

**Prevalentie van *Ehrlichia canis* en *Babesia vogeli* in  
*Rhipicephalus sanguineus* teken en in honden  
afkomstig uit Aruba en Curaçao**



A: larva (bar= 400µm), B: nymf (bar = 0,5mm), C: female (bar = 1mm), D: male (bar = 1mm)

Fig. Dantas-Torres, 2008

Student(nr): Drs. Abbey Luijten (0461474)

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

Stageperiode: Januari 2011 t/m april 2011

Begeleiders: Prof. Dr. Frans Jongejan  
Ing. Michiel Wijnveld

## **Inhoudsopgave**

1. Samenvatting	pg. 4
2. Introductie	pg. 5
3. Literatuuronderzoek	pg. 6
3.1. Teken	pg. 6
3.2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	pg. 6
3.2.1. Taxonomie en identificatie	pg. 6
3.2.2. Levenscyclus <i>R. sanguineus</i>	pg. 7
3.2.3. Ethologie en ecologie	pg. 7
3.2.4. <i>R. sanguineus</i> als vector	pg. 8
3.3. Canine monocytair ehrlichiose	pg. 10
3.3.1. Etiologie	pg. 10
3.3.2. Pathogenese en klinische symptomen	pg. 10
3.3.3. Diagnose	pg. 11
3.3.4. Therapie	pg. 11
3.4. Canine babesiose	pg. 13
3.4.1. Etiologie	pg. 13
3.4.2. Pathogenese en klinische symptomen	pg. 13
3.4.3. Diagnose	pg. 14
3.4.4. Therapie	pg. 15
3.5. Preventie babesiose en ehrlichiose	pg. 16
4. Materiaal en methoden	pg. 17
4.1. Verzameling van monsters	pg. 17
4.2. Determinatie van teken	pg. 17
4.3. DNA extractie uit teken	pg. 17
4.4. Polymerase chain reaction (PCR)	pg. 18
4.5. Gelelektroforese	pg. 19
4.6. Reverse line blot (RLB)	pg. 20
5. Resultaten	pg. 21
5.1. Verzameling van monsters	pg. 21
5.2. Determinatie van teken	pg. 21
5.3. Gebruikte materiaal Aruba en Curaçao	pg. 22
5.4. DNA extractie, PCR en RLB; teken en bloedsamples Aruba en Curaçao	pg. 23

10 mei 2011

5.5. DNA extractie, PCR en RLB; <i>R. sanguineus</i> batch Zuid-Afrika	pg. 24
5.6. DNA extractie, PCR en RLB; <i>R. sanguineus</i> teken uit Nederland	pg. 24
6. Discussie	pg. 25
7. Conclusie	pg. 28
8. Dankwoord	pg. 28
9. Referenties	pg. 29
10. Bijlagen	pg. 32
10.1. Bijlagen – UCTD protocollen	pg. 32
10.2. Bijlagen – RLBs	pg. 37
10.3. Bijlagen – Positieve samples weergegeven in tabel	pg. 49

10 mei 2011

## **1. Samenvatting**

Vanuit Aruba en Curaçao zijn 875 teken van zowel straat-, asiel- als huisdieren afgehaald en opgestuurd naar het Utrecht Centrum voor Tekengebonden Ziekten (UCTD) in Nederland. Hier zijn de teken gedetermineerd. Alle teken behoren tot de soort *Rhipicephalus sanguineus*. Deze teek speelt een belangrijke vectorrol bij de tekengebonden ziektes ehrlichiose en babesiose. In totaal zijn 330 teken nader onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen, waaronder *Ehrlichia canis* en *Babesia vogeli*. Daarnaast zijn er ook bloedsamples van ehrlichiose verdachte honden uit Curaçao onderzocht op de aanwezigheid van deze pathogenen door middel van polymerase chain reaction (PCR) en reverse line blot hybridisatie (RLB).

*E. canis* is niet gevonden in teken afkomstig uit Curaçao. Wel is er een prevalentie van *E. canis* van ~1,2% gevonden in de teken afkomstig uit Aruba. Daarnaast testte ~1,2% positief op *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all en ~0,4% op *Theileria/Babesia* catch-all. In de onderzochte *R. sanguineus* teken uit Curaçao en Aruba werd *B. vogeli* niet gevonden. Echter werd er wel voor het eerst *B. vogeli* gedetecteerd in bloed van honden uit Curaçao, waarvan gedacht werd dat ze ehrlichiose hadden. De gevonden prevalentie van *B. vogeli* is in hondenbloed 12,6% en van *E. canis* 6,8%. Tot slot is er ook een co-infectie van *E. canis* en *B. vogeli* gevonden bij een hond op Curaçao.

## **2. Introductie**

Teken, de familie Ixodidae, vormen de belangrijkste groep van vectoren van pathogenen binnen de tak van de Arthropoda. Deze harde teken kunnen verschillende pathogenen, waaronder bacteriën, helminthen, protozoën en virussen, bij zich dragen en verspreiden [Dantas-Torres, 2010; Dantas-Torres, 2008]. Dit is van groot medisch belang, aangezien het mogelijk tekengebonden ziektes kan veroorzaken bij zowel dier als mens.

Er lijkt een stijgende lijn te zitten in de opkomst van een aantal vectorgebonden ziekten in Europa in de laatste jaren [Beugnet et al, 2009; Menn et al, 2010]. Verscheidene factoren spelen een rol bij de verandering van epidemiologie (distributie, prevalentie etc.) van deze vectorgebonden ziekten. Door een enorme toename van transport van dieren tussen verschillende landen en het internationaal reizen van de mens, kunnen ook pathogenen makkelijk rond circuleren [Beugnet et al, 2009, Jongejan et al, 2004]. Dit samen met een verandering in klimaat, temperatuur en luchtvochtigheid kan ervoor zorgen dat vectoren (en pathogenen) uit endemische gebieden geïntroduceerd kunnen worden in niet-endemische gebieden en zich daar mogelijk kunnen handhaven [Dantas-Torres, 2010; Beugnet et al, 2009; Parola et al, 2008].

Dit geldt ook voor de bruine hondenteek, *Rhipicephalus sanguineus*. Een teek die wereldwijd veelvuldig voorkomt, voornamelijk in de subtropische gebieden (tussen de breedtegraden 50°N en 30°S) en een vector is van meerdere pathogenen [Dantas-Torres, 2010; Dantas-Torres 2008; Walker et al, 2000]. Op Aruba en Curaçao is *R. sanguineus* endemisch en van veterinaire medisch belang. In Nederland is deze teek niet endemisch, maar de omstandigheden binnenshuis, in kennels en pensions zijn gedurende het hele jaar ideaal voor de teek om zich toch te kunnen handhaven [Dantas-Torres, 2008]. Bovendien is hij al meerdere keren in Nederland gevonden en bij het UCTD in de teken-collectie beland. [Bodaan et al, 2007]

Doel van dit onderzoek is om een beeld te krijgen van de teek *R. sanguineus* en de mogelijke pathogenen die deze teek bij zich kan dragen. Gekeken wordt naar de prevalentie van pathogenen, waaronder ook de pathogenen *Ehrlichia canis* en *Babesia vogeli*, in *R. sanguineus* teken uit Aruba en Curaçao. Maar ook naar de prevalentie hiervan in honden, door middel van PCR en RLB.

### **3. Literatuuronderzoek**

#### **3.1. Teken**

Teken, behorende tot de subklasse Acari, zijn ectoparasitaire arthropoden die zich voeden met bloed van een gastheer. Wereldwijd zijn er 878 verschillende soorten teken bekend, die zijn te verdelen over drie groepen families: de Ixodidae (harde teken), de Argasidae (zachte teken) en de Nuttalliellidae. [Sonenshine, 1991; Horak et al 2008].

Onderscheid tussen de Ixodidae en Argasidae teken is te maken door de aanwezigheid van een hard dorsaal gelegen chitineus schild, het scutum, vast te stellen. Deze zijn bij de Ixodidae teken aanwezig, maar ontbreken bij de Argasidae teken. Daarnaast steekt het capitulum bij de Ixodidae vrij naar voren en is van bovenaf zichtbaar, terwijl dit bij de Argasidae niet het geval is [Jongejan, 2001].

De laatste familie, Nuttalliellidae, bestaat maar uit één enkele soort die van minder belang is [Anderson et al 2008]. Verreweg de grootste familie is de Ixodidae familie, welke bestaat uit zo'n 683 tekensorten en die tevens een van de belangrijkste groep van vectoren van een grote verscheidenheid aan pathogenen binnen de Arthropoden is [Jongejan et al, 2004].

#### **3.2. *Rhipicephalus sanguineus***

##### **3.2.1 Taxonomie en identificatie**

*Rhipicephalus sanguineus*, de bruine hondenteek, is een teek die tot de familie Ixodidae behoort. Het is een bleekgeel bruine tot rood bruine teek.

Door een grote morfologische gelijkheid kan *R. sanguineus* makkelijk verward worden met een aantal andere tekensorten, die behoren tot het *Rhipicephalus* genus (en bekend staan als het *R. sanguineus* complex) ; *R. sanguineus sensu stricto*, *R. camicasi*, *R. guilhoni*, *R. sulcatus*, *R. turanicus*, *R. leporis*, *R. pumilio*, *R. rossicus*, *R. pusillis* en *R. schulzei* [Walker et al, 2000; Dantas-Torres 2008]. Zoals bijvoorbeeld het geval is bij *R.camicasi* en *R. turanicus*. Het is daarom van belang om een species juist te identificeren, dit kan door te kijken naar onder andere de volgende kenmerken: de scuta, de genitaal openingen en het spiraculum. Vrouwelijke *R. sanguineus* teken kunnen onderscheiden worden van die van *R. camicasi* en *R. turanicus* door te kijken naar de breedte van de U-vormige genitaalopening, deze is bij *R. sanguineus* breed en bij de *R. camicasi* en *R. turanicus* smal. Bij *R. sanguineus* en *R. camicasi* is het spiraculum smaller dan bij *R. guilhoni* en *R. turanicus*. [Walker et al, 2000; Walker, 2003]

### 3.2.2. Levenscyclus *R. sanguineus*

Bij *R. sanguineus* teken zijn, net als bij alle overige Ixodidae teken, vier ontwikkelingsstadia te onderscheiden namelijk: ei, larve, nymf en adult [Jongejan, 2001; Dantas-Torres, 2008; Anderson, 2008]. Eitjes zijn zeer klein, sferisch en donker van kleur. Larven zijn ook zeer klein en hebben slechts drie paar poten in tegenstelling tot nymfen en adulten, deze hebben vier paar poten. Nymfen zijn kleiner dan adulten, bovendien is er bij de nymfen nog geen genitaal opening aanwezig [Dantas-Torres, 2008]. Pas bij de adulten kan er duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen mannetjes en vrouwtjes. Bij de mannetjes wordt de gehele dorsale zijde bedekt door het scutum, terwijl bij de vrouwtjes alleen het voorste deel van de dorsale zijde bedekt wordt [Jongejan, 2001; Anderson et al, 2008].

Bloedmaaltijden zijn nodig om deze levenscyclus (van ei tot adult) te kunnen doorlopen. De tijdsduur van zo'n bloedmaaltijd opname bij *R. sanguineus* varieert van twee dagen (larve) tot zelfs enkele weken (vrouwtje). Larven en nymfen hebben een bloedmaaltijd nodig voordat ze zich van een gastheer laten vallen en kunnen vervellen naar een volgend stadium. Adulten hebben een bloedmaaltijd nodig voor de reproductie; dus adulte vrouwtjes voordat ze eitjes kunnen leggen en de adulte mannetjes voor copulatie op een gastheer. Na de ovipositie, waarbij het vrouwtje zo tussen de 1500-4000 eitjes kan leggen, sterft het vrouwtje. De ovipositie varieert van drie dagen tot zelfs enkele weken. De *R. sanguineus* mannetjes kunnen meerdere bloedmaaltijden tot zich nemen en meerdere malen paren. Ze verblijven vaak langer op een gastheer, maar kunnen ook afvallen en op een andere gastheer voeden en opnieuw paren. Elke bloedmaaltijd zorgt voor de kans op het verkrijgen van een pathogeen of het overbrengen van een pathogeen aan de gastheer.

### 3.2.3. Ethologie en ecologie

*R. sanguineus* is een monotrofe drie-gastherige teek. Dit houdt in dat elk actieve stadium een gastheer opzoekt en zich daarop voedt, zich vervolgens laat afvallen en zich in de omgeving ontwikkelt tot een volgend stadium (door te vervellen). Vervolgens wordt er opnieuw een gastheer gezocht, waarop kan worden gevoed. Dit betekent dat het merendeel van de *R. sanguineus* teken zich niet op de gastheer (hond) bevindt, maar in de omgeving. [Dantas-Torres, 2008]

Er zijn een aantal voorkeursplaatsen waar de teken zich voeden. Adulten hechten zich vaak vast en voeden zich op de plaatsen waar de gastheer moeilijk bij kan komen (oren, hoofd, nek) en de immature stadia voeden zich op de wat lagere gebieden van het lichaam (buik, achterpoten) [Dantas-Torres, Otranto, 2010].

