anorexie, dyspnoe, oedemen, braken en een verhoogde bloedingsneiging. Duitse herdershonden zijn met name gevoelig voor een infectie met *Ehrlichia canis*.

(Jongejan, 2001)

Genus Anaplasma

Deze bacterie is verwant met *Ehrlichia* en *Rickettsia*. Het is obligaat intracellulair en groeit in erythrocyten. Infecties met *Anaplasma* vinden plaats bij runderen, geiten en schapen in alle tropische gebieden. De symptomen beginnen met koorts en wordt gevolgd door een hemolytische anemie. De tekensoort *Ixodes ricinus* is de belangrijkste vector voor *Anaplasma*.

Anaplasma phagocytophilum: een kleine Gram-negatieve obligate intracellulaire bacterie. *A. phagocytophilum* infecteert granulocyten in het bloed en weefsels. De belangrijkste symptomen van anaplasmosis zijn koorts, algehele malaise, hoofdpijn en spierpijn.

(Jongejan, 2001)

(<http://www.mcharts.be/artsen/Documenten/Labomailing/092006lm.pdf>)

Genus Rickettsia

Rickettsia vormen de grootste groep prokaryote pathogenen die door teken overgebracht worden. Het zijn obligaat intracellulaire Gram-negatieve bacteriën. De rickettsiae bevinden zich vrij in het cytoplasma van de gastheercel. Vermenigvuldiging vindt plaats door tweedeling in de cellen van het reticulo-endotheliale systeem, op erythrocyten of in vasculair endotheel. *Rickettsia* heeft een reservoir in knaagdieren en soms in andere dieren.

In Europa is *Rickettsia coronii* de belangrijkste *Rickettsia*soort. De bacterie wordt overgedragen door de tekensoort *R. sanguineus*. De ziekteverschijnselen zijn hoge koorts, gevolgd door huiduitslag die op de extremiteiten begint en zich verspreidt over het lichaam. Neurologische verschijnselen kunnen optreden. Op de plek van de tekenbeet ontstaat een zwarte plek (tâche noire) op de huid. (Cowan, 1996) Bij Rickettsiose kunnen de symptomen uiteenlopen van sarcoidose, perimyocarditis tot griepachtige verschijnselen. (Nilsson et al, 2002)

Risico's voor mens en dier

Het landschap in Nederland verandert.

Natuurgebieden worden aangelegd, uitgebreid en met elkaar in verbinding gebracht door middel van ecologische verbindingzones. Alle bestaande en nieuwe natuurgebieden met ecologische verbindingzones vormen een samenhangend netwerk, de Ecologische Hoofdstructuur (EHS). Het doel van de ecologische verbindingzones is dat door deze natuurverbindingen tussen geïsoleerde natuurgebieden de verspreiding en migratie van soorten binnen de EHS verbeterd wordt.

(Eijpe, 2002)

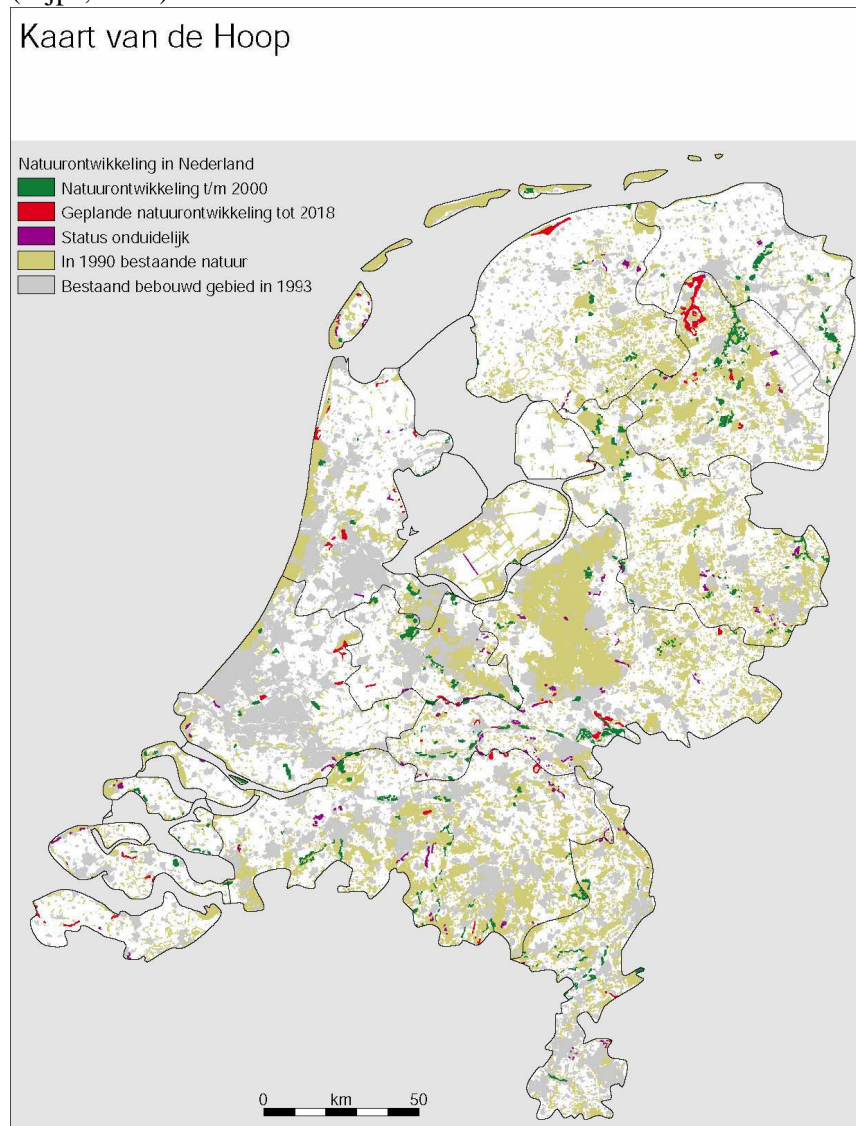


Fig. 5 *Natuurontwikkeling in Nederland: Kaart van de Hoop in relatie tot al bestaande natuurgebieden*

Door deze verbindingzones kan bijvoorbeeld een natuurgebied in Duitsland plots in verbinding komen te staan met een natuurgebied in Nederland. Een voorbeeld hiervan is te

vinden in Zuid Twente waar verschillende natuurgebieden in Duitsland in verbinding staan met de Sallandse Heuvelrug.

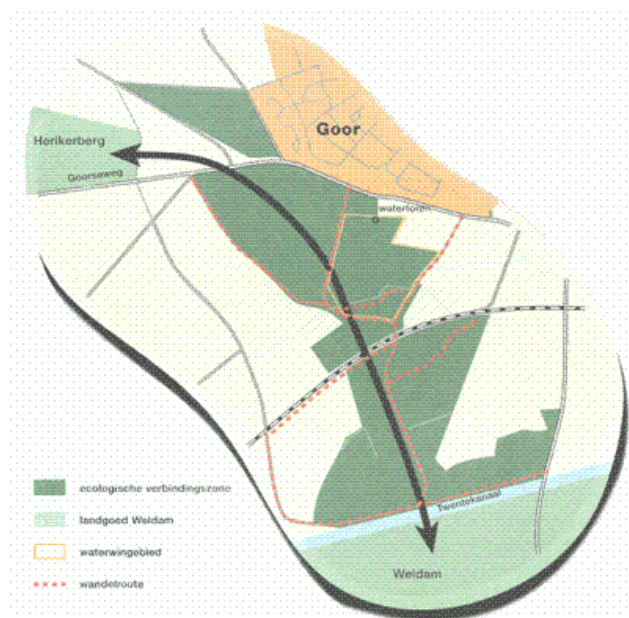


Fig. 6 Voorbeeld van een ecologische verbindingzone (donkergroen) tussen de natuurgebieden Herikerberg en Weidam (lichtgroen)

Een ecologische verbindingzone is hier tot stand gekomen door het aanleggen van beplanting langs beken, het aanleggen en uitbreiden van boscomplexen en het aanleggen van een faunatunnel onder de weg. Deze veranderingen zouden kunnen bijdragen aan de verspreiding van ziekten en parasieten door dieren die trekken via deze ecologische verbindingzones. Deze insleep van meer en nieuwe ziekteverwekkers zouden een gevaar kunnen vormen voor de gezondheid van mens en dier. Teken hebben wat betreft de verspreiding van ziekteverwekkers een zeer belangrijke rol.

Teken kunnen in Nederland goed overleven door:

- Een toename van natuurgebieden en recreatiegebieden (Fig. 5)
- Het met elkaar verbinden van natuurgebieden door ecologische verbindingzones en ecoducten. (Fig. 6) Hierdoor kunnen gastheren met teken zich over grotere delen van het land verspreiden.
- Een toename van het aantal gastheren. De jacht op reeën is bijvoorbeeld aangescherpt. Het aantal reeën is hierdoor fors toegenomen. Ook de leefomstandigheden van knaagdieren zijn verbeterd.
- Klimaatveranderingen. Hierdoor is het mogelijk bepaalde tekensoorten, die hier oorspronkelijk niet voorkwamen kunnen overleven.
- Een toename van recreatie. Honden die mee op vakantie gingen naar Zuid-Europese landen namen bijvoorbeeld de *Dermacentor*-teek mee terug naar ons land. Deze teek heeft zich nu permanent weten te vestigen in een aantal gebieden in Nederland..

Veel in het wild levende dieren zijn de natuurlijke gastheren van de teek. Op deze natuurlijke gastheren kan de teek zijn levenscyclus voltooien. Wilde hoefdieren, maar ook klein wild zoals muizen, vervullen een rol als reservoir voor teken-gebonden ziekten. Het dier wordt als regel zelf niet ziek van het pathogeen, maar voor andere diersoorten kan het na overdracht wel ziekteverwekkend zijn. Een voorbeeld hiervan is de ziekte babesiose, veroorzaakt door

Babesia divergens, die niet alleen haemoglobulinurie kan veroorzaken bij het rund, maar ook tot levensbedreigende ziekteverschijnselen kan leiden bij mensen, bij wie door een operatieve ingreep de milt is verwijderd (splenectomie). Runderen kunnen, na infectie met *Babesia divergens*, babesiose oplopen wanneer het rundvee veelvuldig buiten graast en op deze wijze in contact komt met besmette teken. Ondanks dat *Babesia divergens* doorgaans milde klachten veroorzaakt bij runderen en een infectie onopgemerkt verloopt, sterven er regelmatig runderen aan babesiose. Zo vonden in 2003 verscheidene runderen, die in natuurgebieden en weilanden in Drenthe graasden, de dood als gevolg van babesiose. Vooral de volwassen dieren die voor het eerst in aanraking komen met *Babesia* lopen een groot risico. Het is bekend dat reewild, edelherten en kleine zoogdieren als egels en muizen het reservoir vormen voor *Babesia*. In bepaalde regio's lijken teken meer besmet te zijn met babesia dan in andere gebieden. Het is dus zinvol om een beeld te krijgen in welke gebieden en in welk percentage besmet wild en besmette teken voorkomen in Nederland. Runderen kunnen in die gebieden nauwlettender in de gaten worden gehouden, gelet op ziekteverschijnselen. (Montizaan, 2007)

Niet alleen runderen, maar ook andere diersoorten, zoals honden kunnen ziek worden na een tekenbeet van een besmette teek. *Babesia canis*- en *Ehrlichia canis*-infectie komen in Nederland voornamelijk voor wanneer honden een endemisch gebied hebben bezocht. Af en toe worden ook autochtone *Babesia*-infecties waargenomen. (Zandvliet et al, 2004)

Bij een onderzoek naar autochtone babesiose in Nederland is aangetoond dat naast *Ixodes ricinus*-teken ook de soorten *Ixodes hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus* en *Dermacentor reticulatus* voorkomen. Dit betekent dat ook teken-gebonden pathogenen als *Ehrlichia canis* die de teek *R. sanguineus* als vector heeft, kunnen voorkomen in Nederland. De gevonden volwassen *Dermacentor reticulatus* teken tonen aan dat canine babesiose ooit endemisch kan worden in Nederland. (Matjila et al, 2005)

Uit eerder onderzoek bij teken afkomstig van herten in de Flevopolder is gebleken dat 45% van de *Ixodes ricinus*-teken het DNA van *Ehrlichia* bevatten. (Schouls et al, 1999) Dit pleit voor de reservoir-rol die deze dieren vervullen voor *Ehrlichia/Anaplasma*. *Anaplasma phagocytophilum*, de veroorzaker van granulocyttaire anaplasmosis is aangetroffen bij wild. Deze infectie was al bekend bij herkauwers, honden en bij de mens en was eveneens vastgesteld bij paarden in Nederland.

(Butler et al, 2008)

Er is een grote variatie in het voorkomen van tekenbeten bij mensen in Nederland. Deze variatie is afhankelijk van de geografische ligging. In natuurgebieden in Nederland komen habitattypen voor die als zeer geschikt worden genoemd als leefgebied voor teken. Het RIVM heeft onderzoek gedaan naar twee verschillende habitattypen in Nationaal Park De Hoge Veluwe en de Amsterdamse Waterleidingsduinen, om verdieping te brengen in kennis over de relatie tussen verschillende vegetatiestructuren en het overbrengen van *Borrelia*. Hieruit is gebleken dat dennenbos door zijn bodemopbouw en strooisellaag een betere habitat is voor teken dan eikenbos (Hoge Veluwe). Het aantal reeën en herten dat als gastheer kan fungeren is in dennenbos ook hoger gebleken, waardoor de overlevingskansen van adulte teken hoger zijn. Om een completer beeld te krijgen van het infectierisico met *Borrelia* voor de mens in bepaalde gebieden zullen ook de infectiepercentages van met *Borrelia* besmette teken moeten worden meegenomen.

(http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bul1405/lyme_fenologie.html)

De verschillende teken-gebonden pathogenen vormen een risico voor de gezondheid van mens en dier. Maar bij niet al deze pathogenen is dit risico even groot. Het risico is van een

aantal factoren afhankelijk, zoals de impact van het pathogeen en de mate van blootstelling aan het pathogeen door contact met wild en/of teken afkomstig van wilde hoefdieren.

