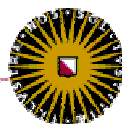


Moleculaire detectie van teken-gebonden zoönosen in
Ixodes hexagonus teken afkomstig van katten in
Nederland.



Arjen Oldehinkel
September 2009 – december 2009

Universiteit Utrecht



Moleculaire detectie van teken-gebonden zoönosen in
Ixodes hexagonus teken afkomstig van katten in
Nederland.

Auteur: Drs. A. Oldehinkel
Stagelocatie: Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD),
Departement Infectieziekten en Immunologie,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
Stageperiode: september 2009 – december 2009
Begeleiding: Prof. Dr. F. Jongejan, Drs. A.M. Nijhof, Ing. J.A. Balk

Afbeelding voorpagina: 72 Ixodes hexagonus teken afkomstig van 2 sheep dogs [18]

Inhoudsopgave

1. Abstract	3 -
2. Samenvatting	4 -
3. Inleiding	5 -
3.1 Inleiding en achtergrond	5 -
3.2 Teken	5 -
3.2.1 Inleiding	5 -
3.2.2 De levenscyclus van de familie Ixodidae	6 -
3.2.3 Ixodes hexagonus	7 -
3.2.4 Teken en pathogenen	8 -
3.2.5 Teken en symbionten	8 -
3.3 (Teken-gebonden) zoönosen	9 -
3.3.1 Inleiding	9 -
3.3.2 Orde der Rickettsiales	9 -
3.3.2a Familie der Anaplasmataceae; Genus Anaplasma	9 -
3.3.2b Familie der Rickettsiaceae; Genus Rickettsia	10 -
3.3.3 Bartonella	12 -
3.3.4 Lyme Borreliosis	15 -
3.3.5 Q-koorts, Coxiella burnetii	17 -
3.3.6 Francisella tularensis	19 -
4. Materiaal en Methode	21 -
4.1 Verzamelen en identificatie van teken	21 -
4.2 DNA-extractie	21 -
4.3 PCR-amplificatie	21 -
4.4 Gelelectroforese	23 -
4.5 Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie	24 -
4.6 Sequencing	25 -
5. Resultaten	26 -
5.1 PCR	26 -
5.2 RLB	27 -
5.3 Sequencing	29 -
6. Discussie	30 -
7. Conclusies	33 -
8. Dankwoord	34 -
9. Referenties	35 -
10. Bijlagen	45 -
10.1 Overzicht inzendingen I. ricinus en I. hexagonus bij katten per provincie:	45 -
10.2 Protocol DNA-extractie	46 -
10.3 Sequenties gebruikte primers	47 -
10.4 Protocol PCR	48 -
10.5 Protocol gelelectroforese	49 -
10.6 Protocol RLB	50 -
10.7 Sequenties gebruikte probes	51 -
10.8 Overzicht verkregen sequenties na sequencing	52 -

1. Abstract

Ticks are vectors of a great diversity of pathogens, which can be of both veterinary and human medical interest. Besides the emerging of the number of vector-borne diseases in humans, the frequency of the number of vector-borne diseases in companion animals in Europe is also rising. This study has tried to map out the prevalence of a number of tick-borne zoonoses in *I. hexagonus* ticks originating from cats in the Netherlands.

Since the way of life of *I. hexagonus* is totally different from that of *I. ricinus* and because there has only been limited research to *I. hexagonus*, there has been chosen to investigate *I. hexagonus* ticks.

With screening by polymerase chain reaction (PCR) and reverse line blot (RLB) hybridization, 182 ♀ *I. hexagonus* ticks – collected from July 2005 up to September 2009 – from the collection of the *Utrecht Centre for Tick-borne Diseases* (UCTD), were screened for the presence of *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* and *Rickettsia* spp.

The screened *I. hexagonus* ticks were infected with *A. phagocytophilum* (2.75%) and *B. schoenbuchensis* (2.20%). This is the first time that *B. schoenbuchensis* is demonstrated in ticks originating from cats. *B. schoenbuchensis* is associated with the zoonosis deer ked dermatitis, although the exact role in the etiology of this disease remains to be elucidated.

Further, there were positive results for *R. helvetica* and there was one positive result for *R. massiliae*. Because the 16S rRNA sequences of 2 other samples which were positive for *Rickettsia* spp. by RLB did not match the 16S rRNA sequence of any known *Rickettsia* spp., these results should be carefully interpreted.

It was remarkable that *B. burgdorferi* sensu lato was not found in any of the screened ticks.

On account of – during this investigation – encountered problems with a newly developed diagnostic RLB test for *Francisella* and *Coxiella*, there are no reliable results concerning the prevalence of these pathogens. At the moment the UCTD is working to prevent such problems in the future.

To conclude: more research at tick-borne zoonoses is desirable, because not from all infectious agents it is known whether they are a zoonosis or not and it is not always known what the role of ticks is in the transmission of these agents.

2. Samenvatting

Teken zijn vectoren van een grote verscheidenheid aan pathogenen die zowel van veterinair als humaan medisch belang kunnen zijn. Naast de opkomst van het aantal vectorgebonden ziekten bij mensen, is ook de frequentie van het aantal vectorgebonden ziekten bij huisdieren in Europa aan het toenemen. Met dit onderzoek is getracht de prevalentie van een aantal teken-gebonden zoönosen bij *I. hexagonus* teken afkomstig van katten in Nederland, in kaart te brengen.

Aangezien de levenswijze van *I. hexagonus* totaal verschillend is van die van *I. ricinus* en omdat er nog slechts beperkt onderzoek is gedaan naar *I. hexagonus* is ervoor gekozen om juist de *I. hexagonus* teken te onderzoeken.

Met behulp van de polymerase chain reaction (PCR) en reverse line blot (RLB) hybridisatie, zijn 182 ♀ *I. hexagonus* teken – die verzameld zijn tussen juli 2005 en september 2009 – uit de verzameling van het *Utrecht Centrum voor Tekengebonden ziekten* (UCTD) onderzocht op de volgende (groepen) pathogenen *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* en *Rickettsia spp.*

De onderzochte *I. hexagonus* teken waren geïnfecteerd met *A. phagocytophilum* (2,75%) en *B. schoenbuchensis* (2,20%), dit is de eerste keer dat *B. schoenbuchensis* is aangetoond in teken afkomstig van katten. *B. schoenbuchensis* wordt in verband gebracht met de zoönose 'hertenluisvlieg dermatitis'. De exacte rol van *B. schoenbuchensis* in de etiologie van deze ziekte, moet echter nog worden opgehelderd.

Verder waren er positieve resultaten voor *R. helvetica* en was er een monster positief voor *R. massiliae*. Omdat de 16S rRNA sequenties van 2 andere monsters – die positief waren voor *Rickettsia spp.* op RLB – niet overeen kwamen met de 16S rRNA sequentie van andere bekende *Rickettsia spp.*, moeten deze resultaten wel voorzichtig geïnterpreteerd worden.

Opmerkelijk is dat er geen *B. burgdorferi* sensu lato aangetroffen is in de teken.

Wegens – tijdens dit onderzoek aan het licht gekomen – problemen met een nieuw ontwikkelde diagnostische RLB test voor *Francisella* en *Coxiella*, zijn er geen betrouwbare resultaten over de prevalentie van deze pathogenen. Momenteel is het UCTD bezig om dergelijke problemen in de toekomst te voorkomen.

Geconcludeerd kan worden dat meer onderzoek naar teken-gebonden zoönosen wenselijk is, omdat nog lang niet van alle infectieuze agentia bekend is of ze een zoönose zijn en wat de rol is van teken in de verspreiding van deze agentia.

3. Introductie

3.1 Inleiding en achtergrond

Teken zijn vectoren van een grote verscheidenheid aan pathogenen die zowel van veterinair als medisch belang kunnen zijn [1].

Van de groeiende lijst van humane pathogenen, zijn er 61% zoönotisch. Van de opkomende infectieziekten zijn er 75% zoönotisch, het grootste deel daarvan is afkomstig van wildlife [2].

De opkomst van vectorgebonden ziekten is voornamelijk toe te schrijven aan de wereldwijde klimaatverandering en aan veranderingen in de activiteiten en het gedrag van mensen (bijv. toename van mobiliteit, toerisme en outdoor activiteiten) [2, 3].

Opkomende zoönosen in Europa die (mogelijk) te linken zijn aan teken, betreffen o.a.: *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens*, en *Rickettsia* spp. [2, 3].

Naast de opkomst van het aantal vectorgebonden ziekten bij mensen, is ook de frequentie van het aantal vectorgebonden ziekten bij huisdieren in Europa aan het toenemen. Vanwege de nauwe contacten tussen mensen en hun huisdieren, kunnen gedomesticeerde carnivoren een rol spelen als signalering van mogelijke ziekten bij hun eigenaars, wat de rol van veterinairen in de diagnose van dergelijke opkomende ziekten versterkt [3].

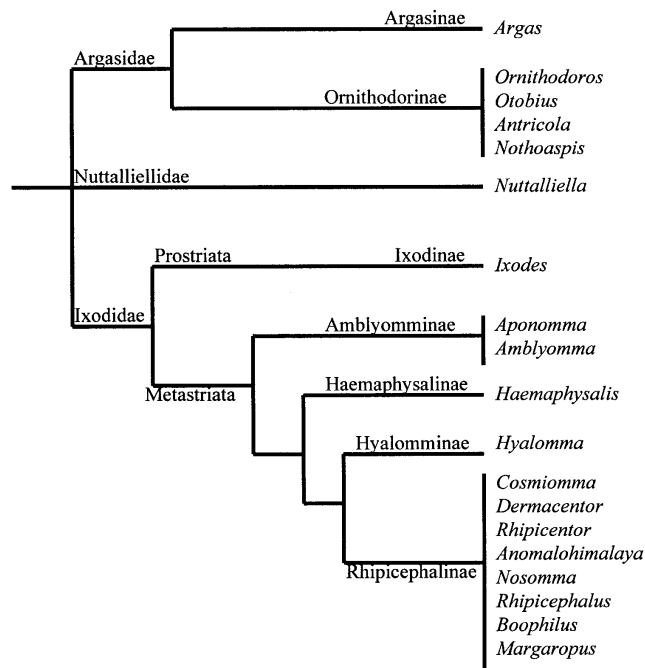
De opkomst van zoönosen en van vectorgebonden infecties bij o.a. gezelschapsdieren maakt het belangrijk om de prevalentie van deze opkomende zoönosen in kaart te brengen om op deze manier de opkomst ervan te kunnen volgen en op basis hiervan - indien nodig - betere bestrijdings- en voorlichtingsmaatregelen te kunnen nemen.

3.2 Teken

3.2.1 Inleiding

Teken zijn obligaat bloedzuigende arthropoden die behoren tot de meest belangrijke vectoren van humane en dierlijke ziekten [4].

Er zijn ongeveer 890 soorten teken bekend, onderverdeeld in 2 grote families: de Ixodidae (of harde teken) bezitten een gekeratiniseerd schild en de Argasidae (of zachte teken) hebben geen gekeratiniseerd schild [4]. Een derde familie, de Nuttalliellidae, bestaat uit slechts een species en komt alleen in Zuid-Afrika en Tanzania voor [4-6]. De familie Ixodidae, is verreweg de grootste en economisch gezien meest belangrijke familie, met 13 genera en ongeveer 650 species. De familie Argasidae bestaat uit 5 genera en ongeveer 170 species [4].



Figuur 1: Classificatie van teken [7]

Honden en katten in Nederland worden vooral geïnfesteerd door volwassen *Ixodes ricinus* teken (92,3%), daarnaast werd *Ixodes hexagonus* ook frequent gevonden [1].

Bij een onderzoek naar het voorkomen van teken bij honden en katten in Groot-Brittannië en Ierland, werd ook *I. ricinus* het meest (52%) gevonden. De op een na meest voorkomende teek was *I. hexagonus* (39%). Opmerkelijk was dat *I. ricinus* hier significant vaker voorkwam bij honden dan bij katten, terwijl katten frequenter *I. hexagonus* bij zich droegen. De onderzoekers suggereren dat dit te maken heeft met verschillen in het gedrag tussen honden en katten, wat van invloed is op de waarschijnlijkheid om *I. ricinus* of *I. hexagonus* tegen te komen [8].

Ook een onderzoek in Frankrijk liet zien dat katten het meest worden geïnfesteerd door *I. hexagonus* [9].

Een overzicht van het percentage *I. hexagonus* infestaties – t.o.v. het totaal aantal infestaties door teken - bij katten in Nederland is te vinden in [bijlage 10.1](#). Hierbij valt op dat *I. hexagonus* teken bij katten relatief vaker voorkomen in de zuidelijke provincies dan elders in het land.

Voor het onderzoek in het kader van deze onderzoekstage zijn *I. hexagonus* teken afkomstig van katten gebruikt, deze teken behoren tot de familie Ixodidae.

3.2.2 De levenscyclus van de familie Ixodidae

De meeste soorten hebben een 3-gasterige levenscyclus. In dat geval zoekt ieder actief stadium, actief naar een gastheer, waar het zich gedurende een aantal dagen voedt. Daarna valt de teek van de gastheer af, om vervolgens een geschikte plek in de natuurlijke omgeving op te zoeken om te kunnen vervellen tot het volgende stadium [4].

Alle teken doorlopen 4 stadia: het embryo bevattende eitje en de 3 actieve stadia: het larvale stadium dat 3 paar poten heeft; in het geval van de Ixodidae, 1 nymphaal stadium met 4 paar poten; het adulte stadium, dat ook 4 paar poten heeft. Sexueel onderscheid is alleen mogelijk bij het adulte stadium. De ♂ teken hebben een schild die hun gehele dorsale lichaamsoppervlak bedekt, hierdoor wordt de expansie van het lichaam van de ♂ teken belemmerd. Het schild van de

♀ teken bedekt slechts een deel van het dorsale lichaamsoppervlak en ♀ teken kunnen dan ook enorm in omvang toenemen tijdens een bloedmaaltijd [4].

Bij vrijwel alle species van het genus *Ixodes* vindt – hoewel *Ixodes* spp. de enige harde teken soorten zijn waarbij de paring niet uitsluitend op de gastheer plaatsvindt - de paring op de gastheer plaats. Na de paring nemen de ♀ teken enorme bloedmaaltijden. Vervolgens vallen de ♀ teken van hun gastheer af en gaan op zoek naar een geschikte plek om duizenden eitjes te leggen, bijvoorbeeld onder afgevallen bladeren, rottende vegetatie, of in spleten/ kieren in natuurlijke of door mensen gecreëerde beschutte plaatsen. Ongeveer 90% van de eitjes wordt in de eerste 10 dagen nadat begonnen is met het eitjes leggen, afgezet. Daarna worden nog 5-10 dagen kleine hoeveelheden eitjes afgezet, waarna de uitgeputte ♀ teken sterven. De ♂ teken blijven na de paring meestal op de gastheer, voeden opnieuw en paren met andere ♀ teken [4].

Onder gunstige omstandigheden in de natuur, kan de volledige levenscyclus van 3-gastherige teken - vanaf het moment van uitkomen, tot het uitkomen van de volgende generatie - binnen een jaar worden afgerond. Klimatologische omstandigheden kunnen echter leiden tot vertraging van: de ontwikkeling, het beginnen met eitjesleggen of het zoeken naar gastheren. Hierdoor kan de levenscyclus wel tot 3 jaar duren, bijvoorbeeld bij *I. ricinus* [4].

3.2.3 *Ixodes hexagonus*

I. hexagonus (endofiele/ 'nidicolous' teek) is een 3-gastherige teek waarvan de levenscyclus zich – i.t.t. *I. ricinus* (exofiele/ 'non-nidicolous' teek) - m.n. afspeelt in de nesten en holen van zijn gastheer [10, 11]. De verspreiding van *I. hexagonus* is dan ook meer geconcentreerd vergeleken met bijvoorbeeld *I. ricinus* die op tal van plekken verspreid in de vegetatie voorkomt [12]. *I. ricinus* voedt dan ook op een grote variëteit gastheren op het Europese continent, deze teek kan namelijk voeden op meer dan 300 verschillende soorten waaronder zoogdieren, vogels en reptielen [13]. *I. hexagonus* is daarentegen relatief gastheerspecifiek, deze teek voedt met name op carnivoren zoals vossen en marterachtigen en op egels, de teek staat ook wel bekend als 'hedgehog tick'. De teek voedt ook, maar minder frequent, op knaagdieren, hazen en konijnen [14, 15]. Daarnaast komt *I. hexagonus* o.a. voor op: honden, katten en de mens [1, 8, 10]. *I. hexagonus* voedt dus ook op mensen, maar minder vaak dan *I. ricinus* [14, 16][17].

De teken reageren op stimuli van de gastheer, m.n. geuren als CO₂ en NH₃, maar ook lichaamswarmte [12].



Figuur 2: ♀ *Ixodes hexagonus* teek [18]

Larven worden gezien op het hoofd en de nek, terwijl de adulten graag voeden in de oksel, liesstreek en genito-anele streek [10].

Hoewel *I. hexagonus* teken zijn gevonden op een grote variëteit zoogdier carnivoren, worden de niet-adulte stadia het meest frequent gevonden op egels en vossen [14, 19].

3.2.4 Teken en pathogenen

Teken kunnen op verschillende manieren met bacteriën geïnfecteerd worden: wanneer ze voeden op dieren die deze bacteriën bij zich dragen, of door transstadiële transmissie – passage van bacteriën van het ene, naar het volgende stadium - en transovariële transmissie: overbrengen van bacteriën van de ene, naar de volgende generatie via de ovaria van de ♀ teek [7, 20].

Bij sommige pathogenen kunnen alle vormen van transmissie voorkomen.

Er zijn 3 punten essentieel in het begrijpen van de manieren waarop bacteriën worden overgedragen door teken en de consequenties daarvan, voor teken-gebonden ziekten. Ten eerste: bacteriën die transovarieel worden overgedragen, maar de speekselklieren van de teek niet infecteren, kunnen niet worden overgedragen naar gevoelige gastheren van de teek en kunnen dan ook geen ziekte veroorzaken bij deze gastheren. Ten tweede: ieder stadium van de Ixodidae voedt slechts een keer, waardoor een bacterie die tijdens de maaltijd door een teek is opgenomen, enkel naar een andere gast kan worden overgedragen, wanneer de teek verveld is naar zijn volgende ontwikkelingsstadium (transstadiële transmissie van de bacterie) en op zoek gaat naar een nieuwe gastheer. Niet alle species in een genus zijn echter in staat om bacteriën transstadiel over te dragen. Tenslotte, wanneer bacteriën zowel transstadiel, als transovarieel worden overgedragen in een teken species, zal deze teek ook het reservoir vormen van de bacterie. De verspreiding van de ziekte zal dan identiek zijn aan de verspreiding van de betreffende teek [7, 20].

Hoewel waarschijnlijk erg zeldzaam, kunnen teken mogelijk ook geïnfecteerd worden met bacteriën middels 'cofeeding' – dat is dat verscheidene teken dicht bij elkaar voeden op dezelfde gastheer – waardoor directe verspreiding van bacteriën van een geïnfecteerde, naar een niet geïnfecteerde teek plaats kan vinden. Verder wordt in een aantal gevallen, seksuele transmissie van bacteriën van geïnfecteerde ♂ naar ♀ teken, beschreven [20].