Monotroof wil zeggen dat *R. sanguineus* zeer gastheerspecifiek is. De primaire gastheer van *R. sanguineus* is de hond, vandaar dat de teek ook wel de bruine hondenteek wordt genoemd. Dit wil

niet zeggen dat *R. sanguineus* alleen maar op de hond gevonden wordt. Incidenteel wordt de teek ook gevonden op andere gastheren, waaronder konijnen, vee, katten, knaagdieren, maar zelfs op de mens [Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres & Figueredo & Brandão-Filho, 2006].

De mogelijkheid tot het succesvol volbrengen van de levenscyclus en het tot reproductie kunnen komen, is afhankelijk van de factoren: temperatuur (optimaal tussen 20-35 °C), luchtvochtigheid (35-95%) en de aanwezigheid van een gastheer [Dantas-Torres, 2010]. Een minimumtemperatuur om zich te kunnen ontwikkelen tot een volgend stadium ligt tussen de 10-15 °C [Dantas-Torres, 2008]. Tropische en subtropische klimaten zijn dus uitermate geschikt voor *R. sanguineus*, hier zijn deze teken gedurende het hele jaar aanwezig. In de wat gematigde klimaten zijn ze voornamelijk gedurende de late lente tot begin herfst te vinden. Maar aangezien *R. sanguineus* ook als een endofiele teek beschouwd wordt, welke binnenshuis gevonden kan worden (tegen muren opkruipend, op tapijt en in kieren en gaten), is het goed mogelijk voor deze teken om zich ook in de wat koudere klimaten zoals in Nederland binnenshuis te kunnen handhaven [Jongejan, 2001; Dantas-Torres 2010].

#### 3.2.4. *Rhipicephalus sanguineus* als vector

Een tekensoort wordt alleen beschouwd als vector van een bepaald pathogeen wanneer het:

- voedt op een infectieuze gewervelde gastheer,
- in staat is gedurende de bloedmaaltijd besmet te raken met dat bepaalde pathogeen,
- in staat is deze bepaalde pathogeen tijdens één of meerdere levensstadia te behouden, en
- deze pathogeen kan doorgeven aan andere gastheren, wanneer er opnieuw een bloedmaaltijd wordt genuttigd [Jongejan et al, 2004].

Transmissie van de pathogenen naar de gastheer kan plaatsvinden via speekselsecretie, regurgitatie, faeces of door ingestie van de teek [Marquez-Jimenez et al, 2005]. Er is een horizontale en verticale pathogeen transmissie tussen teken mogelijk. Horizontale transmissie door teken kan ofwel transstadieel/interstadieel of intrastadieel. Bij transstadieel is er overdracht van een pathogeen tussen de verschillende ontwikkelingsstadia van dezelfde teek. Bij intrastadieel is er behoud van een pathogeen tijdens hetzelfde ontwikkelingsstadium van de teek, dus de teek raakt besmet met het pathogeen en in hetzelfde stadium wordt het pathogeen weer overgedragen. Verticale transmissie is mogelijk door transvariële overdracht van een pathogeen door het vrouwtje aan de larven [Stich et al, 2008].

*R. sanguineus* speelt een zeer belangrijke vectorrol. Van een groot aantal pathogenen is bekend dat deze kunnen worden overgedragen door *R. sanguineus* teken. Een aantal andere pathogenen kunnen mogelijk worden overgedragen door *R. sanguineus* teken, echter is hier meer



10 mei 2011

onderzoek naar nodig. Deze pathogenen zijn onder andere vermeld in een review van F. Dantas-Torres [2010]. In tabel 1 staan een aantal belangrijke pathogenen weergegeven, met de bijbehorende referenties.

Tabel 1 *Belangrijke pathogenen en de ziekten die zij (mogelijk) kunnen overdragen op hun gastheer.*

Organisme	Pathoogeen	Ziekte	Gastheer	Referentie
Protozoa	<i>Babesia gibsoni</i>	Canine babesiose	Hond	Sen (1933)
	<i>Babesia canis</i>	Canine babesiose	Hond	Liebisch en Gillani (1979)
	<i>Hepatozoon canis</i>	Canine hepatozoonose	Hond, kat	Nordgren en Craig (1984)
	<i>Babesia vogeli</i>	Canine babesiose	Hond	Uilenberg et al. (1989), Matilja et al. (2003)
	<i>Leishmania infantum</i> ( <i>Leishmania chagasi</i> ) ??	Canine leishmaniose	Hond	Coutinho et al. (2005), Dantas-Torres et al (2010)
Bacteria	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Rocky Mountain spotted fever	Hond, mens, knaagdieren	Hoogstraal (1967), William et al. (2006)
	<i>Ehrlichia canis</i>	Canine monocytic ehrlichiose	Hond, mens??	Groves et al. (1975), Perez et al (2006)
	<i>Rickettsia rhipicephali</i>		Hond, mens	Burgdorfer et al. (1978)
	<i>Rickettsia conorii</i>	Mediterranean spotted fever	Hond, mens, knaagdieren	Estrada-Peña en Jongejan (1999)
	<i>Anaplasma platys</i>	Canine cyclic thrombocytopenia	Hond	Sanogo et al. (2003)
Nematode	<i>Dipetalonema dracunculoides</i>	Canine filariose	Hond	Olmeda-García (1993)

?? → De vectorrol van *R. sanguineus* moet hier nog verder worden onderzocht, echter wordt er wel al een verband gelegd tussen *R. sanguineus* en het betreffende pathoogeen of gastheer.

Van belang voor de humane gezondheid, is te weten dat er ook pathogenen bij zitten die kunnen worden overgedragen op de mens. Dit zijn bijvoorbeeld *Rickettsia rickettsii* en *Rickettsia conorii* die Mediterranean Spotted Fever of fievre boutonneuse veroorzaakt bij de mens [Dantas-Torres & Figueredo & Brandão-Filho, 2006]. Ook van *E. canis* wordt er gedacht dat deze overgebracht kan worden op de mens door *R. sanguineus*. Dit is recent beschreven voor een stam van *E. canis* uit Venezuela [Perez et al, 2006]. De voornaamste gastheer van de *R. sanguineus* teken is dan wel de hond, maar er zijn gevallen bekend waarop deze teken ook op mensen zijn gevonden [Dantas-Torres 2008; Perez et al, 2006]. Bovendien is er aangetoond in bepaalde studies dat de *R. sanguineus* teken, die worden blootgesteld aan hoge temperaturen, eerder mensen en konijnen bijten [Dantas-Torres, 2010; Parola et al, 2008; Socolovschi et al, 2009]. Dit is een risicofactor voor de mens.

Aangezien *R. sanguineus* dus ook een zeer belangrijke vector rol speelt bij de tekengebonden ziektes babesiose en ehrlichiose bij de hond, worden deze twee ziektes nu verder uitgewerkt.

### 3.3. Canine monocytair ehrlichiose

#### 3.3.1. Etiologie

Canine monocytair ehrlichiose (CME), ook wel tropische canine pancytopenie genoemd, is een tekengebonden, mogelijk fataal verlopende ziekte die wordt veroorzaakt door de prokaryote ziekteverwekker *Ehrlichia canis*. *E. canis* is een kleine Gramnegatieve obligaate intracellulaire bacterie die voornamelijk de monocyten en macrofagen parasiteert en daar clusters, genoemd morulae, vormt. *E. canis* wordt overgebracht door *R. sanguineus* teken (maar ook door *Dermacentor variabilis* teken) [Jongejan, 2001; Stich et al, 2008].

Daarnaast zijn er nog een aantal gerelateerde *Ehrlichia* pathogenen, zoals *Anaplasma platys* en *Anaplasma phagocytophilum*. *E. canis* is echter het meest voorkomend en veroorzaakt het meest ernstige klinisch ziektebeeld [Nelson, 2003].

Infectie met *E. canis* vindt plaats via een transstadiale overdracht door *R. sanguineus* nymfen of adulten. Er is geen transvariële transmissie van *E. canis* mogelijk. *R. sanguineus* mannetjes kunnen *E. canis* zowel transstadieel als intrastadieel overdragen en kunnen een belangrijke rol spelen bij het de transmissie van *E. canis* naar andere honden, aangezien ze tussen canine gastheren kunnen switchen. [Stich et al, 2008; Little et al, 2007] Ook in de afwezigheid van vrouwtjes kunnen zij *E. canis* opnemen en overdragen [Bremer et al, 2005]

#### 3.3.2. Pathogenese en klinische symptomen

Het ziektebeeld van CME kan worden onderverdeeld in drie fases: een acute, subklinische en chronische fase [Jongejan, 2001; Harrus et al, 1999; Stich et al, 2008; Nelson, 2003].

De acute fase volgt na een incubatieperiode van acht tot twintig dagen en kan twee tot vier weken duren. De klinische verschijnselen die zich in deze acute fase kunnen voordoen zijn: anemie, anorexie, ataxie, conjunctivitis, depressie, koorts, leukopenie, ooguitvloeiing, trombocytopenie en braken.

Na de acute fase, welke de meeste honden overleven, volgt een subklinische fase die maanden tot jaren kan duren. Tijdens deze fase zijn er geen duidelijk zichtbare klinische symptomen aanwezig, maar wel milde hematologische abnormaliteiten zoals een milde trombocytopenie, leukopenie en anemie.

De subklinische fase kan overgaan in een milde tot zeer ernstige en levensbedreigende chronische fase. Vaak loopt deze fase fataal af. Deze fase gaat gepaard met een trombocytopenie (en daardoor petechiën en een verhoogde bloedingsneiging), vasculitis, leukopenie en anemie [Nelson, 2003].

### 3.3.3. Diagnose

De diagnose CME moet worden gesteld op basis van anamnese, klinische verschijnselen en laboratorische testen.

#### *Bloedonderzoek*

Meest voorkomende hematologische bevinding in alle fases van CME is een persisterende thrombocytopenie, welke bij 82% van de *E. canis* geïnfecteerde honden aanwezig is [Neer et al, 2002]. Daarnaast is er vaak een milde non-regeneratieve anemie. Hypoalbuminemie, hyperglobulinemie en hypergammaglobulinemie zijn de voornaamste biochemische abnormaliteiten die te zien zijn bij bloedonderzoek [Harrus et al, 1999].

#### *Microscopische bloedonderzoek*

Het identificeren van de typische morulae in de monocytten in bloed en buffycoat uitstrijkjes is een middel van diagnostiek. Echter is dit tijdrovend en vereist ervaring. Een negatieve uitslag is niet bewijzend [Stich et al, 2008].

#### *Serologie*

De diagnose ehrlichiose is meestal gebaseerd op het vinden van een antilichaamtiter met behulp van indirecte fluorescente antilichaam (IFT) testen. Al zeven dagen na infectie, kunnen deze testen antilichamen oppakken, maar sommige honden zijn pas na 28 dagen seropositief. Dit kan dus resulteren in een vals negatieve uitslag. Daarom is het noodzakelijk bij verdenking op ehrlichiose na twee tot drie weken opnieuw te testen op seroconversie [Neer et al, 2002]

#### *PCR amplificatie*

PCR amplificatie van *E. canis* DNA in bloed, beenmerg of milt van geïnfecteerde honden is de meest succesvolle methode om tot een snelle diagnose te komen, al na vier tot tien dagen na infectie, nog voor seroconversie kan er een positieve uitslag worden gevonden. [Neer et al, 2002].

### 3.3.4. Therapie

Verscheidende tetracycline, doxycycline, chloramphenicol en imidocarb dipropionate protocollen zijn er gebruikt voor CME. Tetracyclines en oxytetracyclines zijn effectief in de behandeling van CME en werden voorheen altijd toegepast. De therapie die hedendaags het meest wordt toegepast en ook wordt aanbevolen door het ACVIM Infectious Study Group is een therapie met doxycycline, 10mg/kg/dag PO gedurende 28 dagen [Neer et al, 2002; Nelson, 2003].

Na de start van een tetracyclinetherapie is er na 24-48 uur al een klinische verbetering zichtbaar. Het aantal bloedplaatjes neemt toe en is meestal weer op het normale niveau na 14 dagen. Als er na zeven dagen behandeling nog steeds geen verbetering is van de thrombocytopenie

10 mei 2011

dan kan er een ander mechanisme achter zitten, zoals bijvoorbeeld een co-infectie met *Babesia* of *Bartonella* [Neer et al, 2002; Nelson, 2003].