Het is hierbij relevant om een antwoord te krijgen op de volgende vragen:

- Welke tekensoorten komen voor op wilde hoefdieren in Nederland?
- Welke stadia van de teek komen voor?
- Wat is de besmettingsgraad van teken met de verschillende pathogenen?
- Weerspiegelt de aanwezigheid van een pathogeen in de teek zich in de aanwezigheid van het pathogeen in het bloed van het dier?
- Is er een relatie tussen de aanwezigheid van pathogenen (in teken en in bloed) en de gezondheid van het dier?

(Herbes et al, 1995)

Jachtlocaties

In 2008 werden er op enkele rundveebedrijven in de buurt van Vorden ziekteverschijnselen gevonden bij de runderen. Tegelijkertijd werden er diverse zieke en zwakke reeën in de directe omgeving waargenomen. Om te kunnen vaststellen of er sprake is van een verband, is destijds het 'Reeënproject' opgezet in samenwerking met de Koninklijke Nederlandse Jagers Vereniging en is er contact opgenomen met jagers in de omgeving van Vorden. Tegelijkertijd zijn er ook op andere locaties onderzoeken gestart, zoals Nationaal Park de Hoge Veluwe, en een jachtgebied rondom Zundert. Later is tevens een jachtgebied rond Winterswijk betrokken bij het screeningsonderzoek. Faunabeheereenheid Zeeland kreeg in december 2008 ontheffing om in de maanden januari en februari van 2009 268 stuks damherten af te schieten. Hiervan zijn bloed en teken van 21 damherten, afkomstig van het eiland Walcheren, gebruikt voor dit deel van het onderzoek.



Nat. Park De Hoge Veluwe:	11 edelherten, 5 wilde zwijnen, 1 ree, 1 moeflon
Vorden:	17 reeën, 1 das
Walcheren:	21 damherten
Winterswijk:	7 reeën
Zundert:	1 ree

Fig. 7 Jachtgebieden betrokken bij het screeningsonderzoek

Voor dit deel van het screeningsonderzoek zijn uit bovenstaande jachtgebieden bloed en teken onderzocht, afkomstig van verschillende dieren. Deze dieren betroffen zowel afgeschoten wild als valwild. (Valwild: wild dat op een andere wijze is gestorven dan door de jacht).



Fig. 8 Valwild: Ree, verkeersslachtoffer (Vorden)

Betrokken diersoorten

Het Ree

(*Capreolus capreolus*)

Dit dier is de kleinste en meest algemeen voorkomende vertegenwoordiger van de hertachtigen in Europa en komt in vrijwel geheel Nederland voor. De schouderhoogte bedraagt 75 cm, de lichaamslengte is 95 tot 125 cm. Een bok weegt 13-23 kg, een geit iets minder. Kenmerkend aan een volwassen reebok is het zesender gewei. Rond de anus heeft het ree een wit-gele haarvlek, genaamd 'de spiegel'.



Biotoop: reewild kan zich goed aanpassen aan de leefomgeving. Rust en dekking zijn hierbij van groot belang. Het ree heeft als voorkeur een parklandschap: bebost gebied, afgewisseld met akkers en weilanden. (Faunabeheerplan Ree 2006-2010)

In de zomer leeft het ree solitair, in de herfst in sprongen van 3 tot 12 reeën. De bronsttijd loopt bij reewild van half juli tot half augustus. Het kalf wordt pas in mei geboren doordat het embryo na dekking pas begint te groeien in januari/februari.

(<http://www.bertgaljaard.nl/algemeen/hetree.html>)

Bedreigingen en beheer: reeën kunnen de verkeersveiligheid in gevaar brengen. Dit komt voornamelijk voor als gevolg van territoriaal gedrag door overpopulatie.

Reewild heeft in Nederland geen natuurlijke predatoren. Voedselaanbod en de aanwezigheid van rust zijn bepalend voor het aantal reeën in een bepaald gebied. Groei van populaties kan leiden tot voedselstress, toename van schade aan flora en verhoogt de kans op uitbreken van epidemieën. (<http://www.faanabeheereenheid.nl/drenthe/faunaschade/veroorzaakte%20schade/schade-5.doc/>) Te hoge reeëndichtheden ten opzichte van de draagkracht worden voorkomen door middel van afschot. Een beeld van de dichtheden van de aanwezige populaties wordt verkregen door middel van tellingen in het voorjaar. Deze schemertellingen worden georganiseerd door vrijwel alle Wildbeheereenheden. Reeën zijn, gezien hun verborgen leefwijze vaak moeilijk te tellen. Daarom wordt door veel Wildbeheereenheden gebruik gemaakt van jaarrondtellingen, welke een beter beeld geven van de populatiedichtheid.

(Faunabeheerplan Ree 2006-2010)



Fig 9 Verspreiding van het geslacht *Capreolus*

Het Edelhert

(*Cervus elaphus*)

Het edelhert is een van de grootste herten. Deze hertensoort komt voor in Europa, Azië en Noord-Amerika. In Nederland komt het edelhert voor op de Veluwe (1600 stuks), de Oostvaardersplassen (2400 stuks) en in het Weerterbos (24 stuks) in Limburg/ Brabant. (<http://www.hetedelhert.nl>) De schouderhoogte bedraagt 114-140 cm,



de lichaamslengte is 165-260 cm. Een hert weegt maximaal 225 kg, een hinde weegt tot 125 kilo. Het edelhert heeft rust, ruimte en variatie in voedsel nodig. Het is een sociaal levend dier en leeft het grootste deel van het jaar in roedels. Edelherten zijn in de zomer roodbruin van kleur en wordt dan ook roodwild genoemd. 's Winters is het haarkleed grijs gekleurd. Biotoop: het edelhert is een dier dat zich goed kan aanpassen aan verscheidene voedselomstandigheden. Het voedsel kan bestaan uit grassen, heide, kruiden, twijgen, knoppen en blad van loofbomen. In de herfst en winter worden veelal eikels, kastanjes, heide en dennennaalden gegeten.

Bedreigingen en beheer: het edelhert is volledig beschermd. Dit betekent dat de jacht uitsluitend plaatsvindt uit het oogpunt van beheer. De enige bedreiging vormt de mens, voornamelijk vanwege verkeer, maar ook vanwege luchtballonnen en recreanten in het leefgebied van edelherten. Afschot vindt plaats omwille van de nagestreefde relatie van planten en diergemeenschappen. Bij overpopulatie zouden edelherten eerst hun eigen leefgebied vernietigen, daarna zal het aantal gereguleerd worden door de voedselsituatie. Een jaarlijks afschot is gelijk aan het aantal geboorten min de verkeersslachtoffers. (Vereniging Het Edelhert)



Fig. 10 Verspreiding edelhert in Europa en Azië

Het Damhert

(Dama dama)

Van nature komt het damhert voor in loofbossen en gemengde bossen. In Nederland komen dit diersoort voor in de duingebieden van Kennemerland, op de Veluwezoom, in de kop van Schouwen (Schouwen-Duiveland) en een relatief kleine populatie in de Manteling van Walcheren. Hiernaast zijn damherten natuurlijk ook te vinden in hertenkampen en kinderboerderijen.



Damherten zijn groter dan reeën en kleiner dan edelherten. De schoudehoogte is 85-110 cm en de lichaamslengte bedraagt 130-170 cm. Een damhert weegt tussen de 45 en 100 kg, waarbij het hertenbok zwaarder is dan de hinde. De vachtkleur is variabel, waarbij de dominante kleur verschilt per gebied. Over het algemeen is de rugzijde roodachtig geel tot kastanjebruin en de buikzijde geelwit van kleur. Meestal is de vacht bezaaid met witte vlekjes. Opvallend bij hertenbokken is het schoffelgewei.

Het damhert leeft in roedels tot de paartijd. Hierna zonderen de volwassen hertenbokken zich af in aparte groepen en leven de hinds met hun jongen, van het huidige en het afgelopen jaar, in groepjes van vijf tot zeven herten. Een dergelijke hindenroedel wordt door een dominante hinde geleid.

(<http://www.zoogdiervereniging.nl/node/478>)

Biotoop: damherten voeden zich voornamelijk met grassen, kruiden, boombladeren. In de herfst veelal dennen- en sparrennaalden, bessen, granen, wortelen en appels. 's Winters bestaat het voedsel uit schors, heide en hulst. Het damhert eet uitsluitend plantaardig voedsel.

Het voedt zich voornamelijk met grassen, biezen en kruiden, aangevuld met jonge (boom)bladeren, dennen- en sparrennaalden, bessen (zoals rozenbottel, braam en bosbes), eikels, granen, wortelen en 's winters schors, hulst en heide. Ook eten ze appels.

Bedreigingen en beheer: De jacht en het verkeer vormen de belangrijkste onnatuurlijke bedreigingen voor damherten, maar ook loslopende honden en recreatie in natuurgebied kunnen bedreigingen vormen. Hiernaast komen geen natuurlijke vijanden voor in Nederland. Het damhert heeft geen natuurlijke vijanden in Nederland. Damherten die op eilanden leven, zoals Walcheren, leven gescheiden van dieren die op de Veluwe leven. In een dergelijke gesloten populatie is wildbeheer noodzakelijk. Wildbeheer door middel van afschot vindt plaats om aantallen te reguleren en welzijn van de overblijvende dieren te vergoten. Ook vindt afschot plaats om bij overpopulatie verkeersslachtoffers te reduceren.

(www.veluwshert.nl)



Fig. 11 Leefgebied van het damhert

Het Wild Zwijn

(*Sus scrofa*)

In Nederland kennen we nog maar twee officiële leefgebieden voor de wilde zwijnen, namelijk de Veluwe (4.000-6.000 stuks) en het Meinweggebied (ong. 150 stuks)

Keilers bereiken een hoogte van 64-109 cm met een lichaamslengte van 105-167 cm. Vrouwtjes worden 59-89 cm hoog met een lichaamslengte van 100-146 cm lang. Het wild zwijn heeft een donkere en borstelige vacht. Keilers hebben opvallende hoektanden in c



Wilde zwijnen leven in kleine groepen, rotte genaamd. Een rotte bestaat uit vrouwtjes met hun jongen en één- en tweejarige zwijnen. De keilers leven echter meestal solitair.

Biotoop: Wilde zwijnen komen voornamelijk voor in loofbossen, halfopen landschappen en landbouwgebieden. Voldoende beschutting is hierbij een vereiste. De dieren zijn actief in de schemering in 's nachts. Wilde zwijnen zijn alleseters. Het voedsel bestaat uit voornamelijk plantaardig voedsel als eikels, kastanjes, knollen en planten. Hiernaast wordt ook dierlijk voedsel genuttigd als regenwormen, insectenlarven en knaagdieren.

Bedreigingen en beheer: De mens vormt de enige bedreiging voor het wilde zwijn. Om de populaties op peil te houden en schade aan landbouwgewassen te beperken, moeten wilde zwijnen bejaagd worden. In Nederland mag dit tegenwoordig echter niet. Een ontheffing op dit verbod kan verleend worden door de Provincie. Het aantal wilde zwijnen mag dan worden gereduceerd om overeenstemming met de draagkracht te bewerkstelligen. Deze draagkracht wordt bepaald door de hoeveelheid beschikbaar voedsel, schade aan gewassen en verkeersveiligheid.

(<http://www.nojg.nl/Indexpagina/Archief%20nieuws%20en%20actualiteiten/Verslag%20van%20het%20Nederlands-Duits%20overleg%20wilde%20zwijnen%20in%20Heinsberg.htm>)



Fig. 12 *Beheergebieden wild zwijn Nederland*

De Moeflon

(Ovis musimon)

In Nederland is er in 1921 een roedel Moeflons uitgezet in de Veluwe, waar tegenwoordig ongeveer 300 stuks leven. Sinds 1958 leeft er een kleinere populatie in de Koninklijke Houtvesterijen van Het Loo en sinds enige tijd leeft in de Amsterdamse waterleidingsduinen ook een kleine populatie.



Dit kleinste wilde schaap heeft opvallende gekrulde hoorns, die 85 cm lang kunnen worden. De rammen hebben in de winter witte “sokken” en snuit, een lichtgekleurd “zadel”, met een donkere nek, schouders en bovenbenen. Rammen hebben een gemiddelde schofthoogte van 75cm met een lichaamslengte van 110-130 cm. Ooien zijn wat kleiner en korter van bouw.

Biotoop: Het dieet van de moeflon bestaat uit hoofdzakelijk uit jonge bladeren, grassen, twijgen en knoppen en ’s winters voornamelijk boomschors. Vanwege dit karige dieet kunnen moeflons goed leven op heide- en zandgebieden.

(<http://www.knjv.nl/default.asp?id=521&menu=>)

Bedreigingen en beheer: omdat de moeflon niet tot de inheemse diersoort behoort betekent dit dat het dier in principe afgeschoten mag worden. Of een populatie van een bepaalde grootte mag blijven bestaan, wordt bepaald door de terreineigenaar.

(<http://www.zoogdiervereniging.nl/node/595>)

De Das

(Meles meles)

Het verspreidingsgebied van dassen in Nederland is versnipperd. Door middel van ecologische verbindingzones kunnen versnipperde populaties met elkaar in verbinding worden gebracht. Uit verspreidingsonderzoek van het ministerie van LNV is gebleken dat de grootste populaties voorkomen in het zuiden en midden van Nederland en bevinden zich op de Veluwe, in Zuid-Limburg en de Maasvallei. In 2007 telde Nederland ongeveer 4500 dassen in het wild, waarvan 84% in bovengenoemde gebieden. Dassen hebben een lichaamshoogte van gemiddeld 30 cm. Mannetjes hebben een lichaamslengte van 68,6-80,3 cm en vrouwtjes van 76,3-78,7 cm. Biotoop: Dassen zijn in het voorjaar meer carnivoor en in het najaar meer herbivore dieren. Het dieet van de das bestaat in het voorjaar onder andere uit regenwormen, insectenlarven, slakken, amfibieën en kleine zoogdieren. In het



najaar wordt er voornamelijk plantaardig voedsel als vruchten, granen, noten en gras gegeten. Bedreigingen en beheer: dassen zijn niet meer een bedreigde diersoort in Nederland. Verkeer vormt een grote bedreiging voor de das.