3.2.5 Teken en symbionten

Naast ziekte verwekkers, is het bekend dat teken niet-pathogene, symbiotische microben kunnen dragen [21]. Bacteriële symbionten lijken voor te komen in de meeste harde en zachte teken. Deze microben worden transovarieel overgedragen en lijken niet pathogeen te zijn voor de teken [21]. In de meeste gevallen zijn de functies van deze endosymbionten t.o.v. hun gastheer, niet bepaald. Gebaseerd op de rol van – bacteriële - insecten symbionten, is een nutritionele functie het meest waarschijnlijk. Andere functies zoals antibiotica productie en bescherming tegen parasieten en pathogenen behoren echter ook tot de mogelijkheden [22, 23].

3.3 (Teken-gebonden) zoönosen

3.3.1 Inleiding

Dierlijke gastheren moeten vatbaar zijn voor de bacterie en moeten een relatief lange bacteremie ontwikkelen om effectieve reservoirs voor de betreffende infectie te kunnen zijn. De infectiviteit van de reservoir gastheren, de mate van de teken infestatie, en de 'gastheerdichtheid' zijn grote variabelen die de epidemiologie van door teken-overdraagbare ziekten bepalen. Deze worden beïnvloed door verscheidene fysiologische en ecologische factoren, o.a.: de voorkeur van de verschillende stadia van de teek voor een bepaalde gastheer; de mate van teek-gastheer contact; seizoensactiviteit van zowel teken als gastheer; de vatbaarheid van de geprefereerde gastheer voor de bacteriën; omgevingsomstandigheden; gastheerimmunititeit [7].

Teken dragen bacteriën over op mensen wanneer hun voedingsplaatsen gecontamineerd zijn met: geïnfecteerde speekselsecreties (bijv. spotted fever group rickettsiae, *Borrelia burgdorferi*), geregurgiteerde middendarm inhoud (bijv. *B. burgdorferi*), of feces (bijv. *Coxiella burnetii*). Indirecte transmissieroutes zijn ook mogelijk, zoals contaminatie van schaafwonden of ogen na het platdrukken van teken met de vingers [7].

In dit onderzoek zijn *Ixodes hexagonus* teken m.b.v. PCR en RLB onderzocht op de aanwezigheid van onder andere *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella (henselae)*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi s.s.*, *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Coxiella burnetii*, *Francisella (tularensis)*, *Rickettsia helvetica* en *Rickettsia raoultii*.

Deze verschillende pathogenen zullen nu (kort) besproken worden.

3.3.2 Orde der Rickettsiales

Rickettsiale ziekten zijn zoönosen veroorzaakt door obligaat intracellulaire bacteriën. De taxonomie van de Rickettsiales is de laatste jaren nogal veranderd. Tegenwoordig worden drie groepen ziekten nog steeds geclassificeerd als Rickettsiale ziekten. Dit betreft: (i) rickettsioses door bacteriën van het genus *Rickettsia*, (ii) ehrlichioses en anaplasmoses door bacteriën binnen de familie Anaplasmataceae en (iii) "scrub typhus" door *Orientia tsutsugamushi*, welke wordt overgedragen door bepaalde mijten [20, 24-27].

3.3.2a Familie der Anaplasmataceae; Genus Anaplasma

***Anaplasma phagocytophilum* bij de mens**

Bacteriologie - *Anaplasma phagocytophilum* is de veroorzaker van Humane Granulocyttaire Anaplasmosose (HGA), voorheen stond deze ziekte bekend als Humane Granulocyttaire Ehrlichiose [27].

Vectoren en reservoirs - De pathogeen wordt overgedragen naar mensen en dieren door de beet van *Ixodes* spp. [3]. De teken vormen echter niet het reservoir van HGA [7]. De prevalentie die gevonden is in teken uit verschillende plekken in Europa varieert van 1,2% tot 8,7% [28]. Hoewel andere teken species of genera zoals *Dermacentor* spp. zelden *A. phagocytophilum* dragen, is hun rol als vector nog niet bekend [29].

A. phagocytophilum is in Europa – naast in grote zoogdieren (paarden, vee, schapen, geiten, honden en katten) – ook gevonden in kleine zoogdieren zoals bepaalde muizensoorten en deze zijn gesuggereerd als potentiële reservoirs van *A. phagocytophilum* [30].

Klinische verschijnselen - Sinds het eerst in Europa gerapporteerde geval van HGA in 1997, zijn er - tot 2006 - 22 andere gevallen gerapporteerd in Europa [3]. Ook in Nederland is een geval bekend van HGA bij een 58-jarige man in 1998 [31]. HGA uit zich meestal als een ongedifferentieerde, met koorts gepaard

gaande ziekte in de zomer of lente [32]. De incubatieperiode na de tekenbeet is 7-10 dagen. Symptomen zijn o.a.: hoge koorts, rillingen, gegeneraliseerde spierpijn, ernstige hoofdpijn en malaise [32, 33]. Een verminderde eetlust, misselijkheid, gewrichtspijnlijkheid en een niet-productieve hoest, komen ook vaak voor [33].

Leucopenie en thrombocytopenie worden vaak waargenomen, anemie wordt minder frequent gezien. Ongeveer de helft van de patiënten die met klachten langskwamen bij het St. Mary's Medical Center in Duluth, Minnesota, waren ziek genoeg voor een ziekenhuisopname van gemiddeld 5,8 dagen. De ziekte kan – vooral bij bejaarden – ernstig zijn, als het samengaat met chronische ziekte, een gebrek aan herkenning of een te late specifieke antibioticabehandeling [33].

In de VS zijn fatale gevallen gerapporteerd, de mortaliteit wordt er geschat op ongeveer 1% [33, 34].

In Europa lijkt de ziekte minder erg te zijn dan in de VS en er zijn nog geen sterfgevallen gerapporteerd [35].

Diagnostiek - Voor de bevestiging van HGA gelden de volgende eisen: (i) een met koorts gepaard gaande ziekte met een geschiedenis van een tekenbeet of blootstelling aan teken, en (ii) bewijs van een *A. phagocytophilum* infectie middels een van de volgende 4 punten: (i) seroconversie of (ii) een ≥ 4 -voudige verandering in serum antilichaam titers, of (iii) positieve PCR resultaten met daaropvolgende sequencing, waarbij *Anaplasma*-specifiek DNA in het bloed wordt aangetoond, of (iv) isolatie van *A. phagocytophilum* in een bloed kweek [36].

Behandeling - De ziekte kan effectief behandeld worden met tetracyclines [27].

***Anaplasma phagocytophilum* bij de kat**

Het eerste geval van Feline Granulocytair Anaplasmosis werd gerapporteerd in Zweden in 1999 [37]. Het dier werd gepresenteerd met een sinds 2 dagen aanwezige lethargie, verminderde eetlust en tachypneu. Klinisch onderzoek en laboratorium uitlagen brachten o.a. koorts, dehydratie, hyperglycemie, intracytoplasmatische Ehrlichia insluitlichaampjes in neutrofielen en de aanwezigheid van teken aan het licht. De diagnose werd bevestigd middels PCR en DNA sequencing. Een op doxycycline gebaseerde behandeling leidde tot volledig herstel.

In een groot onderzoek in de VS, waren 4,3% van de 460 onderzochte katten seropositief op *A. phagocytophilum* [38]. In een andere studie die in het noordoosten van de VS werd uitgevoerd – en waar de pathogeen van nature meer voorkomt – waren na een IFA, 30% van de katten positief voor *A. phagocytophilum* antilichamen [39].

3.3.2b Familie der Rickettsiaceae; Genus Rickettsia

Bacteriologie - Teken-gebonden rickettsioses worden veroorzaakt door obligaat intracellulaire gramnegatieve bacteriën die behoren tot de 'spotted fever group' (SFG) [20].

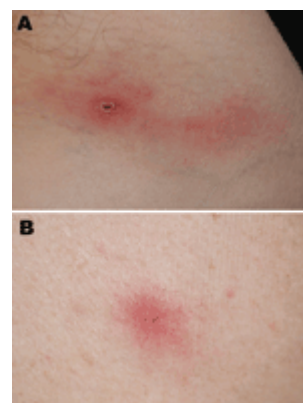
Vectoren - Teken vormen het belangrijkste reservoir van de SFG rickettsiae en de verspreiding van de SFG rickettsioses wordt dan ook bepaald door de verspreiding van de teken [20].

Bij de teken-gebonden rickettsioses komen alle vormen van transmissie – via voeding, transovarieel en transstadieel – voor [20].

Reservoirs - Alhoewel vele dieren (zoogdieren en vogels) vatbaar zijn voor tekengebonden rickettsioses en een rickettsemie en klinische verschijnselen kunnen ontwikkelen, moet de rol van gewervelde dieren als reservoirs voor het behoud van zoönotische foci nog worden bepaald [20]. Mensen lijken geen reservoir te vormen van tegen-gebonden rickettsioses, aangezien ze slechts af en toe door teken worden gebeten en slechts voor korte tijd een rickettsemie ontwikkelen [20].

Klinische verschijnselen, diagnostiek en behandeling – Als pathogene teken-gebonden SFG rickettsiae worden overgedragen naar een menselijke gastheer, komen ze terecht in kleine tot medium formaat bloedvaten, alwaar ze zich vermeerderen. Hier veroorzaken ze een vasculitis, die verantwoordelijk is voor de klinische en laboratorium afwijkingen die voorkomen bij teken-gebonden rickettsioses. De belangrijkste klinische verschijnselen variëren afhankelijk van de betreffende rickettsia species. Maar ze beginnen over het algemeen 6 – 10 dagen na een tekenbeet en betreffen koorts, hoofdpijn, spierpijn, huiduitslag, lokale lymfadenopathie en 1 of meerdere 'inoculation eschars' [20].

Bij verdenking op een rickettsiose wordt normaal gesproken al gestart met een doxycycline behandeling – afhankelijk van de ernst van de ziekte voor de duur van 1 – 7 dagen – voordat de diagnose in het laboratorium bevestigd is. Ook andere antibiotica zijn effectief [40].



Figuur 3: 'Inoculation eschar' bij een *Rickettsia africae* infectie [41]

Rickettsia helvetica

R. helvetica is voor het eerst geïsoleerd uit *I. ricinus* teken in Zwitserland in 1979 [42, 43]. Tot ongeveer 20 jaar na zijn ontdekking, werd *R. helvetica* als een niet-pathogene rickettsia beschouwd. Echter, in 1999, werd *R. helvetica* genoemd bij een aantal gevallen van fatale perimyocarditis bij patiënten in Zweden. De infectie was gedocumenteerd middels electronen microscopie, PCR en serologie [44]. Daarna rapporteerden deze onderzoekers een controversieel verband tussen *R. helvetica* en sarcoidose in Zweden. Bij de validiteit van deze associaties werden echter vraagtekens geplaatst door prominente Rickettsiologen [45, 46].

Daarna zijn er nog een paar patiënten geweest, waarvan een op serologie gebaseerde diagnose bestaat. Deze patiënten hadden relatief milde, zelflimiterende ziekte geassocieerd met hoofdpijn, spierpijn en minder vaak met huiduitslag en/of een 'eschar' [47].

Verdere evaluatie en isolatie van de bacterie van klinische monsters zijn echter nodig om de pathogeniteit van *R. helvetica* met zekerheid vast te kunnen stellen [46].

Rickettsia raoultii

R. raoultii is een recent beschreven SFG rickettsia [48]. Sinds 1999 zijn er verschillende rickettsia genotypen (DnS14, DnS28 en RpA4 genaamd) geïdentificeerd in *Dermacentor* spp. teken op verschillende plaatsen in Europa [48-51].

Door het verkrijgen van isolaten, werd duidelijk dat deze genotypen tot een unieke SFG rickettsia soort behoorden, namelijk *R. raoultii* [48, 52].

R. raoultii DNA is niet alleen gevonden in *Dermacentor* spp., maar is in Polen ook gevonden in *I. ricinus* teken [53].

Er wordt vermoed dat *R. raoultii* een humaan pathogeen is. *R. raoultii* wordt namelijk geassocieerd met tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA), ook wel *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy (DEBONEL) genoemd.

TIBOLA/DEBONEL is een goedaardige, zelflimiterende ziekte met een incubatieperiode van 4-7 dagen. De ziekte wordt gekenmerkt door een 'inoculation eschar' op de kruin met perifeer erytheem en vergrote cervicale lymfeknopen. Hoofdpijn, koorts en een trombocytopenie zijn andere mogelijke bevindingen. Secundaire alopecia komt ook regelmatig voor [54-56]. TIBOLA/DEBONEL kan behandeld worden met doxycycline, een alternatief zijn de nieuwe macroliden [46].

In 2002 werd *R. raoultii* DNA gevonden in een *D. marginatus* teek. Deze teek was afkomstig van een patiënt in Frankrijk, die typische klinische verschijnselen van TIBOLA/DEBONEL ontwikkelde [48]. Bovendien is er DNA – waarvan men nu weet dat het *R. raoultii* DNA is – gevonden in het bloed van een patiënt met TIBOLA/DEBONEL [57]. Daarnaast bestaat bij 7 TIBOLA/DEBONEL patiënten die in Frankrijk gebeten zijn door *Dermacentor* spp. het vermoeden van een *R. raoultii* infectie [58].

Rickettsia (helvetica en Rickettsia raoultii) bij de kat

R. helvetica is al aangetoond in *I. ricinus* en *I. hexagonus* teken afkomstig van katten in Nederland [1].

De klinische significantie van *R. helvetica* voor katten is nog niet bepaald [59].

Bij een Amerikaans onderzoek zijn antilichamen van *Rickettsia* spp. aangetoond bij een aantal katten, maar het is onbekend of de geïnfecteerde katten ook klinische verschijnselen ontwikkelen [60].

3.3.3 Bartonella

Bacteriologie – Het genus *Bartonella* bestaat uit 18 species en 3 subspecies die geassocieerd worden met vlooiën, luizen en zandvliegen [61]. Leden van het genus *Bartonella* zijn kleine, gramnegatieve, aerobe bacteriën [62].

Het onderzoek heeft zich de afgelopen twee decennia primair gefocust op de natuurlijke reservoirs van *B. henselae*, terwijl veel nieuwe *Bartonella* spp. die dierlijke en humane pathogenen zijn, niet bestudeerd worden [63, 64].

Vectoren en reservoirs – Over het algemeen is de kennis die gerelateerd is aan de vector transmissie van *Bartonella* spp. erg incompleet [62]. Verscheidene insecten zijn betrokken bij de transmissie van de verschillende *Bartonella* spp. waaronder: zandvliegen [65]; de humane lichaamsluiz [66]; de kattenvlo [67-69] en teken [70, 71]. Omdat van alle *Bartonella* spp. vermoedt wordt dat ze door vectoren worden overgedragen, zou de vectorvoorkeur voor bepaalde gastheren, de transmissie van deze *Bartonella* spp. kunnen beïnvloeden. Vermoedelijk is deze vector voorkeur, deels verantwoordelijk voor het meer frequente verband van een bepaalde *Bartonella* sp. met een specifieke gastheer, bijvoorbeeld *B. henselae*, *B. clarridgeiae* en *B. koehlerae* in katten [62]. Deze 'voorkeursinfectiviteit' voor specifieke gastheren, lijkt ook een rol te spelen in het bepalen welke dieren geïnfecteerd zullen worden met een bepaalde *Bartonella* sp. [62].

Katten lijken het belangrijkste reservoir te vormen van o.a.: *B. henselae*, de belangrijkste verwekker van kattenkrabziekte; *B. clarridgeiae*, een andere mogelijke verwekker van kattenkrabziekte [67].

Een andere *Bartonella* species, *B. schoenbuchensis* is in Europa geïsoleerd uit de hertenluisvlieg (*Lipoptena cervi* of deer ked) die een natuurlijk reservoir lijkt te zijn, welke de replicatie van *B. schoenbuchensis* ondersteunt. De hertenluisvlieg infesteert gedurende een groot deel van zijn leven herkauwers en neemt regelmatig bloedmaaltijden. Daarom lijkt de hertenluisvlieg een ideale vector te zijn voor efficiënte transmissie van *B. schoenbuchensis* binnen herkauwer populaties. Hertenluisvliegen nemen incidenteel ook bloedmaaltijden van mensen en kunnen dan 'deer ked dermatitis' – hertenluisvlieg dermatitis – veroorzaken. Hoewel niet bekend is was de etiologische verwekker is van deze ziekte, wijzen alle beschikbare gegevens op de transmissie van een bacterie of parasiet via de beet van de hertenluisvlieg, mogelijk is *B. schoenbuchensis* betrokken in het ontstaan van hertenluisvlieg dermatitis [72]. Interessant is namelijk dat *B. schoenbuchensis*, voor wat betreft de *Bartonella* spp. het meest lijkt op *B. bacilliformis* [73], een belangrijk humaan pathogeen, welke de enige is van alle andere *Bartonella* sp. waarvan de vector een vlieg is, namelijk de zandvlieg [74]. Daarnaast lijkt het klinische scenario van hertenluisvlieg dermatitis op de primaire manifestatie van kattenkrabziekte veroorzaakt door *B. henselae*. Alles bij elkaar genomen doen de klinische en histologische eigenschappen van hertenluisvlieg dermatitis denken

aan een humane infectie door bartonellae. Dit wijst er op dat deze pathogenen mogelijk gezien moeten worden als de etiologische agentia van hertenluisvlieg dermatitis, dit moet echter nog verder onderzocht worden [72]. Men heeft nog niet definitief aangetoond dat de hertenluisvlieg *B. schoenbuchensis* overdraagt door een beet. Het is ook mogelijk dat jagers die bloot worden gesteld aan hertenbloed, risicolopen op infectie met *B. schoenbuchensis* [61].

Bij een ander onderzoek – in de VS – is op 2 herten die hertenluisvliegen met *B. schoenbuchensis* DNA bij zich droegen, tevens *B. schoenbuchensis* DNA geïsoleerd uit 4 *I. scapularis* teken. [61]



Figuur 4: Een volwassen ♀ hertenluisvlieg gevonden op een dode ree [75]

De aanwezigheid van hertenluisvliegen met bacterieel DNA impliceert niet zonder meer dat teken die gelijktijdig voeden, geïnfecteerd worden, want verscheidene teken van een hert dat geïnfesteerd werd door hertenluisvliegen met *Bartonella* DNA, testten negatief voor *Bartonella* op PCR. Hoewel er gesuggereerd zou kunnen worden dat hertenluisvliegen geïnfecteerd worden door cofeeding met *Bartonella*-geïnfecteerde teken – alle teken op herten zonder *Bartonella*-positieve hertenluisvliegen, testen negatief – is de rol van teken als vector van *Bartonella* species onbekend. Een andere verklaring voor de bevinding van *Bartonella* DNA in de teken, is dat de herten waar ze op voeden zelf geïnfecteerd waren, maar er zijn geen bloedmonsters van de herten getest. Of *I. scapularis* een competente vector is voor *B. schoenbuchensis*, blijft dan ook speculeren [61].

Klinische verschijnselen – Kattenkrabziekte bij de mens wordt meestal veroorzaakt door de transmissie van *B. henselae* naar de mens. Deze transmissie vindt vooral plaats via een beet of krab van een kat, minder frequent zou transmissie mogelijk zijn via een vlooiën- of tekenbeet [71, 76, 77].