Na een succesvolle behandeling zullen de antilichaamtiteren ook afnemen en over het algemeen in zes tot negen maanden negatief zijn. Dit is echter wel afhankelijk van de hoogte van de antilichaamtiteren bij de start van de therapie [Neer et al, 2002].

Tot slot kan er ook met behulp van PCR gekeken worden naar de effectiviteit van de therapie. Dit gebeurt dan twee weken na het einde van de therapie, is het resultaat positief dan wordt de therapie vier weken herhaald en opnieuw na twee weken getest. Is deze opnieuw positief dan is het noodzakelijk om een ander therapieprotocol in te zetten. Is na een therapie het PCR resultaat negatief, dan wordt er na twee maanden opnieuw gePCRd en wanneer ook dit resultaat negatief is, is therapeutische eliminatie van *E. canis* waarschijnlijk [Neer et al, 2002].

### 3.4 Canine babesiose

#### 3.4.1. Etiologie

Canine babesiose is één van de meest belangrijke tekengebonden ziekten van honden wereldwijd. De ziekte is levensbedreigend en wordt veroorzaakt door intraerythrocytische protozoaire parasieten van het genus *Babesia* [Dantas-Torres & Figueredo, 2006].

Volwassen teken kunnen geïnfecteerd raken door zich te voeden met *Babesia* geïnfecteerd bloed van een gastheer. Er vindt een geslachtelijke ontwikkeling plaats, waarbij de protozoaire parasieten via het ovarium en ei overgaan op de volgende generatie (transovarieel). In de speekselklieren van de volgende generatie teken vindt de sporogonie plaats, die resulteert in de infectieuze *Babesia* sporozoieten. Deze *Babesia* sporozoieten kunnen, tijdens het voeden, via het speeksel van een geïnfecteerde teek weer worden overgebracht op een hond [Jongejan, 2001].

Babesiose in honden wordt voornamelijk geassocieerd met *Babesia canis* en *Babesia gibsoni* [Nelson, 2003]. Aanvankelijk onderscheidde men bij honden drie subsoorten van *B. canis*, namelijk *B. canis canis*, *B. canis rossi* en *B. canis vogeli*. Deze worden tegenwoordig echter beschouwd als gescheiden soorten [Irwin, 2009]. *B. canis* wordt overgebracht door *Dermacentor reticulatus* en *D. marginatus* teken. *B. rossi* wordt overgebracht door *Haemaphysalis leachi* teken. En uit eerder onderzoek in 1936 is al gebleken dat *R. sanguineus* teken *B. vogeli* kunnen overbrengen op een niet geïnfecteerde hond [Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Jongejan, 2001]. Ook van *B. gibsoni* is bekend dat het kan worden overgedragen door de *R. sanguineus* [Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. Daarnaast is er ook een niet vector gerelateerde transmissie van *B. gibsoni* mogelijk via bloeditwisseling tijdens vecht- en bijtincidenten tussen honden onderling [Irwin, 2009]

#### 3.4.2. Pathogenese en klinische symptomen

De ernst van canine babesiose varieert en is afhankelijk van de soort *Babesia* parasiet, de leeftijd en mate van immuniteit van de gastheer en de eventuele aanwezigheid van een co-infectie [Irwin, 2009]. Over het algemeen wordt in Afrika *B. vogeli*, in ieder geval waar het volwassen honden betreft, als het minst pathogeen en *B. rossi* als het meest pathogeen beschouwd.

De symptomen behorend bij het acute stadium van een *B. rossi* infectie komen overeen met die behorend bij een *B. canis* infectie [Jongejan, 2001]. De incubatietijd varieert van één tot twee weken. In het acute stadium kunnen de symptomen apathie, anorexia, hoge koorts en een versnelde pols en ademhaling worden waargenomen. In een later stadium kan tevens een haemolytische anemie ontstaan, die gepaard gaat met haemoglobinurie door lysis van erythrocyten. Indien de infectie onbehandeld blijft, kan icterus, splenomegalie en lymfadenopathie optreden. In ernstige gevallen treedt naast nierdysfunctie diffuse intravasale stolling op.

Cerebrale babesiose komt vrij weinig voor en wordt gekenmerkt door grote aantallen geparasiteerde erythrocyten in capillairen van het centrale zenuwstelsel. Honden met deze vorm van babesiose kunnen hypersensibiliteit, agressief gedrag, cirkelbewegingen en verlammingen vertonen. Tevens kan bij deze vorm van babesiose vaak een zeer laag aantal geparasiteerde erythrocyten worden vastgesteld [Jongejan, 2001].

Een groot deel van de honden met een *B. rossi* infectie ontwikkelt complicaties [Irwin, 2009]. Complicaties als haemoconcentratie, neurologische symptomen, acuut nierfalen en pulmonair oedeem vereisen een vroege, agressieve en intensieve behandeling en brengen een slechte prognose met zich mee. Een infectie met *B. vogeli* is veelal een stuk minder ernstig, maar kan in puppies jonger dan drie tot vier maanden en in honden met een mogelijk verzwakt immuunsysteem fataal zijn.

Alhoewel bloedingen (hemorrhagie) voorheen als symptoom van canine babesiose werden gezien, moet men bij aanwezigheid van bloedingen rekening houden met de mogelijkheid van een co-infectie met *E. canis* [Dantas-Torres & Figueredo, 2006].

### 3.4.3. Diagnose

De diagnose van canine babesiose volgt vaak uit het lichamelijke onderzoek en de geschiedenis van de patiënt. Maar wanneer mogelijk, wordt tevens microscopisch onderzoek uitgevoerd van een uitstrijkje van capillair bloed na kleuring met Giesma of Diff-Quick om de infectie te bevestigen [Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Irwin, 2009; Jongejan, 2001]. *B. canis* is een wat grotere piroplasme (3-5  $\mu\text{m}$ ) dan *B. gibsoni* (1-3  $\mu\text{m}$ ). Simpelheid, hoge specificiteit en lage kosten maken deze methode aantrekkelijk en toegankelijk voor veel dierenartsen wereldwijd. Echter kan middels deze methode in sommige gevallen, met name in chronische of subklinische, de bevestiging niet gemakkelijk worden bewerkstelligd [Dantas-Torres & Figueredo, 2006].

Om chronische infecties, die vanwege het lage aantal parasieten niet gemakkelijk gedetecteerd kunnen worden met behulp van uitstrijkjes van capillair bloed met kleuring, toch te kunnen diagnosticeren, kunnen serologische testen van nut zijn [Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. Deze testen zijn tevens nuttig om niet symptomatische dragers van *Babesia* parasieten te identificeren. Echter kunnen honden voor lange periode seropositief blijven. De diagnostische waarde van serologische testen is zodoende laag, wanneer er geen sprake is van klinische symptomen en kennis van de geschiedenis van de patiënt. De serologische testen IFAT (indirect fluorescent antibody test) en ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) worden als zeer sensitieve en redelijk specifieke detectiemethoden voor antilichamen voor *Babesia* parasieten in honden beschouwd [Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. De sensitiviteit, specificiteit en voorspellende waarde van deze methoden zijn echter niet eerder vermeld.

Ook moleculaire diagnostiek, waaronder PCR, is veelbelovend voor de diagnose van veel parasitische ziekten. Uit onderzoek met een cohort van 55 honden is gebleken dat PCR als methode voor de detectie van *Babesia* DNA in bloedsamples van honden een specificiteit en sensitiviteit van 100% heeft [Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. Een nadeel aan PCR is echter dat gespecialiseerde laboratoriumuitrusting en getrainde laboratoriummedewerkers vereist zijn. Tevens kunnen bij chronische babesiose vals negatieve resultaten worden gevonden. Het is belangrijk om deze beperking te erkennen wanneer PCR wordt gebruikt om mogelijke dragers van *Babesia* parasieten en andere niet symptomatische honden (bijvoorbeeld bloeddonoren) te onderzoeken. Alhoewel het detectievermogen van PCR voor parasitische DNA in chronisch geïnfecteerde dieren kan worden vergroot door meerdere keren te testen, is het aan te raden om in dergelijke situaties te kiezen voor een serologische test als alternatieve, aanvullende diagnostische test [Irwin, 2009].

#### 3.4.4. Therapie

Als therapie bij canine babesiose wordt ofwel imidocarb dipropionaat ofwel diminazene diacetaat toegediend [Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Nelson, 2003]. Naar verluid is een enkele onderhuidse of intramusculaire injectie met 2.5 tot 3.5 mg/kg diminazene diacetaat effectief. Echter kent dit middel wel een aantal bijwerkingen, waaronder depressie, ataxie en convulsie. Twee onderhuidse of intramusculaire injecties met 5-7 mg/kg imidocarb dipropionaat lijkt eveneens effectief op een interval van twee weken. Of een enkele injectie met 7,5 mg/kg imidocarb dipropionaat SC of IM [Nelson, 2003]. Ook bij dit middel kunnen enkele bijwerkingen optreden, namelijk overgeven, koliek, diarree en ptyalisme. Toediening van 0.04 mg/kg atropine tien minuten voor toediening van imidocarb dipropionaat kan de negatieve cholinergische effecten voorkomen [Dantas-Torres & Figueredo, 2006].

Verdachte gevallen van canine babesiose, waarbij al eerder teken zijn vastgesteld, moeten altijd worden behandeld [Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. Dit geldt eveneens wanneer een parasitaire infectie nog niet is bevestigd middels diagnostische middelen. Afhankelijk van de ernst van de ziekte kan het noodzakelijk zijn om symptomatische therapie, zoals vloeistoftherapie en bloedtransfusie en eventueel heparine bij diffuse intravasale stolling, te geven [Jongejan, 2001; Dantas-Torres & Figueredo, 2006]. Het overgaan op transfusie moet echter altijd gebaseerd zijn op klinische symptomen (o.a. tachycardie en tachypneu) en hematologische testen. Bij hematocriet  $\leq 15\%$  kan men ook besluiten over te gaan op transfusie en bij hematocriet  $\leq 10\%$  is dit zelfs noodzaak [Dantas-Torres & Figueredo, 2006].

### 3.5. Preventie babesiose en ehrlichiose

Er zijn geen vaccins beschikbaar voor de preventie van ehrlichiose [Neer et al, 2002; Dantas-Torres, 2008]. Het is wel mogelijk tegen *B. canis* en *B. rossi* te vaccineren met exo-antigenen/ Soluble parasite antigen (SPA) uit een in vitro celkweek om zo een beschermende immuniteit bij honden op te wekken, wat leidt tot een vermindering van de ernst van ziekteverschijnselen [Jongejan, 2001; Schetters, 2005; Schetters et al, 2007]. Wellicht dat in de toekomst ook een SPA vaccin voor *B. vogeli* mogelijk is, hier is meer onderzoek naar nodig.

Een aantal therapeutische middelen zijn onderzocht op een profylactische werking tegen babesiose. Zo werd in een experimentele studie gesuggereerd dat een enkele subcutane injectie van 6mg/kg imidocarb twee weken bescherming biedt tegen *B. canis* [Vercammen et al, 1996]. Dit middel is niet geregistreerd in Nederland [Jongejan, 2001]. Ook doxycycline zou een profylactische werking hebben tegen babesiose. Een dosis van 5mg/kg/dag voorkomt klinische ziekte niet, maar resulteert wel in mildere klinische symptomen en herstel in 1 week [Irwin, 2009; Vercammen et al, 1996].

*Babesia* parasieten kunnen worden overgebracht middels bloedtransfusie, zodoende is het van belang te controleren dat bloeddonoren niet geïnfecteerd zijn, dit middels PCR of serologie [Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Nelson, 2003].

Preventie bestaat toch voornamelijk uit het regelmatig controleren van honden op teken en deze zo snel mogelijk verwijderen. Ook is het noodzakelijk de honden te behandelen met acariciden. Dit kan middels spot-on producten, halsbanden, shampoos, sprays en poeders. Meest gebruikte acariciden zijn fibronil, amitraz, carbaryl en pyrethroiden (deltamethrin, permethrin en cypermethrin) [Dantas-Torres, 2008]. Aangezien 95% van de *R. sanguineus* teken zich in de omgeving bevindt en dus niet op de hond, moet de omgeving ook worden behandeld. Echter is hier voorzichtigheid bij geboden, vanwege milieuvervuiling en toxiciteit voor mens en andere organismen. Bovendien moet er rekening gehouden worden met mogelijke acaricide resistentie in teken die zich op lange termijn zou kunnen voordoen [Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres & Figueredo, 2006].