([http://nl.wikipedia.org/wiki/Das_\(dier\)](http://nl.wikipedia.org/wiki/Das_(dier)))

(<http://www.dassenwerkgroepbrabant.nl/pages/brabantpag.html>)



Fig. 13 *Verspreidingsgebied van de das*

Materiaal en Methode

Verzamelen van Bloed en Teken

De participerende wildbeheerders uit de verschillende gebieden hebben het wild onderzocht op teken en tevens bloed afgenomen bij de dieren. Bloedafname geschiedde door van het te verbloeden stuk grofwild zo spoedig mogelijk een EDTA-bloedbuis rechtstreeks met bloed vol te zuigen of vol te doen met bloed vanuit een andere spuit.

Dit bloed is direct uit de halsader getrokken worden. Indien dit niet mogelijk was is tijdens het ontweiden het bloed rechtstreeks uit de hart/hartslagader genomen, dan wel uit de thoraxholte opgezogen. Het bloedmonster dient niet genomen te zijn uit een emmer met het bloed van opgehangen wild; dit bloed kan gecontamineerd zijn met maagzuur.

Zodra het dier afgeschoten of gevonden was, zijn de gevonden teken gedeponeerd in een tekenpotje. Bloed en teken zijn voorzien van een specifiek en uniek wildmerknnummer en in een koelkast/gekoelde ruimte (4-7°C) bewaard. Deze gevonden teken en bloedmonsters zijn vervolgens opgestuurd naar het Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD).

(Bijlage 1: Tap- en verzendinstructie; Bloedafname en tekenverzameling)



Fig. 14 Bloedafname uit thoraxholte bij een Wild Zwijn (Nationaal Park De Hoge Veluwe)



Fig. 15 Bloedafname uit thoraxholte bij een Ree (Vorden)

Determinatie van teken

Voor de determinatie is er onderscheid gemaakt tussen de verschillende soorten teken en de stadia in de cyclus.

Tekensoorten: de drie meest voorkomende tekensoorten in Nederland zijn *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* en *Dermacentor reticulatus*. (Bodaan et al, 2007) Om het onderscheid te maken tussen *Ixodes*- en *Dermacentor*-teken is gelet op de volgende uiterlijke kenmerken:

Monddelen:

Lang: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*

Kort: *Dermacentor reticulatus*

Plaats van anale/ genitale groeve:

Voor anale/genitale opening: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*

Achter anale/genitale opening: *Dermacentor reticulatus*

Schild:

Onbevlekt: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*

Bevlekt: *Dermacentor reticulatus*

Sporen:

Enkel: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*

Dubbel: *Dermacentor reticulatus*
 Om vervolgens onderscheid te maken tussen *Ixodes ricinus*- en *Ixodes hexagonus*-teken is gelet op:
 Plaats van de genitale opening:
 Tussen 3^e en 4^e paar poten: *Ixodes ricinus*
 Tussen 2^e en 3^e paar poten: *Ixodes hexagonus*
 Lengte van de sporen:
 Lang: *Ixodes ricinus*
 Kort: *Ixodes hexagonus*

Stadia:

Voor het onderscheiden van de verschillende stadia is gebruik gemaakt van de volgende uiterlijke kenmerken:

Drie paar poten:	larve
Vier paar poten:	nimf of adult (♂/♀)
Genitale opening afwezig:	nimf
Genitale opening aanwezig:	adult (♂/♀)
Dorsale zijde geheel bedekt door schild:	adult ♂
Dorsale zijde gedeeltelijk bedekt door schild:	adult ♀

DNA-extractie

DNA werd geëxtraheerd van 168 *Ixodes ricinus*- en 4 *Ixodes hexagonus*-teken.
 Het extraheren geschiedde met behulp van de Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens het protocol van de producent voor het purificeren van DNA van insecten. Tevens werd DNA-geëxtraheerd uit 64 bloedsamples met behulp van de Nucleospin Tissue kit.

(Bijlage 2: Protocol DNA extractie (teken en bloed))

PCR (Polymerase Chain Reaction) en gelelectroforese

Na DNA-extractie kan met behulp van de Polymerase Ketting Reactie (Polymerase Chain Reaction) kunnen kleine hoeveelheden van een specifiek stuk DNA vermeerderd worden. Bij de PCR-reacties zijn forward-primers en reverse-primers toegevoegd van vijf groepen pathogenen:

- *Bartonella*: *Bartonella ITS1-F1*, *Bartonella ITS1-R1*
- *Borrelia*: *Borrelia 23S-5S-F1*, *Borrelia 23S-5S-R1*
- *Babesia/Theileria*: *Babesia/Theileria 18S-F2*, *Babesia/Theileria 18S-R2*
- *Anaplasma/Ehrlichia*: *Anaplasma/Ehrlichia 16S-F1*, *Anaplasma/Ehrlichia 16S-R1*
- *Rickettsia*: *Rickettsia 16S-F1*, *Rickettsia 16S-R1*

Naast de primers worden tevens de volgende bestanddelen toegevoegd:

- MilliQ
- 10x supertaq PCR buffer
- Supertaq
- UDG [1U/μL (UNG)]

Aan deze ontstane mix van bestanddelen wordt DNA toegevoegd van de teek of het bloedmonster. Om te controleren of de Polymerase Ketting Reactie heeft gewerkt, worden aan twee mixen respectievelijk een negatieve (MilliQ) en een positieve controle toegevoegd.

Tijdens het amplificatieproces in de thermocycler (iCycler Thermal Cycler van Bio-Rad) worden de primers verder verlengd tot een compleet stuk DNA. Een specifiek stuk DNA wordt op deze wijze zeer vaak vermenigvuldigd, zodat het geanalyseerd kan worden.

(Bijlage 3: Protocol PCR)

De PCR-producten zijn vervolgens opgebracht op een agarosegel voor electroforese. Hieraan is ethidiumbromide toegevoegd, wat zich bindt aan de DNA-fragmenten. Bij de gelectroforese worden DNA-fragmenten van verschillende lengtes van elkaar gescheiden. De negatief geladen DNA-fragmenten bewegen zich door de gel heen, als gevolg van een elektrisch veld. Kleine fragmenten migreren hierbij sneller dan grote fragmenten. In de UV-illuminator zijn de gebonden fragmenten zichtbaar door UV-licht. De grootte van de fragmenten worden vergeleken met een referentie, de DNA-Ladder. Met behulp van deze ladder kunnen de groottes van de fragmenten globaal worden afgelezen. Bij een positieve uitslag kan gecontroleerd worden of de grootte van een DNA-fragment van een bepaald pathogeen overeen komt met de bekende hoeveelheid baseparen van dat pathogeen.

(Devlin, 2002)

(Bijlage 4: Protocol gelectroforese)

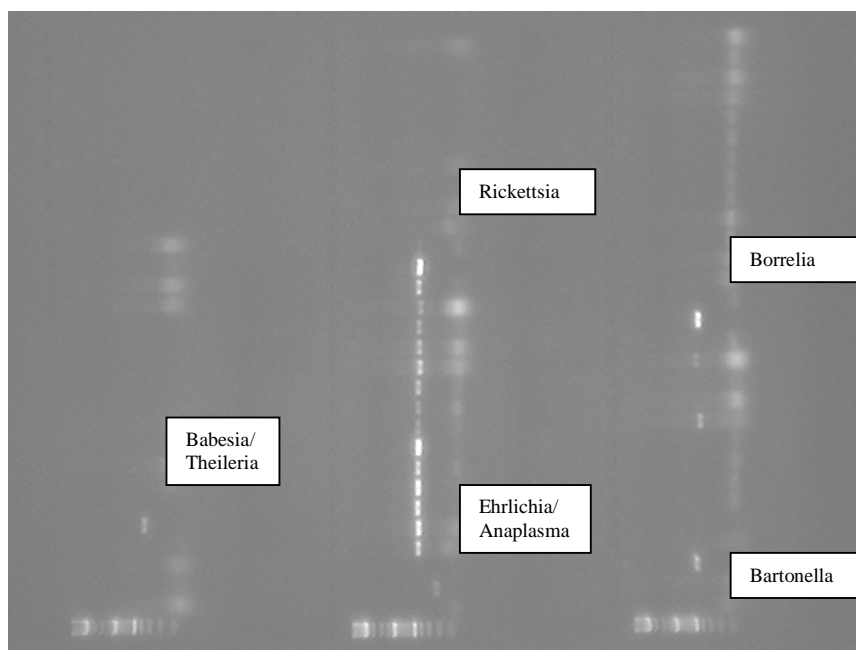


Fig. 16 Voorbeeld van een gelectroforese:
14 teken getest op 5 groepen pathogenen

RLB (Reverse Line Blot)

Wanneer de gelelectroforese een juiste uitslag heeft gegeven (positieve controle dient positief en negatieve controle dient negatief getest te zijn), kan worden gecontinueerd met de RLB. Hierbij kunnen met behulp van een membraan (blot) specifieke pathogenen worden aangetoond. Op dit membraan zijn 43 soortspecifieke oligonucleotides aangebracht en covalent aan de membraan gebonden. Met behulp van een miniblotter worden ieder soortspecifieke oligonucleotide in een lijn aangebracht, waardoor er 43 lijnen met nucleotides ontstaan. PCR-producten worden op de membraan opgebracht met behulp van een miniblotter, in lijnen die tegengesteld aan de richting van de lijnen waarin de oligonucleotides aangebracht zijn. Wanneer een oligonucleotide van een specifiek pathogeen kruist met een PCR-product dat hetzelfde pathogeen bevat, ontstaat er een binding tussen PCR-product en nucleotide (hybridisatie). Een oligonucleotide bestaat uit een kort stukje DNA, dat fungeert als een primer. Met behulp van DNA-polymerase wordt de oligonucleotide verlengd en de complementaire streng DNA gerepliceerd. Na een grondig wasproces worden ongebonden PCR-producten van de membraan verwijderd en de gebonden PCR-producten zichtbaar gemaakt door middel van chemiluminescentie. Luminescentie is mogelijk doordat een biotinelabel wordt gebonden aan de gebonden PCR-producten. Na toediening van streptavidine wordt de membraan geïncubeerd met ECL, een peroxidase substraat. Met ECL ontstaat er een lichtproducerende reactie, welke vastgelegd kan worden op een röntgenfilm. Op de plaatsen waar de soortspecifieke oligonucleotides met PCR-producten gebonden zijn, ontstaan donkere stippen op de film. Met behulp van een raster kan een dergelijke stip gekoppeld worden aan bepaald sample (teek of bloed) en een specifiek pathogeen. (Kaufhold et al, 1994)

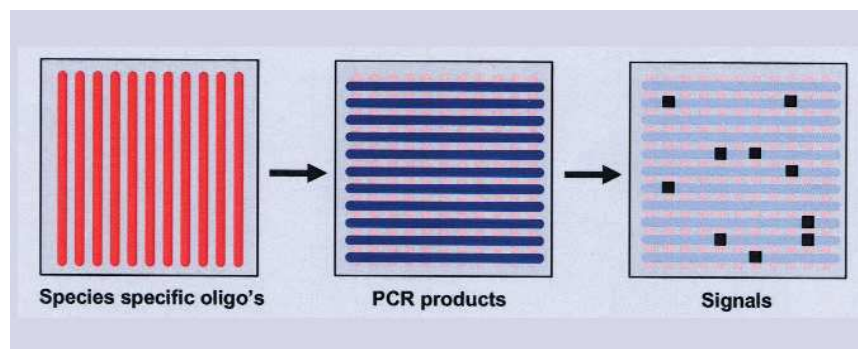


Fig. 17 Het principe van de Reverse Line Blot

(Bijlage 5: Protocol RLB)

(Bijlage 6: Test-pathogenen RLB)

Kloneren

Om een specifieke sequentie te verkrijgen van een bepaald interessant DNA-fragment, wordt dit fragment gekloneerd. Door het DNA-fragment in een bacteriecel te brengen, wordt replicatie van het recombinant DNA bewerkstelligt, doordat de bacteriecel zich deelt en een kopie van zichzelf maakt.

In gemodificeerde bacteriële vectoren wordt een fragment ingebracht, waardoor het een plasmide wordt. De kunstmatige introductie van de vector en het fragment in een bacterie, de transformatie, is mogelijk door middel van elektroporatie. Door deze elektrische stroom worden de cellen permeabel voor kleine DNA-moleculen. De bacteriële plasmiden, die het recombinant DNA bevatten, worden vervolgens in *E. coli*-bacteriën (kolonie JM-109) gebracht en opgebracht op een Ampicilline-agarplaat, waarop ze zich vermenigvuldigen bij een temperatuur van 37°C. Op de agarplaat worden tevens IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) en X-gal opgebracht. IPTG induceert de transcriptie van het gen dat codeert voor het enzym β -galactosidase. X-gal is een chromogeen substraat dat verantwoordelijk is voor een blauwe kleurontwikkeling bij de vorming van β -galactosidase. De niet-getransformeerde bacteriën vormen blauwe kolonies. De bacteriekolonies die het recombinant DNA bevatten zijn niet in staat het enzym te vormen en zijn hierdoor wit gekleurd. De witte kolonies kunnen worden geselecteerd, waarmee vervolgens een kolonie-PCR wordt uitgevoerd. Deze bacteriekolonies worden aangeprikt met een steriel toothpick van de agarplaat. De kolonies worden opgenomen in de PCR mastermix. PCR wordt geleid om te bepalen of de kolonie het fragment van DNA bevat.

(<http://www.pcrstation.com/nl/colony-pcr/>)

De steriele toothpicks worden ingebracht in een medium van LB-Ampicilline (100 μ g/ml). Na een overnachting incubatie bij 37°C wordt het plasmide-DNA gezuiverd (Zie Bijlage 8: Protocol voor Zuivering van DNA) zodat er circulair DNA overblijft, waarvan de sequentie kan worden bepaald (Baseclear Leiden ivc). De sequentie werd ingevoerd in het programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), dat een vergelijking maakt met Genbank. Bekende sequenties worden in dit programma vergeleken met de ingevoerde sequentie. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Het kloneringsproces is uitgevoerd bij 10 interessante resultaten van de Reverse Line Blot.