Kattenkrabziekte bij mensen met een goede weerstand is vaak een onschuldige, soms met koorts gepaard gaande ziekte, die meestal vanzelf overgaat. Het begint vaak met één of meerdere knobbeltjes (2-3 mm) op de huid in de buurt van de krab of beet. Dit worden al snel blaasjes met na enkele dagen een korstje erop. Hierna verdwijnen de plekjes weer. Soms heeft men dit niet eens gemerkt. Na ongeveer twee weken kunnen de lymfeklieren groot en pijnlijk worden (lymfeklierontsteking of lymfadenitis). Er kan zich in de lymfeklier een abces vormen. Wanneer men echter contact met speeksel of de beet of krab in het oog heeft opgelopen, kan er een fikse ontsteking van de slijmvliezen rond het oog optreden. Soms leidt dit tevens tot een ontsteking van de lymfeklier bij het oog, waardoor een abces kan ontstaan. Deze lymfeklierontsteking kan weken tot maanden aanhouden (gemiddeld 6 weken), maar verdwijnt uiteindelijk in het geheel spontaan. Bij 1/3 van de patiënten gaat de ziekte in de eerste dagen tot weken gepaard met koorts, hoofdpijn en algemeen ziek zijn. Bij 2 % van de patiënten kan de ziekte leiden tot een hersenvliesontsteking, waarbij men een verlaagd bewustzijn of zelfs coma en stuipen kan krijgen.

Bij mensen met een verminderde weerstand verloopt de ziekte vaak ernstiger. Hierbij vindt men in eerste instantie vaak knobbeltjes en bloedingen in de huid, lever en milt. Deze kunnen met koorts en algemeen ziek zijn gepaard gaan en soms zelfs tot de dood leiden [78].

Diagnostiek – De klinische diagnose ‘kattenkrabziekte’ wordt bij de mens gesteld op basis van de detectie van een vergrote lymfeknoop en mogelijk de aanwezigheid van een klein blaasje of granuloom op de inoculatie plaats, met in de anamnese een beet of krab van een kat. Bevestiging van de diagnose kattenkrabziekte wordt voornamelijk bereikt op grond van serologische testen, zoals een indirecte immunofluorescentie test of een ELISA [79-81].

Behandeling – Bij mensen met een *B. henselae* infectie, is de behandeling met antimicrobiële middelen voor mensen met een goede weerstand, anders dan voor mensen met een verminderde weerstand [82].

Bij patiënten met een goede weerstand met typische gevallen van kattenkrabziekte, zijn verscheidene antimicrobiële middelen toegediend. In de meeste gevallen lijkt toediening van dergelijke middelen echter niet te leiden tot een mildere of korter verlopende infectie [83].

In geval van abcedering is aspiratie of drainage van pus aangewezen, wat leidt tot verlichting en verkorting van de klachten [81].

Een effectieve behandeling voor patiënten met *Bartonella*-geassocieerde endocarditis, zou moeten bestaan uit het gedurende minimaal 2 weken toedienen van een aminoglycoside [84].

Voor patiënten met een verminderde weerstand geldt dat de behandeling minimaal 6 weken moet duren en indien nodig 4–6 maanden moet worden volgehouden. Effectieve middelen voor deze patiënten zijn tetracyclines, erythromycine, rifampine, doxycycline, of een combinatie van deze middelen [82].

Bartonella bij de kat

Er zijn verscheidene *Bartonella* spp. geïdentificeerd in wilde en gedomesticeerde katten: *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae* en *B. bovis*, voorheen bekend als *B. weissii*. *B. henselae* is echter de meest prevalente en meest verspreide species [62].

De prevalentie van de bacteremie van *Bartonella* in katten is variabel, maar vaak hoog (9-90%) [62].

Een asymptomatische infectie met *B. henselae* of *B. clarridgeiae* komt regelmatig voor bij katten, die dan ook beschouwd worden als het belangrijkste reservoir voor een humane infectie [85]. De belangrijkste vector van *B. henselae* in katten is de kattenvlo, *Ctenocephalides felis* [67]. De transmissie van kat naar kat van *B. henselae*, vindt plaats via intradermale inoculatie van geïnfecteerde feces van *Ct. felis* [68, 86]. De rol van de kattenvlo in de transmissie van *B. henselae* van katten naar mensen is echter nog niet bewezen [85].

Een recente publicatie rapporteerde de succesvolle experimentele transmissie van *B. henselae* van de speekselklieren van *I. ricinus*, naar katten [87]. Verdere onderzoeken en experimenten zijn echter nodig om de natuurlijke capaciteit van *I. ricinus* om *B. henselae* te kunnen overdragen op katten en mensen, en om het epidemiologische belang van een dergelijke infectie te kunnen bepalen. Zelfs als het niet vaak voorkomt, is de transmissie van *B. henselae* van teken naar individuele patiënten van klinisch belang [88].

Een ziekte associatie met natuurlijk voorkomende *Bartonella* infecties is moeilijk vast te stellen, vanwege de hoge prevalentie in schijnbaar asymptomatische katten. Klinische gevallen bij experimenteel geïnduceerde infecties worden gekarakteriseerd door koorts, lethargie, voorbijgaande anemie, lymfadenomegalie, neurologische disfunctie of reproductie problemen [89-93]. De validiteit van de extrapolatie van data afkomstig van experimenteel geïnduceerde infecties, naar natuurlijk voorkomende infecties blijft echter discutabel [85, 94].

Er zijn slechts beperkte rapportages van klinische gevallen in natuurlijk geïnfecteerde katten. Er is een statistische correlatie tussen natuurlijk

geïnficeerde *B. henselae* infecties bij katten, stomatitis en urineweg aandoeningen [95].

De behandeling van bartonellosis en eliminatie van de bacteremie is problematisch. Waarschijnlijk is totale eliminatie van de infectie namelijk onmogelijk ondanks de inzet van een langdurige behandeling met een combinatie van verschillende antibiotica. Daarnaast is er een groot risico op een hernieuwde blootstelling aan de bacterie [85].

3.3.4 Lyme Borreliosis

Bacteriologie - *Borrelia* species zijn gramnegatieve mobiele spirocheten. Lyme Borreliosis (de ziekte van Lyme) wordt veroorzaakt door 3 van de 10 beschreven species in het *B. burgdorferi* sensu lato complex: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* en *B. afzelii* [96-98]. Daarnaast is er een sterke verdenking dat ook *B. valaisiana*, welke in Europa en Azië voorkomt, van belang is als pathogeen [99, 100].

Volgens de huidige kennis, wordt *B. garinii* het meest gevonden in teken in Europa, gevolgd door *B. afzelii* en *B. burgdorferi* s.s. [101, 102]. *B. valaisiana* lijkt veel minder voor te komen en is slechts in een aantal Europese landen gerapporteerd, waaronder Nederland [103].

Reservoirs - Er zijn indicaties dat de verschillende genospecies mogelijk een verschillende voorkeur hebben voor verschillende reservoir gastheren. Zo lijkt er een specifiek verband te bestaan tussen *B. afzelii* en kleine knaagdieren [104, 105], en werd de overheersende aanwezigheid van *B. garinii* in teken die voeden op migrerende vogels beschreven [106]. Vogels hebben een hogere lichaamstemperatuur en de optimale groeitemperatuur van *B. garinii* ligt hoger dan die van *B. afzelii* en *B. burgdorferi* s.s. [107]. Ook *B. valaisiana* lijkt een verband te hebben met vogels [108].

Bewijs voor reservoir competentie van egels is gevonden in Ierland [109], Duitsland [110] en Zwitserland [111]. Twee studies in Duitsland [112, 113] hebben ook vossen aangeduid als reservoir, maar deze dieren lijken niet erg potente reservoirs te zijn, aangezien de borreliae slecht lijken te worden overgedragen naar teken.

Vectoren - De prevalentie van *B. burgdorferi* s.l. in ongevoede *I. hexagonus* teken is onbekend en inspectie van gastheer nesten is nodig voor de verzameling van aanvullende data over ongevoede vrij-levende *I. hexagonus* teken [11].

Normaal gesproken vindt transstadiële transmissie vaker plaats dan transovariële transmissie. Transovariële transmissie is zeldzaam en teken worden dan ook niet beschouwd als reservoir van *B. burgdorferi* [7]. De infectie van de teek zal meestal verkregen zijn van een reservoirgastheer na een bloedmaaltijd door de larven of nymfen. Vervolgens wordt de infectie transstadieel overgedragen op nymfen of adulten. Meestal is het infectiepercentage het hoogst bij de adulte teken, vermoedelijk omdat zij zowel tijdens de larvale, als tijdens de nymfale stadia de kans hebben gekregen om geïnficeerd te raken [114].

De transstadiële transmissie is aangetoond in *I. ricinus* en *I. hexagonus* [115, 116].

In tegenstelling tot *I. ricinus*, kunnen veel meer *I. hexagonus* ♀, *B. burgdorferi* s.l. doorgeven aan hun nakomelingen, maar de mate van infectie binnen een groep nakomelingen is lager dan bij *I. ricinus*. De prevalentie van transovariële transmissie van in de natuur afkomstige *I. hexagonus* larven blijft echter onbekend [11].

Competente teken vectoren verkrijgen *B. burgdorferi* terwijl ze voeden op geïnficeerde reservoir gastheren. De spirocheten blijven inactief in de darm van de teek terwijl deze vervelt [12]. In het volgende ontwikkelingsstadium penetreren

de spirocheten tijdens het voeden van de teek, de darmwand van de teek, waarna ze zich via de hemolymfe naar de speekselklieren verplaatsen. Ze komen daarna via het speeksel in de gastheer terecht. De migratie van de spirocheten van de darm naar de speekselklieren tijdens de voeding, betekent dat infecties meestal niet eerder plaatsvindt dan 2 dagen na de aanhechting. In een deel van de ongevoede teken, zijn de spirocheten echter al aanwezig in de speekselklieren en kan de transmissie naar de gastheer veel sneller plaatsvinden [117, 118].

Klinische verschijnselen – Men denkt dat het verloop van Lyme borreliosis in 3 stadia verloopt [12, 97, 98].

In het eerste stadium – waarin de infectie gelokaliseerd is – is er bij ongeveer 90% van de patiënten sprake van erythema migrans, wat het kenmerk van de ziekte is. Het verschijnt aanvankelijk als een rode macula of papula op de plaats van de tekenbeet, die 7-10 dagen eerder heeft plaats gevonden. De erythema migrans breidt gedurende dagen of weken ringvormig uit, waarbij in het centrum vaak herstel optreedt [97].



Figuur 5:
Erythema migrans t.g.v. Lyme borreliosis [119]

Tijdens het tweede stadium – het vroege gedissemineerde stadium, waarin de infectie over het lichaam wordt verspreid – zijn er elders in de huid meerdere secundaire huidlaesies. Deze secundaire huidlaesies zijn over het algemeen kleiner en breiden in mindere mate uit. De erythema migrans en de secundaire huidlaesies verdwijnen normaal gesproken binnen 3-4 weken, maar neurologische, cardiale, oculaire en reumatische klachten, kunnen weken tot maanden na het begin van de ziekte optreden [97].

Gedurende het derde stadium van de ziekte – het late of persisterende stadium, dat maanden tot jaren na het begin van de ziekte optreedt – kunnen er huidafwijkingen zijn; intermitterende aanvallen van gewrichtszwelling en -pijn; moeheid; oculaire en neurologische verschijnselen [97].

Verschillen in de klinische manifestatie van de ziekte zijn mogelijk het gevolg van infecties met verschillende *Borrelia* subspecies. *B. afzelii* wordt geassocieerd met erythema migrans en een mildere ziekte dan die veroorzaakt door *B. burgdorferi* sensu stricto. Infecties met *B. garinii* worden frequenter geassocieerd met neurologische afwijkingen, terwijl infecties met *B. burgdorferi* sensu stricto vaker worden geassocieerd met reumatische afwijkingen [97-99, 120].

Diagnostiek – De belangrijkste pijler van de diagnostiek van Lymeborreliose is het klinisch beeld. Als een erytheem kleiner dan 5 centimeter is, moet men na een week controleren of uitbreiding heeft plaatsgevonden. De diagnose Lymeborreliose kan gesteld worden in aanwezigheid van:

- erythema migrans, of
- tenminste één manifestatie van gedissemineerde infectie (bijvoorbeeld zenuw- of gewrichtsaandoeningen), en
- serologische bevestiging in serum en/of liquor cerebrospinalis [81]

Behandeling – In de vroege stadia van de ziekte, is een doxycycline behandeling van 20-30 dagen de aanbevolen behandeling. *B. burgdorferi* is echter ook gevoelig voor β -lactam, waaronder ceftriaxone, die gebruikt wordt om de neurologische vormen van de ziekte te behandelen [97].

Lyme borreliosis bij de kat

Er zijn op dit moment nog geen onderzoeken uitgevoerd om te bepalen in welke mate *Borrelia* species bijdragen aan infectie en ziekte in honden en katten [85].

Hoewel er een *B. burgdorferi* seropositiviteit van 4,8-36% gevonden is bij katten in Groot-Brittannië [121], de VS [122] en Duitsland [123], zijn er nog geen natuurlijk voorkomende klinische gevallen gerapporteerd.

De resultaten van experimentele infecties van katten met *B. burgdorferi* zijn – wat betreft het induceren van klinische verschijnselen – tegenstrijdig. Een onderzoek rapporteerde geen verschijnselen [124], terwijl bij andere onderzoeken een aantal katten met non-specifieke verschijnselen waaronder koorts, lethargie, stijfheid en artritis werden gezien [122, 125].

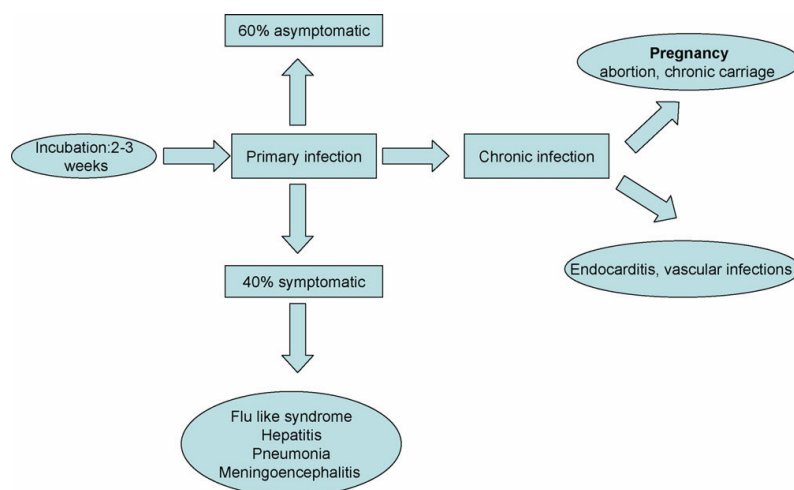
3.3.5 Q-koorts, *Coxiella burnetii*

Bacteriologie – *C. burnetii* is een kleine, obligaat intracellulaire gramnegatieve bacterie en is de veroorzaker van de ubiquitaire zoönose Q-koorts. Q-koorts werd voor het eerst beschreven in 1935 als een met koorts gepaard gaande ziekte bij slachthuiswerkers in Brisbane, Australië. Alle mensen die aangetast werden, werden onderzocht, maar men kon niet tot een diagnose komen. Daarom werd de ziekte 'Q' genoemd, voor 'query (vraagteken) fever'. Later werd gesuggereerd dat de Q stond voor Queensland, de staat waar de ziekte voor het eerst werd beschreven. De bacterie *C. burnetii* kan een soort sporen produceren, die resistent zijn. Deze sporen komen vrij wanneer de cellen lyseren en kunnen lange tijd in de omgeving overleven [126].

Vectoren en reservoirs - De reservoirs zijn omvangrijk, maar slechts gedeeltelijk bekend en omvatten zoogdieren, vogels en geleedpotigen, voornamelijk teken. Rundvee, schapen en geiten vormen het belangrijkste dierlijke reservoir [127]. Transmissie naar mensen vindt voornamelijk plaats via inhalatie van gecontamineerde aerosolen [128, 129].

De bacterie wordt afgescheiden in de urine, feces, melk en in bijzonder hoge concentraties in placenta's en geboortevloeistoffen van geïnfecteerde dieren [127]. Hoewel meer dan 40 tekenspecies van 12 genera op natuurlijke wijze geïnfecteerd kunnen worden met *C. burnetii*, lijken ze niet belangrijk te zijn in het behoud van infecties in vee of mensen [127]. De mogelijkheid van transmissie van *C. burnetii* naar mensen, via een tekenbeet, is slechts zelden gerapporteerd [130]. De bacterie vermenigvuldigt zich echter wel in de darmcellen van teken en grote aantallen *C. burnetii* worden afgescheiden in tekenfeces [131]. De feces van teken die geïnfecteerd zijn met *C. burnetii* bevatten zeer hoge concentraties van de bacterie, die lang kan overleven in de omgeving. Op deze wijze kunnen teken een belangrijke rol spelen in de verspreiding van de bacterie [12]. Gecontamineerde huiden en wol zouden een bron van infectie kunnen zijn voor mensen, namelijk via direct contact of – nadat de feces opgedroogd is – via inhalatie van stofdeeltjes. De bronnen van humane infectie, die het meest zijn geïdentificeerd zijn boerderijdieren zoals rundvee, geiten en schapen [131].

Klinische verschijnselen – Q-koorts wordt geassocieerd met een breed klinisch spectrum: van een a-symptomatische (60%) of milde symptomatische seroconversie, tot fatale gevallen met een mortaliteit van 1-2%. Vanwege de atypische symptomen wordt Q-koorts vaak niet gediagnosticeerd. De incubatieperiode van de acute vorm van Q-koorts kan – afhankelijk van de infectiedosis - variëren van 1 tot meer dan 6 weken. Zo als gezegd kan Q-koorts zich bij mensen manifesteren als een acute vorm – voornamelijk als een zelflimiterende met koorts gepaard gaande ziekte, pneumonie of hepatitis – die in ongeveer 1% tot 5% van de gevallen, kan leiden tot een chronische vorm, welke zich voornamelijk uit als endocarditis.



Figuur 6: Gevolgen van een onbehandelde Q-koorts infectie [126]

De chronische vorm kan zich ook uiten als een chronisch moeheid syndroom en met de zwangerschap gerelateerde problemen, hoewel Q-koorts infecties tijdens de zwangerschap in de meeste gevallen a-symptomatisch zijn. De chronische vorm komt vooral voor bij patiënten met een voorgaande klepaandoening en in mindere mate bij immunodeficiënte patiënten en zwangere vrouwen [127, 132-138].

Diagnostiek – Serologie is het meest belangrijke diagnostische hulpmiddel voor Q-koorts. De indirecte immunofluorescentie test is de belangrijkste bewijsbare diagnostische methode [139].

Behandeling – De meerderheid van de Q-koorts infecties verlopen onopgemerkt en worden niet behandeld. Een toegenomen bewustwording in gebieden met een hoge Q-koorts incidentie is cruciaal. De meeste patiënten met acute Q-koorts zijn a-symptomatisch of hebben slechts milde symptomen en zullen geen contact opnemen met medici. Als er een behandeling wordt ingesteld, zijn er verschillende mogelijkheden.

