

Screeningsonderzoek naar teken-gebonden ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland

Deel 3 van het complete Screeningsonderzoek
binnen het Wildlife project



Auteur: Marloes Busser

Stagelocatie: Utrecht Centrum voor Tekengebonden Ziekten (UCTD), Departement
Infectieziekten en Immunologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Stageperiode: September 2009 – Januari 2010

Begeleiding: Prof. Dr. F. Jongejan, Dr. M.J.L. Kik,
Drs. A.M. Nijhof, J.A. Balk

Samenvatting

Bij dit screeningsonderzoek werden bloedmonsters en teken afkomstig van wilde hoefdieren uit negen verschillende onderzoeksgebieden in Nederland onderzocht op de aanwezigheid van verschillende groepen pathogenen. Het doel van het onderzoek is hierbij het in kaart brengen van de Nederlandse tekenpopulatie en de pathogenen welke zij bij zich dragen en hierbij na te gaan of wilde hoefdieren een reservoirfunctie vervullen voor tekengebonden ziekten.

Er werden 255 teken, waarvan 17 afkomstig van één damhert en 238 afkomstig van 22 reeën, door jagers afkomstig uit negen verschillende onderzoeksgebieden opgestuurd naar het UCTD. Voorts werden 68 bloedmonsters, waarvan één afkomstig van het damhert en 67 afkomstig van reeën, opgestuurd.

De teken werden allereerst gedetermineerd op basis van species, geslacht en levensstadium. Vervolgens werd uit het bloed en de teken DNA geëxtraheerd dat middels PCR (Polymerase Chain Reaction) en RLB (Reverse Line Blot) werd onderzocht op de aanwezigheid van verschillende groepen pathogenen, waarbij in het bijzonder gekeken werd naar: *Babesia/Theileria*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Rickettsia* en *Nicolleia*.

Uit de resultaten bleek dat alle bij dit onderzoek gebruikte teken behoorden tot de species *Ixodes ricinus*. Van de 255 teken behoorden er 7 tot de nimfen, 41 tot het adulte mannelijke stadium en 207 tot het adulte vrouwelijke stadium. Uiteindelijk is alleen DNA geëxtraheerd van de adulte teken.

Resultaten welke verkregen werden met de RLB lieten de volgende besmettingspercentages van teken zien voor de verschillende pathogenen:

Babesia/Theileria: 9,1% (*B. catch-all*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. canis-2*), *Bartonella*: 19,5% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Borrelia*: 0%, *Ehrlichia/Anaplasma*: 25,5% (*E/A catch-all*, *E. canis/ovina*, *E. schotti*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 52,8% (*R. catch-all*, *R. helvetica*, *R. massilae*, *R. conorii*, *R. sp. (DnS14/raoultii)*), *Nicolleia*: 21,6% (*N. catch-all*).

In de bloedmonsters afkomstig van reeën werden de volgende pathogenen aangetoond.

Babesia/Theileria: 70,1% (*B. catch-all*, *B. divergens*, *B. venatorum*), *Bartonella*: 64,2% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Ehrlichia/Anaplasma*: 22,4% (*E/A catch-all*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 10,4% (*R. catch-all*, *R. helvetica*, *R. massilae*), *Nicolleia*: 1,5% (*N. catch-all*). Reeën lijken dus een reservoirfunctie te vervullen voor deze pathogenen.

In het bloedmonster afkomstig van het damhert werden geen pathogenen aangetroffen.

De overdracht van *Babesia/Theileria* van gastheer op teken lijkt niet efficiënt te verlopen. *Borrelia* is zowel in bloed als in teken niet aangetoond. Antilichamen zouden hierbij een rol kunnen spelen. Ook kunnen verschillende tekenpopulaties een variabele vatbaarheid vertonen voor *Borrelia*-soorten, waardoor de vectorcompetentie binnen één tekensort kan variëren. *Rickettsia*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Bartonella* en *Nicolleia* zijn zowel in bloedmonsters als in teken veelvuldig aangetoond. De overdracht van gastheer op teek en andersom lijkt dus efficiënt te verlopen.

Op het gebied van pathologisch onderzoek kunnen nog geen duidelijke conclusies getrokken worden betreffende tekengebonden ziekten.

Abstract

In this research, blood samples and ticks from wild game animals from nine different research areas in the Netherlands were examined on the presence of several pathogen groups. The goal of this research is to map the Dutch tick population and the pathogens that they carry with them and also to investigate whether wild game animals fulfil a reservoir function for tick-bound diseases.

255 ticks, of which 17 came from a fallow-deer and 238 came from roe deer, were sent to the UCTD by hunters from nine different areas. Furthermore, 68 blood samples, of which one came from a fallow-deer and 67 came from roe deer, were sent.

The species, gender and stadia of the ticks were first determined. Next, DNA was extracted from the blood samples and the ticks. The DNA was examined by PCR and RLB for the presence of several pathogen groups. The following pathogens were particularly searched for: *Babesia/Theileria*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Rickettsia* and *Nicolleia*.

The results showed that all the ticks that were used in this research belonged to the species *Ixodes ricinus*. 7 out of 255 ticks were nymphs, 41 ticks were male adults and 207 ticks were female adults. DNA was only extracted from adult ticks.

Results that were obtained from the RLB show the following rates of infection in ticks:

Babesia/Theileria: 9,1% (*B. catch-all*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. canis-2*), *Bartonella*: 19,5% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Borrelia*: 0%, *Ehrlichia/Anaplasma*: 25,5% (*E/A catch-all*, *E. canis/ovina*, *E. schotti*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 52,8% (*R. catch-all*, *R. helvetica*, *R. massilae*, *R. conorii*, *R. sp. (DnS14/raoultii)*), *Nicolleia*: 21,6% (*N. catch-all*).

In the blood samples from roe deer, the following pathogens were found.

Babesia/Theileria: 70,1% (*B. catch-all*, *B. divergens*, *B. venatorum*), *Bartonella*: 64,2% (*B. catch-all*, *B. schoenbuchensis*), *Ehrlichia/Anaplasma*: 22,4% (*E/A catch-all*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*), *Rickettsia*: 10,4% (*R. catch-all*, *R. helvetica*, *R. massilae*), *Nicolleia*: 1,5% (*N. catch-all*). Roe deer seem to fulfil a reservoir role for these pathogens.

In the blood sample from the fallow deer, no pathogens were found.

The transmission of *Babesia/Theileria* from host to ticks seems to be inefficient. *Borrelia* wasn't found in blood or in ticks. Antibodies might play a role here. Different tick populations can show a variable susceptibility for *Borrelia* species. Therefore, vector competence can differ within one tick species. *Rickettsia*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Bartonella* en *Nicolleia* were commonly found in blood samples as well as in ticks. The transmission from host to tick and vice versa seems to be efficient.

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

Inhoudsopgave

• Inleiding.....	5
• Teken.....	6
- <i>Ixodes ricinus</i>	7
- Levenscyclus van <i>Ixodes ricinus</i>	8
• Door teken overdraagbare pathogenen.....	9
- <i>Babesia</i>	9
- <i>Theileria</i>	10
- <i>Rickettsia</i>	10
- <i>Anaplasma</i>	11
- <i>Ehrlichia</i>	11
- <i>Borrelia</i>	11
- <i>Bartonella</i>	12
• Betrokken Diersoorten.....	13
- Ree.....	13
- Damhert.....	13
- Edelhert.....	13
- Eland.....	14
- Moeflon.....	14
- Das.....	14
- Egel.....	14
- Zwijn.....	15
• Jachtlocaties.....	16
• Materiaal & Methodes.....	17
- Teken en bloed verzamelen.....	17
- Determinatie van teken.....	17
- DNA-extractie.....	18
- Polymerase Chain Reaction.....	18-19
- Gelelectroforese.....	20
- Reverse Line Blot.....	21
- Kloneren.....	21
- Pathologisch onderzoek.....	22
• Resultaten.....	23
- Teken.....	23
- PCR.....	23-24
- RLB.....	24-25
- Pathologisch onderzoek.....	26
• Discussie.....	27
- Reflectie resultaten.....	27
▪ Teken.....	27
▪ PCR en RLB.....	27-29
- Reflectie Materiaal en Methodes.....	29-30
- Reflectie pathologisch onderzoek.....	30
• Conclusie.....	31
• Dankwoord.....	32
• Literatuurlijst.....	33-35
• Bijlagen.....	36
- Bijlage 1 Tap- en verzendinstructie; Bloedafname en tekenverzameling.....	36
- Bijlage 2 Protocol DNA extractie (teken en bloed).....	37
- Bijlage 3 Protocol PCR.....	38
- Bijlage 4 Protocol gelelectroforese.....	39
- Bijlage 5 Protocol RLB.....	40
- Bijlage 6 Test-pathogenen RLB.....	41
- Bijlage 7 Protocol klonering.....	42
- Bijlage 8 Protocol Zuivering DNA.....	43
- Bijlage 9 Uitslagen RLB.....	44

Inleiding

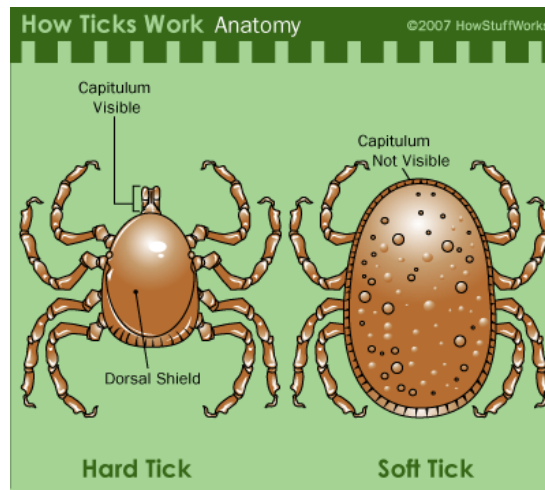
Teken fungeren als efficiënte vectoren van een groot aantal infectieziekten welke zowel bij mensen als bij dieren voorkomen. Een aantal van deze infectieziekten behoort tot de zoönosen. Vanuit veterinaire en medische oogpunten is men bij het Utrecht Centre for Tick-borne Diseases (UCTD) begonnen om de Nederlandse tekenpopulatie en de pathogenen welke zij bij zich dragen in kaart te brengen. Er is al veel onderzoek verricht naar teken welke afkomstig zijn van onze huisdieren. Het is echter ook belangrijk om onderzoek te verrichten naar teken welke afkomstig zijn van wilde hoefdieren. Wilde hoefdieren vervullen namelijk een reservoirfunctie voor tekengebonden ziekten. Bij dit onderzoek worden verschillende populaties wilde dieren (reeën, edelherten, damherten, wilde zwijnen, egels, moeflons, dassen) gescreend op de aanwezigheid van pathogenen. Ook de teken welke deze dieren bij zich dragen, worden onderzocht. Bij dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van moleculaire diagnostiek (DNA-extractie, PCR en RLB) en pathologisch onderzoek.

Dit verslag beschrijft het derde deel van het complete screeningsonderzoek naar tekengebonden ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland. Er worden onderzoeksresultaten vermeld, welke verkregen zijn gedurende een drie maanden durende onderzoeksstage (september 2009 tot december 2009). Allereerst wordt kort ingegaan op enkele andere belangrijke aspecten van het onderzoek, namelijk: de gebruikte teken, het aangeboden wild, de jachtlocaties vanwaar het wild afkomstig was en de pathogenen waarop de ingezonden bloedmonsters en de teken onderzocht werden. Van belang is het beantwoorden van de volgende vragen:

- Welke tekensoorten komen voor op wilde hoefdieren in Nederland?
- Welke stadia van de teek komen voor?
- Wat is de besmettingsgraad van teken met de verschillende pathogenen? (te weten: *Ehrlichia*, *Babesia*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Borrelia* en *Nicolleia*)
- Weerspiegelt de aanwezigheid van een pathogeen in de teek zich in de aanwezigheid van het pathogeen in het bloed van het dier?
- Is er een relatie tussen de aanwezigheid van pathogenen in het bloed van een dier en de gezondheid van een dier?

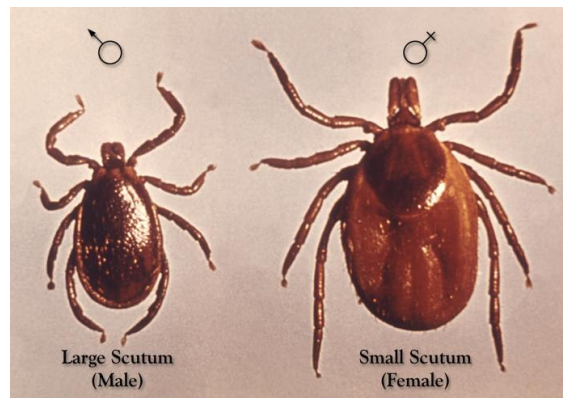
Teken

Teken zijn parasieten van zoogdieren, welke zich voeden door middel van een bloedmaaltijd. Er zijn wereldwijd ongeveer 870 tekensoorten bekend, waarvan er in Noordwest Europa 26 soorten beschreven zijn. De hele tekenpopulatie is op te delen in twee families, te weten: de harde teken (*Ixodidae*) en de zachte teken (*Argasidae*). Ongeveer 80% van alle tekenspecies behoren tot de *Ixodidae*. Deze twee families zijn als volgt van elkaar te onderscheiden. Bij de *Ixodidae* steekt het capitulum ver naar voren en is hierdoor zichtbaar vanaf dorsaal. Bij de *Argasidae* is het capitulum geheel aan de buikzijde gelegen en is hierdoor niet vanaf dorsaal zichtbaar. Verder bezitten alleen harde teken een scutum. Dit is een chitineus, dorsaal gelegen schild[1][2].



Figuur 1 Het verschil tussen harde teken en zachte teken [3]

Het scutum bedekt bij mannetjesteken de gehele dorsale zijde van het lichaam. Bij vrouwjesteken, nimfen en larven wordt alleen het craniale deel van de dorsale zijde van het lichaam door het scutum bedekt.[2].



Figuur 2 Het verschil tussen mannetjesteken en vrouwjesteken [4]

Zowel harde als zachte teken kunnen een belangrijke rol innemen als vector bij de overdracht van een groot aantal pathogene micro-organismen, zoals: bacteriën, protozoa, virussen en helminthen. Een aantal van deze pathogenen kunnen infectieuze ziekten veroorzaken, zoals: *borreliose*, *ehrlichiose* en *babesiose*.

Factoren die ervoor zorgen dat teken een belangrijke rol kunnen spelen bij de overdracht van dergelijke pathogenen zijn:

- Een stevige aanhechting van de teek aan de gastheer
- Langdurige bloedmaaltijden, waarbij grote hoeveelheden pathogenen kunnen worden opgenomen
- Transmissie van pathogenen tussen verschillende stadia (transstadieel) en tussen verschillende generaties (transovarieel).