(Devlin, 2002)

(Bijlage 7: Protocol Klonering)

(Bijlage 8: Protocol Zuivering van DNA)

Pathologisch onderzoek

Wilde hoefdieren die gedurende hun leven opvallende afwijkingen / ziektesymptomen vertoonden zijn ter sectie aangeboden bij de afdeling Pathobiologie van de Faculteit Diergeneeskunde. Door middel van pathologisch onderzoek is hierbij gezocht naar aanwijzingen voor verschillende ziekten (o.a. door teken overdraagbare ziekten). Dit deel van het onderzoek is uitgevoerd door het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC), gehuisvest bij het Veterinair Pathologisch Diagnostisch Centrum (VPDC). De missie van het DWHC is het vermeerderen van de kennis over de gezondheid van wilde dieren en het bevorderen van een goed gebruik van die kennis bij het beleid aangaande de volksgezondheid, de gezondheid van (gedomesticeerde) dieren en het natuurbeheer.

De bevindingen uit de sectierapporten van deze dieren zijn vergeleken met de resultaten van de Reverse Line Blot. Tot dusver betrof het hier dieren afkomstig uit de omgeving van Vorden. Dit bestand zal worden uitgebreid.

(Bodaan et al, 2007)

Resultaten

Het onderzoek naar teken en door teken overgedragen ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland is van start gegaan in september 2008. In dit deel van het onderzoek, zijn het bloed en aanwezige teken onderzocht van 26 reeën, 21 damherten, 11 edelherten, 5 wilde zwijnen, 1 moeflon en 1 das.

Teken

Bijna alle ingezonden teken waren van het soort *Ixodes ricinus*. Bij een das zijn er echter vier *Ixodes hexagonus*-teken aangetroffen.

	♂	♀	Nimf	Larve	Alle stadia
Ree	27	75	4	-	106
Damhert	1	1	-	-	2
Edelhert	18	40	-	-	58
Wild Zwijn	-	-	-	-	-
Moeflon	-	2	-	-	2
Das	-	4	-	-	4
<i>Totaal</i>	46	122	4	-	172

Fig. 18 Aantallen teken verzameld bij de verschillende diersoorten

PCR

In totaal zijn 172 teken en 56 bloedsamples getest op 5 groepen pathogenen door middel van PCR en gelelectroforese.

Teken:

	<i>Bab/Thei</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Ehr/Anapl</i>	<i>Rickettsia</i>
Ree	-	-	8	43	18
Damhert	1	-	-	2	-
Edelhert	6	-	13	44	10
Wild Zwijn	-	-	-	-	-
Moeflon	1	-	-	2	-
Das	2	-	-	1	-
<i>Totaal</i>	10	-	21	92	28

Fig. 19 Aantallen teken positief getest met PCR op 5 groepen pathogenen

Bloed:

	<i>Bab/Thei</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Ehr/Anapl</i>	<i>Rickettsia</i>
Ree	2	-	4	6	-
Damhert	-	-	-	11	-
Edelhert	2	-	2	6	-
Wild Zwijn	-	-	-	-	-
Moeflon	-	-	-	-	-
Das	-	-	-	-	-
<i>Totaal</i>	6	-	6	23	-

Fig. 20 Aantallen bloedsamples positief getest met PCR op 5 groepen pathogenen

Onderstaande grafiek geeft de percentages positief geteste teken en bloedsamples voor de 5 groepen pathogenen weer.

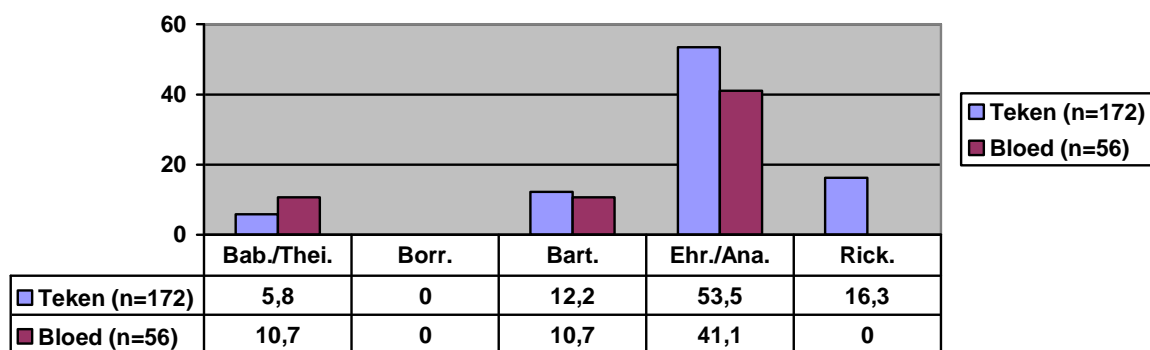


Fig. 21 Percentages positief geteste teken en bloedsamples voor 5 groepen pathogenen met PCR en gelelectroforese

Reverse Line Blot

Onderstaande tabel en geeft het aantal bloedsamples en teken weer, per diersoort, dat positief getest voor de verschillende groepen pathogenen.

De grafieken (Fig 23 t/m 26) geven de **percentages** weer van de positief geteste bloedsamples en teken.

(De uitslagen van bloedsamples en teken van respectievelijk wilde zwijnen en een das waren negatief bij de RLB en zijn derhalve niet weergegeven in een grafiek.)

De specifieke resultaten van de RLB zijn te vinden in bijlage 8.

	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n=21	n=106	n=11	n=58	n=21	n=2	n=1	n=2	n=5	n=4
<i>Babesia/ Theileria</i>	6 (0,29)	-	3 (0,27)	2 (0,03)	3 (0,14)	-	-	-	-	-
<i>Borrelia</i>	-	3 (0,03)	-	-	-	2 (1,00)	-	-	-	-
<i>Bartonella</i>	6 (0,29)	4 (0,04)	6 (0,55)	11 (0,19)	-	-	1 (1,00)	-	-	-
<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i>	5 (0,24)	17 (0,16)	3 (0,27)	16 (0,28)	5 (0,24)	2 (1,00)	-	1 (0,50)	-	-
<i>Rickettsia</i>	-	2 (0,02)	-	9 (0,16)	-	1 (0,50)	-	-	-	-
<i>Nicolleia</i>	-	10 (0,09)	-	6 (0,10)	-	1 (0,50)	-	-	-	-

Fig. 22 Percentages positief gestest met RLB op 5 groepen pathogenen

Ree

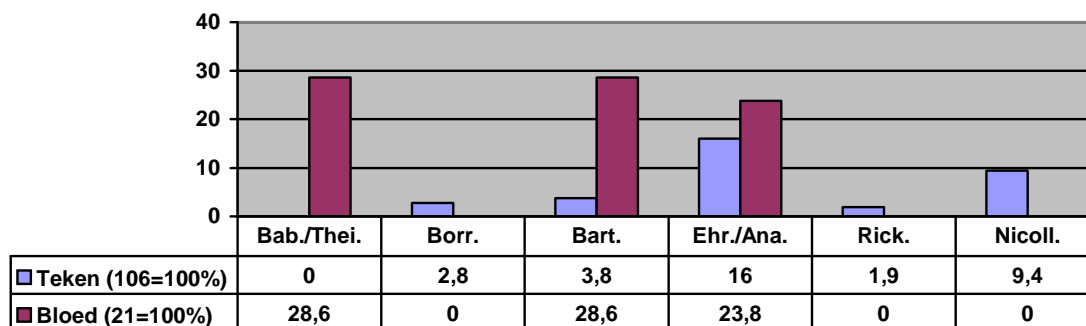


Fig. 23

Edelhert

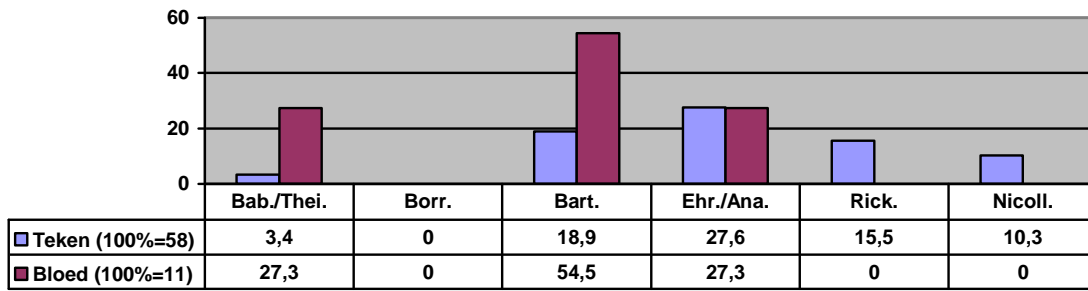


Fig. 24

Damhert

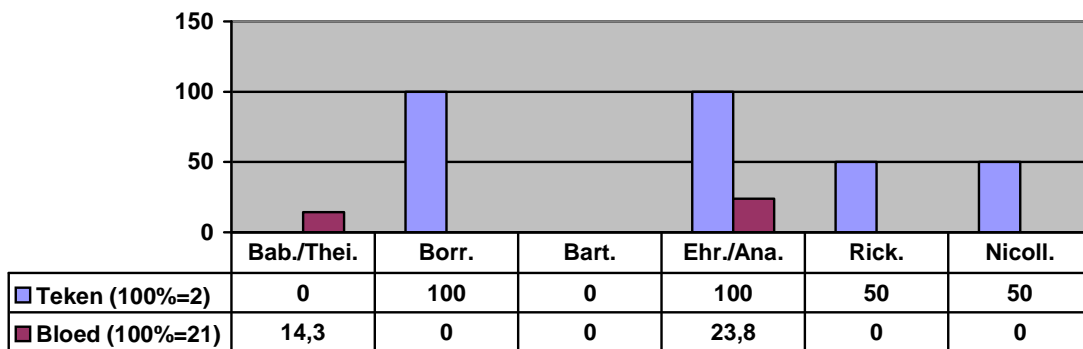


Fig. 25

Moeflon

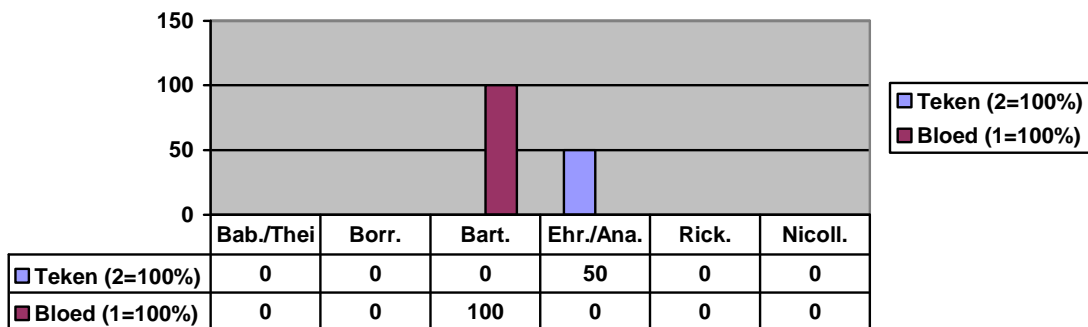


Fig. 26

De besmettingsgraad van teken met teken-gebonden pathogenen bleek verschillend in de vijf onderzoeksgebieden. Het percentage positief geteste teken op Ehrlichia/ Anaplasma blijkt hoog te zijn in bijna alle betrokken onderzoeksgebieden.

	<i>Vorden</i>	<i>Hoge Veluwe</i>	<i>Winterswijk</i>	<i>Walcheren</i>	<i>Zundert</i>
<i>Babesia/Theileria</i>	0%	3% (2/62)	0%	0%	0%
<i>Borrelia</i>	0%	3% (2/62)	0%	0%	0%
<i>Bartonella</i>	2% (1/41)	18% (11/62)	0%	0%	100% (3/3)
<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	20% (8/41)	29% (18/62)	13% (8/60)	100% (2/2)	0%
<i>Rickettsia</i>	0%	15% (9/62)	3% (2/60)	50% (1/2)	0%
<i>Nicolleia</i>	17% (7/41)	15% (9/62)	3% (2/60)	50% (1/2)	0%

Fig. 27 Percentages met RLB positief geteste teken voor 6 groepen pathogenen in de onderzoeksgebieden (N.B. De hoge percentages in Walcheren en Zundert zijn te wijten aan een klein aantal onderzochte teken uit deze gebieden.)

Kloneren

Uit het vorige deel van dit onderzoeksproject kwamen enkele bijzondere en relevante onderzoeksresultaten. Hiervan zijn van 4 verschillende diersoorten kloneringreacties uitgevoerd.

Ree:

Babesia vogeli
Bartonella catch-all
Rickettsia massiliae

Edelhert:

Babesia catch-all 1
Bartonella schoenbuchensis
Anaplasma marginale
Rickettsia helvetica

Moeflon:

Theileria/ Babesia catch-all
Bartonella catch-all

Wild Zwijn:

Ehrlichia/ Anaplasma catch-all

Het gezuiverde DNA is opgestuurd voor sequentie bepaling. Een van de resultaten (zie DNA-sequentie hieronder) is van het bloed sample met *Babesia catch-all 1* (resultaat van RLB) van een edelhert uit Nationaal Park De Hoge Veluwe.

EHV20-13

```
GACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGgCGGcCGCGGGAATT  
CGATTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAaTaaCAATACAGGGCAATTGTCTTGTAATTGGAATGA  
TGGTGACCTAAACCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAA  
TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTTGCGTCA  
CCGTGTATCGACATTGGTCGTTTATCGGTTTCGCTTTCCGGGATTTATCCCTTTTTACTTTGAGAAAAT  
TAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTT  
CTATTTGTGGTTTGTGAACCTTATTAATGGTTAATAGGAGAGGCTGGAGACATTATATCTTCCCT  
GAATCACTTTCATCTCCTACAAAAGAAAACATCACTCTCGTCTCTTTGCTGGTGATAAAAATGATCA  
AGTTCGAAAAGCATACAATATTCGCCAGGAACACTACTGTGCGATGTACGAATTACCCACCCAACCGA  
GTTTGACTTCTACTTGTGCTCTCATGCTGGTATTCAAGGAACATCTCGTCCATCCCATTACCATGTTC  
TTTGGGATGACAACAATCTGACAGCCGACGAACTTCAACAGCTCACATATCAAATGTGCCATACCT  
ACGTGAGATGCACACGATCCGTTTCAATTCCAGCGCAGCATATTATGCTCATTGGTAGCGTTCCG  
CGCTCGTTATCATCTTGTGATCGCGAGCATGACTCTGGAAAAAGTTCTC
```

Bovenstaande sequentie is ingevoerd in het programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). De sequentie toonde onder andere:

96% overeenkomst met *Babesia odocoilei*

94% overeenkomst met *Babesia divergens*

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Babesia odocoilei is een parasiet, gerelateerd aan *Babesia divergens*. *B. odocoilei* is afkomstig van het Witstaarthert of Virginiaans hert (white-tailed deer) (*Odocoileus virginianus*). Deze hertensoort komt voornamelijk voor in Noord- en Zuid-Amerika, maar is ook in enkele Europese landen geïntroduceerd, zoals Tsjechië en Finland. (Herwaldt et al, 2003)

Een tweede klonering is uitgevoerd en opnieuw is van dat bloed sample gezuiverd DNA opgestuurd voor een sequentie bepaling.