## **4. Materiaal en methoden**

### **4.1. Verzameling van monsters**

Het materiaal voor dit onderzoek is afkomstig van voorafgaande onderzoeken naar ehrlichiose en *R. sanguineus* op de eilanden Aruba en Curaçao. Zowel kliniekpatiënten als straathonden werden hier klinisch onderzocht. Teken werden verzameld en opgestuurd naar het UCTD. De teken werden per hond apart opgeslagen in buisjes; hierdoor is de uitslag van de PCR/RLB nog terug te koppelen aan de klinische gegevens van de hond. Vanuit Curaçao zijn er ook DNA monsters van bloed opgestuurd naar het UCTD, afkomstig van honden die verdacht worden op het hebben van ehrlichiose. Dit is niet beschikbaar van patiënten uit Aruba, echter is wel bij een aantal patiënten uit Aruba een Idexx<sup>®</sup> 4Dx<sup>®</sup> snapttest gedaan, waarvan het resultaat verwerkt is in een tabel in het onderzoeksverslag van drs. Vugteveen: 61% testte positief op *E. canis* en 27% op *A. phagocytophilum* [Vugteveen, 2010].

Daarnaast zijn ook nog *R. sanguineus* teken beschikbaar gesteld, die afkomstig zijn uit een experimentele batch die gevoed hebben op met *B. vogeli* besmet bloed (artificial feeding experiment Zuid-Afrika). Deze worden ook onderzocht op *B. vogeli* met behulp van PCR en RLB.

Tot slot zijn er 4 *R. sanguineus* teken, afkomstig uit Nederland, uit de UCTD collectie gehaald voor dit onderzoek.

### **4.2. Determinatie van teken**

Alle teken werden gedetermineerd onder de microscoop en met behulp van het boek: A guide to identification of species – Walker, A.R. Gekeken werd naar soort, stadium en geslacht [Walker 2003]. Elke teek die vervolgens voor verder onderzoek werd gebruikt (2-3 teken per hond), kreeg een Tick ID en werd opgeslagen in een buisje met 70% ethanol. Deze teken zijn at random uit de buisjes gehaald.

### **4.3. DNA extractie uit teken**

Door het detecteren van het DNA van een bepaald pathogeen kan worden vastgesteld of de teek of het bloed van een gastheer (hond) geïnfecteerd was.

DNA extractie uit teken gebeurde volgens protocol (zie bijlagen – UCTD protocollen, pg. 32) met behulp van de Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel). DNA extractie uit bloed was al gedaan.

#### 4.4. Polymerase chain reaction (PCR)

Na DNA extractie werd de Polymerase Chain Reaction (PCR) uitgevoerd (zie Bijlagen – UCTD protocollen pg. 34). Met deze techniek wordt een specifiek stuk DNA, van een pathogeen, in vitro geamplificeerd zodat het later met een RLB kan worden aangetoond.

Hiervoor werd er eerst een mastermix klaargemaakt (volgens UCTD protocol, te vinden in de bijlage), bestaande uit de volgende bestanddelen: H<sub>2</sub>O (nuclease free), 10X True Start buffer, MgCl<sub>2</sub> dNTP/UTP mix, UNG, True Start polymerase en de forward en reverse primers van de pathogenen die met de RLB aangetoond kunnen worden. De bedoeling is dat met zo weinig mogelijk primers zoveel mogelijk pathogenen kunnen worden aangetoond. Er werd gebruik gemaakt van twee primersets: *Ehrlichia/Anaplasma* en *Babesia/Theileria* (tabel 2).

Tabel 2. *sequentie primers*

Primer*	Sequence	Orientation	Tm (°C)
RLB-F2	5'-GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G	+	57.9
RLB-R2	5'-Biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT	-	53.7
Ehr-F	5'-GGA ATT CAG AGT TGG ATC MTG GYT CAG	+	61.0
Ehr-R	5'-Biotin-CGG GAT CCC GAG TTT GCC GGG ACT TYT TCT	-	69.5

De mastermix werd verdeeld over de microcentrifuge epjes (22,5 µl per epje), waaraan 2,5 µl DNA sample werd toegevoegd (zodat het totaalvolume uitkwam op 25 µl per epje). Tot slot werd dit in de thermocycler gedaan en het bijbehorende thermocycler PCR touchdown programma afgedraaid (tabel 3)

Tabel 3. *Thermocycler programma*

1 cycle	3 min	37°C	Activation of UDG
1 cycle	10 min	94°C	Inactivate UDG & activate Taq
2 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	67°C	
	30 sec	72°C	
2 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	65°C	
	30 sec	72°C	
2 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	63°C	
	30 sec	72°C	
2 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	61°C	
	30 sec	72°C	
2 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	59°C	
	30 sec	72°C	
40 cycles	20 sec	94°C	
	30 sec	57°C	
	30 sec	72°C	
1 cycle	7 min	72°C	Final extension

10 mei 2011

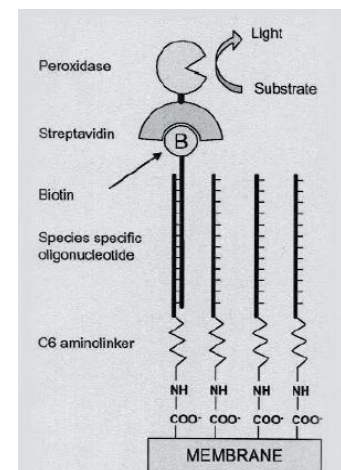
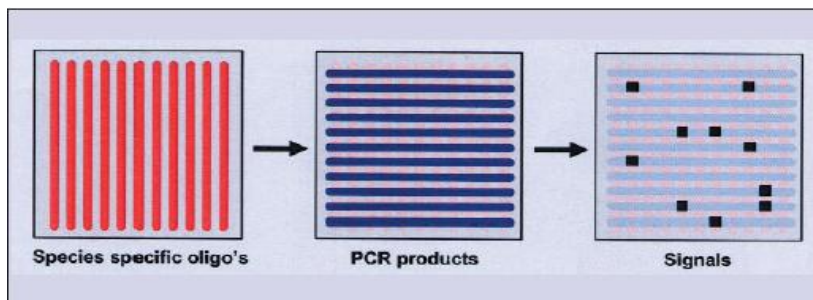
#### **4.5. Gelelektroforese**

Bij gelelektroforese wordt er een elektrisch veld over de agarose gel aangebracht, waardoor de negatief geladen DNA-fragmenten richting de positieve elektrode migreren. Kleinere DNA-fragmenten zullen sneller door de gel heen migreren en een langere afstand afleggen dan de grotere DNA fragmenten. Hierdoor kunnen deze van elkaar gescheiden worden. Tijdsduur waarna het resultaat van de gelelektroforese kan worden bekeken onder UV-licht is onder meer afhankelijk van het type gel dat gebruikt wordt en de voltage, maar duurde bij de 1,5 % agarose gel die gebruikt werd 30-45 min. Gelelektroforese word gedaan ter controle van de DNA extractie. Het gebruikte protocol voor de gelelektroforese is in bijlage te vinden. (Bijlagen – UCTD protocollen, pg. 35)

#### 4.6. Reverse line blot (RLB)

Met behulp van reverse line blot hybridisatie kunnen specifieke pathogenen worden aangetoond. Voorafgaand aan de werkelijke RLB is er PCR amplificatie. Er wordt gebruik gemaakt van een membraan, waarop soortspecifieke oligonucleotiden met behulp van een miniblotter in laantjes worden aangebracht, deze zijn covalent gebonden aan het membraan middels een aminolinker. Daarna worden de PCR-producten ook met een miniblotter aangebracht in laantjes die loodrecht op de oligonucleotide laantjes staan. Er kan een binding plaatsvinden tussen een PCR-product en een soort specifieke oligonucleotide. Detectie van de gebonden PCR producten vindt plaats door middel van een biotine label dat bevestigd is aan het 5'-einde van een van de primers en dus aan elk PCR product vast zit. Na een aantal wasstappen, waardoor de a-specifiek gebonden PCR producten worden weggevoerd, wordt het complex van oligo en PCR product plus biotine geïncubeerd met peroxidase geconjugeerd streptavidine. Middels chemoluminescentie, na toevoeging van het ECL substraat, kan de reactie zichtbaar worden gemaakt op een film. Zie figuur 1 waar het principe van de RLB schematisch is weergegeven. [Jongejan, 2001; Taoufik et al, 2004].

Bovenstaand is de theorie achter de RLB, het uitvoeren van de RLB gebeurde aan de hand van het UCTD protocol RLB (te vinden in de bijlage pg. 36). Na gebruik van een membraan werd het membraan weer ontdaan van de gebonden PCR producten (gestript) en was het weer voor hergebruik beschikbaar.



Figuur 1. Principe van de RLB [Taoufik et al, 2004]

## **5. Resultaten**

### **5.1. Verzameling van monsters**

#### Gegevens Aruba:

Aantal kliniekpatiënten = 128

Totaal aantal teken verwijderd van de kliniekpatiënten = 429, afkomstig van 85 kliniek patiënten (bij 43 kliniek patiënten zijn er geen teken gevonden)

Aantal straathonden = 40

Totaal aantal teken verwijderd van de straathonden = 317, afkomstig van 38 straathonden (2 straathonden waren teekvrij).

#### Gegevens Curaçao:

Totaal aantal honden (zowel huisdieren als asiëldieren) = 78

Aantal bloed DNA monsters = 103, waarvan 30 van dezelfde hond maar dan van een tweede bloedafname na een behandeling met doxycycline gedurende 3 weken.

Totaal aantal teken verwijderd = 129, afkomstig van 33 honden (van de overige honden zijn geen teken van opgestuurd, wel bloedmonsters)

### **5.2. Determinatie van teken**

Alle (n = 875) verzamelde teken afkomstig uit Curaçao en Aruba behoren allemaal tot de soort *R. sanguineus*.

- Teken Aruba-kliniek (n= 429); 176 ♀ (~41%), 183 ♂ (~43%), 26 adulten (~6%) en 44 nymfen (~10%)

- Teken Aruba-straat (n=317); 122 ♀ (~38,5%), 160 ♂ (~50,5%), 21 adulten (~7%) en 14 nymfen (~4%)

- Teken Curaçao (n= 129); 55 ♀ (~43%), 58 ♂ (~45%), 4 adulten (~3%) en 12 nymfen (~9%)

Totale percentage verdeling teken: 40% ♀, 46% ♂, 6% adult en 8% nymf. Dus 92% adult en 8% pre-adult. De aantallen adulten zijn niet verder gedetermineerd op geslacht, aangezien ze in buisjes met veel eitjes en/of bloed zaten of omdat deze kapot waren gegaan tijdens transport.

Experimentele batch *R. sanguineus* teken (Zuid-Afrika) (n= ± 250); waaronder 85♀ en 85 ♂

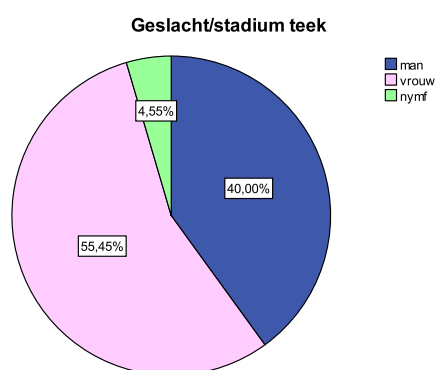
*R. sanguineus* teken uit Nederland (n= 4); 1♀ en 3 ♂

### 5.3. Gebruikte materiaal Aruba en Curaçao

In totaal 330 teken van de 875 verzamelde teken zijn random uitgezocht en hiervan is DNA extractie gedaan. Van deze 330 teken zijn er 132 mannelijk (40%), 183 vrouwelijk (55,5%) en 15 nymf (4,5%). 82 van de 330 teken zijn afkomstig uit Curaçao en de overige 248 onderzochte teken zijn afkomstig uit Aruba. Het percentage man, vrouw en nymf van deze aantallen is per eiland weergegeven in tabel 2, en komt ongeveer overeen met elkaar, en met het totaalbeeld weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. *Frequentie en percentage teken, uitgesplitst naar geslacht/stadium van de teek.*

Geslacht/stadium teek	Frequentie	Percentage
Mannetje	132	40,0
Vrouwtje	183	55,5
Nymf	15	4,5
Totaal	330	100,0



Tabel 5. *Frequentie en percentage teken in Curaçao en Aruba, uitgesplitst naar geslacht/stadium van de teek.*

Land	Geslacht/stadium teek	Frequentie	Percentage
Curaçao	Mannetje	34	41,5
	Vrouwtje	43	52,4
	Nymf	5	6,1
	Totaal	82	100,0
Aruba	Mannetje	98	39,5
	Vrouwtje	140	56,5
	Nymf	10	4,0
	Totaal	248	100,0

Afkomst van de hond waar de teek vanaf is gehaald, is ook bekend per eiland. Dit is weergegeven in de tabel 6. Ongeveer 60% van alle teken is afkomstig van een huisdier, de overige zijn afkomstig van een zwerfdier of asiëldier.