De belangrijkste, in Nederland voorkomende, tekensorten zijn *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* en *Dermacentor reticulatus*. Daarnaast worden er regelmatig exotische tekenspecies in Nederland geïntroduceerd via reptielen, huisdieren en migrerende vogels. *Ixodes ricinus* komt verreweg het meest voor in Nederland. *Ixodes hexagonus* is aanwezig op 90% van alle egels en komt verder voor op honden, dassen en marters. *Dermacentor reticulatus* is recentelijk in Nederland geïntroduceerd en komt lokaal in grote aantallen voor. *Dermacentor reticulatus* is in Nederland tot nu toe aangetoond op zes verschillende locaties.[5]

Levenscyclus van harde teken

De levenscyclus van harde teken bestaat uit drie stadia. De gehele levenscyclus kan zich volbrengen op één, twee of drie gastheren. Dit verschilt per tekensort. Allereerst is er het larvale stadia. Deze larven zijn te herkennen aan het feit dat ze over drie paar poten beschikken. Nadat de larven zich op de gastheer hebben volgezogen met bloed kunnen zij ofwel op de grond vallen en daar vervellen tot nimf, ofwel op de gastheer aanwezig blijven en vervellen tot nimf. Nimfen hebben vier paar poten. De nimf kan, na zich te hebben volgezogen op een gastheer, ook ofwel afvallen en vervellen, ofwel op de gastheer vervellen tot een adulte mannetjesteek of vrouwtjesteek. Hierna volgt de paring, welke meestal op de gastheer plaatsvindt. Alleen *Ixodes spp.* kunnen ook in de vegetatie paren. Na de paring zuigt het vrouwtje zich vol met bloed, valt vervolgens van de gastheer af en legt eenmalig een paar duizend eieren, waarna ze sterft. Mannetjestecken blijven langer (tot wel enkele maanden) op de gastheer zitten en kunnen meerdere malen paren. De hele levenscyclus van harde teken kan enkele maanden (in tropische regio's) tot enkele jaren (in koudere klimaten) in beslag nemen.

[1][2]

Levenscyclus van zachte teken

Het aantal stadia waaruit de levenscyclus van zachte teken bestaat, wisselt sterk. Allereerst is er wederom het zespotige larvale stadia. Larven zuigen zich op de gastheer vol met bloed en vervellen tot nimf. Echter, larven van enkele zachte tekensorten (bijv. *Ornithodoros savignyi*) vervellen rechtstreeks, dus zonder tussenkomst van een bloedmaaltijd, tot nimf. Bij veel zachte tekensorten komen meerdere nimfale stadia voor. Deze stadia nemen steeds meer in omvang toe, totdat uiteindelijk een vervelling tot het adulte stadium optreedt. Zachte teken zuigen, in tegenstelling tot harde teken, meerdere keren bloed gedurende elk levensstadium. De paring van zachte teken vindt in het grootste deel van de gevallen niet, zoals bij de harde teken, plaats op de gastheer. Vrouwtjes kunnen meerdere malen eieren leggen tussen de verschillende bloedmaaltijden. De gehele levenscyclus kan enkele jaren in beslag nemen en duurt dus veel langer dan bij harde teken.

[1][2]

Ixodes ricinus

De in Nederland verreweg meest voorkomende tekenspecies is *Ixodes ricinus*. *Ixodes ricinus* teken prefereren een koel, vochtig microklimaat gecombineerd met een dikke strooisellaag. We vinden deze teken vaak terug in bos- of grasrijke gebieden. *Ixodes ricinus* teken zijn weinig gastheerspecifiek en kan dus op verschillende diersoorten (inclusief de mens) worden aangetroffen. Larven en nimfen vinden we vaak terug op kleine zoogdieren, vogels en hagedissen. Adulte teken zijn terug te vinden op grote herkauwers (runderen, reeën), honden of wilde carnivoren. Adulte teken zijn actief vanaf oktober tot halverwege maart, terwijl de immature stadia activiteit vertonen tussen april en juni.

[6]

Levenscyclus van *Ixodes ricinus*

Tijdens de levenscyclus van *Ixodes* teken worden vier stadia doorlopen. Opeenvolgend zijn dat het ei, de zespotige larve, de achtpotige nimf en de adulte teek. Tijdens de gehele levenscyclus van *Ixodes* teken wordt bloed gezogen van drie verschillende gastheren (3 gastherige levenscyclus).

De larve gaat, nadat deze uit het ei gekomen is, op zoek naar een geschikte gastheer. Deze gastheer is meestal een klein zoogdier of vogel. De larve zuigt zich vervolgens vol met bloed van de gastheer. Dit volzuigen kan vier tot zes dagen in beslag nemen. Een volgezogen larve valt van de gastheer af en vervelt tot nimf in een beschutte omgeving. De nimf zoekt vervolgens een tweede gastheer uit, zuigt zich vol met bloed, om vervolgens weer van de gastheer af te vallen en te vervellen tot adulte teek. Vervolgens vindt de paring plaats welke zowel in de vegetatie als op een gastheer kan plaatsvinden. Het wijfje zoekt na afloop van de paring, indien zij nog in de vegetatie aanwezig is, een geschikte gastheer uit en zuigt zich vol met bloed, waardoor haar lichaamsgewicht soms wel kan vertienvoudigen.[1] Het wijfje valt vervolgens van de gastheer af en produceert meerdere partijen van enkele duizenden eieren. Dit proces kan enkele dagen tot weken duren. Adulte mannetjesteken kunnen na de paring, onaangehecht, op de gastheer aanwezig blijven en meerdere malen paren.[1]

Onder gunstige omstandigheden kan de gehele levenscyclus van een *Ixodes* teek voltooid worden binnen één jaar.[1]

Door teken overdraagbare pathogenen

Tekenbeten kunnen verschillende nadelige gevolgen veroorzaken voor de gastheer. Op de plaats van de tekenbeet kan een lokale ontsteking optreden. Ook kan een gastheer, wanneer deze door vele teken gebeten wordt, veel bloed verliezen. Veel belangrijker is echter dat teken als vector kunnen fungeren bij de overdracht van verschillende pathogenen tussen verschillende gastheren. De pathogenen welke in dit onderzoek onderzocht worden, staan hieronder beschreven.[7]

Babesiose/piroplasmose

De protozoaire parasieten van het genus *Babesia* ontwikkelen zich uitsluitend door tweedeling in erythrocyten van een vertebrate gastheer. Een adulte teek raakt geïnfecteerd door het opzuigen van geïnfecteerd bloed van een gastheer. In de teek vindt vervolgens de geslachtelijke ontwikkeling plaats, waarbij de protozoën via het ovarium en het ei (transovarieel) overgebracht worden op de volgende tekengeneratie. In de speekselklieren van de volgende generatie vindt de sporogonie plaats. De infectieuze sporozoïeten worden, bij een bloedmaaltijd, met het speeksel overgebracht op de volgende gastheer.

De aandoening kan bij de meeste zoogdiersoorten voorkomen. Ziekteverschijnselen treden vooral op bij dieren die op latere leeftijd voor het eerst geïnfecteerd raken.

Na een incubatietijd van één tot twee weken treedt apathie, anorexie, koorts en versnelde pols en ademhaling op. Later kan een haemolytische anemie, gecombineerd met een haemoglobinurie, ontstaan. Bij geen behandeling ontstaat vervolgens icterus, splenomegalie, lymfadenopathie en in ernstige gevallen ook nierdysfunctie en DIS. Er bestaat ook een cerebrale vorm van *babesiose* waarbij hypersensibiliteit, agressie, cirkelbewegingen en verlammingen als belangrijkste symptomen op de voorgrond treden.[8]

Babesia canis

Veroorzaker van canine *babesiose*, welke vooral voorkomt in Zuid-Europa. De meerderheid van de in Nederland geconstateerde gevallen zijn in Frankrijk opgelopen. Sporadisch komt autochtone *babesiose* voor. *Babesia canis* wordt overgedragen door *Dermacentor reticulatus* en *Dermacentor marginatus*. De parasiet is ook aangetoond in *Ixodes ricinus* teken.

Babesia vogeli

Veroorzaakt een mildere vorm van *babesiose* welke voorkomt in de tropen. *Babesia vogeli* wordt overgedragen door *Rhipicephalus sanguineus*.

Babesia rossi

Veroorzaakt een ernstige vorm van *babesiose* welke voornamelijk voorkomt in Afrika. Sporadische importgevallen zijn in Nederland bekend. *Babesia rossi* wordt overgedragen door *Haemaphysalis leachi*.

Babesia gibsoni

Veroorzaakt chronische anemie. Komt voor in Zuid-Azië, Afrika, de V.S. en Europa. Sporadisch komen importgevallen in Nederland voor. *Babesia gibsoni* wordt overgedragen door *Haemaphysalis* en *Rhipicephalus*.

Babesia capreoli

Deze parasiet werd in 1996 voor het eerst aangetoond bij Nederlandse reeën. *Babesia capreoli* wordt overgedragen door *Ixodes ricinus*.

Babesia divergens

De belangrijkste verwekker van *babesiose* bij het rund. *Babesia divergens* wordt overgedragen door *Ixodes ricinus*. Infecties verlopen vaak mild of asymptomatisch. Bij runderen welke op latere leeftijd voor het eerst met de parasiet in aanraking komen, kan de infectie wel een ernstig verloop hebben. *Babesia divergens* komt ook bij de mens voor. Fatale gevallen zijn beschreven bij mensen zonder milt.

Babesia major

Dit agens veroorzaakt *babesiose* bij Nederlandse runderen en wordt overgedragen door *Haemaphysalis punctata*. De parasiet is minder pathogeen dan *Babesia divergens*.

Babesia caballi

De verwekker van *babesiose* bij het paard welke wordt overgedragen door *Dermacentor*, *Hyalomma* en *Rhipicephalus* teken. Aandoening komt veel voor bij paarden in Zuid-Europa. Importgevallen in Nederland worden ook vaak gerapporteerd.

Babesia motasi

De verwekker van een milde vorm van *babesiose* bij Nederlandse schapen welke wordt overgedragen door *Haemaphysalis punctata*.

Babesia microti

Komt voornamelijk voor in de Verenigde Staten. Dit agens heeft knaagdieren als reservoir en wordt overgedragen door *Ixodes scapularis*. Het agens is ook aangetoond in *Ixodes ricinus* teken in Nederland. Er zijn gevallen beschreven bij de mens. Humane babesiose in de Verenigde Staten verloopt vaak asymptomatisch.

Babesia sp. (EU1) (provisorisch ook wel *Babesia venatorum* genoemd)

Wordt overgedragen door *Ixodes ricinus*. Er zijn gevallen beschreven in Europa waarbij *Babesia sp. (EU1)* de veroorzaker was van humane babesiose. Reeën vormen een belangrijk reservoir voor *Babesia sp. (EU1)*.

[9][10]

Theileriose

Theileria-soorten komen vooral voor bij herkauwers, maar ook bij paarden, honden en de mens. Het agens wordt uitsluitend transstadieel tussen teken overgedragen. Er komen drie stadia in de vertebraat voor, namelijk: één stadium in de erythrocyt (piroplasma) en de andere twee stadia (macroscizonten en microscizonten) in lymfocyten.

Theileria annulata

Verwekker van *theileriose* bij het rund welke overgedragen wordt door *Hyalomma*. Komt voor in landen rondom de Middellandse zee, het Midden-Oosten en China.

Theileria parva

Verwekker van East Coast Fever bij het rund in Oost-Afrika welke overgedragen wordt door *Rhipicephalus appendiculatus*.

Theileria buffeli

Apathogene variant van *Theileria* welke bij runderen over de hele wereld voorkomt. Het agens wordt overgedragen door *Haemaphysalis*.

Theileria equi

Veroorzaker van *theileriose* bij het paard in warme, gematigde gebieden en de subtropen. Het agens wordt transstadieel overgedragen door verschillende *Dermacentor*, *Hyalomma* en *Rhipicephalus* teken.

[10]

Rickettsiose

Rickettsiae bevinden zich vrij in het cytoplasma van gastheercellen, waar zij zich vermeerderen door tweedeling. *Rickettsiae* zijn bijna altijd zoönosen met knaagdieren als reservoir. *Rickettsiae* worden overgedragen door mijten, teken en bloedzuigende insecten. Binnen Europa vindt de overdracht van *Rickettsiae* voornamelijk plaats via *Ixodes ricinus* teken. *Nicolleia*-soorten behoren ook tot de *Rickettsiae*.

Rickettsia rickettsii

Veroorzaakt Rocky Mountain Spotted Fever bij mensen in de Verenigde Staten. Deze aandoening begint met het optreden van koorts, hoofdpijn en spierpijn, gevolgd door het ontstaan van uitslag. De aandoening kan een fataal verloop hebben. Het agens wordt overgedragen door *Dermacentor* teken.

Rickettsia slovaka

Dit agens veroorzaakt Tick-Borne Lymfadenopathy. Deze aandoening wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van gezwollen lymfeknopen. Ook dit agens wordt overgedragen door *Dermacentor* teken.

Rickettsia helvetica

Dit agens is beschreven als veroorzaker van fatale perimyocarditis, koorts en sarcoïdose bij de mens. Het agens is aangetoond in teken uit verschillende Europese landen, zoals Zwitserland, Zweden, Polen, Duitsland, Frankrijk en Nederland.

Rickettsia conorii

Veroorzaker van fièvre boutonneuse, welke wordt overgedragen door *Rhipicephalus sanguineus*. Deze aandoening begint met het optreden van hoge koorts, gevolgd door exantheem. Op de plaats van de tekenbeet ontstaat een zwarte plek. Ook kunnen neurologische symptomen ontstaan. De aandoening komt voor in Zuid-Europa.

Rickettsia africae

Veroorzaker van Tick-bite Fever bij mensen in Zuidelijk Afrika. Dit agens wordt overgedragen door *Amblyomma hebraeum* nimfen.

[11][10]

Anaplasmosse

Anaplasma-soorten zijn obligaat intracellulair levende bacteriën, met een voorkeur voor erythrocyten. Transmissie vindt ofwel transstadieel plaats ofwel door stekende vliegen (mechanische transmissie). Infecties komen voor bij runderen, geiten en schapen in tropische gebieden, inclusief Zuid-Europa. Symptomen zijn koorts gevolgd door hemolytische anemie.

Anaplasma mesaeterum

Komt voor in Nederland. Veroorzaakt *anaplasmosse* bij het schaap. Infectie verloopt vaak fataal bij dieren zonder milt. Vectoren zijn *Ixodes ricinus* en *Haemaphysalis punctata*.