Enkele DNA-sequenties van bovenstaande samples bleken afkomstig te zijn van protozoa. Zo toonde onderstaande sequentie:

EHV13-10

ATATAACGACGCGGTTATTATCGCGATTGTAGTGAGGGTATTCTAAACAGAACCT
 ATAGTACGATTAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCTA
 ATAGCGTATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCAAGGAT
 TGTAGAACCCTCCACGGGGATACATCCTACTAGTCTTCGGACTGTTACTGTGAGAA
 AATTAGAGTGTTC AAGCAGGCTTTCGCAAGAATACATTAGCATGGAATAACGAA
 TGTATTTAGAATCTTGGTTAATTCTAAATTACGATTAATAGAGACAGTTGGGGGC
 ATTAGTATTTAACTGTCAGA

99% overeenkomst met protozoa afkomstig uit de pens (*Uncultured Canadian Arcott wether rumen protozoa clone P220_ILP*)

Pathologisch onderzoek

De relevante gegevens van het pathologisch onderzoek van 5 reeën (wildkenmerknnummers) uit de omgeving van Vorden en resultaten van de Reverse Line Blot van bloedsamples van deze dieren, zijn naast elkaar gezet. In bijna alle gevallen ging het hier om zieke, verzwakte dieren (valwild), waaronder een verkeersslachtoffer (VWV4211) en een ree met een ontstekingsproces aan de hals (REE15661).

	Pathologisch Onderzoek	RLB
VWV4211	- Myocarditis	- <i>Bartonella catch-all</i>
VWV4213	- Geringe enteritis	-
VWV4214	- Vergrote milt: proliferatie witte pulpa - Vergrote lever: fibrosering en galgangproliferatie	- <i>Anaplasma phagocytophilum 7</i> - <i>Babesia catch-all 1</i> - <i>Babesia catch-all 2</i> - <i>Babesia divergens</i> - <i>Ehrlichia/Anaplasma catch-all</i> - <i>Theileria/Babesia catch-all</i>
VWV4244	- Vergrote milt: proliferatie witte pulpa - Peritonitis	- <i>Babesia canis 2</i> - <i>Babesia catch-all 1</i> - <i>Babesia divergens</i> - <i>Bartonella catch-all</i>
REE15661	- Ontstekingsproces aan de hals	- <i>Anaplasma phagocytophilum 1</i> - <i>Anaplasma phagocytophilum 3</i> - <i>Ehrlichia/Anaplasma catch-all</i> - <i>Bartonella catch-all</i>

Fig. 28 Relevante resultaten uit sectierapporten van 5 reeën, met resultaten van RLB

Discussie

Reflectie Resultaten

Teken

Soorten

Van de 172 gedetermineerde teken, bleken alle teken van de wilde hoefdieren tot de soort *Ixodes ricinus* te behoren. *Ixodes ricinus* is de meest voorkomende teken species in Europa (Aberer, 2009) Uit voorgaande onderzoeken bleek *Ixodes ricinus* de meest voorkomende teek bij wilde hoefdieren te zijn in Europa. Reeën en herten worden beschouwd als belangrijke gastheren voor *Ixodes*-teken. (Rijpekema et al, 1996) Bij de das zijn 4 *Ixodes hexagonus*-teken aangetroffen. Deze tekensort die veelvuldig voorkomt bij egels, is bij eerder onderzoek ook veelvuldig op dassen aangetroffen. (Butler et al, 1996)

Hoeveelheden

Bij reeën zijn er 106 teken verzameld. Dit is gemiddeld 4 teken per dier. Bij de edelherten zijn er 58 teken verzameld, met gemiddeld 5 teken per dier. De meeste teken werden verzameld vanaf maart. Dit is logisch omdat teken in de periode maart-oktober het meest actief zijn. (Mehlhorn, 2008)

Opvallend is dat bij de damherten er slechts 2 teken verzameld zijn. Dit is te verklaren doordat deze dieren juist in de winterperiode geschoten zijn en teken dan niet actief zijn. Bij de wilde zwijnen zijn geheel geen teken aangetroffen. Dit kan betekenen dat teken of nimfen niet opgemerkt zijn, dat teken niet of nauwelijks voorkomen op wilde zwijnen of dat ze niet voorkomen/ inactief zijn in de periode dat de jacht plaatsvindt (januari-februari). Het laatste lijkt het meest aannemelijk.

(Borgsteede et al, 2005)

Stadia

Wanneer gekeken wordt naar de stadia van de teken valt op dat bij het overgrote deel tot het adulte stadium behoort. Uit de literatuur blijkt dat adulte teken veelvuldig op grote zoogdieren, zoals wilde hoefdieren, te vinden zijn (Mehlhorn, 2008)

Van alle gedetermineerde teken bleek 70,9% van het vrouwelijk geslacht, 26,7% van het mannelijk geslacht en 2,3% nimfen te zijn; teken in het larvale stadium zijn niet verzameld. Larven worden veelal in de zomer waargenomen, wanneer de adulte vrouwelijke teken zich hebben volgezogen, zich op de grond hebben laten vallen en hun eitjes hebben afgezet. Nimfen worden juist in het vroege voorjaar (april-mei) gevangen. Dit verklaart, met het feit dat larven en nimfen klein zijn om gesignaleerd te worden, het lage percentage nimfen en dat er geen larven zijn gevonden.(Borgsteede et al, 2005)

Van de verzamelde adulte teken, bestaat het grootste deel uit vrouwtjes. Dit valt onder andere te verklaren door het feit dat teken van het mannelijk geslacht geen bloed zuigen, vele malen kleiner zijn en dus minder zichtbaar. Een andere oorzaak is dat mannetjesteken zich minder lang op de gastheer bevinden dan vrouwtjes. Mannetjes zoeken tijdens het adulte stadium geen nieuwe gastheer, want als volwassen teek hebben zij geen bloedmaaltijd meer nodig. Adulte teken ontmoeten elkaar voor de paring op grote zoogdieren. Mannetjes zijn alleen op de gastheer te vinden tijdens en een korte periode na de paring.

Uit de resultaten bleek dat er geen significant verschil is tussen de verschillende stadia wat betreft de besmettingsgraad. Bij reeën was 14,8% van de mannetjes besmet, en 25,3% van de vrouwtjes. Bij edelherten was 44,4% van de mannetjes besmet en 50% van de vrouwtjesteken. Uit de resultaten bleek tevens dat er qua besmettingsgraad ook geen significant verschil is aan te tonen tussen teken die zich niet, gedeeltelijk of geheel hebben volgezogen met bloed.

PCR en RLB

Babesia/Theileria:

Een aanzienlijk deel van de reeën (29%, 6/21), damherten (14%, 3/21) en edelherten (27%, 3/11) bleek geïnfecteerd met *Babesia*. De relevante specifieke gevonden soorten die van medische en veterinaire belang zijn, zijn *Babesia canis* en *Babesia divergens*. *Babesia canis* is gevonden bij een bloedsample van een ree. *Babesia divergens* is gevonden in het bloed van 6 reeën, 3 edelherten en 1 damhert. Van de verzamelde teken is geen exemplaar positief getest op *Babesia/Theileria*. In het vorige deel van dit onderzoek bleken de percentages geïnfecteerde dieren hoger te liggen: 100% van de reeën en 79% van de edelherten. Hierbij ging het wel om kleinere aantallen dieren (resp. 6 en 14). Ook werden bij teken van deze dieren destijds lage infectiepercentages gevonden (2% bij beide diersoorten). De *Babesia*-soorten *Babesia microti*, *Babesia venatorum* en *Babesia vogeli* zijn, in tegenstelling tot het vorige deel, niet aangetoond. *Babesia divergens* vormt met name problemen bij volwassen runderen die niet eerder met de parasiet in aanraking zijn geweest (Montizaan, 2007) en immuno-incompetente mensen (na verwijdering van de milt). (Jongejan, 2001) (Hunfeld et al, 2004) Het is bekend dat *Ixodes ricinus* babesiose bij runderen (en sporadisch bij mensen) (*Babesia divergens*) en humane babesiose (*Babesia microti*) kunnen overbrengen. (Jongejan et al, 2009)

Uit onderzoek is gebleken dat *Babesia canis* wordt overgedragen door de tekensoorten recentelijk in Nederland geïntroduceerde *Dermacentor reticulatus* en *Dermacentor marginatus*. (Matjila et al, 2005)

Uit de resultaten blijkt dat *Babesia* niet efficiënt wordt overgedragen van de gastheer op de teken.

Borrelia:

Borrelia-soorten die zijn aangetroffen bij teken van reeën zijn *Borrelia garinii* en *Borrelia burgdorferi sensu lato*. In teken afkomstig van damherten zijn *Borrelia garinii* en *Borrelia afzelii* geïdentificeerd. Bovengenoemde *Borrelia*-soorten zijn allen pathogeen voor de mens. (Rauter et al, 2005)

Borrelia burgdorferi sensu stricto en *Borrelia valaisiana* zijn in het vorige deel van het onderzoek aangetoond in teken van reeën en moeflon. In dit deel van het screeningsonderzoek zijn deze *Borrelia*-soorten niet aangetoond.

Uit een voorgaand onderzoek bleek dat 10-35% van de Nederlandse *Ixodes ricinus*-teken drager is van DNA van *Borrelia*. (Schouls et al, 1999)

Bij een onderzoek naar de infectiegraad van *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*-teken op Ameland, bleek dat van de adulte teken 20-43% geïnfecteerd was met *Borrelia burgdorferi*. (Rijpkema et al, 1994) Uit dit deel van het screeningsonderzoek bleek dat slechts 2,8% van de teken die afkomstig zijn van reeën positief getest zijn op *Borrelia*.

Het DNA van *Borrelia* is echter niet aangetoond in bloedsamples van de dieren. Dit bleek ook in het vorige deel van dit onderzoek. Bij onderzoeken naar humane borreliose, veroorzaakt door *B. burgdorferi s.l.*, bleek dat de bacterie een voorkeur heeft voor een omgeving met een lage zuurstofsaturatie, zoals bindweefsel, kraakbeen, gewrichten en epineuraal weefsel. (Liang et al, 2002) (Guner et al, 1996) (Linder et al, 2001)

Uit een Zweeds onderzoek bleek ook dat, alhoewel reeën en herten een bloedbron vormen voor alle stadia van *Ixodes ricinus*-teken, de dieren niet een belangrijke reservoirrol lijken te vervullen voor *Borrelia*. (Jeanson, 1992) In de literatuur wordt gesproken over het elimineren van *Borrelia*-spirocheten uit de teek, na een bloedmaaltijd. Tekenen die zich hadden gevoed op de reeën hadden significant een lagere infectiegraad dan de tekenen die verzameld waren in het veld. Tevens is in sera van reeën zijn antilichamen tegen *Borrelia* aangetroffen. Aangezien

Borrelia-DNA is aangetroffen in volgezogen en niet-volgezogen vrouwtjesteken, staat de mogelijkheid tot eliminatie van *Borrelia* nog ter discussie. (Rijpkema, 1996)

Bartonella:

Uit de resultaten bleek dat 29% (6/21) van de reeën en 4% (4/106) van de teken afkomstig van reeën positief getest op *Bartonella*. Bij de edelherten was dit respectievelijk 55% (6/11) en 19% (11/58). In totaal is 8,7% (15/172) van de teken positief getest op *Bartonella*. Het bloedsample van de moeflon positief was ook positief getest op *Bartonella*. Wanneer deze percentages worden vergeleken met voorgaande onderzoeken, dan blijken deze percentages lager. In het vorige deel van dit onderzoek bleek 67% (4/6) van de reeën, 64% (9/14) van de edelherten en 17% (26/156) van de teken positief getest. Uit een voorgaand onderzoek bleek meer dan 70% van de onderzochte teken 16S rRNA-sequenties voor *Bartonella*-soorten te bezitten. (Schouls et al, 1999)

Echter, uit een Pools onderzoek bleek de infectiegraad in de reeën in het voorjaar (6,9%) betrekkelijk lager te zijn, dan in de winter (62%). Dit kan een verklaring vormen voor het verschil in percentages tussen dit deel (voorjaar) en het voorgaande deel (winter) van dit onderzoek.

Naast de vele catch-all-signalen, werd *Bartonella schoenbuchensis* gedetecteerd in bloed van 2 reeën (9,5%), in 3 teken van een ander ree (2,8%) en in 1 teek van een edelhert (1,7%). *Bartonella schoenbuchensis* schijnt voornamelijk te worden overgebracht door reevliegen (deer keds)(*Lipoptena cervi*). *Bartonella schoenbuchensis* veroorzaakt dikwijks een bacteriëmie bij herkauwers. *Lipoptena cervi* kan “deer ked dermatitis” veroorzaken bij mensen. De rol van *B. schoenbuchensis* hierbij zal verder onderzocht moeten worden.

(Dehio et al, 2004)

Wanneer DNA van *Bartonella* in teken gedetecteerd wordt, is dit waarschijnlijk het gevolg van contaminatie van geïnfecteerd bloed van het dier. (Matsumoto et al, 2007)

Voor de mens is *Bartonella henselae* pathogeen en kan een bacteriëmie veroorzaken. Dit pathogeen is tot dusver niet gedetecteerd in teken. Uit voorgaand onderzoek bleek dat herten en reeën een reservoir vormen voor *B. capreoli* en *B. bovis*. Deze veterinaire-relevante soorten zijn tijdens dit onderzoek niet gedetecteerd. (Skotarcak et al, 2005)

Knaagdieren blijken het belangrijkste reservoir vormen voor verschillende species van *Bartonella*. De transmissie van *Bartonella* tussen knaagdieren kan plaatshebben door middel van teken, maar tot dusver is het overbrengen van *Bartonella* sp. door teken speculatief. Dierlijke reservoirs en vectoren voor *Bartonella* zullen nader onderzocht moeten worden.