Patiënten met de acute vorm van Q-koorts zouden moeten worden behandeld met doxycycline gedurende 2 tot 3 weken. Een alternatief is een behandeling met fluoroquinolonen. Voor de behandeling van kinderen wordt cotrimoxazole geadviseerd [140].

Een langdurige behandeling van endocarditis in combinatie met een doxycycline en hydroxychloroquine behandeling gedurende tenminste 12 tot 18 maanden heeft gunstige resultaten opgeleverd [141].

Q-koorts tijdens de zwangerschap, wordt tenminste tot en met de bevalling behandeld met cotrimoxazole. Verdere behandeling met doxycycline en hydroxychloroquine kan het persisteren van de Q-koorts infectie voorkomen [142]. Moeders zouden geïnstrueerd moeten worden om af te zien van borstvoeding en serologische screening is nodig tijdens volgende zwangerschappen [140].

Q-koorts/ *Coxiella burnetii* bij de kat

C. burnetii veroorzaakt in katten een subklinische infectie. De seropositiviteit van *C. burnetii* varieert van 16-20% in populaties van zwervkatten en huiskatten in de V.S., Canada en Japan [143-146].

Geïnfecteerde katten worden als belangrijke reservoirs voor humane infecties beschouwd. *C. burnetii* blijkt vaak voor te komen in de vagina van gezonde katten in endemische gebieden [147] en contact met drachtige katten is een risico factor voor een humane infectie [146, 148].

Een behandeling van katten kan nodig zijn in huishoudens waar er een verhoogd risico is op een humane infectie. De behandeling kan bijvoorbeeld bestaan uit een combinatie therapie van doxycycline en fluoroquinolonen met rifampicine [149].

3.3.6 *Francisella tularensis*

Bacteriologie – *F. tularensis* is een kleine, aerobe, gramnegatieve, intra- en extracellulaire bacterie en is de veroorzaker van tularemie. Er zijn 3 belangrijke subspecies: *F. tularensis* biogroup *tularensis* (biovar A), deze is aanwezig in Noord-Amerika en is de meest virulente species; *F. tularensis* biogroup *holartica* (biovar B), welke overheerst in Europa en Azië, maar ook in de VS wordt gevonden; en *F. tularensis* biogroup *novicida* (voorheen *Francisella novicida*), die gevonden wordt in de VS en een lage virulentie heeft [150].

Merkwaardig is dat *F. tularensis* afwezig is in Groot-Brittannië [12, 150].

Vectoren en reservoirs – De epidemiologie van deze zoönose is complex, *F. tularensis* infecties zijn gemeld bij meer dan 250 diersoorten, waaronder zoogdieren en ongewervelden [151]. Er zijn meerdere ziekte cycli en transmissieroutes gemeld, waaronder via aerosolen; gecontamineerd water; beten van teken, vlooien, muggen en andere dieren [151, 152]. Konijnen, hazen en knaagdieren lijken belangrijke zoogdieren te zijn in de ecologie van de ziekte. Meer dan 90% van alle Amerikaanse gevallen van tularemie lijken gerelateerd te zijn aan blootstelling aan konijnen [153]. In Europa moeten de reservoirs van tularemie nog duidelijk vastgesteld worden [151].

Teken-gebonden tularemie komt waarschijnlijk vaker voor dan in boeken gesuggereerd wordt [154].

Klinische verschijnselen – De incubatieperiode van tularemie is gemiddeld 4-5 dagen, maar varieert van 1 dag tot 21 dagen [12, 155]. De ernst van de ziekte varieert, afhankelijk van het betrokken organisme en de route van inoculatie. Het begin van de ziekte is abrupt en de verschijnselen zijn o.a.: koude rillingen, koorts, hoofdpijn, braken, verminderde eetlust, en moeheid. De meest geziene en meest karakteristieke vorm van de ziekte is de ulceroglandulaire vorm.

In dat geval ontwikkelt zich een papula op de plaats van de tekenbeet, die pustuleus wordt en uiteindelijk ulcereerd (inoculatie eschar), verder wordt deze vorm geassocieerd met regionale lymfadenopathie. Glandulaire, oculoglandulaire en faryngeale vormen, - maar ook vormen met pleuritis en pneumonie (slechte prognose) - kunnen voorkomen [12, 150, 155].



Figuur 7: Duim met een huidulcus t.g.v. tularemie [119]

In Nederland is slechts eenmaal, in 1953, melding gemaakt van tularemie. Het betrof een gezin van acht personen, woonachtig in Horn (Limburg). Zeven van hen

werden ziek na het eten van een – naar later bleek – aan tularemie overleden haas. De diagnose werd serologisch bevestigd. In België werden in 1949, 25 gevallen van tularemie aangegeven [81].

Zonder behandeling, duurt de ziekte meestal 2-3 maanden. De mortaliteit wordt geschat op ongeveer 7% [12, 150, 155].

Diagnostiek – De diagnose tularemie wordt wegens een problematische microbiologische diagnostiek, veelal primair gesteld op basis van de anamnestiche gegevens (teken- of vliegenbeet, contact met weefsels van besmette dieren, mogelijk gecontamineerd water) in combinatie met het klinische beeld. De diagnose wordt bevestigd middels serologie [81].

Behandeling – Hoewel doxycycline en chlooramfenicol gebruikt kunnen worden om de ziekte te behandelen, zijn streptomycine en de aminoglycosiden (gentamicine) de eerste keus middelen. De behandeling moet 7-14 dagen worden volgehouden [150].

Francisella tularensis bij de kat

Katten lijken gevoeliger te zijn voor natuurlijk voorkomende klinische tularemie dan honden en jonge katten lijken meer gepredisponerd te zijn. Katten kunnen geïnfecteerd raken via tekenbeten, maar ook door consumptie van een geïnfecteerde knaagdier-, konijnen- of hazenprooi [85].

De klinische verschijnselen bij geïnfecteerde katten zijn o.a. koorts, lethargie, verminderde eetlust, regionale of gegeneraliseerde lymfadenopathie met abcesvorming, splenomegalie en/of hepatomegalie met abcesvorming, orale ulceratie, leukopenie, icterus en in sommige gevallen sterfte [156-158].

De behandeling van feline tularemie is nog niet grondig onderzocht en is afgeleid van de humane behandeling. Aminoglycosiden, tetracycline, chlooramfenicol en fluoroquinolonen kunnen gedurende 2-4 weken worden toegediend [159].

Geïnfecteerde katten kunnen tularemie via bijten en krabben, overdragen op mensen, maar dit komt niet vaak voor [160-162].

4. Materiaal en Methode

4.1 Verzamelen en identificatie van teken

De 182 teken die voor dit onderzoek zijn gebruikt, zijn afkomstig uit de database van het Tickbusters project van het UCTD (*Utrecht Centre for Tick-borne Diseases*) dat gestart is in 2005 en nog steeds wordt voortgezet. In dit project worden dierenartsen/ eigenaren opgeroepen om teken op te sturen naar het UCTD.

Ingezonden teken worden individueel geïdentificeerd naar species, stadium en sexe met behulp van een microscoop. Elke teek krijgt vervolgens een uniek nummer voordat de teek wordt opgeslagen in 70% ethanol.

Na inventarisatie van de in de database aanwezige – van katten afkomstige – teken, is besloten om dit onderzoek te beperken tot *I. hexagonus* teken afkomstig van katten. Hiervoor is gekozen omdat er nog weinig onderzoek gedaan is naar *I. hexagonus* teken afkomstig van katten en omdat het onderwerp enigszins afgebakend moest worden, aangezien er meer dan 1900 inzendingen (variërend van 1 tot 61 teken per inzending) afkomstig van katten aanwezig zijn in de database.

4.2 DNA-extractie

Middels het vinden van DNA van een pathogeen wordt vastgesteld of een teek geïnfecteerd is met het betreffende pathogeen.

Alvorens DNA-extractie werd uitgevoerd bij de uit de database verzamelde *I. hexagonus* teken, werd de determinatie nog eens gecheckt om er zeker van te zijn dat het *I. hexagonus* teken betreft.

DNA werd geëxtraheerd van 143 ♀ *I. hexagonus* teken met behulp van de NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens het protocol van de fabrikant voor het purificeren van DNA van insecten.

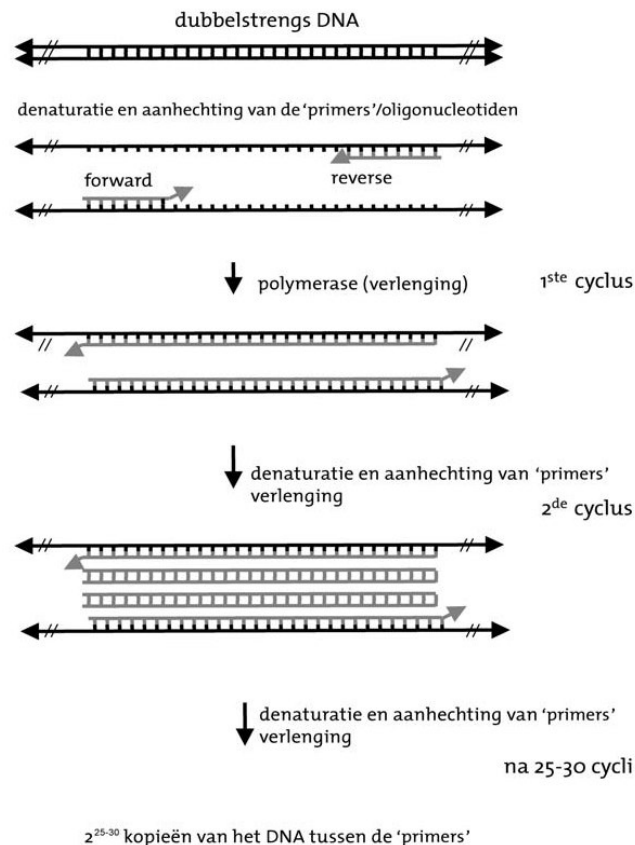
Voor dit onderzoek zijn daarnaast 39 DNA monsters gebruikt van *I. hexagonus* teken die al in een eerder onderzoek geëxtraheerd waren.

(Bijlage 10.2: Protocol DNA extractie)

4.3 PCR-amplificatie

Na DNA-extractie kan met behulp van de Polymerase Ketting Reactie (Polymerase Chain Reaction, PCR) kleine hoeveelheden van specifieke DNA-fragmenten *in vitro* vermeerderd worden.

De PCR werkt als volgt (*figuur 8*): twee specifieke 'primers' – een forward en een reverse primer - (synthetisch geproduceerde stukjes enkelstrengs DNA van 15 tot 30 basen lang), worden zodanig gekozen dat zij het te vermenigvuldigen (amplificeren) gebied begrenzen. De primers zijn naar elkaar toe gericht: de ene primer is complementair aan de + streng, de andere aan de – streng van het DNA. Zij worden in overmaat aan de DNA oplossing toegevoegd, waarin zich o.a. de 4 typen nucleotiden (dNTP's), buffer en het hitte bestendige enzym DNA polymerase, Taq (*Thermus aquaticus*)- polymerase bevinden. Het DNA wordt gedenateerd bij 95° C. – waardoor deze in enkelstrengsvorm komt -, waarna de temperatuur verlaagd wordt zodat de primers met de complementaire sequentie kunnen 'annealen' (= het aanhechten van de basenparen). Vervolgens wordt de temperatuur weer verhoogd, zodat het DNA polymerase deze stukken dubbelstrengs DNA als startplaats kan gebruiken voor de verdere synthese van de complementaire streng ('extension'). Na herhaling van de denaturatiestap, zullen de primers niet alleen aan het oorspronkelijke DNA 'annealen', maar ook aan de nieuw gesynthetiseerde complementaire DNA-steng. Bij iedere cyclus van denaturatie, aanhechten en verlengen zal dus een verdubbeling van het aantal DNA moleculen optreden [163].



Figuur 8: schematische weergave principe PCR-proces [163]

Het voordeel van de PCR is dat deze heel gevoelig is, zodat zelfs met kleine hoeveelheden uitgangsmateriaal toch resultaat verkregen kan worden. Een nadeel is dat de PCR ook gevoelig is voor contaminatie [163].

Voor elk pathogeen waarop in dit onderzoek getest werd, werd een aparte PCR reactie gedaan op elk DNA-sample, hiervoor is gebruik gemaakt van de volgende forward- en reverseprimers (zie [bijlage 10.3](#) voor de sequenties)

- Ehrlichia/Anaplasma
- Bartonella
- Borrelia
- Coxiella
- Francisella
- Rickettsia

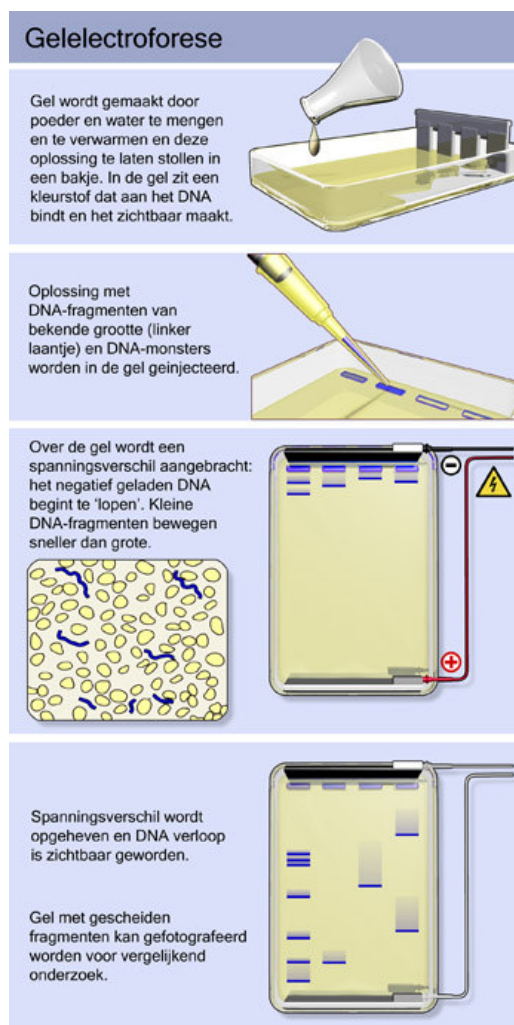
(Bijlag10.4.: Protocol PCR)

4.4 Gelelectroforese

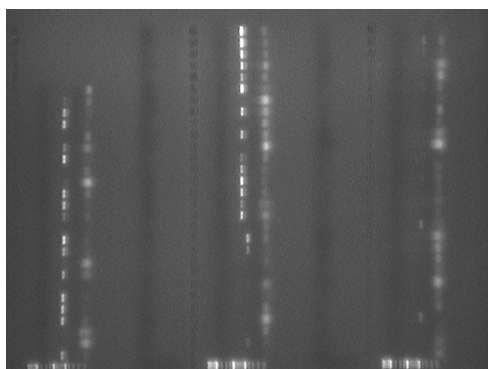
De PCR-producten zijn vervolgens op een 1,5%-agarose gel gezet voor electroforese. Aan deze gel is ethidiumbromide toegevoegd, wat zich bindt aan de DNA fragmenten. Bij de gelelectroforese wordt er een elektrisch veld over de gel gebracht, hierdoor bewegen de negatief geladen DNA-fragmenten door de gel heen richting de positieve elektrode. Doordat grotere DNA fragmenten meer worden afgeremd door de gel dan kleinere DNA fragmenten, worden DNA fragmenten van verschillende groottes van elkaar gescheiden. Dit kan vervolgens zichtbaar worden gemaakt onder UV-licht en er kan een foto van worden gemaakt.

Het doel van de uitvoering van de gelelectroforese is te controleren of de PCR gewerkt heeft a.d.h.v. de positieve en negatieve controles, alvorens de PCR producten te gebruiken voor de RLB.

(Bijlage 10.5.: Protocol gelelectroforese)



Figuur 9: Werking gelelectroforese [164]



Figuur 10: Voorbeeld van het eindresultaat van een gelelectroforese na een PCR. De fluorescerende streepjes zijn positieve reacties.

4.5 Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie

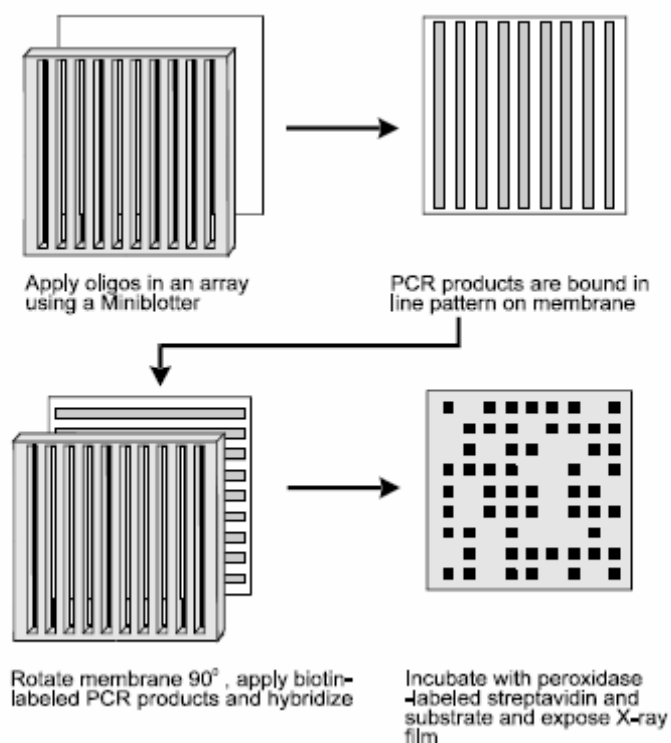
Na controle van de PCR-producten middels gelelectroforese, volgt de volgende stap: de Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie.

De RLB combineert PCR amplificatie, gevolgd door een hybridisatie stap, hetgeen resulteert in een sensitiviteit die tot 1000 keer hoger is dan PCR alleen [165].

Het principe van een RLB is als volgt (zie *figuur 11 en 12*): Met behulp van een miniblatter systeem, kunnen de oligonucleotide sequenties (probes) van maximaal 43 specifieke pathogenen in lijnen worden aangehecht op een membraan [166].

Het miniblatter systeem bestaat uit 2 plastic blokken. Een blok bevat 45 smalle kanaaltjes. Het membraan wordt gefixeerd tussen de beide blokken en middels de kanaaltjes worden de oligonucleotides (probes) in lijnen, covalent gebonden aan de carboxyl-groep van het membraan, via een amino verbinding.

Loodrecht op de lijnen van de oligonucleotides (probes) worden - m.b.v de miniblatter - biotine-gelabelde PCR producten toegevoegd aan het membraan. De betreffende PCR producten zijn gelabeld met biotine doordat een van de primers die gebruikt worden tijdens de PCR, met biotine gelabeld is. Aangezien dubbelstrengs DNA niet kan hybridiseren (hechten) aan de oligonucleotides (probes) op het membraan, worden de PCR producten eerst gedetureerd door ze te verhitten, alvorens ze op het membraan te laden. Na een incubatieperiode, waarin de hybridisatie plaats kan vinden, wordt het membraan gewassen om ongebonden PCR producten te verwijderen [166].