Anaplasma phagocytophilum

Dit agens, welke neutrofiele en eosinofiele granulocyten invadeert, veroorzaakt tick-borne fever bij herkauwers. Het agens wordt binnen Europa voornamelijk overgedragen door nimfen en adulte *Ixodes ricinus* teken, maar is ook in andere teken aangetoond. Het agens is aangetoond bij schapen, geiten, koeien, reeën, paarden, rendieren, honden en katten. Het agens fungeert verder ook als zoönose. Bij de mens veroorzaakt het agens granulocyttaire *ehrlichiose*. De aandoening verloopt zelden fataal, tenzij secundaire infecties optreden.

Runderen met tick-borne fever vertonen koorts, stijve gang, gedaalde melkgift en mogelijk abortus. Na twee weken treedt meestal spontaan herstel op.

Binnen Europa worden vooral knaagdieren aangeduid als reservoir voor *Anaplasma phagocytophilum*. Bewijzen zijn ook gevonden voor het feit dat schapen en reeën dienen als natuurlijke gastheren voor dit agens.

[10, 12]

Ehrlichiose

Ehrlichia-soorten zijn obligaat intracellulair levende bacteriën, met een voorkeur voor leukocyten en endotheelcellen.

Ehrlichia canis

Dit agens, welke wordt overgedragen door *Rhipicephalus sanguineus*, leeft in monocyten. Transmissie in teken vindt transstadieel plaats. Voor infectie is vooral de Duitse herder gevoelig.

Tijdens de acute fase van de infectie (na 5-20dgn), welke 2 tot 4 weken kan duren, ontstaat koorts, anorexie, dyspneu, oedeem, braken, depressie, lymfadenopathie en een verhoogde bloedingneiging. Vervolgens volgt een subklinische fase welke, afhankelijk van de immuunstatus van het dier, overgaat in een milde of ernstige chronische fase. Bij de ernstige vorm ontstaan een verhoogde bloedingneiging, neurologische symptomen, conjunctivitis, gegeneraliseerde vasculitis, perifeer oedeem, uveïtis, poliartritis, glomerulonefritis en beenmerghypoplasie. In het bloed worden een persisterende trombocytopenie met vaak een pancytopenie en een hypergammaglobulinemie gevonden. De ernstige vorm verloopt vaak fataal.

[10, 12]

Borreliose

Borrelia burgdorferi sensu lato

Veroorzaker van de ziekte van Lyme. De bacterie kan ingedeeld worden in tien verschillende species, waarvan *Borrelia afzelii* en *Borrelia garinii* het meest voorkomen in West-Europa. Het agens wordt in West-Europa overgedragen door nimfen en adulte teken van het species *Ixodes ricinus*. In de Verenigde Staten wordt het agens door *Ixodes scapularis* overgedragen. In Oost-Europa en Azië wordt de overdracht van het agens verzorgd door *Ixodes persulcatus*.

Borreliose bij de mens

Lyme *borreliose* vormt een multisystemische infectieziekte bij de mens. Het klinisch beeld kan variëren van asymptomatisch tot neurologische symptomen, hartgeleidingsstoornissen en artritis. Een typisch kenmerk van deze aandoening wordt gevormd door het optreden van erythema migrans. Deze ringvormige huidaandoening ontstaat binnen een maand rondom de tekenbeet.

Borreliose bij de hond

Lyme *borreliose* komt in Nederland frequent voor bij honden. Een infectie verloopt meestal subklinisch. Mogelijk aanwezige symptomen zijn koorts, kreupelheid en anorexie.

Borreliose bij het paard

Lyme *borreliose* bij het paard kan een zeer variabel ziektebeeld vertonen. Mogelijke symptomen zijn sloomheid, poliartritis, keratitis, endocarditis en dermatitis. [10][13]

Bartonellose

Bartonella-soorten behoren tot de facultatief intracellulaire, gramnegatieve bacteriën, welke overgedragen kunnen worden door bloedzuigende arthropoden (zandvliegen, kattenvlooien, humane lichaamssluisen, mijten van woelmuizen, teken). De teken welke als vector zijn aangeduid zijn *Ixodes scapularis* in de Verenigde Staten en *Ixodes ricinus* in Europa. De overdracht kan ook direct plaatsvinden via bloedcontact. De bacteriën kunnen een langdurige infectie veroorzaken bij de gastheer.

De bacteriën kunnen zoönosen veroorzaken, welke verschillende klinische manifestaties kunnen aannemen, te weten: verlammingen, endocarditis, granulomateuze lymfadenitis en peliose hepatitis (met bloed gevulde holtes in de lever). Deze symptomen zijn ook bij honden gezien.

Alle *Bartonella*-soorten hebben met elkaar gemeen dat ze een interactie aangaan met endotheelcellen en erythrocyten van de gastheer.

Katten vormen het belangrijkste reservoir voor *Bartonella henselae*, de veroorzaker van kattenkrabziekte. De prevalentie van een *Bartonella*-bacteriëmie bij katten kan, in gebieden waar vlooien endemisch voorkomen, oplopen tot 50%.

Wilde dieren kunnen, evenals gedomesticeerde dieren, dienen als reservoir voor *Bartonella*-soorten.

[14][15]

Betrokken diersoorten

De Ree

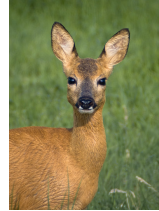
(*Capreolus capreolus*)

De ree is in Europa de meest voorkomende hertensoort en het aantal reeën in Europa neemt nog steeds toe. Ook in Nederland komen reeën vrijwel overal voor. Het aantal in het wild levende reeën in Nederland wordt geschat op ongeveer 60000.

Reeën kunnen zich goed aanpassen aan verschillende leefomgevingen. Bij voorkeur leven de dieren echter in loof- of gemengd bos met enige ondergroei welke als dekking kan dienen. Reeën komen echter ook in parklandschappen voor. Aanwezigheid van voldoende rust is een belangrijke factor.

De ree heeft een zandgele tot roodbruine zomervacht. In de winter heeft de vacht een grijsbruine tot zwarte kleur. Af en toe komen zwarte en witte exemplaren voor. Rond de anus vinden we bij reeën een witgele haarvlek, ook wel spiegel genoemd. Deze vlek is in de winter het duidelijkst zichtbaar. Bij kalveren komen donkere en lichte vlekken op de vacht voor. Een volwassen reebok bezit over een gewei met maximaal drie vertakkingen.

Reeën hebben verder een lichaamslengte van 95 tot 140cm. Het lichaamsgewicht bedraagt 16 tot 35kg. De schofthoogte bedraagt 60 tot 90cm. Het gewei kan tot 25cm lang worden.[16]
[17]



Het damhert

(*Dama dama*)

Het damhert leidt een zwervend bestaan. Zijn leefgebied is zeer uitgebreid en loopt van Zuid-Scandinavië tot Zuid-Europa en Noord-Afrika. Bij voorkeur leven damherten in loofbossen, gemengde bossen of duingebieden. De dieren leven bijna het hele jaar in groepen, welke bestaan uit vrouwtjes met jongen of alleen uit mannetjes. Bokken zijn te herkennen aan het breed vertakte, bladvormige gewei. Dit gewei ontstaat op een leeftijd van 7 tot 8 maanden. Damherten hebben een lichaamslengte van 130 tot 140cm, een schofthoogte van 85 tot 90cm en een kruishoogte van 90 tot 96cm. Het gewicht van damherten bedraagt 100 tot 120kg. De vacht van damherten is in de zomer helder roodbruin gekleurd met witte stippen. In de winter krijgt de vacht een andere kleur. Ook bij het damhert zien we rondom de anus een grote, witte vlek met een zwarte rand eromheen.

In Nederland komen damherten voor op de Veluwe (550 stuks), op Walcheren (125 stuks), in de Kennemerduinen (160 stuks), in Schouwen-Duiveland (768 stuks), in de Amsterdamse Waterleidingduinen (1900 stuks), in de Zuidhollandse Duinen (30 stuks), rondom het Lauwersmeer (10 stuks), in het Friese Oranjewoud (40 stuks) en natuurlijk op kinderboerderijen en in hertenkampen.[16]



Het edelhert

(*Cervus elaphus*)

Het edelhert is de grootste in Midden-Europa en West-Europa voorkomende hertensoort. Na de eland is het edelhert de grootste hertachtige ter wereld. Edelherten leven bij voorkeur in dichte loofbossen of gemengde bossen en dichtbegroeide moerassen. De vrouwtjes leven samen met de kalveren (tot 2jaar) in roedels. De mannetjes leven buiten de bronstijd alleen of in kleine groepjes. De grootte van edelherten is afhankelijk van het ras en de plaats van herkomst. Alleen de bokken dragen een gewei. Het gewei wordt elk jaar afgeworpen, waarna het opnieuw aangroeit.

De lichaamslengte van het Europese hert bedraagt 1,85 tot 2m. De dieren hebben een schofthoogte van 125cm. Het gewicht van edelherten varieert van 175 (vrouwtjes) tot 250kg (mannetjes).

De vacht van damherten is in de zomer roodbruin gekleurd. De wintervacht is grijsbruin van kleur. Ook bij edelherten zien we een grote, witte vlek rondom de anus.

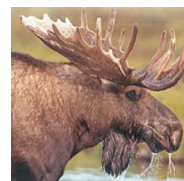
In Nederland komen edelherten voor op de Veluwe (1600 stuks), in de Oostvaardersplassen (2400 stuks) en in het Weerterbos (24 stuks).[16]



De eland

(Alces alces)

Elanden leven bij voorkeur in uitgestrekte naaldbossen. De dieren hebben een voorkeur voor wat drassige leefgebieden. De dieren hebben een lichaamslengte van 2,5 tot 3,5m. Stieren hebben een schofthoogte van 180 tot 220cm en een lichaamsgewicht van 320 tot 800kg. Koeien hebben een schofthoogte van 150 tot 170cm en een lichaamsgewicht van 275 tot 375 kg. Elanden hebben een ruwe, grijsbruine vacht. Stieren hebben een baard en een gewei. Het gewei kan een spanwijdte bereiken van 2m. Elanden komen momenteel niet in het wild voor in Nederland. [16]



De moeflon

(Ovis musimon)

De moeflon leeft alleen nog in het wild op Corsica en Sardinië. Zijn leefgebied bestaat daar uit rotsachtige berggebieden. Niet raszuivere dieren komen in grote aantallen voor in Midden-Europa. Daar bestaat het leefgebied van de moeflon voornamelijk uit hellingbossen en bergweiden.

Zowel rammen als oeien zijn voornamelijk te herkennen aan de opvallende, krullende hoorns, welke altijd blijven groeien en bij een volwassen ram wel 85cm lang kunnen worden.

Vrouwtjes hebben een bruine tot grijze vacht. Mannetjes hebben in de winter lichtgekleurde vlekken op hun rug.

Moeflons hebben een lichaamslengte van 1,2m. De schofthoogte bedraagt ongeveer 70cm. Het lichaamsgewicht van de dieren kan 30 tot 50kg bedragen.

In Nederland komen moeflons momenteel voor op de Veluwe (circa 300 stuks), in de Koninklijke Houtvesterijen van het Loo en in de Amsterdamse waterleidingsduinen.[16]



De das

(Meles meles)

De das behoort tot de familie van marterachtigen. De dieren hebben een kopromplengte van 70 tot 80cm en een staartlengte van 12 tot 19cm. De schofthoogte van dassen bedraagt ongeveer 30cm. Het lichaamsgewicht van de mannetjesdas kan variëren van 9 tot 17kg. Vrouwtjesdassen hebben een gewicht van 7 tot 14kg. Dassen hebben een grijze rug en een zwarte buik, terwijl de kop zwart-wit gestreept is. Het dieet van de das bestaat uit: regenwormen, insectenlarven, granen, kevers, vruchten, kleine zoogdieren, amfibieën, slakken, vogels en eieren. Mannetjes en vrouwtjes leven gezamenlijk in een clan welke bestaat uit ongeveer zes dieren.

De Europese das leeft in holen, ook wel burchten genoemd.[16]

In Nederland komen ongeveer 4500 dassen in het wild voor. Zij leven voornamelijk op de Veluwe, in Zuid-Limburg en in de Maasvallei. Het grootste gevaar voor de das schuilt in het verkeer. Jaarlijks zijn 700 dassen in Nederland het slachtoffer van een verkeersongeval.



De West-Europese egel

(Erinaceus europaeus)

Egels behoren tot de familie van de insecteneters. Karakteristiek voor de egel is zijn stekelige vacht. De egel heeft een rond lichaam dat maximaal 30cm lang is. Het lichaamsgewicht van egels bedraagt ongeveer 1200gram. Egels leven in heggen, tuinen en bosranden met struikgewas.[16]



Het everzwijn

(*Sus scrofa*)

Het leefgebied van everzwijnen omvat loofbossen en gemengde bossen. De dieren komen in Nederland voor veelvuldig voor op de Nederlandse Veluwe. Everzwijnen worden 1,2 tot 1,7 meter lang. Keilers (mannetjes) hebben een schofthoogte van 1m. Hun gewicht kan 150kg bedragen. Zeugen wegen ongeveer 100kg. Everzwijnen hebben een borstelige, zwartbruine vacht. Volwassen beren hebben twee slagstanden.

Zeugjes en biggen leven samen in rotten. Keilers leven buiten de paartijd alleen. In de winter voegen de beren zich bij de rotten.

In Nederland zijn twee officieel toegestane leefgebieden aanwezig voor everzwijnen, namelijk: de Veluwe (naar schatting 4000 tot 6000 stuks) en in Nationaal Park de Meinweg (150 stuks). De rest van Nederland wordt aangeduid als nuloptiegebied. Elk everzwijn wat gesignaleerd wordt in een nuloptiegebied mag worden afgeschoten. Deze nuloptiegebieden zijn aangesteld om te voorkomen dat hongerige everzwijnen schade toebrengen aan landbouw. Naar schatting leven er ongeveer 600 everzwijnen in nuloptiegebieden. In het Nederlands-Duitse grensgebied worden bijvoorbeeld wel everzwijnen gezien.

De jacht op everzwijnen is in Nederland in principe verboden. Een ontheffing op dit verbod kan verleend worden door de Provincie. Het aantal everzwijnen mag vervolgens worden gereduceerd om overeenstemming met de draagkracht te creëren. De draagkracht wordt bepaald door de hoeveelheid beschikbaar voedsel, de mate van schade aan gewassen en de verkeersveiligheid. In de afgelopen jaren is het aantal geschoten everzwijnen in nuloptiegebieden in Midden-Limburg flink gestegen. Everzwijnen begeven zich in toenemende mate buiten het Meiweggebied, waarbij ze zich onder meer verspreiding richting de Peel. De ontwikkeling van grote, aaneengesloten natuurgebieden in het grensgebied tussen Limburg en Noord-Brabant de laatste jaren zal hieraan bijgedragen hebben.