(Schouls et al, 1999) (Skotarcak et al, 2005)

Ehrlichia/Anaplasma:

Een opvallend resultaat van de PCR is het hoge percentage van de teken en bloedsamples dat positief was voor *Ehrlichia/Anaplasma*. Bij de PCR-reacties bleek 53,5% van de bloedsamples en 41,1% van alle onderzochte teken positief getest te zijn op *Ehrlichia/Anaplasma*. Bij de RLB bleek dit percentage voor de onderzochte teken lager te zijn. Alle teken die met de RLB positief getest zijn op *Nicolleia*, gaven tijdens de PCR-reacties een positieve uitslag voor *Ehrlichia/Anaplasma*, ook als er met RLB voor die samples een negatieve uitslag bleek voor *Ehrlichia/Anaplasma*. Dit is te verklaren door het feit dat het DNA van *Nicolleia*-bacteriën ook kunnen vermenigvuldigen met de primer van *Ehrlichia/Anaplasma*. Een groot deel van de positieve *Ehrlichia/Anaplasma*-resultaten voor de PCR is dus vals positief.

Bij de resultaten van de RLB bleek dat 24% (5/21) van de reeën, 27% (3/11) van de edelherten en 24% (5/21) van de damherten positief getest op *Ehrlichia/Anaplasma*-soorten.

Van de teken was 20,9% (36/172) positief getest bij de RLB. *Ixodes ricinus*-teken zijn de belangrijkste vectoren in Europa voor deze bacterieën. (Wielinga et al, 2006)

Uit eerder onderzoek bij teken afkomstig van herten in de Flevopolder is gebleken dat 45% van de *Ixodes ricinus*-teken het DNA van *Ehrlichia* bevatten (Schouls et al, 1999)

Bij de resultaten van de RLB bleek dat naast de vele catch-all-signalen, de meerderheid van de gedetecteerde *Ehrlichia*-soorten behoort tot de *Anaplasma phagocytophila*-groep. Hiernaast werden bij 2 teken van reeën en bij 2 teken van edelherten *Ehrlichia schotti* gedetecteerd. Deze twee *Ehrlichia/Anaplasma*-soorten waren ook in voorgaande studies het meest gedetecteerd. (Wielinga et al, 2006)

Wanneer de resultaten worden vergeleken met resultaten uit het voorgaande deel van dit onderzoek, dan valt op dat de percentages voor positief geteste dieren en teken ook bij *Ehrlichia/Anaplasma* lager liggen. Het is mogelijk dat de infectiegraad voor *Ehrlichia/Anaplasma* in de winter hoger is dan in het voorjaar, maar hier is in de literatuur niets over bekend. In 2004 is de voor de mens pathogene *E. phagocytophila* in teken gevonden. Tot dusver zijn er geen meldingen gedaan van Ehrlichiose (Humane granulocyttaire ehrlichiose (HGE)) bij mensen in Nederland. Gezien de hoge infectiegraad van *Ixodes ricinus*-teken in Nederland, is het de vraag of de ziekte werkelijk niet voorkomt of wel voorkomt en niet gediagnosticeerd wordt. Het is wel bekend dat Ehrlichia-soorten infecties kunnen veroorzaken bij runderen, schapen en honden. (Schouls et al, 1999)

Bij een das zijn 4 *Ixodes hexagonus*-teken gedetermineerd. *Ixodes hexagonus* is de belangrijkste vector van *Theileria annae* in Zuid-Europa. Tijdens dit onderzoek zijn er in deze teken geen teken-gebonden pathogenen aangetoond. (Camacho et al, 2002)

Rickettsia:

Bij de PCR-reacties zijn bij reeën en edelherten in totaal 16,3% (28/172) teken positief getest op *Rickettsia*. Opvallend was dat bloed samples van de onderzochte dieren geen positief signaal gaven voor dit pathogeen. Bij de resultaten van de RLB bleek dat enkele teken van reeën, edelherten en een teek afkomstig van een damhert positief waren bevonden, terwijl geen enkel bloed sample een positief resultaat toonde. Deze resultaten zijn in overeenstemming met met de resultaten van het vorige deel van dit onderzoek; waar 14% van de teken positief getest waren en *Rickettsia* ook niet in de verschillende gastheren kon worden aangetoond. Naast catch-all-signalen in de teek van een ree en teken van edelherten, werd *Rickettsia helvetica* aangetoond in een teek van een damhert. (Stańczak et al, 2007)

Er zijn geen gegevens bekend van reservoirfuncties voor *Rickettsia* bij wilde hoefdieren in Europa. Bij een onderzoek in Japan bij sikaherten (*Cervus nippon*) is aangetoond dat deze hertensoort een potentieel reservoir is voor *R. helvetica* in Japan. (Inokuma et al, 2008)

Bij een onderzoek naar de besmettingsgraad met *Rickettsia* van 2141 *Ixodes ricinus*-teken in Zuid-Duitsland, bleek 12% het pathogeen te bevatten; tevens werd met sequensing DNA van *R. helvetica* aangetoond. Hiermee werd de mogelijke rol aangetoond van *R. helvetica* in *I. ricinus* als een mogelijke bron van infecties bij de mens. (Wölfel et al, 2006)

Kloneren

Van de 10 uitgevoerde kloneringsreactie kwamen weinig resultaten. De DNA-sequenties van de meeste samples toonden echter geen teken-gebonden pathogenen aan. Het is mogelijk dat er tijdens de klonering of bij het sequensen iets mis gegaan is. Ook is er een mogelijkheid dat de resultaten van de RLB niet correct zijn en de aangetoonde pathogenen niet in de desbetreffende teek of het bloedsample aanwezig zijn.

Een resultaat van de klonering toonde 96% overeenkomst met het pathogeen *Babesia odocoilei*. Om zeker te stellen of het hier om dit pathogeen gaat (afkomstig van het Witstaarthert), of dat er toch sprake is van een ander pathogeen, zal een tweede klonering moeten worden uitgevoerd. Er zal opnieuw een sequentie bepaling van het gezuiverde DNA moeten plaatshebben.

In de meeste gevallen worden de wilde hoefdieren geschoten in de thorax, het diafragma blijft dan intact. Soms wordt echter ook de pens geraakt. Het afgenomen bloed kan in die gevallen gecontamineerd raken met protozoa en bacteriën uit de pens. Het resultaat van een klonering toonde 99% overeenkomst met protozoa afkomstig uit de pens. Een verklaring hiervoor kan zijn dat PCR-producten aangaan kruisreacties met protozoa. Verscheidene protozoa vertonen genomische overeenkomsten met bepaalde teken-gebonden protozoa als *Babesia* en *Theileria*. Bij de Reverse Line Blot kunnen deze protozoa als een bepaald catch-all-sigitaal worden gesignaleerd, welke vals-positieve reacties zijn.

Pathologisch Onderzoek

Van een vijftal reeën, waarvan bloed en teken zijn onderzocht op de aanwezigheid van teken-gebonden pathogenen, zijn de sectiegegevens vergeleken. Twee reeën (valwild) toonden ziekteverschijnselen als vermageringen zwakte. Bij het sectiebeeld van deze dieren was een vergrote milt zichtbaar, met proliferatie van de witte pulpa. Wanneer de resultaten van de RLB van bloed samples van deze twee dieren worden vergeleken, valt op dat het bloed van beide dieren verscheidene *Babesia*-soorten bevatten.

Van andere onderzoeken bij diersoorten als honden en runderen zijn soortgelijke sectiegegevens bekend. Dit betroffen oa. onderzoeken bij honden met *B. canis*-infectie (De Lange et al, 2005) en runderen met *B. divergens*. (Zintl et al, 2003) *In de literatuur is echter niets bekend over dergelijke bevindingen bij reewild.*

Nader onderzoek (zowel diagnostisch als pathologisch) zal moeten plaatshebben om conclusies en vergelijkingen te kunnen trekken tussen sectiebeelden en de aanwezigheid van teken-gebonden ziekten.

Reflectie Materiaal en Methoden

In de 172 geteste teken werd geen enkel *Borrelia*-positief sample (bloed en teken) gevonden na de PCR. Halverwege het onderzoek is voor de samples die getest werden voor *Borrelia* een ander programma gebruikt tijdens het amplificatieproces in de thermocycler. Dit programma, met enkele verlaagde temperatuurstappen, was beter geschikt om de *Borrelia*-primers te verlengen. Echter, ook met dit programma werd geen enkel sample positief getest op *Borrelia*. Het is mogelijk dat de primers, die gebruikt zijn voor de PCR-reactie, niet optimaal hebben gewerkt en hierdoor een zwak signaal hebben afgegeven bij de gelelectroforese.

Conclusie

Wilde hoefdieren blijken een reservoirfunctie te vervullen voor *Babesia*, *Bartonella* en *Ehrlichia/ Anaplasma*.

Babesia/Theileria was aanwezig in reeën (29%), edelherten (27%), damherten (14%), en in teken (1,2%). Mogelijk is er geen effectieve overdracht van wild op teken. *Babesia divergens* is aanwezig in hertensoorten. *Babesia odocoilei* is mogelijk aanwezig bij het ree.

Borrelia was niet aanwezig in het bloed van wilde hoefdieren, wel in teken (2,9%). De werking van antilichamen speelt hierbij waarschijnlijk een rol. De voor de mens pathogene soorten (*B. garinii*, *B. Afzelii*) zijn aangetoond. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* is in dit deel van het totale screeningsonderzoek niet aangetoond.

Bartonella was aanwezig in reeën (29%), edelherten (55%) en in teken (9,3%). De infectiegraad bleek in het vorige deel hoger te zijn dan in dit deel van het screeningsonderzoek. *B. schoenbuchensis* is aangetoond in wilde hoefdieren en in teken.

Ehrlichia/ Anaplasma was veelvuldig aanwezig in zowel wild: reeën (24%), edelherten (27%), damherten (24%) als teken (20,9%). De overdracht van het bloed op de teken lijkt effectief te verlopen. *Ehrlichia/ Anaplasma* was aanwezig in alle onderzoeksgebieden. De meeste postieve testuitslagen bleken die van de *Anaplasma phagocytophila*-groep

Rickettsia/Nicolleia bleek niet aantoonbaar in het bloed van de wilde hoefdieren, wel in teken: *Rickettsia*: 6,9%, *Nicolleia*: 9,9%. Deze pathogenen lijken geen reservoir te hebben bij wilde hoefdieren in Nederland.

Wat betreft het pathologisch onderzoek is er geen correlatie gevonden tussen valwild en reguliere afschot, wat betreft teken-gebonden ziekten. Er zijn te weinig gegevens vanuit de onderzoeksresultaten en literatuur bekend om conclusies te kunnen trekken.

Door middel van vervolgonderzoek kunnen meer onderzoeksgebieden betrokken worden bij het screeningsonderzoek, zodat er meer onderzoeksresultaten gebruikt kunnen worden. Hierbij zullen in de toekomst ook de grensgebieden (Duitsland, België) moeten worden meegenomen, aangezien enkele natuurgebieden grensoverschrijdend zijn of met elkaar in verbinding zijn gebracht door middel van ecologische verbindingzones. Concluderend zal geëvalueerd moeten worden of de uiteindelijke onderzoeksresultaten van het algehele screeningsonderzoek een basis kunnen vormen voor het uitvoeren van een 'risk assessment' of dat er nog aanvullende informatie moet worden verzameld. Deze risk assessment kan een uitgangspunt voor zowel publieksvoorlichting alsook waardevolle informatie zijn voor zowel professionals (artsen/dierenartsen) om differentiaal diagnostisch een afweging te kunnen maken en/of welke tekenoverdraagbare aandoeningen in Nederland een rol spelen. (Borgsteede, 2005)

Dankwoord

Ik wil Prof. Dr. Frans Jongejan en Dr. Marja Kik bedanken voor de mogelijkheid om dit onderzoek te kunnen doen. Tevens wil Drs. Ard Nijhof en Jesper Balk bedanken voor hun begeleiding bij alle laboratoriumwerkzaamheden, hun kritische blik, zinvolle opmerkingen en de gezellige sfeer tijdens de uitvoering en uitwerking van dit onderzoek.

Dit onderzoek is mede mogelijk gemaakt voor de Koninklijke Nederlandse Jagers Vereniging, Faunazaken, Margriet Montizaan en Faunabeheereenheid Zeeland Liduin Pree-van't Westende. Zonder materiaal uit de onderzoeksgebieden, afkomstig van de wilde hoefdieren, was dit onderzoek niet mogelijk geweest. Voor dit deel van het screeningsonderzoek bedank ik de wildbeheerders voor hun participatie, interesse en enthousiasme. In het bijzonder noem ik hierbij Dhr. Brinkman en Dhr. Wensink, met wie ik heb kunnen ervaren hoe de jacht in de praktijk in zijn werk gaat. Ook wil ik Lidewij Wiersema, Jolianne Rijks en alle overige betrokken werknemers van het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) bedanken voor de samenwerking binnen het Wildlife-project.