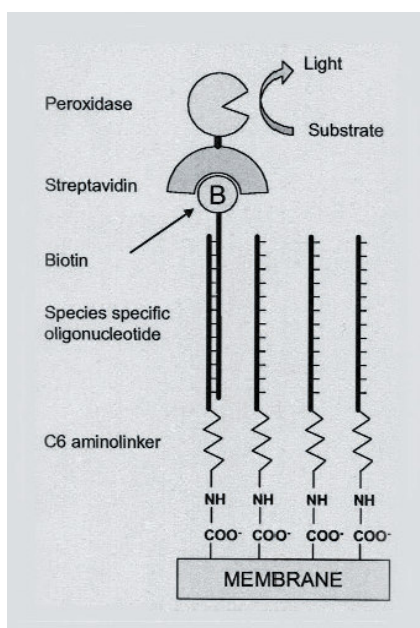


Figuur 11: Schematische weergave uitvoering RLB m.b.v. een miniblatter [166]

De gehybridiseerde biotine-gelabelde PCR producten worden gevisualiseerd door het membraan te incuberen met streptavidine-peroxidase (streptavidine gelabeld met het enzyme peroxidase) en ECL (enhanced chemiluminescence) detectie reagentia (zie *figuur 12*) [165, 166].

De biotine label bindt na incubatie namelijk aan zijn streptavidine ligand, die geconjugeerd is met de peroxidase. De peroxidase zet de ECL detectie reagentia

om in een product dat licht produceert, dat kan worden vastgelegd op een lichtgevoelige film [165, 166].



Figuur 12.: Schematische weergave van het RLB principe [165]

Na ontwikkeling van de film, ontstaan 'blots/ spots' (vlekken) op de plaatsen waar speciespecifieke oligonucleotides (probes) en PCR-producten zijn gehybridiseerd. Vervolgens kan de identiteit van de betreffende pathogenen in het monster worden vastgesteld [165].

(Bijlage 10.6: Protocol RLB)

(Bijlage 10.7: Sequenties gebruikte probes)

4.6 Sequencing

In verband met een aantal opmerkelijke en/of onduidelijke uitkomsten op PCR en RLB is besloten om een aantal monsters nader te laten onderzoeken. Van deze monsters werd opnieuw een PCR ingezet en indien positief werden ze via een aantal vervolgstappen (waaronder plaatsing in een vector om het product te kunnen kloneren), verder bewerkt om uiteindelijk te worden opgestuurd voor sequencing (BaseClear, Leiden, Nederland). Nadat de sequenties bekend waren gemaakt, is geprobeerd om een zo'n groot mogelijk deel van de vectorsequentie van deze sequenties af te halen door de gedeeltes respectievelijk voor en na de forward en reverse primers te deleten. De op deze wijze verkregen 16S rRNA sequenties werden vervolgens ingevoerd in het BLAST programma van het National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Op deze manier worden de verkregen sequenties gekoppeld aan een lijst met pathogenen, die in meer of mindere mate overeenkomen met de betreffende sequentie.

5. Resultaten

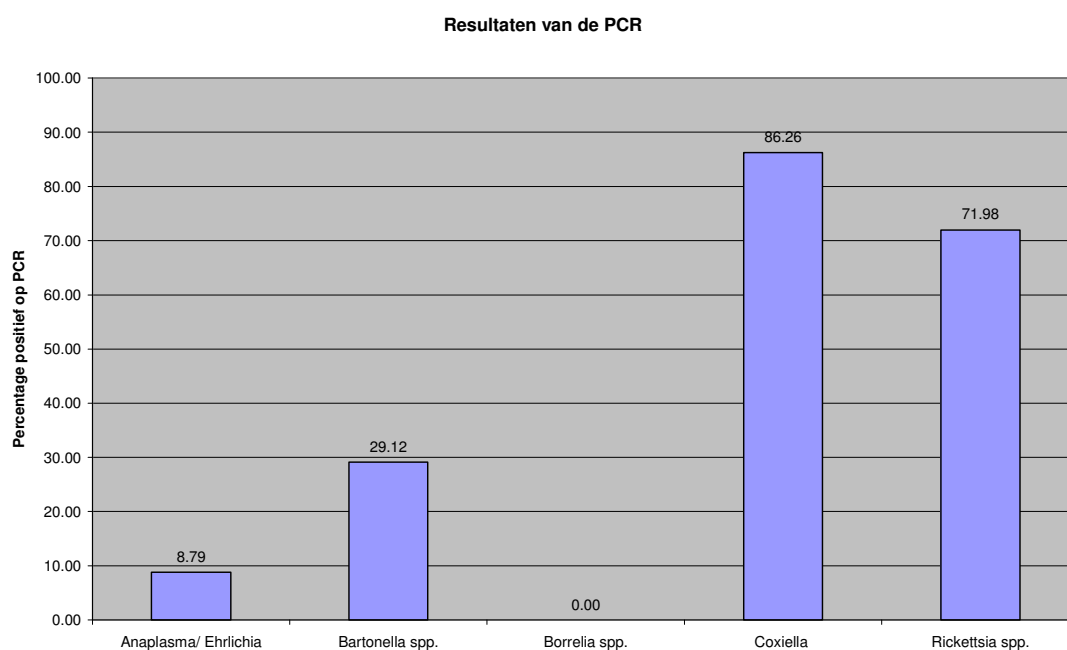
5.1 PCR

In totaal zijn er monsters van 182 adulte ♀ *I. hexagonus* teken onderzocht. Deze waren afkomstig van 106 katten. De onderzochte teken werden opgestuurd in de periode juli 2005 tot en met september 2009.

De betreffende teken zijn onderzocht op aanwezigheid van *Anaplasma*-, *Bartonella*-, *Borrelia*-, *Coxiella*- *Francisella*- en *Rickettsia*-species.

Van de 182 onderzochte monsters, waren 39 monsters al voor een eerder onderzoek gebruikt, de gegevens van dat betreffende onderzoek zijn overgenomen voor dit onderzoek en aangevuld met de resultaten van de pathogenen waar deze monsters nog niet op onderzocht waren, namelijk *Bartonella*-, *Coxiella*- en *Francisella*-soorten.

De resultaten van de PCR staan in onderstaande grafiek weergegeven.



In 8,79% (16/182) van de gevallen was de PCR positief voor *Anaplasma/ Ehrlichia* spp. De PCR was positief voor *Bartonella* spp. in 29,12% (53/182) van de gevallen. Verder werden respectievelijk 86,26% (157/182) en 71,96% (131/182) van de onderzochte teken op PCR positief bevonden voor *Coxiella* en *Rickettsia* spp. *Borrelia* spp. werden met behulp van de PCR niet aangetoond in de onderzochte teken.

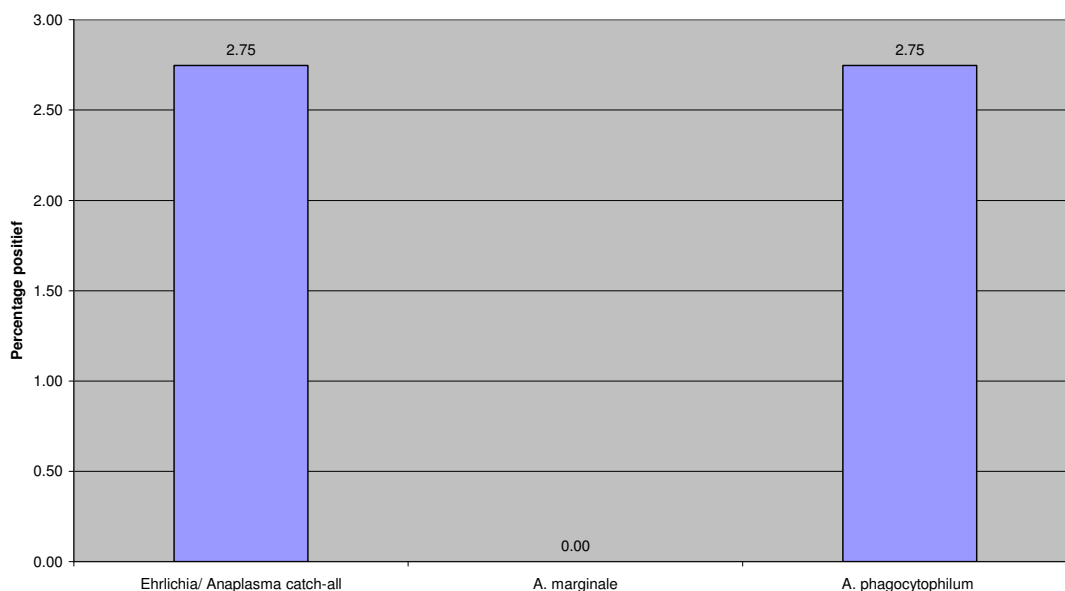
De resultaten van de uitgevoerde *Francisella* PCR zijn - in verband met onbetrouwbare resultaten - niet in bovenstaande grafiek verwerkt. Wel zal er later - in de discussie - dieper op deze '*Francisella*-problematiek' worden ingegaan.

5.2 RLB

Nadat de teken waren getest met PCR en gelelectroforese, werd er een RLB uitgevoerd op de betreffende monsters.

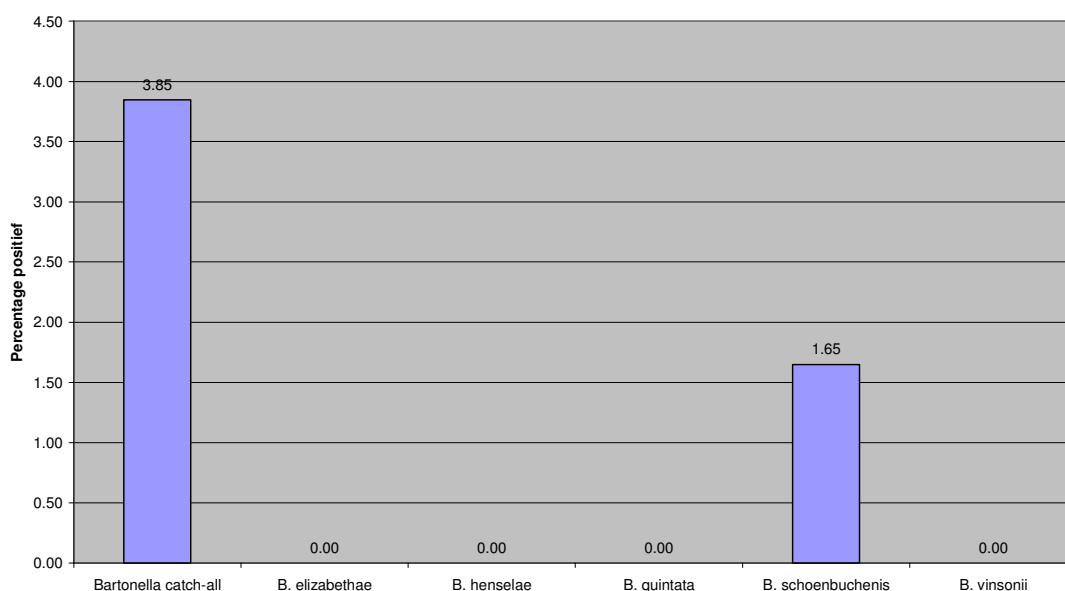
De resultaten van de uitgevoerde RLB staan in onderstaande grafieken weergegeven.

RLB *Anaplasma* spp.



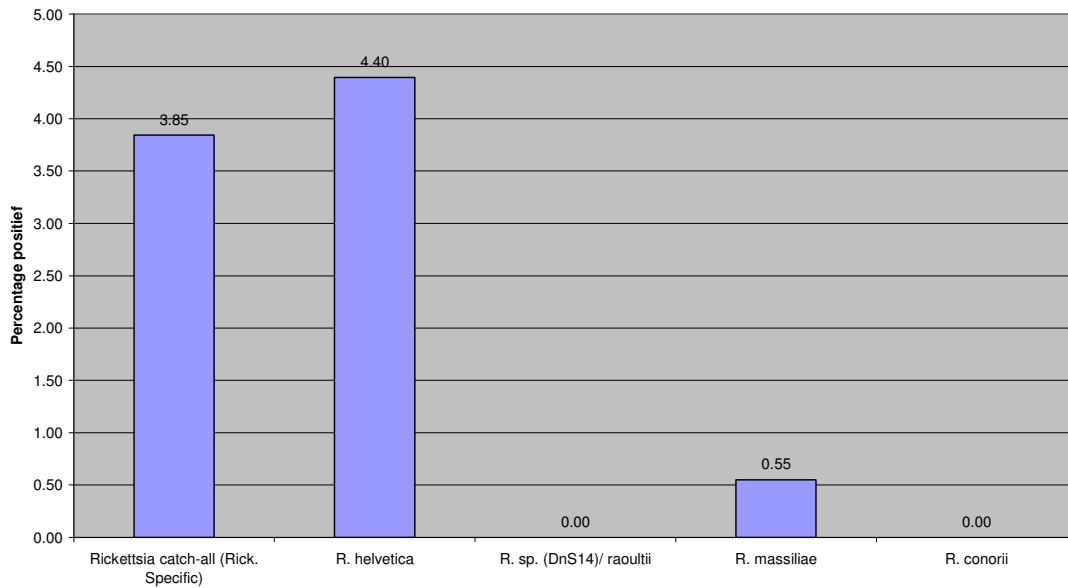
Van de 182 teken was 2,75% (5/182), op RLB positief voor zowel de *Ehrlichia/ Anaplasma* catch-all, als voor *A. phagocytophilum*

RLB *Bartonella* spp.



Zoals in bovenstaande grafiek staat weergegeven was 3,85% (7/182) van de teken op RLB positief voor de *Bartonella* catch-all. Een aantal van de teken die positief waren voor deze *Bartonella* catch-all, waren eveneens positief voor *B. schoenbuchensis*. Het gaat hier in totaal om 1,65% (3/182) van de teken. Voor de overige specifieke *Bartonella* soorten – *B. elizabethae*; *B. henselae*; *B. quintata*; *B. vinsonii* – werden geen positieve gevallen ontdekt.

RLB *Rickettsia* spp.



Wat de *Rickettsia* spp. betreft, was 3,85% (7/182) teken positief voor de *Rickettsia* catch-all. Van deze teken waren er respectievelijk 6 (3,30% van het totale aantal teken) en 1 (0,55% van het totale aantal teken), positief voor *R. helvetica* en *R. massiliae*. Daarnaast waren er nog 2 teken (1,10% van het totale aantal teken) die wel positief waren voor *R. helvetica*, maar niet voor de *Rickettsia* catch-all.

De overige RLB uitslagen staan niet in een grafiek weergegeven want:

- Op RLB was – net als op de PCR - geen van de 182 onderzochte teken positief voor *Borrelia* spp.
- De RLB uitslagen van zowel *Francisella* als *Coxiella* staan hier niet weergegeven, i.v.m. dubieuze uitkomsten. In de discussie zal hier verder op worden ingegaan.

5.3 Sequencing

Een aantal monsters werd – i.v.m. dubieuze en/of twijfelachtige uitkomsten – opgestuurd om te sequencen. De belangrijkste resultaten - na invoer in het BLAST-programma – staan in onderstaande tabel weergegeven.

<i>Monster nummer:</i>	<i>Reden voor sequencen en belangrijkste BLAST-uitkomsten:</i>
2664A-Ehr	Aangezien alle monsters op RLB positief waren voor A. phagocytophilum, is besloten om zo'n monster op te sturen om te sequencen. Hoewel dit monster getest was op Anaplasma/Ehrlichia spp., kwam de sequentie van dit monster voor 96-99% overeen met Mycobacterium spp. De positieve A. phagocytophilum uitslagen op RLB zijn dan ook maar genegeerd en alleen positief beoordeeld als de catch-all ook positief was.
2664A-Frans (13, 14) dit monster gaf op gel 2 verschillende bandjes; deze zijn beide getest (13 en 14)	In verband met dubieuze Francisella-resultaten – namelijk dat bijna alles op PCR en RLB positief was en dat de negatieve controle op PCR, i.t.t. op RLB, ook positief was - is besloten om een monster wat getest was voor Francisella te laten sequencen. Dit monster was getest voor Francisella, maar de sequentie kwam voor 99% overeen met Stenotrophomonas spp., waaronder S. maltophilia en S. rhizophila.
8545C-Cox	Ook voor Coxiella waren er dubieuze resultaten op PCR en RLB, bijna alles was namelijk positief. Dit monster was getest voor Coxiella, de sequentie kwam voor 98% overeen met C. burnetii, maar kwam voor 100% overeen met de Coxiella symbiont van Carios capensis, een zachte teek van zeevogels.
4027C-Rick	Dit monster was op RLB alleen zwak positief voor R. helvetica, zonder catch-all. Daarom is dit monster, dat getest was voor Rickettsia spp., gesequenced. De sequentie kwam echter voor 96% overeen met C. burnetti.
4027G-Rick	In verband met de 96% overeenkomst van het vorige Rickettsia monster met C. burnetti, is besloten om nog een Rickettsia monster te laten sequencen. Dit monster was getest voor Rickettsia spp., maar de sequentie kwam wederom voor 96% overeen met C. burnetii
2664I-Bart	Aangezien er een aantal zwak positieve resultaten waren op RLB voor Bartonella is – om meer duidelijkheid te verschaffen – een van deze monsters opgestuurd. Dit monster was getest voor Bartonella spp. en was alleen (zwak) positief voor de Bartonella catch-all, de sequentie kwam voor 99% overeen met B. schoenbuchensis.

(Bijlage 10.8.:Overzicht verkregen sequenties na sequencing)

6. Discussie

Aangezien er nog maar weinig onderzoek is gedaan naar de prevalentie van pathogenen in *I. hexagonus* teken, is er slechts beperkte literatuur beschikbaar, waarmee de resultaten van dit onderzoek kunnen worden vergeleken.

Vanwege cross-reactiviteit tussen pathogenen (en symbionten) moeten serologische resultaten erg voorzichtig worden geïnterpreteerd. Zodat voorkomen wordt dat er fouten worden gemaakt in de ontdekking en beschrijving van de epidemiologie van teken-gebonden bacteriële ziekten [7].

Dit is het eerste onderzoek dat binnen het UCTD is uitgevoerd naar *Francisella* en *Coxiella*. Hierbij is gebruik gemaakt van een nieuw ontwikkelde diagnostische RLB test voor *Francisella* en *Coxiella*. Tijdens dit onderzoek zijn een aantal problemen aan het licht gekomen met m.n. de resultaten van *Francisella*, en *Coxiella*, maar ook met de resultaten van *Rickettsia*.

Zo was bij de tests voor *Francisella* (bijna) alles positief op PCR en waren er ook veel positieven op RLB. De negatieve controle van de *Francisella* PCR was echter ook positief, terwijl de negatieve controle van de *Francisella* op RLB soms wel, maar soms ook niet negatief bleek te zijn. Aanvankelijk werd gedacht dat er tijdens de uitvoering van de PCR iets was misgegaan. Nadat uiteindelijk alle middelen (inclusief de dure 'stock-primers') die nodig zijn voor de PCR vervangen waren, bleven dezelfde dubieuze PCR resultaten (inclusief een positieve, negatieve controle) naar voren komen, ook wanneer deze door andere personen werd uitgevoerd. Om de voortgang van de rest van het onderzoek niet verder te vertragen is daarom uiteindelijk besloten om niet nog meer tijd te besteden om de monsters die nog niet getest waren op *Francisella*, hierop te testen.