[16][18]

Jachtlocaties

In 2008 werden op enkele rundveebedrijven in de omgeving van Vorden ziekteverschijnselen bij runderen waargenomen. Ook werden er verschillende zieke en verzwakte reeën in de omgeving aangetroffen. Om te kunnen vaststellen of er verband tussen beide aspecten aanwezig is, is men destijds gestart met Reeënproject. In dit project vindt samenwerking plaats tussen de Koninklijke Nederlandse Jagers Vereniging en het Utrecht Centrum voor Tekengebonden Ziekten (UCTD). Teken en bloed van reeën afkomstig uit de Vorden en de directe omgeving werd door de jagers ingestuurd naar het UCTD en werd aldaar onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen.

Inmiddels is het reeënproject uitgebreid en wordt materiaal gebruikt dat afkomstig is uit negen verschillende onderzoeksgebieden, te weten: Vorden, Winterswijk, Lieveren, Sleenezand-Wezep, Borger, Nationaal Park de Hoge Veluwe, Paterswolde, Haamstede en Emmen.

In onderstaande figuur is weergegeven waar de verschillende jachtlocaties/onderzoeksgebieden zich bevinden en hoeveel teken, afkomstig uit deze locaties, zijn gebruikt bij dit screeningsonderzoek.



Figuur 3 De bij dit onderzoek betrokken jachtlocaties en de hoeveelheid teken afkomstig uit deze locaties

Materiaal en Methoden

Teken en bloed verzamelen

Voor de verzameling van de teken en het bloed wat bij dit onderzoek gebruikt is, is de hulp ingeroepen van professionele jagers. Deze jagers zijn allemaal werkzaam in verschillende jachtlocaties in Nederland.

Van een afgeschoten dier wordt zo snel mogelijk bloed opgevangen in een EDTA-bloedbuisje. Dit buisje kan ofwel rechtstreeks met bloed volgezogen worden, ofwel met behulp van een andere spuit met bloed gevuld worden.

Het bloed wordt bij voorkeur direct uit de halsader afgenomen. Wanneer dit niet mogelijk is, kan tijdens het ontweiden het bloed ofwel rechtstreeks uit de hart/halsslagader genomen worden, ofwel uit de thoraxholte, ofwel uit de schotwond gezogen worden. Het bloed dient in geen geval afkomstig te zijn uit een emmer waarin bloed van opgehangen wild is opgevangen. Bloed wat op deze wijze is verkregen, kan namelijk gecontamineerd zijn met maagzuur dat vanuit de slokdarm in de emmer gelekt is.

Het geschoten wild wordt vervolgens ook gecontroleerd op de aanwezigheid van teken. De aanwezige teken worden verzameld en in een tekenpotje gedeponneerd.

Het met bloed gevulde EDTA-buisje en het tekenpotje worden vervolgens per dier voorzien van een uniek en specifiek wildnummer en opgeslagen bij 4-7°C.

Uiteindelijk worden het bloed en de teken in een foamkracht envelop opgestuurd naar het Utrecht Centrum voor tekengebonden infectieziekten, alwaar beiden onderzocht worden op de aanwezigheid van pathogenen.

Determinatie van teken

Ingezonden teken worden elk individueel geïdentificeerd op basis van species, levensstadium en geslacht met behulp van een prepareermicroscoop (40x vergroting). Vervolgens ontvangt elke teek een uniek identificatienummer. Tenslotte worden de teken in tekenpotjes, gevuld met 70% ethanol, opgeslagen.

Determinatie op basis van species

Om onderscheid te kunnen maken tussen *Ixodes* teken en *Dermacentor* teken wordt gelet op de volgende kenmerken[19].

Kenmerk	<i>Ixodes</i>	<i>Dermacentor</i>
Monddelen	Lang	Kort
Ogen	Afwezig	Aanwezig
Plaats van genitale/anale groeve	Voor genitale/anale opening	Achter genitale/anale opening
Schild	Onbevlekt	Bevlekt
Sporen op het eerste segment van de eerste poot	Enkel	Dubbel

Tabel 1 Onderscheid tussen *Ixodes* en *Dermacentor*

Het onderscheid tussen *Ixodes hexagonus* en *Ixodes ricinus* wordt vervolgens gemaakt op basis van de volgende kenmerken[19].

Kenmerk	<i>Ixodes hexagonus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
Plaats van de genitale opening	Tussen het 2 ^e en 3 ^e paar poten	Tussen het 3 ^e en 4 ^e paar poten
Lengte van de sporen	Kort	Lang

Tabel 2 Onderscheid tussen *Ixodes ricinus* en *Ixodes hexagonus*

❖ Determinatie op basis van geslacht

De dorsale zijde van vrouwtjesteken is slechts gedeeltelijk bedekt door het scutum, ofwel schild. Bij mannetjesteken wordt de gehele dorsale zijde bedekt door het scutum. Dit onderscheid is alleen te maken bij teken in het adulte stadia[2].

- ❖ Determinatie op basis van levensstadium
 We onderscheiden achtereenvolgens de volgende levensstadia:
 Larve → 3 paar poten
 Nimf → 4 paar poten, genitale opening afwezig
 Adult → 4 paar poten, genitale opening aanwezig
 [2]

DNA-extractie

Middels het detecteren van het DNA van een bepaalde pathogeen, kan worden vastgesteld of de desbetreffende teek, dan wel het bloed van de bijbehorende gastheer, geïnficeerd was met dit pathogeen.

DNA werd geëxtraheerd van 200 *Ixodes ricinus* teken. Het extraheren geschiedde met behulp van de Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens het protocol van de producent voor het purificeren van DNA van insecten. Tevens werd DNA geëxtraheerd uit 50 bloedsamples met behulp van de Nucleospin Tissue kit.[5]

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Na afloop van de DNA extractie wordt een Polymerase Chain Reaction uitgevoerd. Dit is een techniek waarbij een specifiek stukje DNA *in vitro* miljoenen keren kan worden vermenigvuldigd. De PCR techniek is zeer gevoelig. Een voordeel van deze hoge gevoeligheidsgraad is dat er zelfs met kleine hoeveelheden uitgangsmateriaal resultaat verkregen kan worden. Een nadeel van de hoge gevoeligheidsgraad is dat de techniek ook gevoelig is voor contaminatie.

Bij de PCR wordt gebruik gemaakt van een master mix. Een dergelijke mix bestaat uit de volgende bestanddelen:

- MilliQ
- 10x True Start buffer
- MgCl₂ (25mM)
- dNTP/UTP mix
- True Start polymerase (5u/ul)
- UNG
- Forward-primers en reverse-primers

Aan de master mix worden steeds forward-primers en reverse-primers toegevoegd van de verschillende pathogenen welke we willen aantonen. Deze primers worden in overmaat toegevoegd. De volgende primers worden gebruikt:

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

De sequenties behorende bij de verschillende primers zijn zichtbaar gemaakt in onderstaande tabel.

<u>Primer</u>	<u>Sequentie</u>
Babesia/Theileria 18S-F2	GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G
Babesia/Theileria 18S-R2	CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT
Borrelia 23S-5S-F1	GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG
Borrelia 23S-5S-R1	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA
Bartonella ITS1-F1	CCT CCT TTC TAA GGA TGA TCA AGA
Bartonella ITS1-R1	GAC TTG AAC CTC CGA CCT CA
Ehrlichia/Anaplasma 16S-F1	GGA ATT CAG AGT TGG ATC MTG GYT CAG
Ehrlichia/Anaplasma 16S-R1	CGG GAT CCC GAG TTT GCC GGG ACT TYT TCT
Rickettsia 16S-F1	GAA CGC TAT CGG TAT GCT TAA CAG A
Rickettsia 16S-R2	CAT CAC TCA CTC GGT ATT GCT GGA

Tabel 3 Sequenties behorende bij de verschillende primers

Op deze manier ontstaan er dus vijf verschillende master mixen die gebruikt kunnen worden om een sample (teek of bloedmonster) te onderzoeken op de aanwezigheid van één van de vijf verschillende pathogenen.

Aan de op deze wijze gevormde master mixen wordt DNA toegevoegd van een te onderzoeken teek of bloedmonster. Om te controleren of de PCR gewerkt heeft, worden bij elke master mix ook een negatieve controle (MilliQ) en een positieve controle gebruikt.

Uiteindelijk ontstaan op deze manier voor elk sample (teek of bloedmonster) vijf verschillende PCR producten.

De PCR wordt vervolgens uitgevoerd in een thermocycler (iCycler Thermal Cycler van Bio-Rad). De reactie bestaat uit verschillende stappen, welke tot veertig keer herhaalt worden. Het protocol dat werd gebruikt bij dit onderzoek staat weergegeven in onderstaande tabel. De begrippen welke gebruikt worden in de tabel, worden eerst uitgelegd.

- Denaturatie:
Tijdens de denaturatie wordt het dubbelstrengs DNA van de PCR producten afgebroken tot enkelstrengs DNA.
- Hybridisatie:
De primers hechten aan, aan de complementaire basenparen van het bij de vorige stap gevormde enkelstrengs DNA, waardoor weer dubbelstrengs DNA gevormd wordt.
- Extensie:
DNA polymerase gebruikt de in de vorige stap gevormde stukken dubbelstrengs DNA als startplaats voor de verdere synthese van de complementaire DNA-streng.

[20]

<u>Stap</u>	<u>Aantal cycli</u>	<u>Stappen</u>	<u>Temperatuur</u>	<u>Duur</u>
1	1	1	37°C	05:00 min.
		2	94°C	05:00 min.
2	10	1 (denaturatie)	94°C	00:20 min.
		2 (hybridisatie)	67°C*	00:30 min.
		3 (extensie)	72°C	00:30 min.
3	40	1 (denaturatie)	94°C	00:20 min.
		2 (hybridisatie)	57°C	00:30 min.
		3 (extensie)	72°C	00:30 min.
4	1	1	72°C	07:00 min.
		2	4°C	∞

* Verminder temperatuur na 1e cyclus met 2°C na elke 2 cycli.

Tabel 4 Toegepast PCR-protocol in thermal cycler

Gelelectroforese

Bij de gelelectroforese wordt gebruik gemaakt van elektrische stroom. Deze elektrische stroom zorgt ervoor dat DNA-moleculen van verschillende lengtes van elkaar worden gescheiden, terwijl zij migreren door een agarose gel.

De bij de vorige stap gevormde, kleurloze PCR producten worden allereerst gemengd met 6x Loading Dye. Hierdoor krijgen de PCR producten een blauwe kleur en is de migratie van het DNA door de gel visueel te volgen. Ook zorgt Loading Dye ervoor dat de PCR producten een hogere dichtheid verkrijgen dan de gebruikte buffer, waardoor deze producten, wanneer zij opgebracht worden op de gel, goed afdalen in de wellletjes.

Vervolgens worden de producten opgebracht op de gel. Tevens wordt er een DNA-ladder op de gel gebracht. De gel is geplaatst in een bak, welke gevuld is met een zoutoplossing welke elektrische stroom geleid (de buffer). Aan de gel is ethidiumbromide toegevoegd, wat bindt aan DNA-fragmenten.

Wanneer de gel geladen is met de PCR producten wordt er een elektrisch veld over de gel gebracht. De DNA moleculen zijn negatief geladen en zullen dus gaan migreren in de richting van de positieve elektrode. Kleinere moleculen migreren hierbij sneller en over een grotere afstand gedurende een bepaalde tijdsperiode (meestal 30 tot 45 minuten) dan grotere moleculen. [21]

Na afloop van de electroforese kunnen we de gel bekijken onder UV-licht in de UV-illuminator. De gebonden DNA-fragmenten worden vervolgens zichtbaar. De grootte van de fragmenten kan vergeleken worden met de referentiewaarde, de DNA ladder. Bij een positieve uitslag kan gecontroleerd worden of de grootte van een het betreffende DNA fragment overeenkomt met de positieve controle.

De gelelectroforese is geslaagd wanneer de positieve controle een positieve uitkomst geeft en de negatieve controle een negatieve uitkomst geeft.



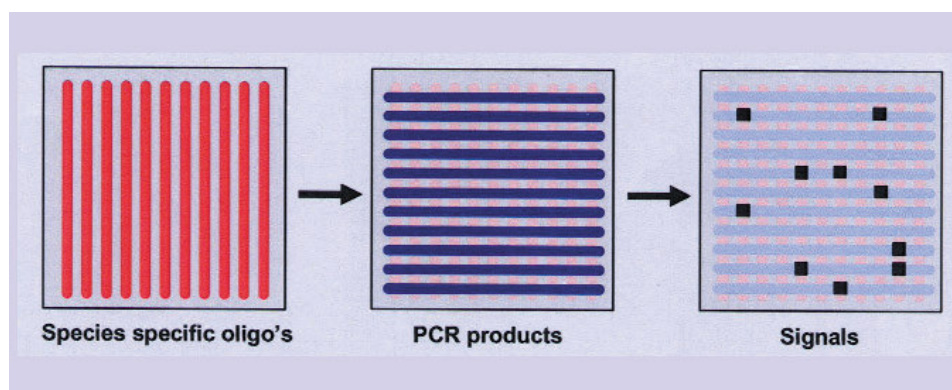
Figuur 4 Gelelectroforese [22]

RLB (Reverse Line Blot)

Na afloop van een geslaagde gelelectroforese kan gecontinueerd worden met de uitvoering van een Reverse Line Blot. Bij de Reverse Line Blot wordt gebruik gemaakt van een membraan (blot) waaraan 43 soortspecifieke oligonucleotides covalent zijn gebonden. Deze oligonucleotides bestaan uit korte stukjes DNA welke functioneren als primer.

Met behulp van een miniblotter worden deze verschillende soortspecifieke oligonucleotides elk in een lijn op de membraan aangebracht. Hierdoor ontstaan 43 lijnen met soortspecifieke oligonucleotides. De PCR producten worden vervolgens, wederom met behulp van de miniblotter, in lijnen op de membraan gebracht. Alle PCR-producten van één sample (teek of bloedmonster) kunnen gezamenlijk in een lijn worden opgebracht. De lijnen met PCR producten hebben een tegengestelde richting aan de lijnen met de soortspecifieke oligonucleotides. Wanneer een oligonucleotide van een specifiek pathogeen kruist met een PCR-product dat hetzelfde DNA bevat, gaat het oligonucleotide een binding aan met het PCR-product (hybridisatie). Met behulp van DNA-polymerase wordt vervolgens het oligonucleotide verlengd en de complementaire DNA-streng verdubbeld.