Tabel 6. Frequentie en percentage teken afkomstig uit Curaçao en Aruba, uitgesplitst naar afkomst van de hond.

Land	Afkomst hond	Frequentie	Percentage
Curaçao	Huisdier	50	61,0
	Asiel	29	35,4
	Onbekend	3	3,7
	Totaal	82	100,0
Aruba	Huisdier	150	60,5
	Zwerfdier	98	39,5
	Totaal	248	100,0

#### 5.4. DNA extractie, PCR en RLB; teken en bloedsamples Aruba en Curaçao

Middels DNA extractie is DNA van de 330 uitgezochte teken verkregen. Daarnaast waren er al 103 bloed DNA samples van de honden uit Curaçao beschikbaar. Deze DNA samples zijn allemaal getest; de PCR producten zijn aangebracht op een RLB. Getest werd er op de aanwezigheid van *Babesia-Theileria*-, *Anaplasma*- en *Ehrlichia* soorten.

Alle RLBs zijn te vinden in de bijlage (Bijlagen – RLBs pg. 37 t/m 49), waarbij de aangebrachte DNA samples en de probes duidelijk vermeld staan. De samples die uiteindelijk een positief signaal gaven op de RLB membranen staan voor de duidelijkheid nog eens vermeld in een tabel in de bijlage (Bijlagen – Positieve samples weergegeven in tabel, pg. 49)

#### Teken:

Van alle onderzochte teken uit Curaçao (n=82) is er geen een positief resultaat gevonden met de RLB. Van de teken uit Aruba (n=248) waren er 7 positief, bijna 3 %. Dit waren 2 vrouwtjes *R. sanguineus* teken afkomstig van een huisdier en 5 mannetjes *R. sanguineus* teken afkomstig van een zwerfdier. Slechts 3 teken (~1,2%) was positief op *E. canis*. 3 teken (~1,2%) op *E/A* catch-all en 1 teek (0,4%) op de *T/B* catch-all. Meer mannetjes dan vrouwtjes teken van Aruba testte positief op een pathogeen.  $5/98 = 5,1\%$  van de mannetjes en  $2/140 = 1,4\%$  van de vrouwtjes.

#### Bloedsamples:

De bloedsamples gaven meer positieve resultaten op de RLB. Van de 103 bloedsamples waren er 22 positief (21%), waaronder 6,8% op *E.canis* en bijna 13% van het totaal aantal bloedsamples op *B. vogeli*. Daarnaast was 1 van de 103 bloedsamples positief op *E/A* catch-all en er was 1 co-infectie gevonden (sample 31B, te zien op membrane ML3 – 25-03-2011 in de bijlage)

Bij de bloedsamples die positief waren op *B. vogeli* zaten vier bloedsamples die waren afgenomen na een therapie met doxycycline. Drie van de vier waren ook bij de eerste bloedafname positief, maar één was pas bij de tweede bloedafname positief. Ook was er één bloedsample die voor de therapie met doxycycline positief was op *B. vogeli* en na de therapie negatief was (sample D46B).

De gevonden prevalenties met behulp van de RLBs staan hieronder vermeld in tabel 7.

Tabel 7. Prevalentie van de gevonden tekengebonden pathogenen

	DNA bloedsamples honden Curaçao n/103 (%)	Teken Curaçao n/82 (%)	Teken Aruba n/248 (%)
<i>E. canis</i>	7/103 (~6,8%)	-	3/248 (~1,2%)
<i>B. vogeli</i>	13/103 (~12,6%)	-	-
<i>E/A</i> catch-all	1/103 (~1%)	-	3/248 (~1,2%)
<i>T/B</i> catch-all	-	-	1/248 (~0,4%)
<i>E. canis</i> & <i>B. vogeli</i>	1/103 (~1%)	-	-

### 5.5. DNA extractie, PCR en RLB; *R. sanguineus* batch Zuid-Afrika

Van de *R. sanguineus* batch, zijn allereerst 30 individuele *R. sanguineus* teken onderzocht op de aanwezigheid van *B. vogeli*. Verdeling hiervan was 15♀ en 15♂. Geen van deze teken waren positief. Vervolgens is besloten pools te maken met vijf teken per pool. Elke pool bevat enkel mannetjes of enkel vrouwtjes *R. sanguineus* teken. In totaal zijn er 28 pools onderzocht, dus een totaal van 140 teken (70♀ en 70♂). Resultaat van het membraan is in de bijlage toegevoegd (Membrane ML3 – 14-04-2011). Negen pools waren positief op *B. vogeli*; zes mannelijke pools en drie vrouwelijke pools. Dit geeft een prevalentie in deze tweede batch van op zijn minst  $9/140 = 6,4\%$  wanneer er slechts één enkele teek uit elke pool positief was, maar in een pool kunnen natuurlijk ook meerdere positieve teken zitten. Zouden alle teken in een pool positief zijn, dan geeft dat een percentage van  $45/140 = 32,1\%$ . Meer mannetjes dan vrouwtjes testte positief.:  $6/70 = 8,6\%$  van de mannetjes en  $3/70 = 4,3\%$  van de vrouwtjes.

### 5.6. DNA extractie, PCR en RLB; *R. sanguineus* teken uit Nederland

4 *R. sanguineus* teken zijn onderzocht (1♀ en 3♂). Uitslag van de RLB was negatief. Zie bijlage, membrane ML3 – 14-04-2011.



## **6. Discussie**

### Teken

Alle gevonden teken afkomstig uit Aruba en Curaçao waren *Rhipicephalus sanguineus* teken. Dit is geen onverwachte bevinding. Ook in andere onderzoeksverslagen kwam duidelijk naar voren dat *R. sanguineus* de enige tekenssoort is die daar wordt gevonden [van Straaten, 2008; Klarenbeek, 2010, Vugteveen, 2010; Moreta, 2009].

### Stadia/geslacht

Het grootste deel van de verzamelde teken zijn volwassen teken. Man/vrouw ratio is in dit onderzoek voor het totaal: 53,5%-46,5%. Het gegeven dat er meer mannetjes dan vrouwtjes gevonden worden, is vergelijkbaar met wat er in eerdere studies is gevonden [Van Straaten, 2008; Klarenbeek 2010]. De teken die at random zijn uitgezocht om verder te onderzoeken middels DNA extractie, PCR en RLB hebben een iets andere geslachtsverhouding. Meer vrouwtjes teken dan mannetjes teken zijn uit de buisjes gehaald, dit kan misschien te verklaren zijn doordat vrouwtjes vaak wat groter waren, doordat ze volgezogen waren.

### Resultaten teken en bloed uit Aruba en Curaçao

Van alle honden afkomstig uit Aruba die getest waren met behulp van een Idexx<sup>®</sup> 4Dx<sup>®</sup> snaptest, testte er 61% positief voor *E. canis* [Vugteveen, 2010], wat hoger dan vergelijkbare onderzoeken van van Straaten en Moreta, waarin percentages van 58% en 47% werden gevonden. Zeker omdat de honden van dit onderzoek at random waren uitgekozen. In dit onderzoek waren slechts 3 van de 248 teken van Aruba positief op *E. canis*, dit is ~1,2%. De hoge serologische uitkomst (61%) kan komen doordat *E. canis* titers nog gedurende lange tijd, tot 16 maanden, hoog kunnen blijven, terwijl het organisme al uit het lichaam is opgeruimd [Neer et al, 2002]. Vandaar dat er niet een heel hoge infectiegraad van de teken hoeft te zijn. Aangezien er wel enkele samples positief zijn, zou het niet aan de labtechnieken (zoals DNA-extractie) moeten liggen. Bovendien zijn dezelfde lab protocollen op het UCTD al vaak en succesvol uitgevoerd.

Daarnaast testte 27% van alle honden die getest waren met behulp van een Idexx<sup>®</sup> 4Dx<sup>®</sup> snaptest positief op *A. phagocytophilum* [Vugteveen, 2010] Aangezien de vector (*Ixodes* spp) niet op Aruba voorkomt, was het de vraag of het een kruisreactie met *A. platys* was of dat *R. sanguineus* toch mogelijk een vectorrol speelt bij de transmissie van *A. phagocytophilum* [Vugteveen, 2010] In dit onderzoek testten geen van de teken positief op *A. phagocytophilum*. Een kruisreactie lijkt inderdaad de meest logische verklaring.

Van alle teken afkomstig uit Curaçao is er geen enkele die positief was op *E. canis*. Laat staan op een ander pathogeen. Het kan natuurlijk gewoon zijn dat deze teken vrij zijn van pathogenen. Echter zijn de teken van Curaçao getest op het oude membraan JB 1.1. en dit membraan gaf wat inconsequente en mindere resultaten. De teken T4B en T11B waren op het oude membraan JB 1.1 positief op T/B catch-all, maar op het nieuwe ML3 membraan waren ze negatief. Dit was ook het geval met een bloedsample D16A; op het oude membraan kwam er een *Babesia* en *Theileria/Babesia* catch-all uit en op het nieuwe membraan *E. canis*. Bovendien waren de *Ehrlichia* primers die bij de teken van Curaçao gebruikt werden niet zo goed werkzaam. Bij de teken uit Aruba zijn er nieuwe RLB primers gebruikt en functioneerde alles naar behoren.

Van de 7 positief geteste teken uit Aruba, waren er 3 positief op *E.canis*, 3 positief op enkel de E/A catch-all en 1 op de T/B catch-all. Er is bekend van de *R. sanguineus* teek dat deze ook een rol kan spelen bij de transmissie van het pathogeen *A. platys*. Er zat geen *A. platys* probe op het RLB membraan, dus er is verder onderzoek naar nodig of de dit *A. platys* kan zijn door middel van sequencing of hertesten van het DNA sample op een membraan waar wel een *A. platys* probe op zit. De positieve T/B catch-all wijst naar de aanwezigheid van een nog niet nader gespecificeerde *Theileria*. Dit gegeven zou ook verder onderzocht moeten worden, doormiddel van sequencing.

Dit is het eerste onderzoek waar de aanwezigheid van *B. vogeli* in bloed van honden uit Curaçao wordt bevestigd. Voorheen was deze protozoaire parasiet nog niet ontdekt op Curaçao [Schoeman, 2009]. Wel al op Aruba met een prevalentie van 12,8% [Moreta, 2009] Dit is vergelijkbaar met wat in dit onderzoek is gevonden. Daarnaast is *B. vogeli* nog in meerdere onderzoeken bij honden gevonden en overgedragen door *R. sanguineus*: in 2004 is *B. vogeli* bij 13 honden voor het eerst in Zuid-Afrika ontdekt 13 van de 297 bloedsamples waren hier positief op *B. vogeli*, dit geeft een prevalentie van 4,4% [Matjila et al, 2004]. In 2004 werd ook voor het eerst *B. vogeli* in honden uit Brazilië bevestigd [Passos et al, 2004] In Grenada werd er een prevalentie van  $5/73 = 7\%$  gevonden [Yabsley et al, 2008].

Wat wel ter discussie staat, is het feit dat er relatief weinig *E. canis* positieve bloedmonsters zijn gevonden (6,8%), aangezien alle honden uit Curaçao verdacht waren ehrlichiose te hebben. Onderzoek in Grenada gaf een prevalentie van 24,7%, een veel hoger percentage *E. canis* positieve honden [Yabsley et al, 2008]. Een negatief bloedsample resultaat wilt echter niet zeggen dat de hond niet geïnfecteerd is. Uit onderzoek is gebleken dat een milt een sensitiever orgaan is om *E. canis* infectie in te detecteren dan het detecteren van *E. canis* infectie in bloed. 4 van de 6 honden had een positief PCR resultaat met de milt samples en maar 2 van deze honden had ook een positief resultaat met de bloed samples [Harrus et al, 2008] Aangezien de klinische symptomen van babesiose en ehrlichiose op elkaar kunnen lijken, kan dit ook een verklaring zijn voor de lage *E. canis* prevalentie.

10 mei 2011

Tot slot is er ook een co-infectie gevonden met zowel *E. canis* als *B. vogeli* (sample D31B), wat vaker voorkomt [Schoemann, 2009].

#### Resultaten teken Zuid-Afrika

Aangezien deze teken die onderzocht waren op *B. vogeli* afkomstig zijn van een experimentele opzet (van kunstmatig voeden op *B. vogeli* besmet bloed), kan het ook geen verrassing zijn dat er ook daadwerkelijk teken positief testten op *B. vogeli* met behulp van PCR en RLB. Wel was de prevalentie laag, de eerste 30 geteste *R. sanguineus* teken waren allemaal negatief. Prevalentie bij de gepoolde teken was op zijn minst ~6,4%. Dit zou wat hoger kunnen uitvallen, want een pool bestaat uit 5 teken en er kunnen er meer dan 1 positief zijn. Wanneer alle teken in de pools positief zouden zijn, zou dat een prevalentie geven van  $45/140 = \sim 32,1\%$ .