Na raadpleging van de literatuur kwam naar voren dat de PCR-diagnostiek van *Francisella* een bekend probleem is, welke o.a. wordt veroorzaakt door het voorkomen van zogenaamde '*Francisella*-Like Endosymbionts' (FLEs) [167]. Inmiddels zijn er al methodes gepresenteerd om deze problematiek te kunnen omzeilen [167, 168].

Een andere mogelijke verklaring voor de dubieuze *Francisella* uitslagen is de bacterie *Stenotrophomonas maltophilia* welke gevonden werd in het *Francisella* monster dat was opgestuurd voor sequencen.

Deze bacterie blijkt een 'emerging' opportunistische humane pathogeen te zijn. Hoewel de bacterie niet erg virulent is, kan deze de oorzaak zijn van ernstige infecties - met de dood tot gevolg - in de verzwakte gastheer met een verminderde immuunafweer [169]. De bacterie is een ubiquitair omgevingsbacterie die ook geïsoleerd is uit o.a. teken en 'steriel' water [170, 171]. Dit laatste zou ook een verklaring kunnen zijn voor de dubieuze resultaten van de *Francisella* PCR: alles - inclusief de negatieve controle - positief. Na controle bleek de *Francisella* primer slechts op 2 nucleotides te verschillen van *S. maltophilia*.

Nog een mogelijke verklaring is dat er iets mis was met de primers of probes.

Ook de resultaten m.b.t. *Coxiella* waren dubieus: een hoog percentage was positief op PCR en ook op RLB was er een erg hoog percentage positief. In dit geval was de negatieve controle van de PCR wel gewoon negatief, maar was de negatieve controle op RLB positief.

Een mogelijke verklaring van deze opmerkelijke hoge prevalentie van *Coxiella*, zijn symbionten.

Zo is bij verschillende tekensoorten bekend dat ze microben dragen die gerelateerd zijn aan *C. burnetii* [21]. Bij de teek *Amblyomma americanum* werd een *Coxiella*-achtige symbiont aangetroffen met een prevalentie van 100% [172]. Een ander punt dat deze verklaring voor de dubieuze *Coxiella* resultaten

ondersteund, is het feit dat bij sequenzen van een *Coxiella* monster een 100% overeenkomst werd aangetroffen met de *Coxiella* symbiont van *Carios capensis*, een zachte teek van zeevogels. De eerste keer dat deze symbiont werd aangetroffen, werd deze gevonden in een *Carios capensis* teek afkomstig van een pelikaan [173].

Een andere mogelijke verklaring is dat er iets mis is met de primers of probes.

Bij de resultaten van de *Rickettsia* spp. valt op dat bij PCR een veel hoger percentage positief is dan op RLB. Ook deze resultaten zijn te verklaren met symbionten.

Symbionten die nauw gerelateerd zijn aan *Rickettsia* spp. zijn namelijk al langere tijd bekend en in meerdere teken species aangetroffen [21, 174]. Doordat de RLB een hogere specificiteit heeft, worden de vals positieve *Rickettsia* resultaten op PCR er uit gefilterd.

Opmerkelijk was echter dat de 2 'gesequencde' monsters die op RLB positief waren voor *Rickettsia* (een positief voor zowel de catch-all als voor *R. helvetica*, de ander alleen positief voor *R. helvetica*) geen overeenkomst lieten zien met *Rickettsia* sequenties, maar voor 96% overeenkwamen met *Coxiella burnetii*. Dit percentage van slechts 96% is onvoldoende om te kunnen zeggen dat er zeker sprake is van de aanwezigheid van *C. burnetii* in deze monsters, mogelijk is er echter wel sprake van een nog niet eerder beschreven symbiont.

Door deze uitkomsten moeten - hoewel *R. helvetica* al eerder m.b.v. RLB is aangetoond in *I. hexagonus* teken in Nederland [1] - ook de *Rickettsia* resultaten met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden.

Wel is zeker dat o.m. *R. helvetica* regelmatig in Nederland voorkomt. Zo werd m.b.v. PCR en RLB een prevalentie gevonden variërend van 6 tot 66% in *I. ricinus* teken afkomstig uit verschillende biotopen in Nederland. Ter controle werden 15 monsters gesequenced, in dit geval kwam de sequentie wel overeen met *R. helvetica* [175].

De RLB resultaten van *Anaplasma/Ehrlichia* die in dit onderzoek werd gevonden bij *I. hexagonus* teken (2,75%), ligt in de zelfde orde van grootte als bij een eerder in Nederland uitgevoerd onderzoek bij *I. ricinus* teken. De totale prevalentie van *Anaplasma/Ehrlichia* die hier met RLB werd gevonden, was namelijk 6,8% [176].

In verband met problemen met de probe van *A. phagocytophilum* - vermoedelijke cross-reactiviteit met *Coxiella* en/of *Francisella* - werden de resultaten van *A. phagocytophilum* negatief beschouwd, tenzij er sprake was van een positieve catch-all. De prevalentie van *A. phagocytophilum* die in dit onderzoek m.b.v. RLB werd gevonden ligt eveneens op 2,75%.

Hiermee wordt de eerdere waarneming van aanwezigheid van *A. phagocytophilum* in *I. hexagonus* teken in Nederland bevestigd [1].

Hoewel dit onderzoek niet gericht was op *Ehrlichia* spp., kan vermeld worden dat er op RLB geen positief signaal was voor een specifieke *Ehrlichia* species.

Borrelia spp. - de verwekkers van de bij het publiek meest bekende teken-gebonden ziekte, de ziekte van Lyme - werden m.b.v. PCR en RLB verrassend niet aangetroffen in de onderzochte *I. hexagonus* teken. Wel sluit deze bevinding aan bij eerder in Nederland uitgevoerd onderzoek [1].

Onderzoek in het laboratorium laat echter zien dat *I. hexagonus* een competente vector van *B. burgdorferi* s.l. is [116, 177].

Verder werd *B. burgdorferi* s.l. in Groot-Brittannië, wèl m.b.v. PCR gevonden in *I. hexagonus* teken [178, 179].

Tevens is bekend dat ook *I. hexagonus* - hoewel minder vaak dan *I. ricinus* - voedt op knaagdieren, welke als belangrijk reservoir van *B. burgdorferi* s.l. worden beschouwd [14, 15]. Daarnaast is gebleken dat een belangrijke gastheer van *I.*

hexagonus – de egel – reservoir competentie heeft voor *B. burgdorferi* s.l. [109-111].

Een duidelijke verklaring waarom *B. burgdorferi* s.l. tot nu toe nog niet in Nederlandse *I. hexagonus* teken is gevonden is niet te geven, mogelijk komt het doordat er nog maar beperkt onderzoek is uitgevoerd naar *I. hexagonus* teken.

Er is nog weinig bekend over de rol van teken in de transmissie van *Bartonella* spp.

Hoewel katten het belangrijkste reservoir lijken te vormen van *B. henselae* [67], is *B. henselae* niet gevonden in teken afkomstig van katten. Deze bevinding sluit aan bij eerdere onderzoeken [180, 181].

Wel is *B. henselae* in eerdere onderzoeken aangetroffen in verschillende teken afkomstig van verschillende gastheren, waaronder mensen en honden [180, 182-185].

Deze resultaten suggereren de mogelijkheid dat teken een vector zijn van *B. henselae* infecties. Het definitieve bewijs van de rol van teken als competente vector, moet echter experimenteel geleverd worden door de transmissie van *Bartonella* spp. van geïnfecteerde dieren naar teken na aanhechting en vice versa [180]. Inmiddels is er een publicatie waarin dit bewijs experimenteel geleverd is [87], maar er is tot nu toe nog geen bewijs van een natuurlijke vectorcapaciteit van teken voor de transmissie van *Bartonella* [88].

Tijdens dit onderzoek is DNA van de bacterie *B. schoenbuchensis* in 3 van de 182 onderzochte teken (prevalentie van 1,65%) gevonden. Een positieve *Bartonella* catch-all, zonder positief signaal voor een specifieke *Bartonella*, bleek na sequencen ook overeen te komen met *B. schoenbuchensis*. Dat maakt het totaal aantal positieve reacties voor *B. schoenbuchensis* op 4 (2,20%). Voor zover bekend is dit de eerste keer dat deze bacterie in teken afkomstig van katten is aangetroffen. Zoals gezegd wordt *B. schoenbuchensis* in verband gebracht met de zoönose 'hertenluisvlieg dermatitis'. Het is echter nog niet precies bekend hoe *B. schoenbuchensis* wordt overgebracht en of *B. schoenbuchensis* daadwerkelijk een rol speelt in de etiologie van 'hertenluisvlieg dermatitis' [61, 72], verder onderzoek is hiervoor noodzakelijk. Ook als *B. schoenbuchensis* geen zoönose blijkt te zijn, is de ontdekking van belang. Het is voor een zorgvuldige diagnostiek van bijvoorbeeld kattenkrabziekte, van belang om te weten dat er veel meer *Bartonella* spp. zijn dan *B. henselae* alleen.

Verder waren er nog 3 positieve resultaten voor de *Bartonella* catch-all, zonder een positief signaal voor een specifieke *Bartonella* sp., deze 3 resultaten zijn helaas niet gesequenced, maar uitgaande op de 3 positieve RLB uitslagen en op het monster dat gesequenced is, betreffen ook deze monsters mogelijk *B. schoenbuchensis*.

Wat betreft de materiaal en methode kan vermeld worden dat er – n.a.v. de dubieuze resultaten in dit onderzoek – op het moment van schrijven, door het UCTD wordt gekeken naar de validiteit van de gebruikte primers en probes. Een suggestie om de problemen op RLB te voorkomen is om – net als voor de overige pathogenen waar op getest wordt – ook voor *Francisella* en *Coxiella* een catch-all probe te ontwikkelen en een specifieke probe voor *Francisella tularensis* en *Coxiella burnetii*, om op deze manier de vals positieve uitslagen door symbionten er uit te kunnen filteren.

Tot slot dient vermeld te worden dat er tijdens de uitvoering van de RLB m.n. met de wasstappen fouten kunnen zijn opgetreden – bijvoorbeeld te zacht geschud – waardoor ongebonden PCR producten mogelijk niet goed verwijderd worden en vervolgens kunnen leiden tot vals positieve resultaten.

7. Conclusies

De teek *I. hexagonus* is, voor wat betreft zijn leefwijze, een compleet andere teek dan *I. ricinus*. Hoewel *I. hexagonus* veel minder vaak op mensen voedt dan *I. ricinus*, heeft dit onderzoek aangetoond dat ook *I. hexagonus* teken verschillende zoönosen bij zich kunnen dragen. Ondanks het feit dat *I. ricinus* een veel grotere rol speelt in de verspreiding van teken-gebonden pathogenen naar mensen, moet ook rekening worden gehouden met de rol van *I. hexagonus*.

Door aan het licht gekomen problemen m.b.t. de diagnostiek van m.n. *Francisella* en *Coxiella*, zijn er tijdens dit onderzoek geen betrouwbare resultaten over de prevalentie van deze pathogenen naar voren gekomen. Toch is deze bevinding van belang, omdat er nu aan oplossingen van deze problemen kan worden gewerkt, zodat in toekomstig onderzoek binnen het UCTD naar deze pathogenen mogelijk wel betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden.

Opvallend is dat er in *I. hexagonus* teken in Nederland tot nog toe geen *B. burgdorferi* s.l. is gevonden, een goede verklaring voor deze bevinding is er niet. Mogelijk dat de bacterie bij verder onderzoek naar *I. hexagonus*, in de toekomst alsnog gevonden wordt.

In dit onderzoek is – voor zover bekend – voor het eerst de bacterie *B. schoenbuchensis* aangetoond in teken afkomstig van katten. Of teken een competente vector van *Bartonella* spp. zijn, is nog niet helemaal duidelijk, hiervoor is meer onderzoek nodig. Ook is meer onderzoek nodig naar *B. schoenbuchensis*, omdat het momenteel nog niet vaststaat hoe de transmissie van deze bacterie plaats vindt en of deze bacterie al dan niet als een zoönose beschouwd moet worden.

Kortom: meer onderzoek naar teken-gebonden zoönosen is wenselijk omdat nog lang niet van alle infectieuze agentia bekend is of ze een zoönose zijn en wat de rol van teken in de verspreiding van deze agentia is.

Verder is er überhaupt betrekkelijk weinig onderzoek gedaan naar de prevalentie van pathogenen in *I. hexagonus* teken, om hier meer van te kunnen weten is verder onderzoek interessant, zowel voor de veterinaire, als de humane geneeskunde.

8. Dankwoord

Hierbij wil ik gebruik maken van de mogelijkheid om het personeel van het UCTD – de ‘Tickbusters’ - te bedanken. Ik wil ze bedanken voor de stageplaats; de enthousiaste uitleg over teken; de uitleg en het inwerken van de laboratoriumwerkzaamheden; het geduld om iets - indien nodig - nog eens uit te leggen; de hulp bij het wegwijs worden in de database; het feit dat er altijd iemand klaar staat waar je met je problemen en vragen terecht kunt; en tot slot voor een leuke, gezellige, leerzame stageperiode.

9. Referenties

1. Bodaan C, Nijhof AM, Postigo M, et al. Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren in Nederland. Tijdschrift voor Diergeneeskunde **2007**;132(13):517-523.
2. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. Epidemiol Infect **2007**;135(8):1231-47.
3. Beugnet F, Marie JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet Parasitol **2009**;163(4):298-305.
4. Sonenshine DE. Biology of ticks. vol. 1. Oxford University Press, **1991**.
5. Bedford GAH. South African ticks. Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry **1934**;11:49-99.
6. Keirans JE, Clifford CM, Hoogstraal H, Easton ER. Discovery of *Nuttalliella namaqua* Bedford (acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) in Tanzania and redescription of the female based on scanning electron microscopy. Ann Entomol Soc Am **1976**;69(5):926-32.
7. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. Clin Infect Dis **2001**;32(6):897-928.
8. Ogden NH, Cripps P, Davison CC, et al. The ixodid tick species attaching to domestic dogs and cats in Great Britain and Ireland. Med Vet Entomol **2000**;14(3):332-8.
9. Pichot J, Gilot B, Almire N, Polette K, Degeilh B. *Ixodes* populations (*ixodes ricinus* Linné, 1758; *ixodes hexagonus* Leach, 1815) in the city of Lyon (France) and its outskirts: Preliminary results. Parasite (Paris) **1997**;4(2):167-71.
10. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J-, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: A guide to identification of species. University of Zaragoza, **2004**.
11. Gern L, Humair PF. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control **2002**:149-174.
12. Sonenshine DE. Biology of ticks vol. 2. Oxford University Press, **1993**.
13. Anderson JF. Epizootiology of Lyme borreliosis. Scand J Infect Dis Suppl **1991**;77:23-34.
14. Arthur DR. The host relationships of *ixodes hexagonus* Leach in Britain. Parasitology **1953**;43(3-4):227-38.
15. Toutoungi LN, Gern L, Aeschlimann A, Debrot S. A propos du genre *Pholeioxodes*, parasite des carnivores en Suisse. Acarologia **1991**;32(4):311-28.
16. Liebisch A, Liebisch G. Hard ticks (Ixodidae) biting humans in Germany and their infection with *Borrelia burgdorferi*. In: Mitchell R, Horn DJ, Needham GN, Welbourn WC, eds. Acarology IX, Vol. 1: Proceedings. The Ohio Biological Survey, **1996**:465-468.
17. Liebisch G, Sohns B, Bautsch W. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. J Clin Microbiol **1998**;36(11):3355-8.
18. Dartmoor tick watch [homepage on the Internet]. . 2009. Available from: <http://www.dartmoorcam.co.uk/dartmoortickwatch/index.htm>.
19. Liebisch A, Walter G. Untersuchungen von Zecken bei Haus- und Wildtieren in Deutschland: Zum Vorkommen und zur Biologie der Igelzecke (*ixodes hexagonus*) und der Fuchszecke (*ixodes canisuga*). Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **1986**;93:447-450.
20. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev **1997**;10(4):694-719.
21. Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. Appl Environ Microbiol **1997**;63(10):3926-32.

22. Kaltenpoth M, Göttler W, Herzner G, Strohm E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology* **2005**;15(5):475-9.
23. Moran NA, Degnan PH, Santos SR, Dunbar HE, Ochman H. The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**;102(47):16919-26.
24. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families rickettsiaceae and anaplasmataceae in the order rickettsiales: Unification of some species of ehrlichia with anaplasma, cowdria with ehrlichia and ehrlichia with neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol* **2001**;51(Pt 6):2145-65.
25. Hechemy KE, Avšič-Županc T, Childs JE, Raoult DA. Rickettsiology: Present and future directions. **2003**.
26. Watt G, Parola P. Scrub typhus and tropical rickettsioses. *Curr Opin Infect Dis* **2003**;16(5):429-36.
27. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* **2005**;36(3):469-92.
28. Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, et al. Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* **2007**;54(2):94-101.
29. Courtney JW, Dryden RL, Montgomery J, Schneider BS, Smith G, Massung RF. Molecular characterization of anaplasma phagocytophilum and borrelia burgdorferi in ixodes scapularis ticks from Pennsylvania. *J Clin Microbiol* **2003**;41(4):1569-73.
30. Liz JS, Anderes L, Sumner JW, et al. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in ixodes ricinus ticks and wild small mammals in western switzerland. *J Clin Microbiol* **2000**;38(3):1002-7.
31. van Dobbenburgh A, van Dam AP, Fikrig E. Human granulocytic ehrlichiosis in Western Europe. *N Engl J Med* **1999**;340(15):1214-6.
32. Olano JP, Walker DH. Human ehrlichioses. *Med Clin North Am* **2002**;86(2):375-92.
33. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* **2000**;31(2):554-60.
34. Paddock CD, Childs JE. Ehrlichia chaffeensis: A prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2003**;16(1):37-64.
35. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in europe. *Clin Microbiol Infect* **2002**;8(12):763-72.
36. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in europe. *Clin Microbiol Infect* **2005**;10:1108-32.
37. Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis: A report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J Small Anim Pract* **1999**;40(1):20-4.
38. Breitschwerdt EB, Abrams-Ogg ACG, Lappin MR, et al. Molecular evidence supporting ehrlichia canis-like infection in cats. *Journal of veterinary internal medicine* **2002**;16(6):642-9.
39. Magnarelli LA, Bushmich SL, IJdo JW, Fikrig E. Seroprevalence of antibodies against borrelia burgdorferi and anaplasma phagocytophilum in cats. *Am J Vet Res* **2005**;66(11):1895-9.
40. Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. In vitro susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**;42(7):1537-41.
41. Stephany D, Buffet P, Rolain JM, Raoult D, Consigny PH. Rickettsia africae infection in man after travel to Ethiopia. *Emerg Infect Dis* **2009**;15(11):1867-9.
42. Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. Ixodes ricinus: Vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop* **1979**;36(4):357.