Vervolgens worden enkele wasstappen uitgevoerd, waarbij ongebonden PCR-producten van het membraan verwijderd worden en gebonden PCR-producten zichtbaar gemaakt worden door middel van chemieluminescentie. Deze luminescentie kan plaatsvinden doordat een biotinelabel aan de PCR-producten gebonden wordt. Na toevoeging van streptavidine wordt het membraan geïncubeerd met ECL, een peroxidase substraat. ECL veroorzaakt een lichtproducerende reactie, welke vastgelegd kan worden op een röntgenfilm. Daar waar binding heeft plaatsgevonden tussen soortspecifieke oligonucleotides en PCR-producten ontstaan donkere stippen op de röntgenfilm. Met behulp van een raster kunnen deze stippen gekoppeld worden aan een bepaald sample (teek of bloedmonster) en een specifiek pathogeen[23].



Figuur 5 Het principe van de Reverse Line Blot [23]

Kloneren

Om een specifieke sequentie te verkrijgen van een bepaald DNA-fragment, kan dit fragment gekloneerd worden. Het fragment wordt in een bacterieel gebracht. Wanneer de bacterieel zich deelt, vindt dan ook replicatie van het DNA-fragment plaats.

In gemodificeerde bacteriële vectoren wordt een fragment ingebracht, hierdoor ontstaat een plasmide. Deze plasmide wordt met behulp van elektroporatie ingebracht in colibacteriën (kolonie JM-109). Dit proces wordt transformatie genoemd. Bij de elektroporatie wordt gebruik gemaakt van elektrische stroom welke ervoor zorgt dat de bacteriecellen permeabel worden voor DNA-moleculen.

De bacteriën worden vervolgens op een ampicilline-agarplaat gebracht, waarop ze zich repliceren bij 37°C. Op deze agarplaat worden ook IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) en X-gal aangebracht. IPTG induceert de transcriptie van het gen dat codeert voor β -galactosidase. X-gal zorgt voor een blauwe kleurontwikkeling bij de vorming van β -galactosidase.

De niet-getransformeerde bacteriën vormen blauwgekleurde kolonies. De getransformeerde bacteriën zijn niet in staat om β -galactosidase te vormen en zijn hierdoor wit van kleur. De witgekleurde kolonies worden geselecteerd. Deze kolonies worden met een steriele tandenstoker aangeprikt van de agarplaat. Vervolgens worden ze opgenomen in de PCR

mastermix. Vervolgens wordt een PCR uitgevoerd om te bepalen of de kolonie het verkozen DNA-fragment bevat.

De steriele tandenstokers worden nu ingebracht in een medium van LB-Ampicilline (100µg/ml). Na een overnachting incubatie bij 37°C wordt het plasmide-DNA gezuiverd (zie bijlage 8). Na deze zuivering houden we circulair DNA over. Van dit DNA kan de sequentie worden bepaald (Baseclear Leiden ivo). De sequentie van het gecreëerde DNA wordt ingevoerd in het programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dit programma vergelijkt de sequentie met bekende sequenties uit de Genbank.

[24][25]

Pathologisch onderzoek

Wilde hoefdieren welke bij leven opvallende ziekteverschijnselen vertonen, worden voor sectie aangeboden aan de afdeling Pathobiologie van de faculteit diergeneeskunde. Met behulp van pathologisch onderzoek wordt vervolgens gezocht naar aanwijzingen voor de aanwezigheid van (tekengebonden) infectieziekten. Bevindingen bij het pathologisch onderzoek worden genoteerd in een sectierapport.

Het pathologisch onderzoek wordt uitgevoerd door het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC), wat een onderdeel vormt van het Veterinair Pathologisch Diagnostisch Centrum (VPDC). De doelstelling van het DWHC vormt het uitbreiden van de kennis betreffende de gezondheid van wilde dieren en het bevorderen van het gebruik van deze kennis bij de beleidsvorming rondom volksgezondheid, diergezondheid en natuurbeheer.

Van het bij de afdeling Pathobiologie aangeboden wild worden ook de aanwezige teken en in sommige gevallen een bloedmonster verzameld. Deze teken en het eventueel aanwezige bloedmonster worden aangeboden aan het Utrecht Centrum voor tekengebonden infectieziekten en daar onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen.

De informatie uit de sectierapporten wordt vervolgens vergeleken met de resultaten bij Reverse Line Blot.

Resultaten

Het onderzoek naar door teken overdraagbare ziekten bij wilde hoefdieren in Nederland is in september 2008 gestart.

In dit deel van het onderzoek zijn van 22 reeën de teken en een bloedmonster onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen. Verder werd ook van 1 damhert een bloedmonster en de teken onderzocht.

Teken

Alle voor dit onderzoek ingezonden teken behoorden tot de soort *Ixodes ricinus*.

Diersoort	♀	♂	Nimf	Larve	Totaal
Ree (22)	192	39	7	-	238
Damhert (1)	15	2	-	-	17

Tabel 5 Hoeveelheden verzamelde teken van verschillende stadia bij verschillende diersoorten

Bij dit onderzoek zijn alleen de adulte teken verder onderzocht op de aanwezigheid van tekengebonden pathogenen middels PCR en RLB.

PCR

In totaal zijn 248 teken en 18 bloedmonsters onderzocht op de aanwezigheid van tekengebonden pathogenen. Van 5 reeën werden namelijk alleen teken ingezonden en geen bloedmonsters.

Vervolgens werden van 50 andere reeën bij dit onderzoek de bloedmonsters onderzocht op de aanwezigheid van tekengebonden pathogenen. De teken welke van deze dieren afkomstig zijn, dienen tijdens vervolgonderzoek alsnog onderzocht te worden.

In onderstaande tabellen is te zien hoeveel teken en hoeveel bloedmonsters met behulp van een PCR positief getest zijn op de vijf verschillende pathogenen. De monsters zijn over het algemeen eenmalig getest. Alleen wanneer bij een PCR de positieve controle negatief testte of de negatieve controle positief testte, werd de PCR opnieuw uitgevoerd.

Teken:

Diersoort	<i>Babesia/Theileria</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Erhlichia/Anaplasma</i>	<i>Rickettsia</i>
Ree (22)	14	-	81	43	163
Damhert (1)	-	-	5	14	17
Totaal	14	-	86	57	180

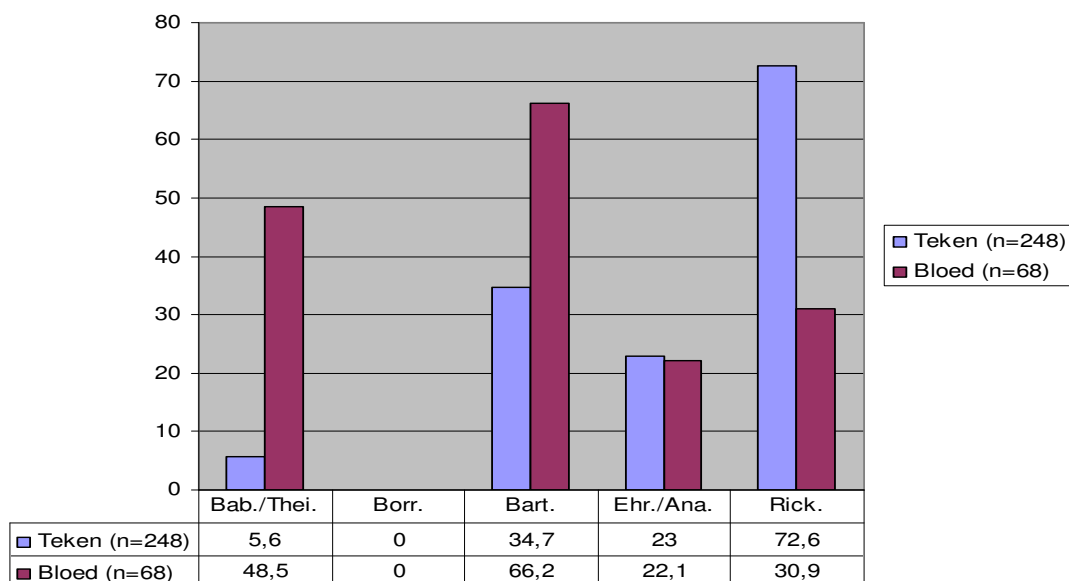
Tabel 6 Hoeveelheid teken positief getest met PCR op 5 groepen pathogenen

Bloed:

Diersoort	<i>Babesia/Theileria</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Bartonella</i>	<i>Erhlichia/Anaplasma</i>	<i>Rickettsia</i>
Ree (17)	11	-	16	7	7
Damhert (1)	-	-	-	-	-
Ree (50)	22	-	29	8	14
Totaal	33	-	45	15	21

Tabel 7 Hoeveelheid bloedmonsters positief getest met PCR op 5 groepen pathogenen

In onderstaande grafiek staan de percentages positief geteste teken en bloedmonsters voor de 5 verschillende groepen pathogenen weergegeven.



Figuur 6 Percentages positief geteste teken en bloedsamples voor 5 groepen pathogenen met PCR en gelelectroforese

RLB

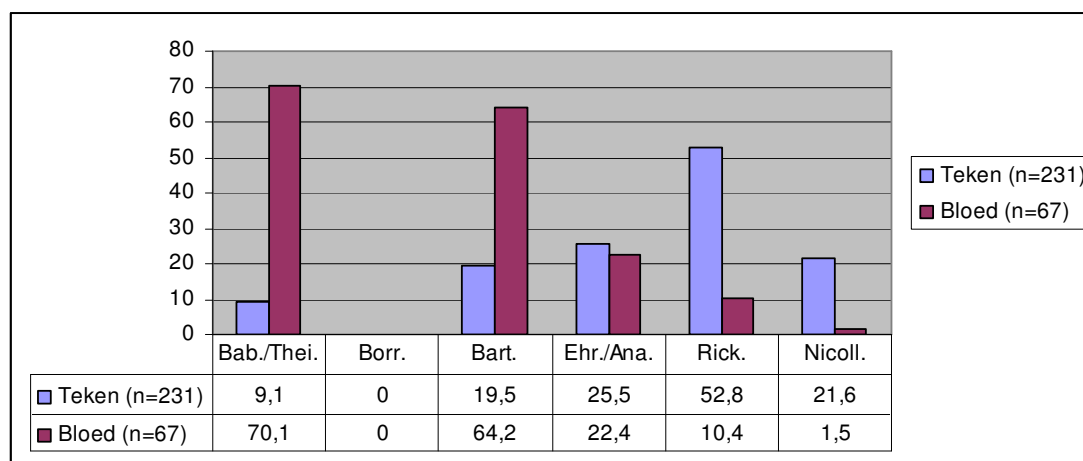
In onderstaande tabel wordt het aantal, met behulp van een RLB, positief geteste teken en bloedmonsters voor de vijf verschillende groepen pathogenen, per diersoort, weergegeven. De specifieke resultaten voor RLB zijn weergegeven in bijlage 9.

	Reeën		Damhert	
	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	(n = 67)	(n = 231)	(n = 1)	(n = 17)
Babesia/Theileria	47 (0,701)	21 (0,091)	-	-
Borrelia	-	-	-	-
Bartonella	43 (0,642)	45 (0,195)	-	-
Ehrlichia/Anaplasma	15 (0,224)	59 (0,255)	-	2 (0,118)
Rickettsia	7 (0,104)	122 (0,528)	-	13 (0,765)
Nicolleia	1 (0,015)	50 (0,216)	-	1 (0,059)

Tabel 8 Het aantal bij RLB positief geteste teken en bloedmonsters voor de verschillende pathogenen

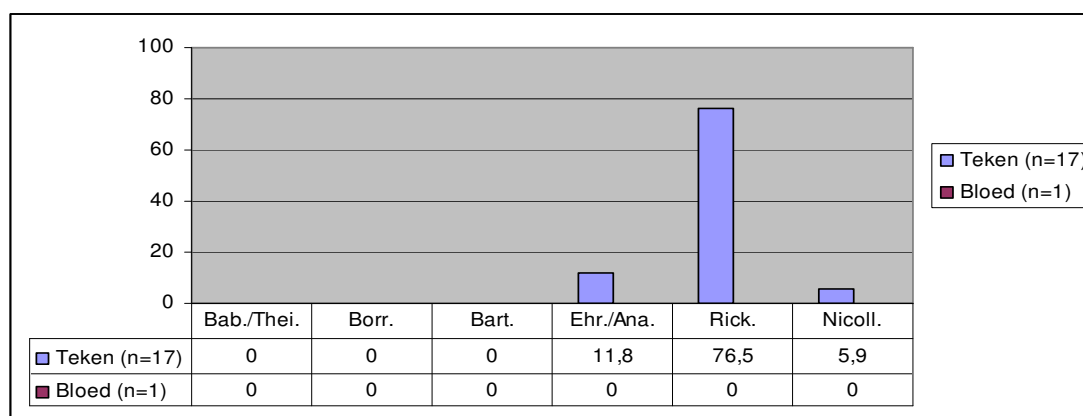
In onderstaande grafieken worden de percentages, met behulp van een RLB, positief geteste teken en bloedmonsters voor de vijf verschillende groepen pathogenen, per diersoort weergegeven.

Ree



Figuur 7 Percentages teken en bloedmonsters van reeën welke bij RLB positief getest zijn voor 5 verschillende pathogenen

Damhert



Figuur 8 Percentages teken en bloedmonsters van damherten welke bij RLB positief getest zijn voor 5 verschillende pathogenen

De besmettingsgraad van teken met tekengebonden pathogenen bleek verschillend te zijn in de verschillende onderzoeksgebieden. In onderstaande tabel worden de percentages, met behulp van een RLB, positief geteste teken voor vijf verschillende pathogenen per onderzoeksgebied weergegeven.

	Vorden	Winterswijk	Lieveren	Sleenerzand-Wezep	Borger	Hoge Veluwe	Paters-wolde	Haamstede	Emmen
Babesia/Theileria	13,8% (8/58)	42,9% (3/7)	1,0% (1/97)	0%	53,8% (7/13)	40% (4/10)	0%	0%	0%
Borrelia	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Bartonella	41,4% (24/58)	14,3% (1/7)	18,6% (18/97)	100% (1/1)	0%	30% (3/10)	0%	0%	0%
Ehrlichia/Anaplasma	36,2% (21/58)	14,3% (1/7)	22,7% (22/97)	0%	0%	20% (2/10)	42,9% (12/28)	11,8% (2/17)	0%
Rickettsia	36,2% (21/58)	28,6% (2/7)	55,6% (54/97)	0%	84,6% (11/13)	50% (5/10)	53,6% (15/28)	76,5% (13/17)	13,3% (2/15)
Nicolleia	44,8% (26/58)	14,3% (1/7)	12,4% (12/97)	0%	30,8% (4/13)	30% (3/10)	7,1% (2/28)	5,9% (1/17)	6,7% (1/15)

Tabel 9 De percentages bij RLB positief geteste teken voor de verschillende pathogenen per onderzoeksgebied

Pathologisch onderzoek

De relevante resultaten afkomstig van het pathologisch onderzoek voor een aantal reeën met de hierbij behorende resultaten van de Reverse Line Blot van de bloedmonsters van deze dieren zijn in onderstaande tabel uiteengezet. Het ging hierbij steeds om magere, verzwakte dieren. De plaats van herkomst van de reeën staat ook vermeld.