Literatuurlijst

- Aberer, E., What Should One Do in Case of a Tick Bite? (2009) Department of Dermatology, Medical University of Graz, Graz, Austria., *Curr Probl Dermatol.* 37:155-166.
- Bodaan, C., Nijhof, A.M., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jansen, S., Jongejan, F. (2007) Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren in Nederland. *Tijdschr. Diergeneesk.* 132 (13): 517-523
- Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., Boer, de A., Dijkstra, J., Het verloop van tekenpopulaties en de besmetting van teken met *Borrelia* en *Ehrlichia*, Resultaten van onderzoek in de periode 2000_2005 Animal Sciences Group WUR, Divisie Infectieziekten
- Breitschwerdt E., B., Kordick, D., L., (2000) *Bartonella* Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection
- Butler, C., Nijhof, A., M., Jongejan, F., Kolk van der, H. (2008), *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses in the Netherlands. *Vet Rec.* 162:216-217
- Butler, J., M., Roper, T., J., (1995) Ectoparasites and sett use in European badgers, References and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must this article. School of Biological Sciences, University of Sussex
- Camacho, T., Pallas, E., Gestal J., J., Guitián, F., J., Olmeda A., S., Telford, S., R., (2002) *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain and A. Spielman Laboratorio Lema & Bandín, C./Lepanto, 5 Bajo, 36201, Vigo, Spain
- Cook, G., C., (1996) Manson's Rickettsial diseases. In: *tropical diseases*. 20th Ed. London: Saunders., 2
- Cotté, V., Bonnet, S., Rhun, Le, D., Le Naour, Le, E., Chauvin, A., Boulouis, H., J., Benoit, L., Lilin, T., Vayssier-Taussat M., (2008) Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*, *Emerg Infect Dis.* 14(7): 1074–1080
- Cowan, G. (2000) Rickettsial diseases: the typhus group of fevers—a Review *Postgrad Med J* 76:269–272
- Dehio, C., Sauder, U., Hiestand, R., (2003), Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a Blood-Sucking Arthropod Causing Deer Ked Dermatitis, Division of Molecular Microbiology, Interdisciplinary Center for Microscopy, Biozentrum of the University of Basel, Basel, Switzerland, Accepted 18 June 2004 *Journal of Clinical Microbiology*, p. 5320-5323, Vol. 42, No. 11

- Devlin, T., M., (2002) *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Fifth edition, New York
- Dorrestein, G. M., Jongejan, F., Rijpkema, S., (1996) Survey of tick related problems in roe deer (*Caperolus capreolus*) in The Netherlands, *Vet Q* 18 Suppl 3: S148
- Eijpe, A., A., H., (2002) Ontsnippering van het Gooi, de Eempolder en de randmeren een literatuuronderzoek naar bestuurlijke en landschappelijke potenties en knelpunten voor ecologische verbindingszones, Wetenschapswinkel Biologie, Sectie Natuurwetenschap & Samenleving, P-UB-2002-02
- Guner, E., S., (1996) Complement evasion by Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-cultures; role of fibronectin in complement resistance. *Experientia*; 52: 364-372
- Herbes, R., G., Verbeek-De Kruif, N., Rijpkema, S., G., T., Schellekens, J., F., P., (1995) Populatiodynamiek en fenologie van teken in Nederland, Onderzoek naar de aanwezigheid van *Borrelia Burgdorferi* in reeën en teken in drie gebieden in Nederland. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 120, 722-725
- Herwaldt, B., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U, Giovanni Poletti, G., Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S., Norman J. Pieniazek, (2003) Molecular Characterization of a Non-*Babesia divergens* Organism Causing Zoonotic Babesiosis in Europe, *Emerging Infectious Diseases* Vol. 9, No. 8
- Hunfeld, K., Brade, V., (2004) Zoonotic *Babesia*: Possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in central Europe, Institute of Medical Microbiology, University Hospital of Frankfurt, *Germany Int. J. Med. Microbiol.* 293, Suppl. 37, 93-103
- Inokuma, H., Seino, N., Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Igota, H., Inoue, S., (2008) Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, Volume 44, pp. 164-167
- [Jaenson, T., G., T.](#), [Tälleklint, L.](#) (1992) Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. Section of Entomology, Department of Zoology, University of Uppsala, Box 561, S-751 22 Uppsala, Sweden. *Journal of Medical Entomology*
- Jongejan, F. (2001) Teken en door teken overgedragen ziekten. *Diergeneeskundig Memorandum* 1
- Jongejan, F. , Uilenberg, G., (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3-S14
- Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoel M, Top J, Schouls L. (1994) Reverse Line Blot hybridisation in the detection of tick-borne diseases as published in

BTi September 2004 Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA probes.
FEMS Microbiol letters 119: 19 – 26

- Lange, de T., de Nijhof A., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Jongejan, F., (2005) Autochtone babesiose bij de hond in Nederland geassocieerd met lokale *Dermacentor reticulatus* teken, *Tijdschr Diergeneeskd*; 130: 234-8
- Liang, F., T., Jacobs, M., B., Bowers, L., C., Philipp, M., T.,(2002) An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliose. *J.Exp. Med.* 195: 415-422
- Linder, S., Heimerl, C., Fingerle, V., Aepfelbacher, M., Wilske, B., (2001) Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect Immun*; 69(3):1739-46
- Matjila T., P., A., M., Taoufik, A Houwers, D., Teske, E., Penzhorn B., L., Lange de, T., Jongejan, F., (2005) Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands, Division of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands^bDepartment of Veterinary Tropical Diseases, University of Pretoria
- Matsumoto, K., Berrada, Z., Elissa Klinger, Goethert, H. (2008) Molecular Detection of *Bartonella schoenbuchensis* from Ectoparasites of Deer in Massachusetts, Telford, III. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 8(4): 549-554
- Mehlhorn,H., (2008) *Encyclopedia of Parasitology*. Third edition, Volume 1
- Montizaan, M., (2007) Babesiose, edelherten en runderen, *De Nederlandse Jager*, 07, 2007
- Nilsson, K., Pahlson, C., Lukinius, A., Eriksson, L., Nilsson, L., Lindquist, O., (2002) Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis*; 185(8):1128-38.
- Podsiadly, E., Chmielewski, T., Sochon, E., Tylewska-Wierzbanska, S., (2007). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* Ticks Removed from Dogs *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 7(2): 189-192
- Rauter, C., hartung, T., (2005), Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis, Biochemical Pharmacology, Faculty of Biology, University of Konstanz, Germany
- Rijpkema, J., Nieuwenhuijs, F., F., J., Franssen, L., . Jongejan, F., (1994) Infection rates of *Borrelia burgdorferi* in different instars of *Ixodes ricinus* ticks from the Dutch North Sea Island of Ameland

- Rijpkema, S., G., Herbes, R., G., Verbeek-de Kruif, N., Schellekens J., F., P., (1996) Detection of Four Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks Collected from Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in the Netherlands, *Epidemiology and Infection*, Vol. 117, No. 3, pp. 563-566
- Rijpkema S., G., Molkenboer, M., J., Schouls L., M., Jongejan, F., Schellekens, J., F., (1995) Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 33: 3091 – 3095
- Schouls, L. M., Pol van de ,I., Rijpkema, S., G., Schot, C., S., (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2215-2222
- Skotarczak, B., Małgorzata Adamska, M., (2005) Detection of Bartonella DNA in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in ticks removed from deer, Springer-Verlag 2005
- Stańczak, J., Racewicz, M., ^a, Jerzy Michalik, J., Buczek, A., ^c, (2008) Distribution of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* tick populations in Poland, *J Wildl Dis.* 44(1):164-7
- Vos, S., de, Jongejan, F., (2000) ongepubliceerde waarnemingen, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 13, No. 3 p: 428-438
- Wielinga, P., Gaasenbeek, C., Fonville, M., Boer, de A., Vries, de A., (2006) Longitudinal Analysis of Tick Densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* Infections of *Ixodes ricinus* Ticks in Different Habitat Areas in The Netherlands
- Wölfel, R., Terzioglu, R., ; Kiessling, J., Wilhelm, S., Essbauer, S., Pfeffer, M., Dobler, G., (2006) *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Bavaria, Germany, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 1078, Number 1, pp. 509-511(3)
- Zandvliet, M., M., J., M., Teske, E., Piek, C., J., (2004). Ehrlichia-en Babesia-infecties bij de hond in Nederland. *Tijdschrift Diergeneeskunde.* 129, 740-745
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H., Taylor, S., Gray, J., (2003), *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance, Department of Veterinary Microbiology & Parasitology and Conway Institute of Biomedical & Biomolecular Research, *Clinical Microbiology Reviews*, , Vol. 16, No. 44, p. 622-636

- <http://www.bertgaljaard.nl/algemeen/hetree.html>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- http://www.hetedelhert.nl/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=598
- <http://journals.cambridge.org> Downloaded: 19 Jan 2009 IP address: 131.211.160.178
- <http://www.mcharts.be/artsen/Documenten/Labomailing/092006lm.pdf>
- http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bul1405/lyme_fenologie.html (3 of 5)3-5-2006 13:12:20Infectieziekten Bulletin 14.05 2003
- <http://www.faunabeheereenheid.nl/drenthe/faunaschade/veroorzaakte%20schade/schade-5.doc/:edelhert-algemeen&catid=42:fauna-edelhert&Itemid=113>
- <http://www.zoogdiervereniging.nl/node/478>
- www.veluwshert.nl
- <http://www.nojg.nl/Indexpagina/Archief%20nieuws%20en%20actualiteiten/Verslag%20van%20het%20Nederlands-Duits%20overleg%20wld%20zwijnen%20in%20Heinsberg.htm>
- <http://www.knjv.nl/default.asp?id=521&menu=>
- <http://www.pcrstation.com/nl/colony-pcr/>
- <http://www.dassenwerkgroepbrabant.nl/pages/brabantpag.html>
- [http://nl.wikipedia.org/wiki/Das_\(dier\)\)](http://nl.wikipedia.org/wiki/Das_(dier)))

Bijlage 1: Tap- en verzendinginstructie; Bloedafname en tekenverzameling

BLOED

Per afgeschoten dier wordt zo spoedig mogelijk na het afschot bloed opgevangen.

Dit kan door van het te verbloeden stuk grofwild zo spoedig mogelijk 1 (paarse of blauwe) bloedbuis rechtstreeks met bloed vol te zuigen of vol te doen met bloed vanuit een andere spuit.

Indien het nog mogelijk is kan dit bloed direct uit de halsader getrokken worden.

Anders kan tijdens het ontweiden het bloed rechtstreeks uit de hart/hartslagader genomen worden, dan wel uit de borstholte gezogen worden.

In ieder geval mag het bloedmonster NIET genomen worden uit een emmer waarin het bloed van opgehangen wild genomen worden. Dit bloed kan nl vervuild zijn met maagzuur dat uit de slokdarm gelekt is.

Hygiënisch werken (schoon materiaal, schone handen) en zo snel mogelijk bloed opvangen en opzuigen tijdens of na het verbloeden.

Op de blanco sticker wordt m.b.v. een watervaste viltstift, het unieke wildnummer geschreven. De ingevulde sticker wordt op de EDTA-buis geplakt.

De buizen worden in een koelkast/gekoelde ruimte (4-7°C) bewaard.

TEKEN

Zodra het dier afgeschoten is, gaarne zoveel mogelijk (evt. volgezogen) teken voorzichtig verwijderen en in de aangeleverde potjes doen.

Op de blanco sticker wordt m.b.v. Een watervaste viltstift, het unieke wildnummer geschreven. De ingevulde sticker wordt op het potje geplakt.

De potjes worden in een koelkast/gekoelde ruimte (4-7°C) bewaard.

VERZENDEN:

De bloedbuisjes (en evt. potjes met teken) worden eerst in een absorberend stoffen zakje gedaan (er passen max. 6 in een zakje). Dit wordt in het afsluitbare plastic zakje gedaan, deze graag dichtplakken. Vervolgens komt dit in een gewone envelop. Deze envelop komt vervolgens in een met plastic gevoerde stootbestendige envelop. Dus achtereenvolgens:

- absorberend stoffen zakje
- afsluitbare plastic zakje
- gewone envelop
- stootbestendige envelop

De buizen en potjes kunnen worden verstuurd in de aangeleverde enveloppen naar:

Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD)

t.a.v. de tickbusters, Jos Wolters

Faculteit Diergeneeskunde,

Universiteit Utrecht, Yalelaan 1,

3584 CL Utrecht

(zie sticker)

Kosten voor het verzenden worden gedeclareerd.

Bijlage 2: Protocol DNA extractie (teken en bloed)

Teken

1. Zet een waterbad aan (56°C) en zet de T1 er in.
2. Selecteer de teken.
3. Nummer de epjes (2 ml epjes), corresponderend met de nummers van de teken.
4. Maak de teken schoon (in een buisje milliQ op de vortex) en leg ze op het filterpapier.
5. Doe 180 µl T1 in de epjes.
6. Snij de teken in kleine stukken (elke teek met een ander mesje) en doe ze in het bijbehorende epje (m.b.v. een pincet die na elke teek wordt gewassen in de 70% ethanol en milliQ).
7. Mix de teken in het epje m.b.v. een mixer (de mixerstaven worden na elke teek gewassen in de milliQ, 70% ethanol en opnieuw milliQ).
8. Voeg 25 µl proteinase K toe aan de epjes.
9. Vortex.
10. Incubeer de epjes gedurende 1½ h. in een waterbad (56°C) onder schudden.
11. Na 1 h. het hitteblok aanzetten (70°C) en de B3 erop leggen.
12. Haal de epjes uit het waterbad en voeg 200 µl B3 toe.
13. Incubeer de epjes gedurende 12 min. in het hitteblok (70°C).
14. Pak de column's en opvangbuisjes. Nummer de column's, corresponderend met de nummers van de teken.
15. Leg de BE op het hitteblok (70°C).
16. Voeg 210 µl 100% ethanol toe aan de epjes.
17. Vortex en centrifugeer (2 min., 11.000 rpm).
18. Breng het mengsel over in de column's. Centrifugeer (1 min., 11.000 rpm). Gooi het vocht in de opvangbuis weg.
19. Voeg 500 µl BW toe. Centrifugeer (1 min., 11.000 rpm). Gooi het vocht in de opvangbuis weg.
20. Voeg 600 µl B5 toe. Centrifugeer (1 min., 11.000 rpm). Gooi het vocht in de opvangbuis weg.
21. Centrifugeer (2 min., 11.000 rpm).
22. Plaats de column in een 1,5 ml epje en voeg 100 µl voorverwarmde BE toe (70°C), direct op de membraan.
23. Incubeer voor 3 min.
24. Centrifugeer 1 min. bij 8.000 rpm, daarna nog 1 min. bij 11.000 rpm.
25. Label het epje met het nummer van de teek en doe het in de vriezer bij -20°C.

Bloed

Het protocol voor de DNA extractie uit bloed is grotendeels gelijk aan dat voor de DNA extractie uit teken. Stap 13 t/m 25 uit het bovenstaande schema zijn in beide protocollen gelijk (met die opmerking dat je bij de DNA extractie uit bloed uiteraard de nummers van het bloed noteert en niet de nummers van de teken). De stappen 1 t/m 12 worden vervangen door de volgende stappen:

1. Zet het hitteblok aan (70°C) en leg de B3 erop.
2. Selecteer de bloedmonsters.
3. Nummer de epjes (1,5 ml epjes), corresponderend met de nummers van het bloed.
4. Pipetteer 200 µl bloed in de bijbehorende epjes.
5. Voeg 200 µl B3 toe en 25 µl proteinase K.
6. Vortex.