#### Resultaten teken Nederland

De vier teken vanuit Nederland zijn allen negatief. Dit is een logische bevinding, aangezien het aantal onderzochte teken uit Nederland heel laag is en de prevalentie bij de vele onderzochte teken vanuit het Caribisch gebied ook erg laag is.

## **7. Conclusie**

Alle gevonden teken van Aruba en Curaçao in dit onderzoek, behoren tot de species *R. sanguineus*. Deze teek speelt een zeer belangrijke vectorrol bij de overdracht van vele pathogenen. Relevant voor Aruba en Curaçao is het feit dat *R. sanguineus* ook de pathogenen *E. canis* en *B. vogeli* kan overbrengen, welke ehrlichiose en babesiose veroorzaken. Dit is ook naar voren gekomen in dit onderzoek. De prevalentie van *E. canis* in *R. sanguineus* is zeer laag in dit onderzoek, maar er zijn wel positieve teken gevonden (3 van de 330 onderzochte teken uit het Caribisch gebied). Er is een prevalentie van 1,2% in teken van Aruba gevonden, alle teken van Curaçao waren negatief. Daarnaast is dit het eerste onderzoek waarin de aanwezigheid van een infectie met *B. vogeli* in bloed van ehrlichiose verdachte honden op Curaçao is bevestigd. *B. vogeli* wordt als een milde pathogene ziekteverwekker gezien, maar speelt mogelijk een grotere rol met vergelijkbare symptomen zoals bij CME gezien wordt. Ook is het bestaan van co-infecties van *E. canis* en *B. vogeli* nog eens bevestigd.

## **8. Dankwoord**

Heel graag wil ik de volgende personen bedanken.

Allereerst Prof. Dr F. Jongejan voor het feit dat ik mijn onderzoekstage bij het UCTD kon lopen, voor de begeleiding en zijn enthousiasme voor het vak.

Natuurlijk Michiel Wijnveld voor het uitleggen van alle labwerkzaamheden en hulp.

Drs. Jesse Lenssen voor het determineren van een deel van de teken. Last but not least, uiteraard Drs. Annemarie Conijn, voor haar gezelligheid!

Ik heb het naar mijn zin gehad en heb een hoop labvaardigheden opgedaan, waar ik langzaamaan wat sneller in werd.

## **9. Referenties**

- Anderson J.F., Magnarelli L.A. - Biology of Ticks - Infect Dis Clin N Am 22 (2008) 195–215
- Beugnet F., Marié J-L. – Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe – Veterinary Parasitology 163 (2009) 298-305
- Bodaan C., Nijhof A.M., Postigo M., Nieuwenhuijs H. Opsteegh M., Franssen L., Jebbink F., Jansen en Jongejan F. – Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren in Nederland – Tijdschrift voor Diergeneeskunde, deel 132, Juli, Aflevering 13, 2007
- Bremer W.G., Schaefer J.J., Wagner E.R., Ewing S.A., Rikihisa Y., Needham G.R., Jittapalapong S., Moore D.L., Stich R.W. – Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus* – Veterinary Parasitology 131 (2005) 95-105
- Dantas-Torres F. – The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. – Veterinary Parasitology 152 (2008) 173-185
- Dantes-Torres F. – Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* – Parasites & vectors (2010) 3:26
- Dantas-Torres F, Otranto D - *Rhipicephalus sanguineus* on dogs: relationships between attachment sites and tick developmental stages - Exp Appl Acarol. 2011 Apr; 53(4):389-97.
- Dantas-Torres F, Figueredo LA. – Canine babesiosis: a Brazilian perspective – Vet Parasitol. 2006 Nov 5; 141(3-4):197-203. Epub 2006 Sep 8. Review
- Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. – *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. – Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Jan Feb; 39(1): 64-7. Epub 2006 Feb 23.
- Harrus S., Waner T., Aizenberg I., Foley J.E., Poland A.M., Bark H. – Amplification of Ehrlichial dDNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis* – Journal of clinical Microbiology (Jan 1998) Vol. 36 No. 1 pg 73-76
- Harrus S., Waner T., Bark H., Jongejan F. and Cornelissen A.W. – Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis – *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999), pp. 2745–2749.
- Horak I.G., Camicas J-L., Keirans J.E. – The Argasidae, Ixodidae, and Nuttalliellidae (Acari: ixodida): a world list of valid tick names. – Exp Appl Acarol 2002; 28:27–54.
- Irwin P.J. – Canine babesiosis – Vet Clin North Small Anim Pract. 2010 Nov; 40960: 1141-56. Review
- Jongejan F. – Diergeneeskundig Memorandum 48e jaargang no.1 – 2001 ISSN: 0417-4631
- Jongejan F., Uilenberg G. – The global importance of ticks – Parasitology (2004), 129, S3-S14
- Klaarenbeek M.M. – *Rhipicephalus sanguineus*, *Ehrlichia canis* and current tick control on Curaçao – 2010 Feb.

- Little S.E., Hostetler J. and Kocan K.M. – Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co housed dogs during active feeding – *Vet. Parasitol.* 150 (2007), pp. 139–145.
- Márquez-Jiménez F.J., Hidalgo-Pontiveros A., Contreras-Chova F., Rodríguez-Liévana J.J., Muniain Excurra Á.M. – Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganism in Spain – Publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005; 23:94-102. -vol.23 núm 02]
- Matjila P.T., Penzhorn B.L., Bekeer C.P.J., Nijhof A.M., Jongejan F. – Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa – *Veterinary Parasitology* 122 (2004) 119-125
- Menn B., Lorentz S., Naucke T.J. – Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany – *Parasit Vectors*, 2010 Apr 8; 3:34.
- Moreta V.F. – Examination of the diagnostic and therapeutic effectivity among dogs suspected of an *Ehrlichia canis* infection on the island of Aruba – 2009
- Neer T.M., Breitschwerdt E.B., Greene R.T., Lappin M.R. – Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *American College of Veterinary Internal Medicine.* – *J Vet Intern Med.* 2002 May-Jun; 16(3): 309-15. Review.
- Nelson and Couto – *Small animal internal medicine* – 3<sup>rd</sup> Ed, 2003, Elsevier, ISBN:
- Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P-E., Sotito A., Labauge P., Raoult D. – Warmer weather linked tot tick attack and emergence of severe rickettsioses – *PloS Negl Trop Dis* (2008) 2(11): e338. doi:10.1371/journal.pntd.0000338
- Passos L.M., Geiger S.M. Ribeiro M.F., Pfister K., Zahler-Rinder M. – First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil – *Veterinary Parasitology* 127 (2005) 81- 85
- Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. – Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. – *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct; 1078:110-7.
- Schettlers T.P., Kleuskens J., Carcy B., Gorenflot A., Vermeulen A. - Vaccination against large *Babesia* species from dogs - *Parassitologia.* 2007 May;49 Suppl 1:13-7.
- Schettlers T. – Vaccination against canine babesiosis – *Trends Parasitol.* 2005 Apr;21(4):179-84.
- Socolovschi C, Raoult D, Parola P. – Influence of temperature on the attachment of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on rabbits. – *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 326–327.
- Sonenshine D.E. – *Biology of ticks*, vol. 1. – New York: Oxford University Press; 1991
- Stich R.W., Schaefer J.J., Bremer W.G., Needham G.R., Jittapalapong S. – Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20; 158(4):256-73.

10 mei 2011

- Taoufik A., Nijhof A., Hamidjaja R. and Jongejan F. – Reverse line blot hybridization in the detection of tick-borne diseases. – Bti September 2004
- Vercammen F., De Deken R., Maes L. – Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline – Veterinary Parasitology 66 (1996) 251-255
- Van Straaten G. – A survey of ticks, *Ehrlichia canis* and current control methods on dogs on the island of Aruba – 2008
- Vugteveen, V. – *Ehrlichia canis* infections on the island of Aruba – 2010
- Walker J.B., Keirans J.E. and Horak I.G. – The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world – Cambridge university press (2000), ISBN 0-521-48008-6
- Walker, A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston P.M. – Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species – Copyright: The University of Edinburgh (2003), ISBN 0-9545173-0-X
- Yabsley M.J., McKibben J., Macpherson C.N., Cattan P.F., Cherry N.A., Breitschwerdt E.B., O'Connor T., Chandrashekar R., Paterson T., Perea M.L., Ball G., Friessen S., Goedde J., Henderson B., Sylvester W. – Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada – Veterinary Parasitology 151 (2008) 279-285

## **10.1. Bijlagen – UCTD protocollen**

### **DNA isolatie uit de teek**

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

Zet tevens een waterbad aan op 56°C en een hitteblok op 70°C. Voorverwarm de BE buffer op 70°C. Voor je begint, verwijder de blender delen en was deze in een buis met gedemineraliseerd water, vervolgens in 70% alcohol en hierna weer in gedemineraliseerd water. Droog de onderdelen en zet de blender weer in elkaar. Vul tevens het sonificatie bad met gedemineraliseerd water.

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

**Was de pincet, net zoals bij stap b, na de teek uit het sonificatie bad gehaald te hebben en na het in het epje doen van de gesneden tekenstukjes.**  
**(Ververs om de 5 teken de twee buizen met gedemineraliseerd water en de 70% alcohol)**
7. Voeg 25µl proteinase K toe en vortex. (Proteinase K ligt in de vriezer.)
8. Incubeer vervolgens 1 tot 3 uur bij 56°C. Vortex elk uur. De duur van deze incubatie is afhankelijk van hoe snel de teek afgebroken wordt, maar duurt meestal 3 uur. Epjes kort afdraaien in centrifuge
  - a. Als het hitte blok nog niet aan staat op 70°C, doe dit dan voor het laatste uur incuberen en voorverwarm de BE buffer.
9. Voeg 200µl B3 buffer toe.
10. Incubeer vervolgens 10 tot 15 minuten bij 70°C. Draai de epjes vervolgens kort af in de centrifuge zodat de epjes weer vrij zijn van condensvorming.
11. Voeg 210µl 100% alcohol toe en vortex.
12. Centrifugeer 2 minuten op 11.000 x g.
13. Breng het supernatant over naar een nucleospin kolom en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g . Verwijder de doorgelopen vloeistof. (Voorkom dat stukjes teek, mee genomen worden op de kolom. Label de kolom correct.)
14. Voeg 500µl BW buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.
15. Voeg 600µl B5 buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.
16. Centrifugeer vervolgens nog een keer 1 minuut op 11.000 x g.
17. Plaats de kolom in een nieuwe, steriele, 1,5ml epje. Label dit epje correct. (TeekID + Datum.)
18. Pipetteer vervolgens 100µl voorverwarmde BE buffer direct op het membraan en incubeer gedurende 1 minuut.
19. Centrifugeer 1 minuut op 8.000 x g en vervolgens nog 1 minuut op 11.000 x g.
20. Bewaar het verkregen DNA monster bij -20.

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



10 mei 2011

### **DNA isolatie uit bloed**

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

Zet tevens een hitteblok op 70°C. Voorverwarm de BE buffer op 70°C.

1. Pipetteer tot 200µl bloed en 25µl Proteinase K in een 1,5ml epje. (Proteinase K ligt in de vriezer.)
2. Voeg 200µl B3 buffer toe en vortex goed (10 – 20s)
3. Incubeer de monsters 5 minuten bij kamertemperatuur.
4. Incubeer vervolgens 15 minuten bij 70 op het hitteblok. (De monsters moeten nu bruinig kleuren, is dit niet het geval of wordt er met oud bloed gewerkt dan kan de incubatie verlengt worden tot 30 minuten. Vortex enkele keren goed.)
5. Draai de monsters kort af.
6. Voeg 210µl 96-100% ethanol toe.
7. Vortex de monsters.
8. Breng de monsters over op correct gelabelde Nucleospin kolommen
9. Centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g en verwijder de doorgelopen vloeistof.
10. Voeg 500µl BW buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.
11. Voeg 600µl B5 buffer toe en centrifugeer 1 minuut op 11.000 x g. Verwijder de doorgelopen vloeistof.
12. Centrifugeer vervolgens nog een keer 1 minuut op 11.000 x g.
13. Plaats de kolom in een nieuwe, steriele, 1,5ml epje. Label dit epje correct. (bloedID + Datum.)
14. Pipetteer vervolgens 100µl voorverwarmde BE buffer direct op het membraan en incubeer gedurende 1 minuut.
15. Centrifugeer 1 minuut op 8.000 x g en vervolgens nog 1 minuut op 11.000 x g .
16. Bewaar het verkregen DNA monster bij -20.