Wildkenmerk	Pathologie	RLB
VWV5101 Vorden	Borst- en buikorganen erg vervuild	<i>Babesia catch all-1, Babesia catch all-2, Babesia divergens, Rickettsia helvetica, Rickettsia massilae, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>
RH01 Haamstede	Longworm is doodsoorzaak	<i>Anaplasma phagocytophilum-3, Babesia catch all-1, Babesia catch all-2, Babesia divergens, Babesia venatorum, Ehrlichia/Anaplasma catch all, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella Schoenbuchensis</i>
11627 Lieveren	50 stuks keelhorzels aanwezig	<i>Babesia catch all-1, Babesia divergens, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>
VWV5103 Vorden	Myocarditis, verdacht van BVD	<i>Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>
11630 Nijland	Opvallend veel keelhorzels	<i>Babesia catch all-1, Babesia catch all-2, Babesia divergens, Babesia venatorum, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>
Ree17263 Vorden	Bleke longen, afkomstig uit gebied met veel Neospora	<i>Babesia catch all-1, Babesia catch all-2, Babesia divergens, Babesia venatorum, Rickettsia catch all, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>
Ree004	Blind kalf, ogen flets en pussig	<i>Babesia catch all-1, Babesia catch all-2, Babesia divergens, Babesia venatorum, Rickettsia catch all, Theileria/Babesia catch all, Bartonella catch all, Bartonella schoenbuchensis</i>

Tabel 10 Resultaten van pathologisch onderzoek van enkele reeën

Discussie

Reflectie Resultaten

Teken

Species

Alle 255 teken welke voor dit onderzoek gedetermineerd werden, bleken te behoren tot de species *Ixodes ricinus*. Deze bevinding is niet geheel onverwacht. *Ixodes ricinus* is de meest voorkomende tekenspecies in West-Europa.[26] Bij eerdere onderzoeken werd ook al geconstateerd dat *Ixodes ricinus* de meest voorkomende tekenspecies vormt bij wilde hoefdieren. Wilde hoefdieren worden hierom gezien als belangrijke gastheren voor *Ixodes ricinus*.[27]

Hoeveelheden

Van de 22 reeën welke gebruikt werden bij dit onderzoek zijn in totaal 231 teken afkomstig. Dit komt neer op een gemiddeld aantal teken van 10.5 per ree. Bij het damhert dat bij dit onderzoek werd gebruikt werden 17 teken gevonden. De meeste teken werden verzameld vanaf maart. Dit is te verklaren vanwege het feit dat adulte *Ixodes ricinus* teken evenals de nimfen van deze tekenspecies van maart tot oktober het meest actief zijn.[28]

Stadia

Verreweg het grootste deel van de teken (97%) welke voor dit onderzoek verzameld werden bij wilde hoefdieren behoorde tot het adulte stadia.

Uit de literatuur blijkt al dat adulte teken voornamelijk voorkomen op grote zoogdieren, zoals wilde hoefdieren. Larven en nimfen komen veelal voor op kleinere zoogdieren en vogels.[28]

Van alle gedetermineerde teken bleek 80,7% tot het vrouwelijk geslacht te behoren, 6,4% behoorde tot het mannelijk geslacht en 2,9% behoorde tot het nimfale stadia. Er werden bij dit onderzoek geen larven verzameld. Voor deze bevindingen zijn meerdere verklaringen mogelijk.

De jacht op wilde hoefdieren en daarmee ook de verzameling van de teken welke afkomstig zijn van deze dieren vindt veelal plaats in de schemering. Volgezogen vrouwtjesteken zijn op een dergelijk moment beter zichtbaar dan de veel kleinere mannetjesteken, nimfen of larven. Het is daarom mogelijk dat mannetjesteken, nimfen en larven niet door de jagers gesignaleerd worden, terwijl de volgezogen vrouwtjesteken wel gesignaleerd worden. Zo kan, onterecht, het beeld gecreëerd worden dat alleen vrouwtjesteken aanwezig zijn.

Vervolgens is het zo dat larven voornamelijk in de zomer worden aangetroffen. Adulte vrouwtjesteken hebben zich dan volgezogen, zich op de grond laten vallen en hun eitjes afgezet. Nimfen worden voornamelijk in het voorjaar (april tot mei) aangetroffen.[10]

Verreweg het grootste deel van de verzamelde teken behoorde tot het adulte vrouwelijke stadium. Dit gegeven kan op meerdere manieren verklaard worden.

Mannetjesteken zuigen geen bloed. Hierdoor zijn zij vele malen kleiner dan volgezogen vrouwtjesteken en vallen dus minder op.

PCR en RLB

Babesia/Theileria

70,1% van de bloedmonsters afkomstig van reeën werden positief getest op de aanwezigheid van *Babesia/Theileria*. 9,1% van de teken, afkomstig van reeën, werden positief getest op de aanwezigheid van *Babesia/Theileria*. Het bloedmonster en de teken welke afkomstig waren van het damhert werden niet positief getest op *Babesia/Theileria*.

De relevante specifieke soorten welke aangetoond werden, zijn *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* en *Babesia canis*. (zie bijlage 9 voor percentages) Bij de vorige delen van dit onderzoek werden ook *Babesia microti* en *Babesia vogeli* aangetoond.

Humane babesiose wordt veroorzaakt door verschillende *Babesia*-soorten. In Noord-Amerika veroorzaakt *Babesia microti*, welke overgedragen wordt door *Ixodes scapularis*, humane babesiose. In Europa worden de meeste gevallen van humane babesiose veroorzaakt door *Babesia divergens*. Recentelijk zijn in Europa ook gevallen van humane babesiose voorgekomen welke veroorzaakt werden door *Babesia EU1 (Babesia venatorum)* en *Babesia microti*. In Europa worden de meeste gevallen van humane babesiose gezien bij mensen zonder milt. Humane babesiose verloopt in Europa vaak ernstig, terwijl in de Verenigde Staten veel gevallen voorkomen van asymptomatische humane babesiose. [29][30]

Babesia canis wordt overgedragen door *Dermacentor reticulatus* en *Dermacentor marginatus* welke recentelijk in Nederland zijn geïntroduceerd.

Bij de vorige delen van dit onderzoek werd ook aangetoond dat de bloedmonsters van wilde hoefdieren een hoger besmettingspercentage vertoonden voor *Babesia/Theileria* dan de teken welke afkomstig waren van deze wilde hoefdieren.

Het percentage bloedmonsters van reeën, dat geïnfecteerd was met *Babesia/Theileria* bleek dus veel hoger te zijn dan het percentage teken, afkomstig van deze reeën, dat geïnfecteerd was met *Babesia/Theileria*. Een mogelijke verklaring voor deze bevinding is dat de overdracht van *Babesia/Theileria* van gastheer op teek niet efficiënt verloopt.

Borrelia

In dit deel van het onderzoek is geen *Borrelia* aangetoond in zowel de bloedmonsters als de teken afkomstig van reeën en het damhert.

In de vorige delen van dit onderzoek zijn *Borrelia*-soorten aangetoond in alleen de teken welke afkomstig waren van wilde hoefdieren. In teken afkomstig van reeën werden *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* en *Borrelia valaisiana* aangetoond. In teken afkomstig van damherten werden *Borrelia garinii* en *Borrelia afzelii* aangetoond.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat 5-35% van de in Nederland voorkomende *Ixodes ricinus* teken drager is van DNA van *Borrelia*. [13]

Uit eerder onderzoek kwam ook naar voren dat reeën geen belangrijk reservoir vervullen voor *Borrelia*. Er wordt gesuggereerd dat *Borrelia* spirocheten mogelijk geëlimineerd kunnen worden in de teken, gedurende een bloedmaaltijd. Ook zijn antilichamen tegen *Borrelia* aangetoond in bloedmonsters van reeën. Aangezien er echter wel DNA van *Borrelia* kan worden aangetoond in (niet) volgezogen vrouwtjesteken, kan de mogelijkheid tot deze eliminatie nog ter discussie gesteld worden. [27]

Uit een ander onderzoek bleek dat de vectorcompetentie van teken kan variëren binnen verschillende tekensoorten. Verschillende tekenpopulaties kunnen meer of minder vatbaar zijn voor verschillende *Borrelia*-soorten. Bij dit onderzoek werd ook gesteld dat de aanwezigheid van *Borrelia burgdorferi* in teken niet direct aangeeft dat deze teken ook kunnen zorgen voor transmissie van de spirocheet. De spirocheet kan door een teek opgenomen worden gedurende een bloedmaaltijd en vervolgens worden overgedragen op de volgende generatie. Deze volgende generatie kan de spirocheet niet altijd overdragen aan een gastheer. [34]

Bartonella

74,2% van de bloedmonsters afkomstig van reeën werden positief getest op de aanwezigheid van *Bartonella*. 19,5% van de teken, afkomstig van reeën, werden positief getest op de aanwezigheid van *Bartonella*. Het bloedmonster en de teken welke afkomstig waren van het damhert werden niet positief getest op *Bartonella*. De gevonden percentages zijn hoger dan de percentages welke bij vorige delen van dit screeningsonderzoek gevonden werden.

De relevante specifieke soort welke werd aangetoond, is *Bartonella schoenbuchensis*. (zie bijlage 9 voor percentages)

Bartonella schoenbuchensis veroorzaakt dikwijls een bacteriemie bij herkauwers. Dit pathogeen wordt overgedragen door reevliegen (*Lipoptena cervi*), welke deer ked dermatitis kunnen veroorzaken bij mensen. De rol van *Bartonella schoenbuchensis* bij deze aandoening moet nog verder onderzocht worden. [31]

In een recent Pools onderzoek werd *Bartonella* aangetoond in 27,6% van de bloedmonsters afkomstig van reeën. Dit percentage was echter in de winter veel hoger (62%) dan in het voorjaar (6,9%). In 7,7% van de *Ixodes ricinus* teken afkomstig van deze reeën werd *Bartonella* aangetoond. De conclusie bij dit onderzoek is dan ook dat reeën een reservoir vormen voor *Bartonella*-soorten en dat *Ixodes ricinus* hierbij een belangrijke vector vormt. De relevante specifieke soorten welke dit desbetreffende onderzoek werden aangetoond, waren *Bartonella capreoli* en *Bartonella bovis*. Deze soorten zijn bij ons screeningsonderzoek nog niet gedetecteerd.

In een ander onderzoek wordt een prevalentie van een *Bartonella*-bacteriemie van 50-95% aangegeven bij knaagdieren, katten, reeën en runderen.

Bartonella-soorten zijn dus aangetoond in bloedmonsters van verschillende diersoorten, evenals in teken. De precieze correlatie tussen deze twee zal nog verder onderzocht moeten worden. [14][15]

Ehrlichia/Anaplasma

22,4% van de bloedmonsters afkomstig van reeën werden positief getest op de aanwezigheid van *Ehrlichia/Anaplasma*. 25,5% van de teken, afkomstig van reeën, werden positief getest op de aanwezigheid van *Ehrlichia/Anaplasma*. 11,8% van de teken afkomstig van het damhert werden positief getest op *Ehrlichia/Anaplasma*. Het bloedmonster wat afkomstig was van het damhert werd niet positief getest op *Ehrlichia/Anaplasma*.

Uit eerder onderzoek is al gebleken dat *Ixodes ricinus* de belangrijkste vector vormt voor *Ehrlichia/Anaplasma* in Europa. Er wordt een besmettingspercentage gevonden van 1-16% van de *Ixodes ricinus* teken in Nederland met *Ehrlichia/Anaplasma*. [32]

De relevante specifieke soorten welke werden aangetoond, zijn *Ehrlichia canis/ovina*, *Ehrlichia schotti*, *Anaplasma marginale* en *Anaplasma phagocytophilum*. *Anaplasma phagocytophilum* werd regelmatig aangetoond. De overige drie pathogenen werden sporadisch aangetoond. *Anaplasma phagocytophilum* kwam dus als belangrijkste specifieke soort naar voren. (zie bijlage 9 voor percentages) Dit resultaat werd ook al verkregen in eerdere delen uit dit screeningsonderzoek.

Uit resultaten van een onderzoek in Groot-Brittannië bleek dat 29% van de daar onderzochte wilde hoefdieren geïnfecteerd was met *Anaplasma phagocytophilum*. Bij damherten kwam een significant lagere prevalentie voor (21%) dan bij reeën (50%). Er wordt gesuggereerd dat het habitat van invloed is op het besmettingspercentage.

In 1998 werd voor het eerst humane granulocytair *anaplasmosis* (HGA) aangetoond in Nederland. Er zijn momenteel geen gegevens bekend over de prevalentie van de aandoening in Nederland.

[33]

Rickettsia

10,4% van de bloedmonsters afkomstig van reeën werden positief getest op de aanwezigheid van *Rickettsia*. 52,8% van de teken, afkomstig van reeën, werden positief getest op de aanwezigheid van *Rickettsia*. 76,5% van de teken afkomstig van het damhert werden positief getest op de aanwezigheid van *Rickettsia*. Het bloedmonster wat afkomstig was van het damhert werd niet positief getest op *Rickettsia*.

De relevante specifieke soorten welke werden aangetoond, zijn *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii* en *Rickettsia sp. (DnS14)/raoultii*. *Rickettsia helvetica* werd met grote regelmaat aangetoond in zowel bloedmonsters afkomstig van reeën als in teken afkomstig van reeën. Ook in de teken afkomstig van het damhert werd *Rickettsia helvetica* aangetoond. De overige drie specifieke soorten werden sporadisch aangetoond. (zie bijlage 9 voor percentages)

Bij een negen jaar durend Nederlands onderzoek werden *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia sp. IRS* en *Rickettsia bellii-like* in *Ixodes ricinus* teken aangetoond. Ook de zeer pathogene varianten *Rickettsia typhi* en *Rickettsia prowazekii* werden gevonden. Bij dit onderzoek werden teken uit vijf verschillende onderzoeksgebieden onderzocht. *Rickettsia helvetica* werd, net als bij ons screeningsonderzoek, met enige regelmaat aangetoond. De infectiegraad van de teken met *Rickettsia helvetica* varieerde van 6-66% tussen de vijf onderzoeksgebieden, met een gemiddelde infectiegraad van 41%. Dit percentage ligt iets lager dan het percentage wat gevonden is in dit deel van het screeningsonderzoek. Uit het negen jaar durende onderzoek blijkt verder dat de infectiegraad met *Rickettsia helvetica* ongeveer gelijk is voor verschillende levensstadia van *Ixodes ricinus*. Hieruit wordt geconcludeerd dat het agens een efficiënte transoveriële overdracht doormaakt binnen de teek.