Bijlage 3: Protocol PCR

Stap 1 t/m 4 in de PCR ruimte, stap 5 t/m 7 in de flowkast.

1. Merk vijf 1,5 ml epjes met de vijf verschillende pathogenen.
2. Maak in deze epjes vijf verschillende mastermixen. De supertaq PCR buffer, dNTP/dUTP mix, forward- en reverse-primer moeten vóór toevoegen worden gevortexd.

* $n = \text{aantal DNA samples} + 1 \text{ positieve controle} + 1 \text{ negatieve controle} + 1 \text{ of } 2 \text{ extra}$
De extra hoeveelheid die je toevoegt compenseert voor eventuele kleine verliezen die bij het pipetteren optreden. Wanneer je met een grote hoeveelheid samples (> 20) werkt, voeg je twee extra hoeveelheden toe. Wanneer je met minder samples werkt is één extra hoeveelheid voldoende.

3. Vortex en centrifugeer de mastermixen kort.
4. Verdeel de vijf verschillende mastermixen over afzonderlijke microcentrifuge tubes (20 µl per tube), welke duidelijk zijn gemerkt met het betreffende pathoogeen. Het aantal tubes dat je per mastermix moet vullen is gelijk aan het aantal samples dat je wilt testen + twee (een positieve en een negatieve controle).
5. Verdeel de DNA samples over de microcentrifuge tubes. Ieder DNA sample krijgt vijf eigen microcentrifuge tubes (één per pathoogeen), waar per tube 5 µl van het sample in wordt toegevoegd.
6. Doe 5 µl milliQ in de vijf negatieve controles.
7. Doe 2,5 µl milliQ + 2,5 µl positieve controle in de vijf positieve controles.
8. Plaats de microcentrifuge tubes in de thermocycler en stel het PCR-programma in.
9. Bewaar de PCR-producten in de vriezer bij -20°C.

Bijlage 4: Protocol gelelectroforese

1. Los 1,5 gram agarose op per 100 ml 1x TAE door het geheel te verwarmen in de magnetron.
2. Koel het geheel iets af onder de kraan en voeg dan 2,5 µl ethidiumbromide (10 mg/ml) toe per 100 ml oplossing. Goed mengen door middel van zwenken.
3. Giet het mengsel over in een gel tray, waarvan de uiteinden zijn afgesloten met (autoclaaf) tape. Verwijder belletjes met een pipetpunt en plaats de kammen in de gel.
4. Laat de gel minimaal 30 tot 45 min uitharden bij kamertemperatuur.
5. Verwijder de kammen en de autoclave tape en plaats de gel in een electroforese bak.
6. Voeg electroforese buffer toe indien nodig (1x TAE buffer, tot 1 mm over de gel).
7. Meng de verschillende PCR-producten in een "96 wells plate" met een "6x Loading Dye Solution" (steeds 5 µl PCR-product met 1 µl Loading Dye).
8. Vul de slotjes in de gel met deze mengsels (steeds 5 µl). De buitenste slotjes worden gevuld met 5 µl DNA Ladder Mix.
9. Laat gedurende 30 tot 45 min een stroom door de gel lopen van maximaal 125 V.
10. Bekijk de gel onder een UV-illuminator met behulp van het programma Labworks. Maak een foto van het eindresultaat.

Bijlage 5: Protocol RLB

1. Maak een lijst met alle samples die op de RLB gaan, inclusief A/E-, T- en B-probe is er plaats voor 43 samples.
2. Zet het waterbad aan op 50°C, de incubator op 42°C en de buisjesincubator op 100°C.
3. Zet de 2xSSPE / 0,1%SDS en de 2xSSPE / 0,5%SDS in het waterbad op 50°C.
4. Nummer het benodigde aantal 1,5 ml epjes.
5. Vul de epjes met 150 µl 2xSSPE / 0,1%SDS.
6. Voeg aan de desbetreffende epjes 10 µl van elk pathogeen-sample toe.
7. Zet de epjes 10 min in de buisjesincubator op 100°C, waarna ze onmiddellijk gekoeld moeten worden op ijs.
8. Centrifugeer de epjes nadat ze zijn afgekoeld.
9. Incubeer de membraan 5 minuten in 2xSSPE / 0,1%SDS bij kamertemperatuur onder zacht schudden.
10. Plaats de membraan in de miniblotter met de slotjes haaks op de probes.
11. Verwijder overbodige vloeistof door deze op te zuigen.
12. Vul de slotjes met de PCR-producten (150 µl), voorkom luchtbellens. Vul de buitenste en eventuele lege slotjes met 2xSSPE / 0,1%SDS.
13. Incubeer de miniblotter voor 60 minuten bij 42°C op een horizontaal oppervlak, zonder schudden.
14. Verwijder de samples door ze op te zuigen.
15. Verwijder de membraan uit de blotter.
16. Was de membraan 2x in voorverwarmd 2xSSPE / 0,5%SDS voor 10 minuten in het waterbad op 50°C onder zacht schudden.
17. Incubeer de membraan met 20 ml 2xSSPE / 0,5%SDS en 5 µl streptavidine (eerst samen mengen) voor 30 minuten op 42°C in de incubator.
18. Was de membraan 2x met 2xSSPE / 0,5%SDS voor 10 minuten op 42°C in het waterbad onder zacht schudden.
19. Was de membraan 2x met 2xSSPE voor 5 minuten op kamertemperatuur onder zacht schudden.
20. Gooi de 2x SSPE weg.
21. Doe 10 ml ECL (5 ml ECL 1 + 5 ml ECL) over de membraan en schud voor een aantal minuten zodat de membraan volledig bedekt is.
22. Plaats de membraan tussen twee overhead sheets (om hem te drogen).
23. Incubeer op kamertemperatuur voor tenminste 1 min.
24. Plaats de membraan tussen twee schone overhead sheets, verwijder luchtbellens door er met een doekje overheen te wrijven en plaats het geheel in de exposure cassette.
25. In een donkere kamer: plaats een röntgenfilm in de cassette, doe de cassette dicht en laat hem liggen voor 10 min.
26. Haal de film uit de cassette en ontwikkel hem.
27. Was de membraan 2x 30 min in voorverwarmde 1%SDS oplossing (90°C) in een waterbad van 90°C onder zacht schudden.
28. Leg de membraan in 20 mM EDTA en bewaar deze op 4°C.

Bijlage 6: Test-pathogenen RLB

1. *Anaplasma marginale*
2. *Anaplasma phagocytophilum* 1
3. *Anaplasma phagocytophilum* 3
4. *Anaplasma phagocytophilum* 5
5. *Anaplasma phagocytophilum* 7
6. *Babesia catch-all* 1
7. *Babesia catch-all* 2
8. *Babesia canis* 2
9. *Babesia crassa catch-all*
10. *Babesia divergens*
11. *Babesia microti*
12. *Babesia bigemina*
13. *Babesia rossi*
14. *Babesia venatorum* (= *Babesia* sp. (EU 1))
15. *Babesia vogeli*
16. *Borrelia burgdorferi sensu lato*
17. *Borrelia afzelii*
18. *Borrelia burgdorferi sensu stricto*
19. *Borrelia garinii*
20. *Borrelia valaisiana*
21. *Ehrlichia* / *Anaplasma catch-all*
22. *Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ovina*
23. *Ehrlichia schotti*
24. *Nicolleia catch-all*
25. *Orientia catch-all*
26. *Rickettsia catch-all* (*Rickettsia* specifiek)
27. *Rickettsia helvetica*
28. *Rickettsia* sp. (DnS14) / *raoultii*
29. *Rickettsia massiliae*
30. *Rickettsia conorii*
31. *Theileria* / *Babesia catch-all*
32. *Theileria catch-all*
33. *Theileria annae*
34. *Theileria cervi*
35. *Theileria equi* 2
36. *Theileria orientalis* 2
37. *Bartonella catch-all*
38. *Bartonella elizabethae*
39. *Bartonella grahamii*
40. *Bartonella henselae*
41. *Bartonella quintana*
42. *Bartonella schoenbuchensis*
43. *Bartonella vinsonii*

Bijlage 7: Protocol Klonering

Preparatie van electrocompetente cellen

1. Voeg 5ml van een overnachte cultuur aan 100 ml LB medium in een erlenmeyer
2. Laat 60-90 minuten staan
3. Breng het over in 50ml buisjes en laat gedurende 30 min staan op ijs
4. Centrifugeer bij 4°C gedurende 15 min met 3500rpm
5. Was met 50ml ijskoud steriel H₂O.
6. Centrifugeer bij 4°C gedurende 10 min met 3500rpm
7. Herhaal stap 5 en 6
8. Was met 2,5 ml gesteriliseerd glycerol 10%
9. Centrifugeer bij 4°C gedurende 10 min
10. Suspendeer in 250µl (ongeveer hetzelfde volume als van de pellet) ijskoud glycerol 10%
11. Laat staan op ijs voor directe electroporatie of bewaar 100µl in een eppendorfcupje bij -70°C.

Precipitatie van de ligatie

1. Centrifugeer de ligatie
2. Voor 10µl: voeg 1µl 3M NaAc PH 5,2 toe, voeg 25µl 100% ethanol toe
3. Bewaar bij -80°C gedurende 30 minuten
4. Koel de centrifuge tot 4°C
5. Centrifugeer met maximale snelheid gedurende 15 minuten
6. Verwijder het supernatant
7. Was de pellet (onzichtbaar) met 150µl 70% EtOH (-20°C)
8. Centrifugeer gedurende 15 minuten
9. Droog de pellet bij kamertemperatuur gedurende 5 minuten
10. Los de pellet op in 10µl MilliQ en bewaar op ijs

Electroporatie

1. Voeg 5 µl ligatie en 50 µl electrocompetente cellen toe in een 2 ml buis
2. Bewaar op ijs gedurende minstens 1 minuut
3. Centrifugeer kort, pipetteer de oplossing in electroporatie-cuvettes
4. Stroomstoot: 2,48kV, 200Ω, 25µF, gedurende 3.5-4.5 msec.
5. Was de oplossing uit de cuvette met 1ml SOC (4ml SOB met 80µl MgCl₂ en 40µl glucose 2M in flowkabinet)
6. Schud gedurende 1 uur bij 37°C
7. Plaat 50µl uit op een LB-Ampcillineplaat met 30µl IPTG 100mM en 30µl X-Gal
8. Incubeer overnacht bij 37°C

Bijlage 8: Protocol Zuivering van DNA

Isolatie van DNA-plasmides uit E. Coli met Nucleospin® Plasmid

1. Kweek van bacteriën: Centrifugeer 1-5ml van de E. coli LB cultuur bij 11,000 x g gedurende 30 sec. Verwijder het supernatant.
2. Lyseren van cellen:
3. Voeg 250µl buffer A1 toe. Los de pellet op door grondig te vortexen.
4. Voeg 250µl buffer A2 toe. Mix voorzichtig door het eppendorfcupje 6-8 maal om te keren (niet vortexen). Incuberen bij kamertemperatuur, maximaal 5 minuten
5. Voeg 300µl buffer A3 toe. Mix voorzichtig door het eppendorfcupje 6-8 maal om te keren (niet vortexen).
6. Klaring van het lysaat: Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 5-10 minuten bij kamertemperatuur
7. Binden van DNA: Plaats een Nucleospin® Plasmid-column in een 2 ml-eppendorfcupje en pipetteer het supernatant (van stap 3) op de column. Centrifugeer bij 11,000 x g. Gooi het vocht in de opvangbuis weg.
8. Membraan wassen: Plaats de Nucleospin® Plasmid-column terug in een 2 ml-eppendorfcupje en voeg 600µl buffer A4 toe. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 1 minuut. Gooi het vocht in de opvangbuis weg.
9. Membraan drogen: Plaats de Nucleospin® Plasmid-column in een leeg 2 ml-eppendorfcupje. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 2 minuten.
10. Elueren: het scheiden van gezuiverd DNA. Plaats de Nucleospin® Plasmid-column in een leeg 1,5 ml- eppendorfcupje. Voeg 50µl buffer AE toe. Incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 1 minuut.
11. Het vocht in de opvangbuis is het gezuiverde DNA.

Bijlage 9: Uitslagen RLB

In de onderstaande tabellen staan alléén pathogenen vermeld die in ten minste één sample *positief getest* hebben. Zie bijlage 5 voor een compleet overzicht op de geteste pathogenen.

<i>Babesia/Theileria</i>	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n =21	n=106	n=11	n =58	n=21	n=2	n = 1	n = 2	n = 5	n = 4
Theileria/Babesia catch-all	5	-	2	-	2	-	-	-	-	-
Babesia catch-all 1	6	-	3	2	3	-	-	-	-	-
Babesia catch-all 2	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Babesia canis 2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Babesia divergens	6	-	3	-	1	-	-	-	-	-

<i>Borrelia</i>	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n =21	n=106	n=11	n =58	n=21	n=2	n = 1	n = 2	n = 5	n = 4
<i>Borrelia afzelii</i>	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-

<i>Bartonella</i>	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n =21	n=106	n=11	n =58	n=21	n=2	n = 1	n = 2	n = 5	n = 4
<i>Bartonella</i> catch-all	6	4	5	11	-	-	1	-	-	-
<i>Bartonella schoenbuchensis</i>	2	3	-	1	-	-	-	-	-	-

<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n =21	n=106	n=11	n =58	n=21	n=2	n = 1	n = 2	n = 5	n = 4
<i>Ehrlichia/Anaplasma</i> catch-all	5	18	1	14	5	2	-	-	-	-
<i>Ehrlichia schotti</i>	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 1	1	-	1	4	-	-	-	-	-	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 3	3	6	-	2	-	-	-	-	-	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 5	-	1	1	4	-	-	-	-	-	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> 7	2	5	2	11	-	-	-	1	-	-

<i>Rickettsia</i>	Reeën		Edelherten		Damherten		Moeflon		Wild zwijn	Das
	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	n =21	n=106	n=11	n =58	n=21	n=2	n = 1	n = 2	n = 5	n = 4
<i>Rickettsia catch-all</i>	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-
<i>Rickettsia helvetica</i>	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Nicolleia</i>	-	10	-	6	-	1	-	-	-	-