10 mei 2011

**PCR ten behoeve van de Reverse Line Blot (RLB) Hybridisatie**

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

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

UNG en de True Start DNA polymerase zijn beide enzymen. Dit houdt in dat ze in glycerol in de vriezer staan en pas op het moment van toevoeging aan de mastermix, uit de vriezer behoren te worden gehaald. Let bij het pipetteren van de enzymen er op dat je pipetpunt niet in de vloeistof gaat maar net het oppervlak aanraakt. (Glycerol is erg stroperig en door zo te pipetteren wordt voorkomen dat er druppels aan de pipettip vormen en hierdoor teveel enzymen worden toegevoegd.)

RLB-PCR (Fermentas True Start polymerase)

Volledige Mix voor 1 reactie:

15,025ul	H2O
2,5 µl	10x True Start buffer, thaw & vortex before use
2,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> , thaw & vortex before use
0,1 µl	UNG
0.5 µl	F primer (20 pmol/ul)
0.5 µl	R primer (20 pmol/ul)
1,25 µl	dNTP/UTP mix
0.125 µl	True Start polymerase (5u/ul)
y µl (meestal 2,5ul)	cDNA or DNA

Eind volume per PCR reactie: 25 µl

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

10 mei 2011

### Agarose gel electroforese

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

PCR product voorbereiden op de electroforese

Pipetteer 1µl 6x loadingbuffer in een 0,2ml epje of in een welletje van een 96 wells plaat.

Voeg hier 5 µl PCR product aan toe.

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

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

Run vervolgens de gel gedurende 30-45 minuten.

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

**Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie**

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

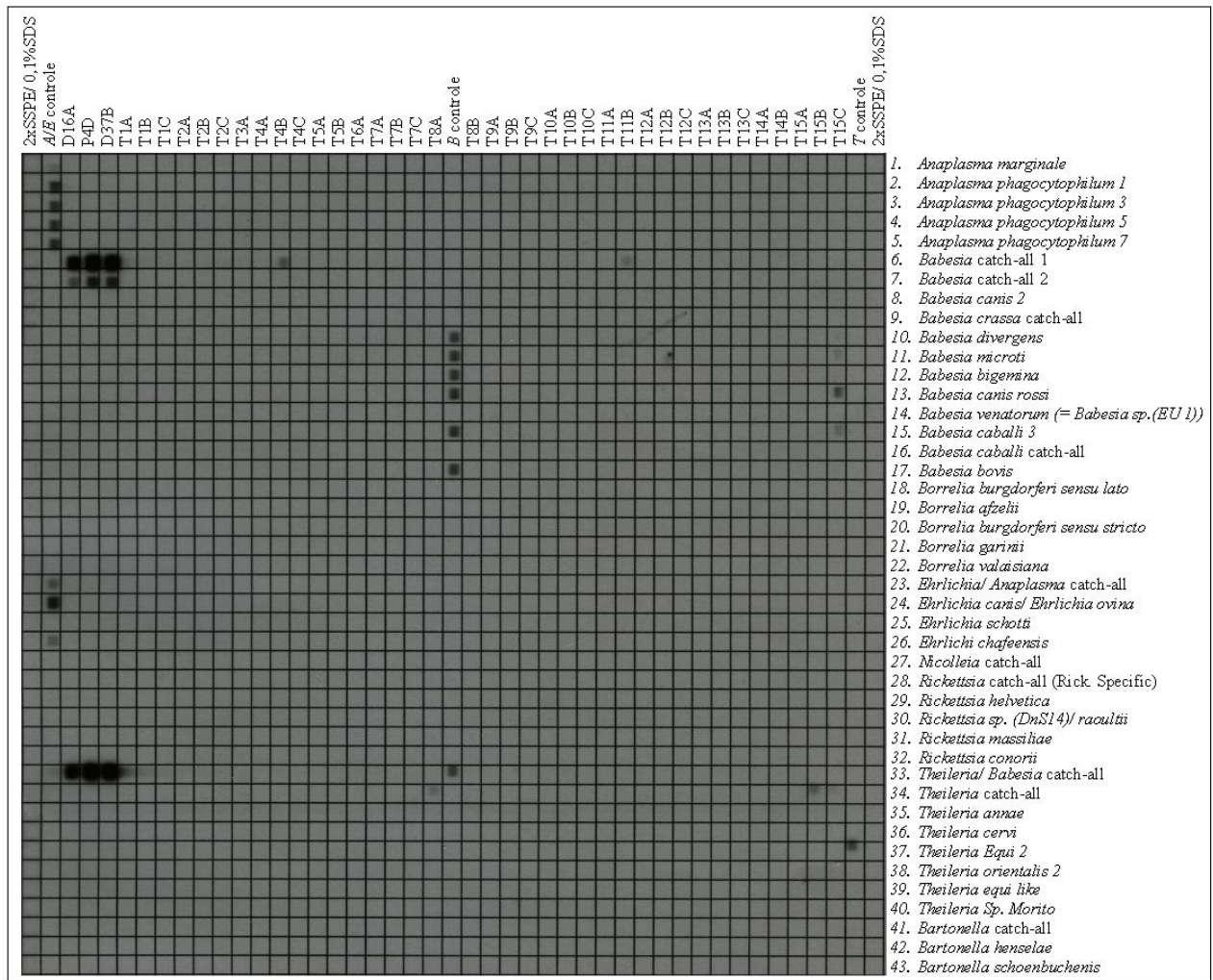
1. Combineer en verdun de verkregen PCR producten in een 1,5 epje. Neem van elk PCR product 10  $\mu$ l en vul dit aan tot een totaal volume van 160  $\mu$ l met 2x SSPE/0,1% SDS. (B.V. 10  $\mu$ l Anaplasma/Ehrlichia PCR + 10  $\mu$ l Babesia/Theileria PCR + 140  $\mu$ l 2x SSPE/0,1%SDS. De verdunning van de PCR producten kan ook de dag voor de RLB gedaan worden, de verdunde monsters kunnen vervolgens bewaard worden in de koude kamer.)
2. Denatureer de verdunde PCR producten gedurende 10 minuten bij 100°C op een heating block en koel vervolgens de epjes meteen op ijs. Centrifugeer, short spin, de epjes kort nadat ze zijn afgekoeld.
3. Incubeer tijdens de denaturatie van de PCR producten het RLB membraan gedurende 5 minuten in  $\pm$ 100ml 2x SSPE/0,1%SDS bij kamertemperatuur onder zacht schudden.
4. Plaats het membraan op een ondersteunend kussen in de miniblotter, met de sloten van de miniblotter haaks op de aangebrachte probes op het membraan.
5. Verwijder de buffer uit de sloten van de miniblotter met behulp van vacuüm.
6. Pipetteer vervolgens de PCR verdunde producten in de sloten. (De sloten kunnen 150  $\mu$ l bevatten dus je houdt 10  $\mu$ l van de 160  $\mu$ l over. Deze overmaat is zodat de gehele slot gevuld kan worden ZONDER luchtbellens. Wanneer luchtbellens ontstaan, zuig met behulp van de pipet het monster weer op en pipetteer opnieuw tot dat er geen luchtbellens meer in de slot aanwezig zijn.)
7. Laat de PCR producten gedurende 60 minuten hybridiseren bij 42°C in de stoof zonder te schudden.
8. Zet alvast 30ml 2x SSPE/0,5%SDS in een tube in de stoof bij 42°C om op temperatuur te komen.
9. Verwijder de monsters met behulp van vacuüm.
10. Was het membraan 2x met  $\pm$ 100ml voorverwarmde 2x SSPE/0,5% SDS gedurende 10 minuten bij 50°C onder rustig schudden in het waterbad.
11. Incubeer het membraan met 30 ml 2x SSPE/0,5% SDS + 5  $\mu$ l streptavidine gedurende 30 minuten bij 42 in de stoof onder rustig schudden. Zet het waterbad op alvast op 42°C met de 2x SSPE/0,5%SDS zodat beide op de juiste temperatuur komen.
12. Was het membraan 2x met  $\pm$ 100ml 2x SSPE/0,5% SDS gedurende 10 minuten bij 42°C onder rustig schudden.
13. Was het membraan 2x met  $\pm$ 100ml 2x SSPE gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur onder rustig schudden.
14. Verwijder de 2x SSPE.
15. Spreid 10ml ECL (5ml ECL1 + 5ml ECL2, koude kamer) over het membraan door met de hand de bak heen en weer te bewegen tot het volledige membraan bedekt is met ECL.
16. Plaats het membraan tussen 2 overhead sheets of tussen keuken folie, voorkom luchtbellens.
17. Plaats het membraan in de foto cassette.
18. Ga naar de donkere kamer op de 5<sup>e</sup> verdieping en plaats de x-ray film op het membraan. (Markeer hoeken zodat het uiteindelijk makkelijker oriënteren is.)
19. Belicht de x-ray gedurende 10 minuten.
20. Ontwikkel de foto met behulp van het ontwikkelingsapparaat.