43. Beati L, Peter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D. Confirmation that *rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *Int J Syst Evol Microbiol* **1993**;43(3):521.
44. Nilsson K, Lindquist O, Pålsson C. Association of *rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *The Lancet* **1999**;354(9185):1169-73.
45. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci* **2003**;990(1):1-11.
46. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* **2005**;18(4):719.
47. Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. Aneruptive fever associated with antibodies to *rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol* **2004**;42(2):816.
48. Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, et al. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with dermacentor ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol* **2008**;58(7):1635.
49. Shpynov S, Fournier PE, Rudakov N, Tankibaev M, Tarasevich I, Raoult D. Detection of a rickettsia closely related to *rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," rickettsia sp. strain RpA4, and *ehrlichia muris* in ticks collected in russia and kazakhstan. *J Clin Microbiol* **2004**;42(5):2221.
50. Stańczak J. Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in dermacentor *reticulatus* (acari: Ixodidae) in Poland. *International Journal of Medical Microbiology* **2006**;296:144-8.
51. Dautel H, Dippel C, Oehme R, Hartelt K, Schettler E. Evidence for an increased geographical distribution of dermacentor *reticulatus* in Germany and detection of rickettsia sp. RpA4. *International Journal of Medical Microbiology* **2006**;296:149-56.
52. Mediannikov O, Parola P, Raoult D. Other tick-borne rickettsioses. In: Raoult D, Parola P, eds. *Rickettsial diseases*. New York: Informa Healthcare, **2007**:139-62.
53. Chmielewski T, Podsiadly E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanowska S. *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerging Infectious Diseases* **2009**;15(3):486.
54. Raoult D, Berbis PH, Roux V, Xu W, Maurin M. A new tick-transmitted disease due to *rickettsia slovaca*. *The Lancet* **1997**;350(9071):112-3.
55. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, et al. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: Clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clinical Microbiology and Infection* **2004**;10(4):327-31.
56. Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier PE. Spotless rickettsiosis caused by *rickettsia slovaca* and associated with dermacentor ticks. *Clin Infect Dis* **2002**;34(10):1331-6.
57. Ibarra V, Oteo JA, Portillo A, et al. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Ann N Y Acad Sci* **2006**;1078:206-14.
58. Parola P, Rovey C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. *Emerg Infect Dis* **2009**;15(7):1105-8.
59. Shaw S, Day MJ. Rickettsial infections. In: Green CE, ed. *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. London: Manson Publishing Ltd, **2005**:134.
60. Bayliss DB, Morris AK, Horta MC, et al. Prevalence of rickettsia species antibodies and rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **2009**;11(4):266-70.
61. Matsumoto K, Berrada ZL, Klinger E, Goethert HK, Telford I, S.R. Molecular detection of *bartonella schoenbuchensis* from ectoparasites of deer in massachusetts. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **2008**;8(4):549-54.

62. Breitschwerdt EB, Kordick DL. Bartonella infection in animals: Carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* **2000**;13(3):428-38.
63. Boulouis HJ, Chang C, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic bartonella infections. *Vet Res* **2005**;36:383-410.
64. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. Bartonella spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infect Dis* **2006**;12(3):389-94.
65. Garcia-Caceres U, Garcia FU. Bartonellosis. an immunodepressive disease and the life of daniel alcides carrion. *Am J Clin Pathol* **1991**;95(4 Suppl 1):S58-66.
66. Roux V, Raoult D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J Clin Microbiol* **1999**;37(3):596-9.
67. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, et al. Experimental transmission of bartonella henselae by the cat flea. *J Clin Microbiol* **1996**;34(8):1952-6.
68. Foil L, Andress E, Freeland RL, et al. Experimental infection of domestic cats with bartonella henselae by inoculation of ctenocephalides felis(siphonaptera: Pulicidae) feces. *J Med Entomol* **1998**;35(5):625-8.
69. Higgins JA, Radulovic S, Jaworski DC, Azad AF. Acquisition of the cat scratch disease agent bartonella henselae by cat fleas (siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* **1996**;33(3):490-5.
70. Pappalardo BL, Correa MT, York CC, Peat CY, Breitschwerdt EB. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to bartonella vinsonii in dogs. *Am J Vet Res* **1997**;58(5):467-71.
71. Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, et al. Cat scratch disease in connecticut--epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl J Med* **1993**;329(1):8-13.
72. Dehio C, Sauder U, Hiestand R. Isolation of bartonella schoenbuchensis from lipoptena cervi, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *J Clin Microbiol* **2004**;42(11):5320-3.
73. Dehio C, Lanz C, Pohl R, et al. Bartonella schoenbuchii sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* **2001**;51(4):1557-65.
74. Caceres AG. Geographic distribution of *lutzomyia verrucarum* (townsend, 1913) (*diptera, psychodidae, phlebotominae*), vector of human bartonellosis in peru. *Rev Inst Med Trop* **1993**;35:485-90.
75. [homepage on the Internet]. . 2010 13-01-2010. Available from: <http://www.diptera-amateur.nl/beginpaginahippoboscidae.htm>.
76. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, rickettsia felis, and wolbachia pipientis in cat fleas, france. *Emerging Infectious Diseases* **2003**;9(3):338-42.
77. Eskow E, Rao RVS, Mordechai E. Concurrent infection of the central nervous system by borrelia burgdorferi and bartonella henselae: Evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch Neurol* **2001**;58(9):1357-63.
78. Zoönosen op een rij [homepage on the Internet]. RIVM. 2008 13-06-2008. Available from: http://www.rivm.nl/ziekdoordier/zoon_op_rij/.
79. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of bartonella infections (an exception to koch's postulate). *Clinical and Vaccine Immunology* **2002**;9(1):8-18.
80. Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat scratch disease in the United States: An analysis of three national databases. *Am J Public Health* **1993**;83(12):1707-11.
81. Infectieziekten A-Z [homepage on the Internet]. RIVM. 2009 28-04-2009. Available from: <http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/>.

82. Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **1993**;17:612-24.
83. Chomel BB. Cat-scratch disease. *Rev Sci Tech* **2000**;19(1):136-50.
84. Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, et al. Outcome and treatment of bartonella endocarditis. *Arch Intern Med* **2003**;163(2):226-30.
85. Shaw SE, Birtles RJ, Day MJ. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **2001**;3(4):193-209.
86. Flexman JP, Lavis NJ, Kay ID, Watson M, Metcalf C, Pearman JW. Bartonella henselae is a causative agent of cat scratch disease in Australia. *J Infect* **1995**;31(3):241-5.
87. Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, et al. Transmission of bartonella henselae by ixodes ricinus. *Emerging Infectious Diseases* **2008**;14(7):1074-80.
88. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of bartonella species to their hosts and vectors. *Vet Res* **2009**;40(2):29.
89. Guptill L, Slater L, Wu CC, et al. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with bartonella henselae. *J Infect Dis* **1997**;176(1):206-16.
90. Guptill L, Slater LN, Wu CC, et al. Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of bartonella henselae in experimentally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* **1998**;65(2-4):177-89.
91. Kordick DL, Breitschwerdt EB. Relapsing bacteremia after blood transmission of bartonella henselae to cats. *Am J Vet Res* **1997**;58(5):492-7.
92. O'Reilly KL, Bauer RW, Freeland RL, et al. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of bartonella henselae (LSU16). *Infect Immun* **1999**;67(6):3066-72.
93. Mikolajczyk MG, O'Reilly KL. Clinical disease in kittens inoculated with a pathogenic strain of bartonella henselae. *Am J Vet Res* **2000**;61(4):375-9.
94. Karem KL. Immune aspects of bartonella. *Crit Rev Microbiol* **2000**;26(3):133-45.
95. Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H. Seroprevalence of bartonella henselae infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* **1997**;35(11):2883-5.
96. Gern L, Humair PF. Natural history of borrelia burgdorferi sensu lato. *Wien Klin Wochenschr* **1998**;110(24):856-8.
97. Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis. *The lancet* **1998**;352(9127):557-65.
98. Steere AC. *Borrelia burgdorferi* (lyme disease, lyme borreliosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases vol 2*. New York: Churchill Livingstone, **2000**:2504-18.
99. Ryffel K, Peter O, Rutti B, Suard A, Dayer E. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of borrelia burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, and B. valaisiana in humans. *J Clin Microbiol* **1999**;37(12):4086.
100. Rijpkema SGT, Tazelaar DJ, Molkenboer M, et al. Detection of borrelia afzelii, borrelia burgdorferi sensu stricto, borrelia garinii and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical Microbiology and Infection* **1997**;3:109-16.
101. Habálek Z, Halouzka J. Distribution of borrelia burgdorferi sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* **1997**;13(8):951-7.
102. Girons IS, Gern L, Gray JS, et al. Identification of borrelia burgdorferi sensu lato species in Europe. *Zentralblatt für Bakteriologie* **1998**;287(3):190-5.
103. Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. 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 **1995**;33(12):3091-5.
104. Humair P, Peter O, Wallich R, Gern L. Strain variation of lyme disease spirochetes isolated from ixodes ricinus ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. J Med Entomol **1995**;32(4):433-8.
 105. Humair PF, Rais O, Gern L. Transmission of borrelia afzelii from apodemus mice and clethrionomys voles to ixodes ricinus ticks: Differential transmission pattern and overwintering maintenance. Parasitology **1999**;118(01):33-42.
 106. Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S. Prevalence of borrelia burgdorferi sensu lato-infected ticks on migrating birds. Appl Environ Microbiol **1995**;61(8):3082-7.
 107. Hubalek Z, Halouzka J, Heroldova M. Growth temperature ranges of borrelia burgdorferi sensu lato strains. J Med Microbiol **1998**;47(10):929-32.
 108. Humair PF, Postic D, Wallich R, Gern L. An avian reservoir (turdus merula) of the lyme borreliosis spirochetes. Zentralbl Bakteriologie **1998**;287(4):521-38.
 109. Gray JS, Kahl O, Janetzki-Mittman C, Stein J, Guy E. Acquisition of borrelia burgdorferi by ixodes ricinus ticks fed on the european hedgehog, erinaceus europaeus L. Experimental and Applied Acarology **1994**;18(8):485-91.
 110. Liebisch G, Finkbeiner-Weber B, Liebisch A. The infection with borrelia burgdorferi s.l in the european hedgehog (erinaceus europaeus) and its ticks. Parasitologia (Rome) **1996**;38:385.
 111. Gern L, Toutoungi LN, Godfroid E. Transmission cycles of borrelia burgdorferi sensu lato involving ixodes ricinus and/or I. hexagonus ticks and the european hedgehog, erinaceus europaeus, in suburban and urban areas in Switzerland. Folia Parasitol **1997**;44:309-14.
 112. Kahl O, Geue L. Laboratory study on the role of the European fox, vulpes vulpes, as a possible reservoir of borrelia burgdorferi s.l. In: Coons L, Rothschild M, editors. Proceedings of the 2nd international conference on tick-borne pathogens at the host-vector interface: A global perspective; 28 August-1 September 1995; Kruger National Park, South Africa. **1998**:29.
 113. Liebisch G, Dimpfl B, Finkbeiner-Weber B, Liebisch A, Frosch M. The red fox (vulpes vulpes), a reservoir competent host for borrelia burgdorferi sensu lato. In: Coons L, Rothschild M, editors. Second international conference on tick borne pathogens at the host vector interface (THPI); 28 August-1 September 1995; Kruger National Park, South Africa. 238.
 114. Gray JS. Review the ecology of ticks transmitting lyme borreliosis. Experimental and Applied Acarology **1998**;22(5):249-58.
 115. Monin R, Gern L, Aeschlimann A. A study of the different modes of transmission of borrelia burgdorferi by ixodes ricinus. Zentralblatt für Bakteriologie **1989**;18:14-20.
 116. Gern L, Toutoungi LN, Chang MH, Aeschlimann A. Ixodes(pholeoixodes) hexagonus, an efficient vector of borrelia burgdorferi in the laboratory. Med Vet Entomol **1991**;5(4):431-5.
 117. Korenberg EI, Moskvitina GG, Vorobyeva NN. Prevention of human borreliosis after infected tick's bite. In: Cevenini R, Sambri V, La Placa M, editors. Proceedings of the VIth international conference on lyme borreliosis; June 19-22; Bologna, Italy. 209-11.
 118. Leuba-Garcia S, Kramer MD, Wallich R, Gern L. Characterization of borrelia burgdorferi isolated from different organs of ixodes ricinus ticks collected in nature. Zentralblatt für Bakteriologie **1994**;280(4):468-75.
 119. Public health image library (PHIL) [homepage on the Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2008 14-01-2008. Available from: <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp>.

120. Baranton G, Marti Ras N, Postic D. Molecular epidemiology of the aetiological agents of lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* **1998**;110(24):850-5.
121. May C, Carter SD, Barnes A, et al. *Borrelia burgdorferi* infection in cats in the UK. *J Small Anim Pract* **1994**;35(10):517-20.
122. Omran MT, Young CR, Gibson MD, Oestmann D. Feline lyme borreliosis. In: August JR, ed. *Consultations in Feline Internal Medicine Edition*. Philadelphia: Saunders, **1997**:23-30.
123. Lindner A, Bockel K. Serological investigations into the occurrence of antibodies against *borrelia burgdorferi* in dogs and cats. *Prakt Tierarzt* **1995**;76:177.
124. Burgess EC. Experimentally induced infection of cats with *borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res* **1992**;53(9):1507-11.
125. Gibson MD, Young CR, Omran MT, et al. *Borrelia burgdorferi* infection of cats. *J Am Vet Med Assoc* **1993**;202(11):1786.
126. Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Vet Microbiol* **2009**.
127. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* **1999**;12(4):518-53.
128. Tiggert WD, Benenson AS. Studies on Q fever in man. *Trans Assoc Am Physicians* **1956**;69:98-104.
129. Marrie TJ, Langille D, Papukna V, Yates L. Truckin'pneumonia: An outbreak of Q fever in a truck repair plant probably due to aerosols from clothing contaminated by contact with newborn kittens. *Epidemiol Infect* **1989**;102:119-27.
130. Eklund CM, Parker RR, Lackman DB, Eklund CM, Lockman DB. A case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. *Public Health Reports (1896-1970)* **1947**;62:1413-6.
131. Babudieri B. Q fever: A zoonosis. *Adv Vet Sci* **1959**;5:81-182.
132. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* **2005**;36:327-49.
133. Muskens J, Mars MH, Franken P. Q fever: An overview. *Tijdschr Diergeneeskd* **2007**;132(23):912-7.
134. Nabuurs-Franssen MH, Weers-Pothoff G, Horrevorts AM, Besselink R, Schneeberger PM, Groot CAR. Als de vraag Q-koorts is: Diagnostiek en behandeling van Q-koorts. *Ned Tijdschr Med Microbiol* **2008**;16:20-5.
135. Van Steenbergen JE, Morroy G, Groot CAR, Ruikes FGH, Marcelis JH, Speelman P. Een uitbraak van Q-koorts in Nederland-mogelijk verband met geiten. *Ned Tijdschr Geneeskd* **2007**;151(36):1998-2003.
136. Dupont HÉT, Raoult D, Brouqui P, et al. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med* **1992**;93(4):427-34.
137. Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clinical Infectious Diseases* **2006**;44(2):232-7.
138. Tissot-Dupont H, Raoult D. 21. clinical aspects, diagnosis, and treatment of Q fever. In: Raoult D, Parola P, eds. *Rickettsial diseases*. CRC Press, **2007**:291-302.
139. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol* **1998**;36(7):1823-34.
140. Delsing CE, Kullberg BJ. Q fever in the netherlands: A concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *Neth J Med* **2008**;66(9):365-7.
141. Raoult D, Houpikian P, Dupont HT, Riss JM, Arditi-Djiane J, Brouqui P. Treatment of Q fever endocarditis: Comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med* **1999**;159(2):167-73.

142. Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy: Diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch Intern Med* **2002**;162(6):701-4.
143. Randhawa AS, Dieterich WH, Jolley WB, Hunter CC. Coxiellosis in pound cats. *Feline Pract* **1974**;4:37-8.
144. Higgins D, Marrie TJ. Seroepidemiology of Q fever among cats in New Brunswick and Prince Edward Island. *Ann N Y Acad Sci* **1990**;590:271-4.
145. Htwe KK, Amano K, Sugiyama Y, et al. Seroepidemiology of coxiella burnetii in domestic and companion animals in japan. *Vet Rec* **1992**;131(21):490.
146. Morita C, Katsuyama J, Yanase T, et al. Seroepidemiological survey of coxiella burnetii in domestic cats in japan. *Microbiol Immunol* **1994**;38(12):1001-3.
147. Nagaoka H, Sugieda M, Akiyama M, Nishina T, Akahane S, Fujiwara K. Isolation of coxiella burnetii from the vagina of feline clients at veterinary clinics. *Journal of Veterinary Medical Science* **1998**;60(2):251-2.
148. Pinsky RL, Fishbein DB, Greene CR, Gensheimer KF. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *J Infect Dis* **1991**;164(1):202-4.
149. Levy PY, Drancourt M, Etienne J, et al. Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases of Q fever endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**;35(3):533-7.
150. Cross JT, Penn RL. *Francisella tularensis (tularemia). Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone **2000**:2393-402.
151. Morner T. The ecology of tularaemia. *Rev Sci Tech* **1992**;11(4):1123-30.
152. Hubalek Z, Tremel F, Halouzka J, Juricova Z, Hunady M, Janik V. Frequent isolation of francisella tularensis from dermacentor reticulatus ticks in an enzootic focus of tularaemia. *Med Vet Entomol* **1996**;10(3):241-6.
153. Gill V, Cunha BA. Tularemia pneumonia. In: *Seminars in respiratory infections*; Saunders, **1997**:61-7.
154. Telford SR, Goethert HK. Emerging tick-borne infections: Rediscovered and better characterized, or truly 'new'? *Parasitology* **2005**;129(S1):301-27.
155. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: A 30-year experience with 88 cases. *Medicine* **1985**;64(4):251-69.
156. Baldwin CJ, Panciera RJ, Morton RJ, Cowell AK, Waurzyniak BJ. Acute tularemia in three domestic cats. *J Am Vet Med Assoc* **1991**;199(11):1602-5.
157. Gliatto JM, Rae JF, McDonough PL, Dasbach JJ. Feline tularemia on Nantucket Island, Massachusetts *J Vet Diagn Invest* **1994**:102-5.
158. Woods JP, Crystal MA, Morton RJ, Panciera RJ. Tularemia in two cats. *J Am Vet Med Assoc* **1998**;212(1):81-5.
159. Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: Review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* **1994**;19:42-7.
160. Arav-Boger R. Cat-bite tularemia in a seventeen-year-old girl treated with ciprofloxacin. *Pediatr Infect Dis J* **2000**;19(6):583-4.
161. Capellan J, Fong IW. Tularemia from a cat bite: Case report and review of feline-associated tularemia. *Clinical Infectious Diseases* **1993**;16(4):472-5.
162. Rodon P, Levallois D, Akli J, Leaute E, Friocourt P. Tularemia acquired from a cat-scratch. *Med Mal Infect* **1998**;28:223-4.
163. Bakker E, Ginjaar HB. De introductie van de PCR in het (neuro) genetisch onderzoek. *Ned Tijdschr Neurol* **2001**;5:359-66.
164. [homepage on the Internet]. Centre for Society and Genomics. 2009. Available from: <http://allesoverdna.roquin.net/basisinfo/dna-analyse/zo-werkt-gelelektroforese.html>.
165. Reverse line blot hybridization in the detection of tick-borne diseases [homepage on the Internet]. BIO TECH international. 2004. Available from:

http://www.biotech-online.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/reverse-line-blot-hybridisation-in-the-detection-of-tick-borne-diseases.pdf.