Bij hetzelfde onderzoek werd ook de infectiegraad van wildlife met *Rickettsiae* onderzocht. Voor reeën werd een infectiegraad gevonden van 19% met *Rickettsia helvetica*. Hieruit werd geconcludeerd dat reeën een reservoir vormen voor dit agens.

[11]

Reflectie Materiaal en Methoden

Opvallend was dat van de 248 teken en de 68 bloedmonsters geen enkel positief resultaat met behulp van de RLB voor *Borrelia* gevonden werd.

Verder viel op dat bij dit deel van het screeningsonderzoek een veel hogere infectiegraad werd gevonden van teken met *Bartonella* en *Rickettsia* dan bij eerdere delen van het screeningsonderzoek. Ook werd bij dit deel van het screeningsonderzoek een hogere

infectiegraad van bloedmonsters van reeën met *Bartonella* en *Babesia* gevonden dan bij eerdere delen van dit screeningsonderzoek.

Mogelijke verklaringen voor deze resultaten zijn bij reflectie resultaten al gegeven. Echter er zijn nog andere verklaringen mogelijk.

De Reverse Line Blot kan namelijk vals positieve resultaten opleveren. Dit kan veroorzaakt worden op verschillende manieren:

- Contaminatie van het DNA tijdens de extractie met DNA van een pathogeen, bijvoorbeeld doordat de gebruikte buffers bij eerdere experimenten gecontamineerd zijn geraakt. (Zou bij Good Laboratory Practice geen rol mogen spelen)
- Probes zijn niet specifiek voor één bepaald pathogeen, maar geven positieve resultaten voor meerdere pathogenen.
- De teek kan geïnfecteerd zijn geraakt met symbionten (bacteriën). Het DNA van deze bacteriën kan lijken op het DNA van de pathogenen waarop in dit onderzoek getest wordt. Zo kunnen de symbionten reageren met een probe waardoor een vals positief resultaat ontstaat.
- De membraan welke gebruikt wordt tijdens de RLB is na eerder gebruik niet goed gewassen waardoor DNA fragmenten uit eerdere testen nog gebonden zijn aan de membraan. Deze fragmenten kunnen bij een volgend experiment een vals positief resultaat opleveren. (Zou bij Good Laboratory Practice geen rol mogen spelen)

De verschillende infectiegraden van teken en bloedmonsters welke gevonden werden bij de verschillende delen van het screeningsonderzoek kunnen ook verklaard worden doordat het materiaal dat gebruikt werd in verschillende periodes verzameld is. (verschillende seizoenen etc.)

Uiteindelijk kan het natuurlijk ook puur toeval zijn dat verschillende infectiegraden tijdens verschillende delen van het screeningsonderzoek worden gevonden. Ook kunnen de verschillende infectiegraden welke gevonden te verklaren zijn doordat Continuering van het screeningsonderzoek kan over dit vraagstuk duidelijkheid verschaffen.

Bij dit deel van het screeningsonderzoek valt vooral het hoge percentage bij RLB positief geteste teken van reeën voor *Rickettsia helvetica* op. Ook het percentage bij RLB positief geteste bloedmonsters van reeën voor *Babesia*-soorten ligt veel hoger dan bij eerdere delen van dit screeningsonderzoek. Om uit te sluiten dat het bij deze positieve uitkomsten gaat om vals positieven kan klonering van het DNA uitgevoerd worden. Ook zijn zowel in bloedmonsters als in teken exotische pathogenen aangetoond welke nog niet eerder in Nederland zijn aangetoond (zoals *Anaplasma marginale*). Deze bevinding kan van groot belang zijn, maar dient eerst middels klonering bevestigd te worden.

Dit kloneren is tijdens dit deel van het screeningsonderzoek nog niet uitgevoerd.

Reflectie pathologisch onderzoek

Op een aantal reeën is, naast het onderzoek van bloedmonsters en teken op de aanwezigheid van pathogenen, een sectie verricht. De uitslagen van de RLB van de bloedmonsters zijn vergeleken met de sectiegegevens.

De reeën waren allen vermagerd en zwak. Verder zijn zeer verschillende aspecten gevonden bij de sectie zoals, myocarditis en de aanwezigheid van longworm. Omdat de resultaten van de sectie van de verschillende reeën vrijwel geen gelijkens vertonen, kunnen ook geen harde conclusies uit deze gegevens worden getrokken.

Het pathologisch onderzoek dient binnen dit screeningsonderzoek uitgebreid te worden. Pas wanneer dit gebeurt, kunnen de resultaten welke worden verkregen bij RLB nauwkeurig vergeleken worden met de resultaten welke verkregen worden bij sectie en kan gezocht worden naar verbanden. Tot nu toe blijft het bij gissen naar eventuele verbanden.

Conclusie

Alle teken welke gebruikt zijn voor dit onderzoek behoorde tot de species *Ixodes ricinus*. Voornamelijk adulte vrouwtjesteken werden aangetroffen, maar ook adulte mannetjesteken en nimfen zijn, zij het in een minder groot aantal, gevonden.

Na afloop van het onderzoek van zowel de bloedmonsters en de teken kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

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

In de bloedmonsters afkomstig van reeën werd naar verhouding veel vaker *Babesia/Theileria* aangetroffen (70,1%) dan in de teken afkomstig van diezelfde reeën (9,1%). Een mogelijke verklaring voor deze bevinding is dat de overdracht van *Babesia/Theileria* van gastheer op teek niet efficiënt verloopt. De specifieke *Babesia*-soorten welke zowel in de bloedmonsters als in de teken veelvuldig zijn aangetoond zijn *Babesia divergens* en *Babesia venatorum* (*Babesia EU1*).

In zowel de bloedmonsters afkomstig van reeën als de teken afkomstig van diezelfde reeën is geen *Borrelia* aangetoond. De werking van antilichamen speelt hierbij mogelijk een rol.

Ehrlichia, *Bartonella*, *Nicolleia* en *Rickettsia* zijn zowel in bloedmonsters afkomstig van reeën als in teken afkomstig van reeën aangetoond. De overdracht van gastheer op teek lijkt efficiënt te verlopen. De specifieke soorten van deze pathogenen welke zowel in de bloedmonsters als in de teken veelvuldig zijn aangetoond zijn *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella schoenbuchensis* en *Rickettsia helvetica*.

Over de klinische relevantie van *Rickettsia helvetica*, *Bartonella schoenbuchensis* en *Babesia venatorum* is nog niet zo veel bekend. Verder onderzoek naar deze pathogenen en hun rol als zoönose is nodig.

Wat betreft het pathologisch onderzoek is er geen correlatie gevonden tussen valwild en regulier afschot, wat betreft het voorkomen van tekengebonden ziekten. Er zijn te weinig sectieresultaten bekend om conclusies te trekken over het verband tussen het voorkomen van een infectie met een tekengebonden ziekte en bepaalde pathologische afwijkingen.

Met behulp van vervolgonderzoek kunnen meer onderzoeksgebieden betrokken worden bij dit screeningsonderzoek, zodat er meer resultaten verkregen kunnen worden. Hierbij is het belangrijk dat in de toekomst ook grensgebieden (Duitsland/België) bij het onderzoek betrokken worden, aangezien verschillende natuurgebieden grensoverschrijdend zijn of met elkaar verbonden zijn door ecologische verbindingszones. Belangrijk hierbij is dus ook dat het pathologisch onderzoek een groter aandeel gaat krijgen binnen de screening. Ook is het belangrijk dat klonering van verschillende fragmenten uitgevoerd wordt om bepaalde bij dit onderzoek verkregen resultaten (zoals de vondst van exotische pathogenen) te bevestigen.

Uiteindelijk kunnen de resultaten van het complete screeningsonderzoek gebruikt worden bij publieksvoorlichting. Ook kunnen de resultaten gebruikt worden door professionals om te bepalen welke tekengebonden ziekten in Nederland een rol spelen en natuurlijk als hulpmiddel binnen de humane en veterinaire diagnostiek van ziektes.

Dankwoord

Graag wil ik Prof. Dr. Frans Jongejan en Dr. Marja Kik bedanken voor de mogelijkheid tot de uitvoering van dit onderzoek. Ook wil ik Drs. Ard Nijhof en Jesper Balk bedanken voor alle hulp bij de laboratoriumwerkzaamheden, de gezellige sfeer in het lab en het feit dat ze altijd klaarstonden om iets uit te leggen.

Natuurlijk wil ik ook alle jagers die op geheel vrijwillige basis hebben deelgenomen aan dit onderzoek bedanken voor hun anticipatie en enthousiasme. Zonder deze mensen zou er geen onderzoeksmateriaal voor handen zijn en zou dit onderzoek dus onmogelijk zijn.

Dit onderzoek is verder mede mogelijk gemaakt door de Koninklijke Nederlandse Jagers Vereniging, Faunazaken, Margriet Montizaan en Faunabeheereenheid Zeeland Liduin Preevan t Westende.

Literatuurlijst

1. Sonenshine DE. Biology of ticks. Vol. 1. Oxford University Press, Inc, **1991**:447.
2. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. Infect Dis Clin North Am **2008**;22(2):195-215.
3. [homepage on the Internet]. . Available from:
http://images.google.nl/imgres?imgurl=http://static.howstuffworks.com/gif/tick-8.gif&imgrefurl=http://animals.howstuffworks.com/arachnids/tick.htm/printable&usq=__KupfkqgPepyJM4_DME_Zn5pz82w=&h=357&w=400&sz=37&hl=nl&start=5&um=1&tbnid=8fpInXpzbxCtBM:&tbnh=111&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Dhard%2Bticks%2Bsoft%2Bticks%26hl%3Dnl%26um%3D1.
4. [homepage on the Internet]. . Available from:
http://images.google.nl/imgres?imgurl=http://www.lib.uiowa.edu/haRDIN/MD/pictures/22/cdc/5978_lores.jpg&imgrefurl=http://www.lib.uiowa.edu/haRDIN/MD/cdc/5978.html&usq=__6IW376k7bXcUKqX-J6W_zjgUgp0=&h=491&w=700&sz=44&hl=nl&start=3&um=1&tbnid=nASCC6S02Vti4M:&tbnh=98&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dticks%2Bmale%2Bfemale%26hl%3Dnl%26um%3D1.
5. Bodaan C, Nijhof A.M., Postigo M., Nieuwenhuijs H., Opsteegh M., Franssen L., Jebbink F., Jansen S., Jongejan F. Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren in nederland. Tijdschrift voor Diergeneeskunde **2007**;132(13):517-23.
6. Knapa N, Durmišia E, Saksida A, Korvaa M, Petroveca M, Avšič-Županc T. **Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in slovenia** . Veterinary Parasitology **2009**;164(2-4):275-81.
7. Jongejan F, Uilenberg G. **The global importance of ticks..** Parasitology **2004**;129:3-14.
8. Hunfelda KP, Hildebrandt A, Gray JS. **Babesiosis: Recent insights into an ancient disease.** International Journal for Parasitology **2008**;11(38):1219-37.
9. Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. Babesia sp. EU1 from roe deer and transmission within ixodes ricinus. Emerging infectious diseases **2007**;13(8):1208.
10. Jongejan F. Teken en door teken overgedragen ziekten. Diergeneeskundig memorandum **2001**;1(48):1-44.
11. 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.
12. Stuen S. Anaplasma phagocytophilum-the most widespread tick-borne infection in animals in europe. Vet Res Commun **2007**;31:79-84.
13. **Teken, tekenbeten en borrelia infecties in nederland deel II april 2008: Update met gegevens van 2006 en 2007**
[homepage on the Internet]. wageningenuniversity. 2008. Available from:
http://www.wageningenuniversity.nl/NR/rdonlyres/8EC3F86E-C3F5-4BFB-ADBA-3007804AFEf1/60029/080331_tekenrapportdef1.pdf.
14. Skotarczak B, Adamska M. Detection of bartonella DNA in roe deer (capreolus capreolus) and in ticks removed from deer. European Journal of Wildlife Research **2005**;51(4):287-90.

15. 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.
16. [homepage on the Internet]. . Available from: <http://wildlife.hetdierenrijk.nl/landzoogdieren/>.
17. Faunabeheerplan 2006-2011 [homepage on the Internet]. Faunabeheereenheid. 2006. Available from: <http://www.faunabeheereenheid.nl/noordbrabant/jacht%20beheer%20en%20schadebestrijding/fbp/FBP%202006-2011.pdf>.
18. Holtjer L. **Dossier everzwijn - facts & figures van het wild zwijn in nederland**. Boomblad **2008**;20(1):18-21.
19. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the mediterranean region: A guide to identification of species. University of Zaragoza, **2004**:131.
20. Bakker E, Ginjaar HB. De introductie van de PCR in het (neuro) genetisch onderzoek. Ned Tijdschr Neurol **2001**;5:359-66.
21. [homepage on the Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory's. Available from: <http://www.dnalc.org/resources/animations/>.
22. [homepage on the Internet]. . Available from: http://images.google.nl/imgres?imgurl=http://allesoverdna.roquin.net/uploads/pics/ig1-gelelectroforese_web_01.jpg&imgrefurl=http://allesoverdna.roquin.net/basisinfo/dna-analyse/zo-werkt-gelelektroforese.html&usq=__rpy7zB8Uw0ISTH9WDtzsqlFSW8k=&h=689&w=350&sz=113&hl=nl&start=3&um=1&tbnid=oBF7bkH2QCDBqM:&tbnh=139&tbnw=71&prev=/images%3Fq%3Dgel%2Belectroforese%26ndsp%3D18%26hl%3Dnl%26sa%3DN%26um%3D1.
23. Reverse line blot hybridisation 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.
24. **Cloning fact sheet** [homepage on the Internet]. Human Genome Project Information 11-05-2009. Available from: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/elsi/cloning.shtml.
25. Dieckman L, Gu M, Stols L, Donnelly M, Collart F. High throughput methods for gene cloning and expression. Protein Expression and Purification **2002**;25:1-7.
26. Stanek G. Pandora's box: Pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in central europe. Wiener Klinische Wochenschrift **2009**;121(21-22):673-83.
27. Rijpkema SGT, Herbes RG, Verbeek-de Kruif N, Schellekens JFP. **Detection of four species of borrelia burgdorferi sensu lato in ixodes ricinus ticks collected from roe deer (capreolus capreolus) in the netherlands**. Epidemiology and Infection **1996**;117(3):563-6.
28. 28. Meijlon HA, Jaenson TGT. **ixodes ricinus ticks (acari: Ixodidae)** . Questioning behaviour of . Experimental and Applied Acarology **2004**;21(12):747-54.

29. CIENIUCH S, STAŃCZAK J, RUCZAJ A. The first detection of babesia EU1 and babesia canis canis in ixodes ricinus ticks (acari, ixodidae) collected in urban and rural areas in northern poland. POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS **2009**;58(3):231-6.
30. Wielinga PR, Fonville M, Sprong H, Gaasenbeek C, Borgsteede F, Giessen JWB. Persistent detection of babesia EU1 and babesia microti in ixodes ricinus in the netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. Vector-Borne and Zoonotic Diseases **2009**;9(1):119-22.
31. 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
32. 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.
33. Robinson MT, Shaw SE, Morgan ER. Anaplasma phagocytophilum infection in a multi-species deer community in the new forest, england. European Journal of Wildlife Research **2009**;55(4):439-42.
34. [homepage on the Internet]. European Union Concerted Action On Lyme Borrelioses. Available from: <http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?lang=en>

Bijlagen

Bijlage 1: Tap- en verzendinstructie; Bloedafname en tekenverzameling

Bloed

Per afgeschoten dier vindt, zo spoedig mogelijk na het afschot, de bloedafname plaats. Het bloedbuisje (paars of blauw) kan ofwel rechtstreeks met bloed volgezogen worden, ofwel met behulp van een andere spuit met bloed gevuld worden.

Het bloed wordt bij voorkeur direct uit de halsader afgenomen. Wanneer dit niet mogelijk is, kan tijdens het ontweiden het bloed ofwel rechtstreeks uit de hart/halsslagader genomen worden, ofwel uit de thoraxholte, ofwel uit de schotwond gezogen worden. Het bloed dient in geen geval afkomstig te zijn uit een emmer waarin bloed van opgehangen wild is opgevangen. Bloed wat op deze wijze is verkregen, kan namelijk gecontamineerd zijn met maagzuur dat vanuit de slokdarm in de emmer gelekt is. Hygiënisch werken (schoon materiaal, schone handen) en het zo snel mogelijk laten plaatsvinden van de bloedafname is erg belangrijk.

Het met bloed gevulde EDTA-buisje wordt per dier met behulp van een etiket en een watervaste stift voorzien van een uniek en specifiek wildnummer en opgeslagen bij 4-7°C.

Teken

Na afloop van de bloedafname worden vervolgens ook, zo veel mogelijk, teken van het grofwild verzameld. De aanwezige teken worden in een tekenpotje gedeponereerd. Dit potje wordt, wederom met behulp van een etiket en een watervaste stift, voorzien van het unieke wildnummer en opgeslagen bij 4-7°C.

Uiteindelijk worden het bloed en de teken in een foamkracht envelop opgestuurd naar het Utrecht Centrum voor tekengebonden infectieziekten, alwaar beiden onderzocht worden op de aanwezigheid van pathogenen.

Verzenden

De bloedbuisjes en tekenpotjes worden eerst in een absorberend stoffen zakje gedeponereerd (Max. 6 per zakje). Dit absorberende zakje wordt in een afsluitbaar plastic zakje gedeponereerd. Dit plastic zakje dient dicht geplakt te worden. Vervolgens wordt het geheel in een gewone envelop gedeponereerd. Tenslotte wordt het geheel in een foamkracht envelop gedeponereerd, waarna het opgestuurd wordt naar het UCTD.

Adres:

Utrecht Centrum voor Tekengebonden Ziekten (UCTD)

T.a.v. de tickbusters, Marloes Busser

Faculteit Diergeneeskunde,

Universiteit Utrecht, Yalelaan 1,

3584 CL Utrecht

(zie sticker)

Kosten voor het verzenden worden gedeclareerd.

Bijlage 2: Protocol DNA extractie (teken en bloed)

Teken

Zet een waterbad aan (56°C) en zet de T1 er in.

Selecteer de teken.

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

Bloed

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

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

Bijlage 3: Protocol PCR

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

Merk vijf 1,5 ml epjes met de vijf verschillende pathogenen.

Maak in deze epjes vijf verschillende mastermixen. De supertaq PCR buffer, dNTP/dUTP mix, forward- en reverse-primer moeten vóór toevoegen worden gevortexd.

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

Vortex en centrifugeer de mastermixen kort.

Verdeel de vijf verschillende mastermixen over afzonderlijke microcentrifuge tubes (20 µl per tube), welke duidelijk zijn gemerkt met het betreffende pathogeen. Het aantal tubes dat je per mastermix moet vullen is gelijk aan het aantal samples dat je wilt testen + twee (een positieve en een negatieve controle).

Verdeel de DNA samples over de microcentrifuge tubes. Ieder DNA sample krijgt vijf eigen microcentrifuge tubes (één per pathogeen), waar per tube 5 µl van het sample in wordt toegevoegd.

Doe 5 µl milliQ in de vijf negatieve controles.

Doe 2,5 µl milliQ + 2,5 µl positieve controle in de vijf positieve controles.

Plaats de microcentrifuge tubes in de thermocycler en stel het PCR-programma in.

Bewaar de PCR-producten in de vriezer bij -20°C.

Bijlage 4: Protocol gelelectroforese

Los 1,5 gram agarose op per 100 ml 1x TAE door het geheel te verwarmen in de magnetron. Koel het geheel iets af onder de kraan en voeg dan 2,5 µl ethidiumbromide (10 mg/ml) toe per 100 ml oplossing. Goed mengen door middel van zwenken.

Giet het mengsel over in een gel tray, waarvan de uiteinden zijn afgesloten met (autoclaaf) tape. Verwijder belletjes met een pipetpunt en plaats de kammen in de gel.

Laat de gel minimaal 30 tot 45 min uitharden bij kamertemperatuur.

Verwijder de kammen en de autoclave tape en plaats de gel in een electroforese bak.

Voeg electroforese buffer toe indien nodig (1x TAE buffer, tot 1 mm over de gel).

Meng de verschillende PCR-producten in een "96 wells plate" met een "6x Loading Dye Solution" (steeds 5 µl PCR-product met 1 µl Loading Dye).

Vul de slotjes in de gel met deze mengsels (steeds 5 µl). De buitenste slotjes worden gevuld met 5 µl DNA Ladder Mix.

Laat gedurende 30 tot 45 min een stroom door de gel lopen van maximaal 125 V.

Bekijk de gel onder een UV-illuminator met behulp van het programma Labworks. Maak een foto van het eindresultaat.

Bijlage 5: Protocol RLB

Maak een lijst met alle samples die op de RLB gaan, inclusief A/E-, T- en B-probe is er plaats voor 43 samples.

Zet het waterbad aan op 50 °C, de incubator op 42 °C en de buisjesincubator op 100 °C.

Zet de 2xSSPE / 0,1%SDS en de 2xSSPE / 0,5%SDS in het waterbad op 50 °C.

Nummer het benodigde aantal 1,5 ml epjes.

Vul de epjes met 150 µl 2xSSPE / 0,1%SDS.

Voeg aan de desbetreffende epjes 10 µl van elk pathogeen-sample toe.

Zet de epjes 10 min in de buisjesincubator op 100 °C, waarna ze onmiddellijk gekoeld moeten worden op ijs.

Centrifugeer de epjes nadat ze zijn afgekoeld.

Incubeer de membraan 5 minuten in 2xSSPE / 0,1%SDS bij kamertemperatuur onder zacht schudden.

Plaats de membraan in de miniblotter met de slotjes haaks op de probes.

Verwijder overbodige vloeistof door deze op te zuigen.

Vul de slotjes met de PCR-producten (150 µl), voorkom luchtbellens. Vul de buitenste en eventuele lege slotjes met 2xSSPE / 0,1%SDS.

Incubeer de miniblotter voor 60 minuten bij 42 °C op een horizontaal oppervlak, zonder schudden.

Verwijder de samples door ze op te zuigen.

Verwijder de membraan uit de blotter.

Was de membraan 2x in voorverwarmd 2xSSPE / 0,5%SDS voor 10 minuten in het waterbad op 50 °C onder zacht schudden.

Incubeer de membraan met 20 ml 2xSSPE / 0,5%SDS en 5 µl streptavidine (eerst samen mengen) voor 30 minuten op 42 °C in de incubator.

Was de membraan 2x met 2xSSPE / 0,5%SDS voor 10 minuten op 42 °C in het waterbad onder zacht schudden.

Was de membraan 2x met 2xSSPE voor 5 minuten op kamertemperatuur onder zacht schudden.

Gooi de 2x SSPE weg.

Doe 10 ml ECL (5 ml ECL 1 + 5 ml ECL) over de membraan en schud voor een aantal minuten zodat de membraan volledig bedekt is.

Plaats de membraan tussen twee overhead sheets (om hem te drogen).

Incubeer op kamertemperatuur voor tenminste 1 min.

Plaats de membraan tussen twee schone overhead sheets, verwijder luchtbellens door er met een doekje overheen te wrijven en plaats het geheel in de exposure cassette.

In een donkere kamer: plaats een röntgenfilm in de cassette, doe de cassette dicht en laat hem liggen voor 10 min.

Haal de film uit de cassette en ontwikkel hem.

Was de membraan 2x 30 min in voorverwarmde 1%SDS oplossing (90 °C) in een waterbad van 90 °C onder zacht schudden.

Leg de membraan in 20 mM EDTA en bewaar deze op 4 °C.

Bijlage 6: Test-pathogenen RLB

Anaplasma marginale
Anaplasma phagocytophilum 1
Anaplasma phagocytophilum 3
Anaplasma phagocytophilum 5
Anaplasma phagocytophilum 7
Babesia catch-all 1
Babesia catch-all 2
Babesia canis 2
Babesia crassa catch-all
Babesia divergens
Babesia microti
Babesia bigemina
Babesia rossi
Babesia venatorum (= Babesia sp. (EU 1))
Babesia vogeli
Borrelia burgdorferi sensu lato
Borrelia afzelii
Borrelia burgdorferi sensu stricto
Borrelia garinii
Borrelia valaisiana
Ehrlichia / Anaplasma catch-all
Ehrlichia canis / Ehrlichia ovina
Ehrlichia schotti
Nicolleia catch-all
Orientia catch-all
Rickettsia catch-all (Rickettsia specifiek)
Rickettsia helvetica
Rickettsia sp. (DnS14) / raoultii
Rickettsia massiliae
Rickettsia conorii
Theileria / Babesia catch-all
Theileria catch-all
Theileria annae
Theileria cervi
Theileria equi 2
Theileria orientalis 2
Bartonella catch-all
Bartonella elizabethae
Bartonella grahamii
Bartonella henselae
Bartonella quintana
Bartonella schoenbuchensis
Bartonella vinsonii

Bijlage 7: Protocol Klonering

Preparatie van electrocompetente cellen

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

Precipitatie van de ligatie

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

Electroporatie

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

Bijlage 8: Protocol Zuivering van DNA

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

Kweek van bacteriën: Centrifugeer 1-5ml van de E. coli LB cultuur bij 11,000 x g gedurende 30 sec. Verwijder het supernatant.

Lyseren van cellen:

Voeg 250µl buffer A1 toe. Los de pellet op door grondig te vortexen.

Voeg 250µl buffer A2 toe. Mix voorzichtig door het eppendorfcupje 6-8 maal om te keren (niet vortexen). Incuberen bij kamertemperatuur, maximaal 5 minuten

Voeg 300µl buffer A3 toe. Mix voorzichtig door het eppendorfcupje 6-8 maal om te keren (niet vortexen).

Klaring van het lysaat: Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 5-10 minuten bij kamertemperatuur

Binden van DNA: Plaats een Nucleospin® Plasmid-column in een eppendorfcupje (2ml) en pipetteer het supernatant (van stap 3) op de column. Centrifugeer bij 11,000 x g. Gooi het vocht in de opvangbuis weg.

Membraan wassen: Plaats de Nucleospin® Plasmid-column terug in een 2 ml-eppendorfcupje en voeg 600µl buffer A4 toe. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 1 minuut. Gooi het vocht in de opvangbuis weg.

Membraan drogen: Plaats de Nucleospin® Plasmid-column in een leeg 2 ml- eppendorfcupje. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 2 minuten.

Elueren: het scheiden van gezuiverd DNA. Plaats de Nucleospin® Plasmid-column in een leeg 1,5 ml- eppendorfcupje. Voeg 50µl buffer AE toe. Incubeer gedurende 1 minuut bij kamertemperatuur. Centrifugeer bij 11,000 x g gedurende 1 minuut.

Het vocht in de opvangbuis is het gezuiverde DNA.

Bijlage 9: Uitslagen RLB

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

<i>Babesia/Theileria</i>	Reeën		Damhert	
	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	(n = 67)	(n = 231)	(n = 1)	(n = 17)
Theileria/Babesia catch-all	43 (0,642)	20 (0,087)	-	-
Babesia catch-all 1	47 (0,701)	21 (0,091)	-	-
Babesia catch-all 2	31 (0,463)	7 (0,030)	-	-
Babesia divergens	38 (0,567)	5 (0,022)	-	-
Babesia venatorum	27 (0,403)	16 (0,069)	-	-
Babesia canis-2	-	1 (0,004)	-	-

<i>Bartonella</i>	Reeën		Damhert	
	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	(n = 67)	(n = 231)	(n = 1)	(n = 17)
Bartonella catch-all	43 (0,642)	45 (0,195)	-	-
Bartonella schoenbuchensis	34 (0,507)	26 (0,113)	-	-

<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	Reeën		Damhert	
	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	(n = 67)	(n = 231)	(n = 1)	(n = 17)
Ehrlichia/Anaplasma catch-all	12 (0,179)	59 (0,255)	-	2 (0,118)
Ehrlichia canis/ovina	-	2 (0,009)	-	-
Ehrlichia schotti	-	5 (0,022)	-	-
Anaplasma marginale	1 (0,015)	2 (0,009)	-	-
Anaplasma phagocytophilum 1	1 (0,015)	-	-	-
Anaplasma phagocytophilum 3	8 (0,119)	3 (0,013)	-	-
Anaplasma phagocytophilum 5	-	-	-	-
Anaplasma phagocytophilum 7	3 (0,044)	2 (0,009)	-	-
Anaplasma phagocytophilum catch all	-	10 (0,043)	-	-

<i>Rickettsia</i>	Reeën		Damhert	
	Bloed	Teken	Bloed	Teken
	(n = 67)	(n = 231)	(n = 1)	(n = 17)
Rickettsia catch-all	6 (0,090)	93 (0,402)	-	-
Rickettsia helvetica	1 (0,015)	122 (0,528)	-	13 (0,765)
Rickettsia massiliae	2 (0,030)	10 (0,043)	-	-
Rickettsia conorii	-	5 (0,022)	-	-
Rickettsia sp. (DnS14)/raoultii	-	1 (0,004)	-	-
Nicolleia catch-all	1 (0,015)	50 (0,216)	-	1 (0,059)