166. "Rifo assay" a pcr + reverse line blot hybridization method to detect rifampin resistance [homepage on the Internet]. Bilthoven, the Netherlands: Natinoal Institute of Public Health and the Environment. Available from: https://hypocrates.rivm.nl/RIFOASSAY_140303.pdf. Accessed 14-03-2003.
167. Kugeler KJ, Gurfield N, Creek JG, Mahoney KS, Versage JL, Petersen JM. Discrimination between francisella tularensis and francisella-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl Environ Microbiol* **2005**;71(11):7594-7.
168. Escudero R, Toledo A, Gil H, et al. Molecular method for discrimination between francisella tularensis and francisella-like endosymbionts. *J Clin Microbiol* **2008**;46(9):3139-43.
169. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging opportunist human pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* **2009**;9(5):312-23.
170. Spencer RC. The emergence of epidemic, multiple-antibiotic-resistant *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* and *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Hosp Infect* **1995**;30:453-64.
171. Stojek NM, Dutkiewicz J. Studies on the occurrence of gram-negative bacteria in ticks: *Ixodes ricinus* as a potential vector of *Pasteurella*. *Ann Agric Environ Med* **2004**;11:319-22.
172. Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. Localization and visualization of a coxiella-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* **2007**;73(20):6584-94.
173. Reeves WK, Loftis AD, Sanders F, et al. *Borrelia, coxiella, and rickettsia* in *Carios capensis* (acari: Argasidae) from a brown pelican (*pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Experimental and Applied Acarology* **2006**;39(3):321-9.
174. Hayes SF, Burgdorfer W. Interactions between rickettsial endocytobionts and their tick hosts. *Insect endocytobiosis: Morphology, physiology, genetics, evolution* **1989**:217-32.
175. Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, et al. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *rickettsia* species. *Parasites & Vectors* **2009**;2:41-8.
176. Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, et al. Longitudinal analysis of tick densities and *borrelia, anaplasma, and ehrlichia* infections of *ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **2006**;72(12):7594-601.
177. Toutoungi LN, Gern L. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology* **1993**;17(8):581-6.
178. Hubbard MJ, Baker AS, Cann KJ. Distribution of *borrelia burgdorferi* s. l. spirochaete DNA in british ticks(argasidae and ixodidae) since the 19 th century, assessed by PCR. *Med Vet Entomol* **1998**;12(1):89-97.
179. Nuttall P, Randolph S, Carey D, Craine N, Livesley A, Gern L. The ecology of lyme borreliosis in the UK. NATO ASI series.Series A, Life sciences (USA) **1994**.
180. Podsiadly E, Chmielewski T, Sochon E, Tylewska-Wierzbanowska S. *Bartonella henselae* in *ixodes ricinus* ticks removed from dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **2007**;7(2):189-92.
181. van Dijk S. Teken en door teken overgedragen infecties bij de kat. **2008**.
182. Adelson ME, Rao RVS, Tilton RC, et al. Prevalence of *borrelia burgdorferi, bartonella spp., babesia microti, and anaplasma phagocytophila* in *ixodes*

- scapularis ticks collected in northern new jersey. J Clin Microbiol **2004**;42(6):2799-801.
- 183.** Morozova OV, Cabello FC, Dobrotvorsky AK. Semi-nested PCR detection of bartonella henselae in ixodes persulcatus ticks from western Siberia, Russia. Vector-Borne & Zoonotic Diseases **2004**;4(4):306-9.
- 184.** Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, et al. Bartonella henselae in ixodes ricinus ticks (acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends Vol.9, No.3, March 2003 **2003**;9(3):329-32.
- 185.** Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of ehrlichia, borrelia burgdorferi sensu lato, and bartonella species in Dutch ixodes ricinus ticks. J Clin Microbiol **1999**;37(7):2215-22.

10. Bijlagen

10.1 Overzicht inzendingen I. ricinus en I. hexagonus bij katten per provincie:

Provincie	Aantal inzendingen <i>Ixodes ricinus</i>	Aantal inzendingen <i>Ixodes hexagonus</i>:
Zeeland:	30	21 (41,18%)
Limburg:	49	10 (16,95%)
Noord-Brabant:	132	22 (14,29%)
Gelderland:	215	18 (7,73%)
Overijssel:	65	5 (7,14%)
Noord-Holland:	313	21 (6,29%)
Zuid-Holland:	286	33 (5,33%)
Groningen:	77	3 (3,75%)
Utrecht:	136	5 (3,55%)
Drenthe:	102	3 (2,86%)
Friesland:	172	4 (2,27%)
Flevoland:	27	0

10.2 Protocol DNA-extractie

DNA extraction from ticks (Nucleospin Tissue) 30-1-09

Buffer T1 and B3 may form precipitate during storage. Incubate at 50-70°C to dissolve precipitate. Prepare waterbath at 56°C and thermocycler (hot plate) at 70°C. Preheat buffer BE at 70°C.

1. Select tick, rinse with milliQ and dry on clean filter paper max of 5 ticks per tube.
2. Cut tick into 2-4 pieces and make sure to use a clean piece of the paper for every tick
3. Put each tick separately into 2ml eppendorf tube and label tubes
4. Turn on the waterbath at 56°C
5. Add 180µl T1 and crush with crusher after every tick:
 - a. Remove the crusher parts from the machine
 - b. Wash the loose parts first in falcon tube with MilliQ, then 70% alcohol and again in a new falcon tube with MilliQ.
 - c. Dry the crusher and place back into machine
6. Add 25µl proteinase K* (in cold room) and vortex
7. Pre-lysis: incubate in water bath at 56°C for 1-3 hours, vortex every hour.
 - a. Turn on hotplate before last hour is over.
8. Add 200µl B3
9. Lysis: incubate at 70°C for 10-15min on the hot plate
10. Add 210µl of 100% ethanol and vortex.
11. Centrifuge at 11,000rpm for 2 min.
12. Transfer supernatant to column (nucleospin tube) and centrifuge at 11,000rpm for 1 min. Discard flow-through
13. Add 500µl BW and centrifuge at 11,000rpm for 1 minute. Discard flow-through.
14. Add 600µl B5 and centrifuge at 11,000rpm for 1 minute. Discard flow through.
15. Place column into 1,5ml (eppendorf) tube and add 100µl preheated (70°C) BE directly onto membrane.
16. Incubate for 1 minute (at room temperature) and centrifuge at 8,000rpm for 1 minute. Afterwards, centrifuge an additional time at 11,000rpm for 1 min.
17. Label tube with TickID, date and store at -20°C.

*Proteinase K from Nucleospin has a concentration of 22,4mg/ml, use 25µl of this solution.

10.3 Sequenties gebruikte primers

Overzicht gebruikte primers:

Primer	Sequentie (5'→ '3)
F-> Ehrlichia	GGA ATT CAG AGT TGG ATC ?TG G?T CAG
R-> Ehrlichia	CGG GAT CCC GAG TTT GCC GGG AC
F-> Bartonella	CCT CCT TTC TAA GGA TGA TCA AGA
R-> Bartonella	GAC TTG AAC CTC CGA CCT CA
F-> Borrelia	GAG AGT AGG TTA CCA GGG
R-> Borrelia	ACC ATA GAC TCT TAT TAC TTT GAC CA
F-> Coxiella	CTT GTA GTG GGG GAT AAC CTG G
R-> Coxiella	GTC AGT ATT GGT CCA GGA AGT CG
F-> Francisella	CCA CAT TGG GAC TGA GAC ACG
R-> Francisella	TAA TCC TGT TTG ATC CCC ACG
F-> Rickettsia	GAA CGC TAT CGG TAT GCT TAA CAC A
R-> Rickettsia	CAT CAC TCA CTC GGT ATT GCT GGA

10.4 Protocol PCR

RLB-PCR using Fermentas True Start polymerase

Master Mix for 1 reaction:

15,025ul	H ₂ O
2,5 ul	10x True Start buffer, thaw & vortex before use
2,5 ul	25 mM MgCl ₂ , thaw & vortex before use
0,1 ul	UNG
0,5 ul	F primer (20 pmol/ul)
0,5 ul	R primer (20 pmol/ul)
1,25 ul	dNTP/UTP mix
0,125 ul	True Start polymerase (5u/ul)
y ul (usually 2,5ul)	cDNA or DNA

Final volume: 25 ul

(PCR program:

1x 37° 3 min
1x 95° 10 min
Amplification step
Final extension at 72°C
hold at 4° / room temperature ∞)

Reagents/Buffers:

10x True Start buffer
MgCl₂ (25 mM)
dNTP/UTP mix
True Start polymerase (5u/ul)
Primer F/R
H₂O (milli-Q)

10.5 Protocol gelelectroforese

Agarose gel electrophoresis

Agarose gel preparation

1. Prepare 1 liter of 1X TAE by diluting 10x TAE stock
2. Prepare 1,5% agarose gel by weighing 1.5g agarose and adding 100ml 1x TAE
 - a. with a large gel use double dose
3. Boil the solution to dissolve the agarose in a microwave oven
4. Wait until it cools down to about 60°C
5. Add 2,5 µl of a 10mg/ml ethidiumbromide stock (**carcinogenic, use gloves!**) then mix the solution carefully.
6. wait until the bubbles in the solution disappear then pour gently into the gel tray and insert the comb
7. When the agarose has solidified carefully remove the comb and add 1X TAE buffer to cover the gel surface

PCR products preparation

1. Aliquot 1µl 6 X loading buffer (LB) in 0.2ml tubes or 96 wells plate. 6X LB= 42% (w/v) sucrose, 0,20% bromophenol blue
2. Add 5µl of PCR product and mix by pipetting up and down
3. Load the samples into the slots of solidified agarose gel
4. Load 5µL of 100bp DNA marker into the gel slots flanking the samples
5. Close the electrophoresis apparatus and connect the wiring to a DC power supply
6. Turn on the power supply and adjust the voltage to 100V (125V max)
7. The electrophoresis will take about 30-45min
8. Transfer the gel to a UV-illuminator ($\lambda = 302\text{nm}$) and take a picture

Reagents/Buffers:

6 X loading dye

1X TAE ultrapure (invitrogen)

Ethidiumbromide (10mg/ml)

Agarose (Hispanagar)

DNA ladder mix generuler (0,5ug/ul)(Fermentas)

10.6 Protocol RLB

Hybridization with PCR product

Make sure the thermal cycler is available!

1. Dilute PCR products: 10 µl in 150µl 2x SPPE/0.1%DS in 1.5ml tubes
2. Denature diluted PCR products for 10 min at 100°C in thermal cycler and cool on ice immediately. Centrifuge after samples have cooled down.
3. Incubate membrane for 5 min in ~10 ml 2 X SSPE/0,1% SDS at room temperature under gentle shaking
4. Place membrane in miniblotted, with slots perpendicular to line pattern of applied probes.
5. Remove residual fluid by aspiration.
6. Fill slots with PCR product (150µl). AVOID AIRBUBBLES. Fill empty slots with 2 x SSPE/0.1% SDS, to avoid cross flow.
7. Hybridize at hybridization temperature 42°C for 60 min on horizontal surface, no shaking.
8. Remove samples by aspiration. Remove membrane from blotter
9. Wash membrane **twice** in preheated **2 x SSPE/0,5% SDS** for **10 min** at **50°C** in water bath under gentle shaking
10. Incubate membrane with **20 ml** 2x SSPE/0.5% SDS + 5µl streptavidine for 30 min at 42°C in incubator
11. Wash membrane **twice** with 2x SSPE/0,5% SDS for 10 min at 42°C in water bath under gentle shaking
12. Wash membrane **twice** with 2x SSPE for 5 min at room temperature under gentle shaking
13. Dispose 2x SSPE
14. Spread 10ml ECL (5ml ECL1+ 5 ml ECL2, in cold room) over membrane, shake for few minutes so that membrane is fully covered
15. Cover membrane with overhead sheet
16. Incubate at room temperature for at least 1 minute
17. Place membrane between 2 (clean) overhead sheets, remove air bubbles by rolling a tube or some tissue over the sheet, and place them in the exposure cassette
18. Expose x-ray film for 10 min
19. Develop film on 5th floor
 - Miniblotted 45 (Immunetics, Cambridge, MA 02139)
 - Plastic cushions PC 200 (Immunetics)
 - Biotinylated C Membrane (negatively-charged Nylon 6.6), 0,45µ pore size 60320 (Pall Corporation, Gelman laboratory)
 - Streptavidin-POD Conjugate 1 089 153 (500U in 1 ml)(Roche)
 - ECL detection reagents RPN 3004 (Amersham pharmacia biotech)

10.7 Sequenties gebruikte probes

Overzicht sequenties gebruikte probes

Probe	Sequentie (5'→ '3)
<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i> catch-all	GGG GGA AAG ATT TAT CGC TA
<i>Anaplasma marginale</i>	GAC CGT ATA CGC AGC TTG
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	CCT ACC AAG GCG ATG ATC TAT A
<i>Borrelia burgdorferi s.l.</i>	CTT TGA CCA TAT TTT TAT CTT CCA
<i>Borrelia afzelii</i>	AAC ATT TAA AAA ATA AAT TCA AGG
<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	AAC ACC AAT ATT TAA AAA ACA TAA
<i>Borrelia garinii</i>	AAC ATG AAC ATC TAA AAA CAT AAA
<i>Borrelia valaisiana</i>	CAT TAA AAA AAT ATA AAA AAT AAA TTT AAG G
<i>Rickettsia</i> catch-all (Rick. Specific)	TTT AGA AAT AAA AGC TAA TAC CG
<i>Rickettsia helvetica</i>	GCT AAT ACC ATA TAT TCT CTA TG
<i>Rickettsia sp. (DnS14)/ raoultii</i>	CTA ATA CCG CAT ATT CTC TAC G
<i>Rickettsia massiliae</i>	TGG GGC TTG CTC TAA TTA GT
<i>Rickettsia conorii</i>	CTT GCT CCA GTT AGT TAG T
<i>Bartonella</i> catch-all	GAT GAT GAT CCC AAG CCT TC
<i>Bartonella elizabethae</i>	CGC TAA CTC TCA ATG AAT CCC TC
<i>Bartonella henselae</i>	GCC CCT ACC TCT GAA AGA GTG
<i>Bartonella quintana</i>	CTT CGG GCG ATC TCT TAC AAT A
<i>Bartonella schoenbuchensis</i>	CAA GCG TTC TGT TCA TCA AAT
<i>Bartonella vinsonii</i>	TTA AAC CGT GCA TAT GAC ACT AA
<i>Coxiella</i> catch-all	CTT GTA GTG GGG GAT AAC CTG G
<i>Francisella</i> catch-all	TCT GTA GGT GGT TTG TTA AGT CAG ATG T

10.8 Overzicht verkregen sequenties na sequencing

Tabel met verkregen sequenties zoals deze verkregen zijn van Base Clear (dus nog inclusief de gebruikte vector)

Monster nummer:	Sequenties:
2664A-ehr	ATGATAGACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGC CGCCATGGCGGCCCGGGAATTCGATTGGAATTCAGAGTTGGATCATGGT TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAG GCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATC TGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAG GACCACACACTTCATGGTGAGTGGTGCAAAGCTTTTGGCGTGTGGGATGA GCCCCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACG ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACGCTGGGACTGAGATACG GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCATAATGGGCGC AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAA ACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAAA
4027G-rick	ACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATG GCGGCCGCGGGAATTCGATTGAACGCTATCGGTATGCTTAACACATGCAA GTCGAACGGCAGCGCGGGGAGCTCTTGCTCCCTGGTGGCGAGTGGCGGAC GGGTGAGTAATACGTAGGAATCTACCTTGATAGTGGGGGATAACCGGGGA AACTCGGGCTAATACCGCATAATCTCTGTGGAGCAAAGCGGGGGATCTTC GGACCTCGTGCTTAAAGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTTGTGGTGGGG TAATGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAG CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GGAATCTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTG ATGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGA GCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA
2664A Frans (13)	TCGACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCGC ATGGCGGCCCGGGAATTCGATTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTGC TACACCGGGAATTCACACTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCC ACTGCAATTCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAAACAAC CACCTACGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGACCCCTT CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGG TACCGTCAGAACAAACCGAGTATTAATCGACTGCTTTTCTTCCCAACAAA AGGGCTTACAACCCGAAGGCCTTCTCACCCACGCGGTATGGCTGGATC AGGCTTGCGCCCATTTGTCAGTATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT CTGGACCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG CCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGC
2664A-Frans (14)	GATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCCGGGAAT TCGATTCCACATTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCG TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGGTGGAAAGAAAA GCAGTCGATTAATACTCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACC GGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAC TCGGAATTAAGGCGTAAAGCGTGCAGTGGTGGTTGTTTAAAGTCTGTTG TGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAG AGTGTGGTAGAGGGTAGTGAATCCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGA GATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGAC ACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAATCACTAGTGA
8545C-Cox	GATGTATCGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCC GGCCGCATGGCGGCCCGGGAATTCGATTCTGTAGTGGGGGATAACCT GGGGAAACTCGGGCTAATACCGCATAATCTCTGTGGAGCAAAGCGGGGA TCTTCGGACCTCGTGCTTAAAGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTTGTGG TGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACG ATCAGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGGGGAATCTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCCGCT GTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAGAGAAAGAAAT CTCAAGGGTAATATCCTTGGGCGTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACTG GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGAGTGCAGCGTTAAT CGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGATATTAAAGTCGGATG

<p>4027C-Rick</p>	<p>GACTCCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCAT GGCGGCCGCGGGAATTCGATTCATCACTCACTCGGTATTGCTGGATCAGG GTTTCCCCCATTGTCCAAGATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACG GATCGTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTAATCCGACATA GGCTCATCTTAAAGCACGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTTGCTCCACAGA GATTATGCGGTATTAGCCCCGAGTTTCCCCGGGTTATCCCCACTACAAGG TAGATTCCTACGTATTACTACCCGTCGCCACTCGCCACCAGGGAGCAA GAGTCCCCGCGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCATACCGATAGC GTTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAG AGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATA</p>
<p>Monster 2664I-Bart</p>	<p>ATGTATAGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCG GCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCCTCCTTTCTAAGGATGATCA AGAATGGGGTTTACTCCTTTTTGATCAAATTAGACATCAGTTTTATTAC ATTTAAACTTATTATGAGTGCATTAACCTTATTATGAGTGCAAATGTTTT GAATAAAACCTTTTAAATCAGCCTATAATCACTATAGGTTAAGCAGGCTT GCCGCCTTCATTTCTTTCTTCCGATGATGATCCCAAGCCTTCAAGCGT TCTGTTCAATTTTCAAAGCGTTTAAAGAAACAGGTAAAAAGGTGTTT AAGAAACATATTTGTTTCTTAAACATATCTTTTTGTTTTCTTTGTTTGT CCCGAGGAAGGTTTTTACCGATTTACTCCTGAGGGCTTGTAGCTCAGTTG GTTAGAGCGCGCGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGAGGTTCAAGTCAATCAC TAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCA</p>