**RLB membraan strippen**

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

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

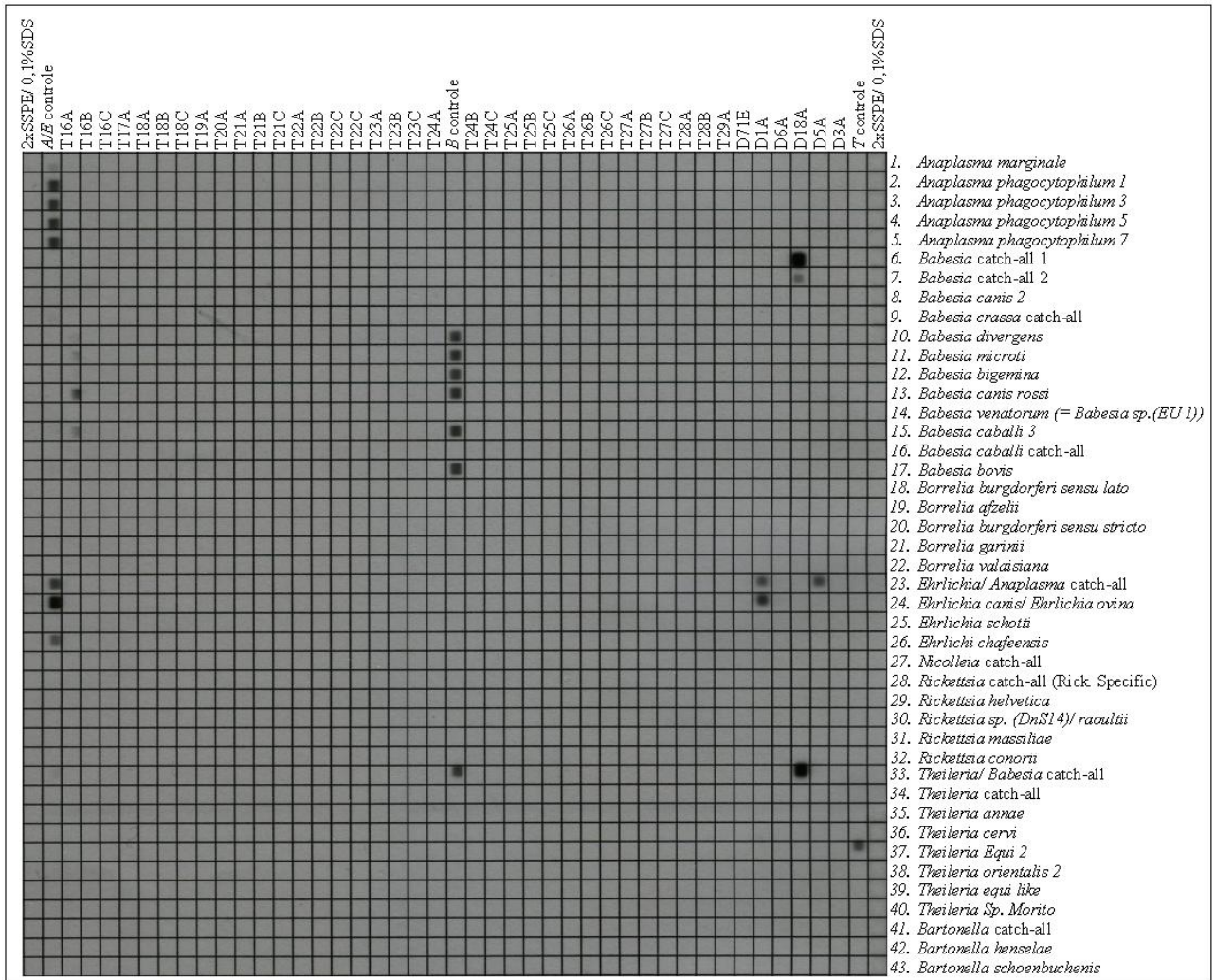
10 mei 2011

**10.2. Bijlagen – RLBs****RLB: membrane JB1.1 – 08-02-2011**

3 DNA bloed samples (D=dog, P=pup) en 37 DNA teken samples (T=tick) op bovenstaande membrane JB 1.1

10 mei 2011

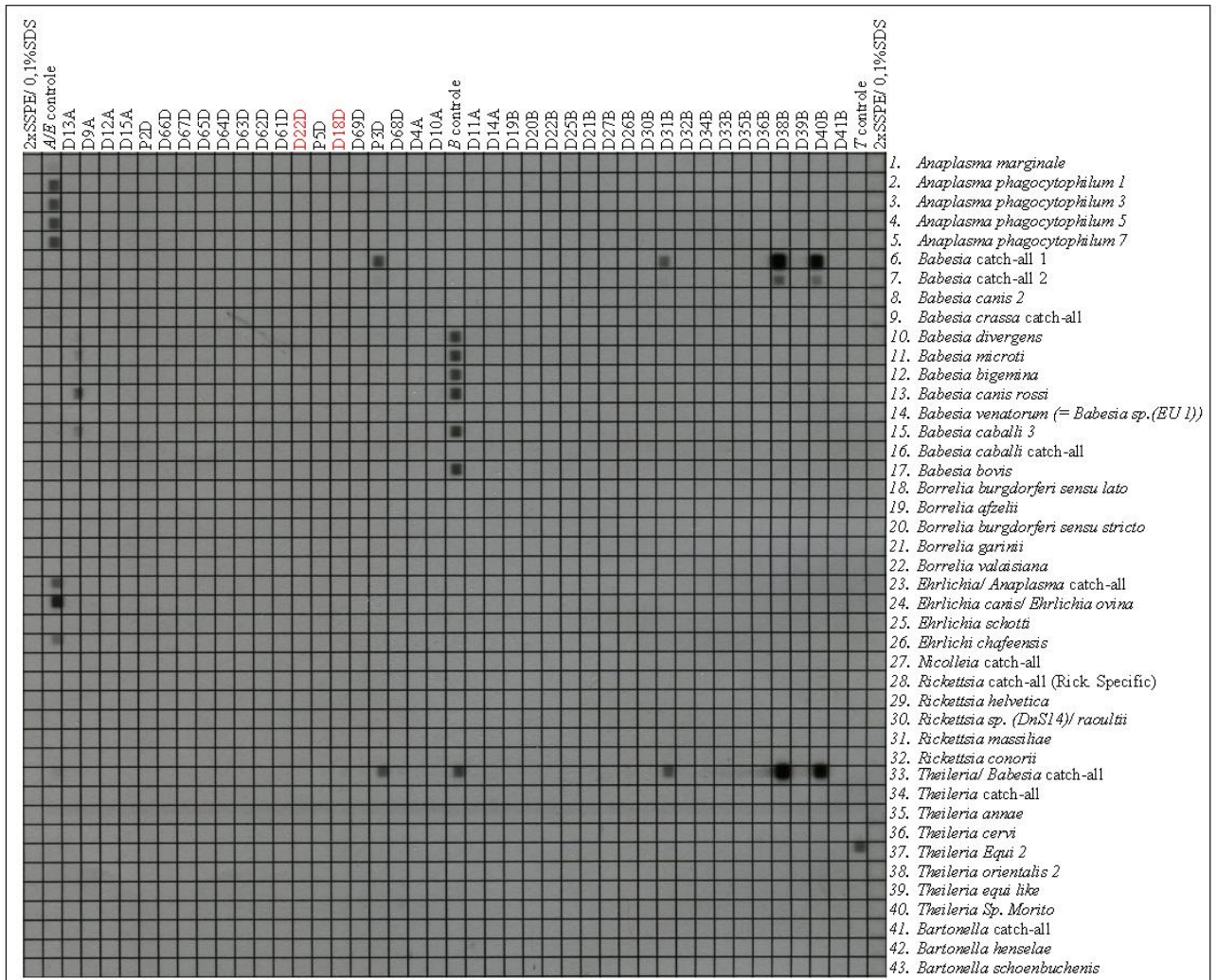
RLB: membrane JB1.1 – 10-02-2011



34 DNA teken samples (T=tick) en 6 DNA bloed samples (D=dog) afkomstig uit Curaçao

10 mei 2011

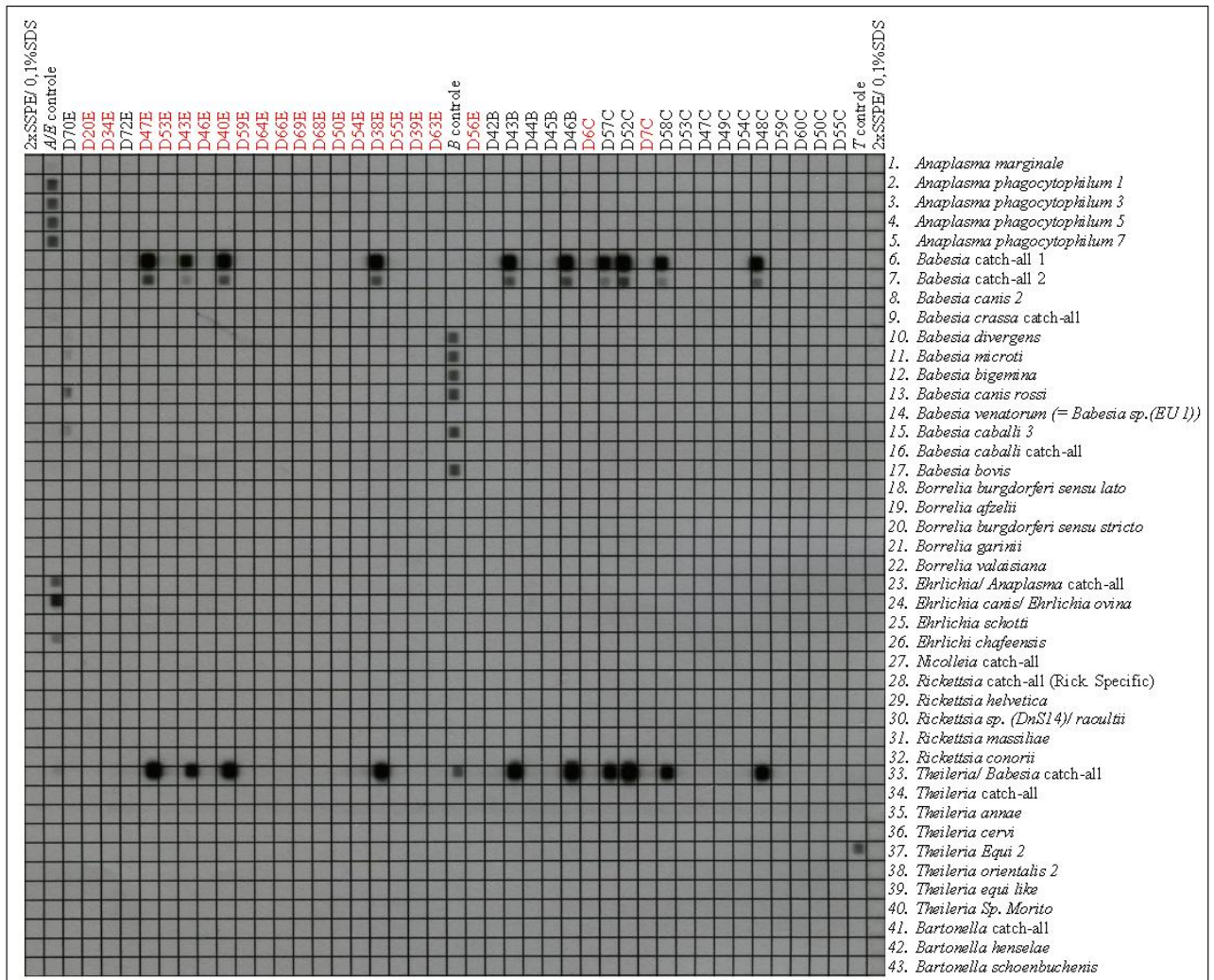
## RLB: membrane JB1.1 – 11-02-2011



40 DNA bloed samples (D=dog, P=pup) afkomstig van honden van de klinieken uit Curaçao. In het rood staan de samples die zijn verkregen na een 2<sup>e</sup> bloedafname van honden van de klinieken op Curaçao, ongeveer 3 weken na de start van een therapie met doxycycline

10 mei 2011

## RLB: membrane JB1.1 – 15-02-2011

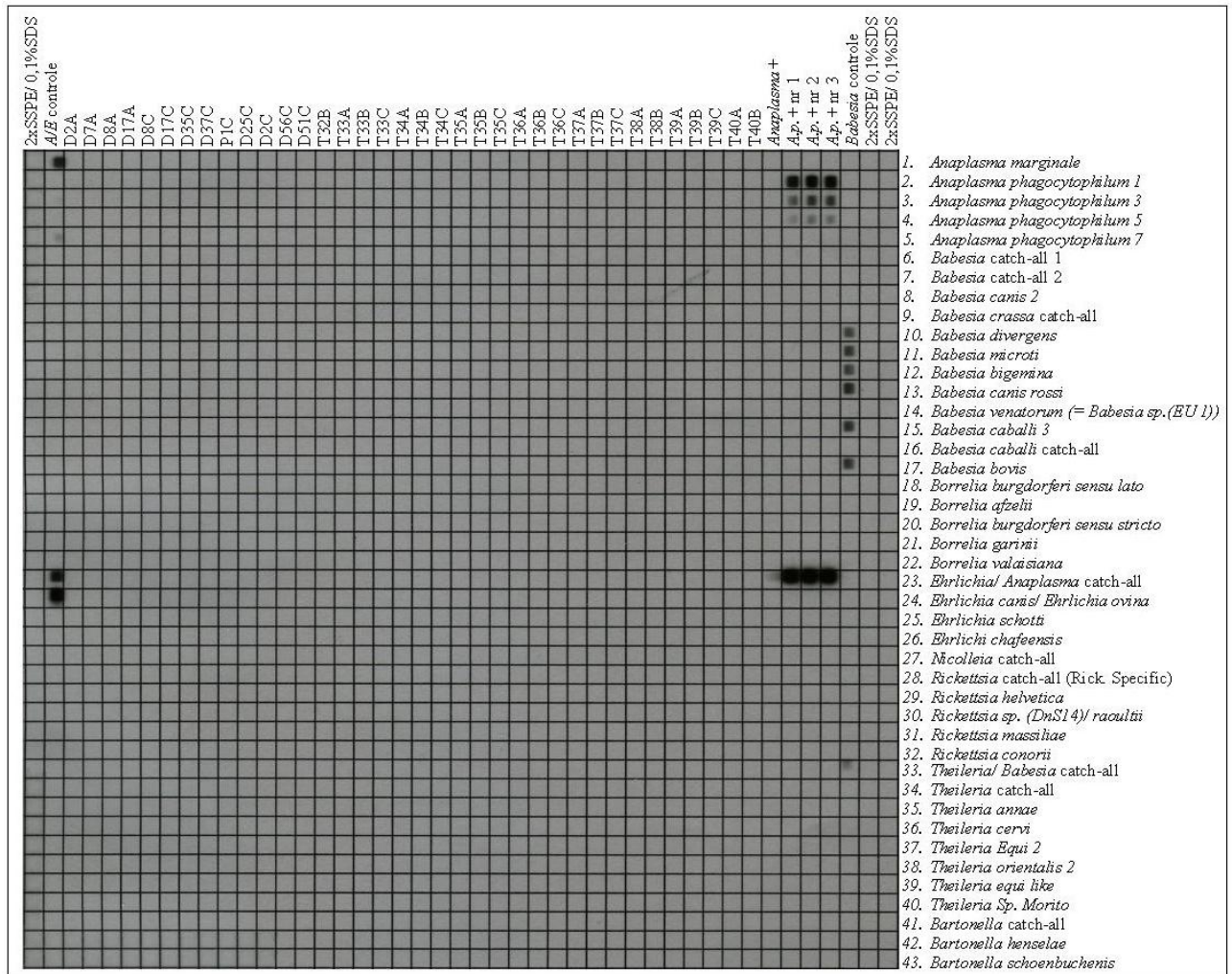


40 DNA bloed samples (D=dog) afkomstig van honden van de klinieken uit Curaçao. In het rood staan de samples die zijn verkregen na een 2<sup>e</sup> bloedafname van honden van de klinieken op Curaçao, ongeveer 3 weken na de start van een therapie met doxycycline



10 mei 2011

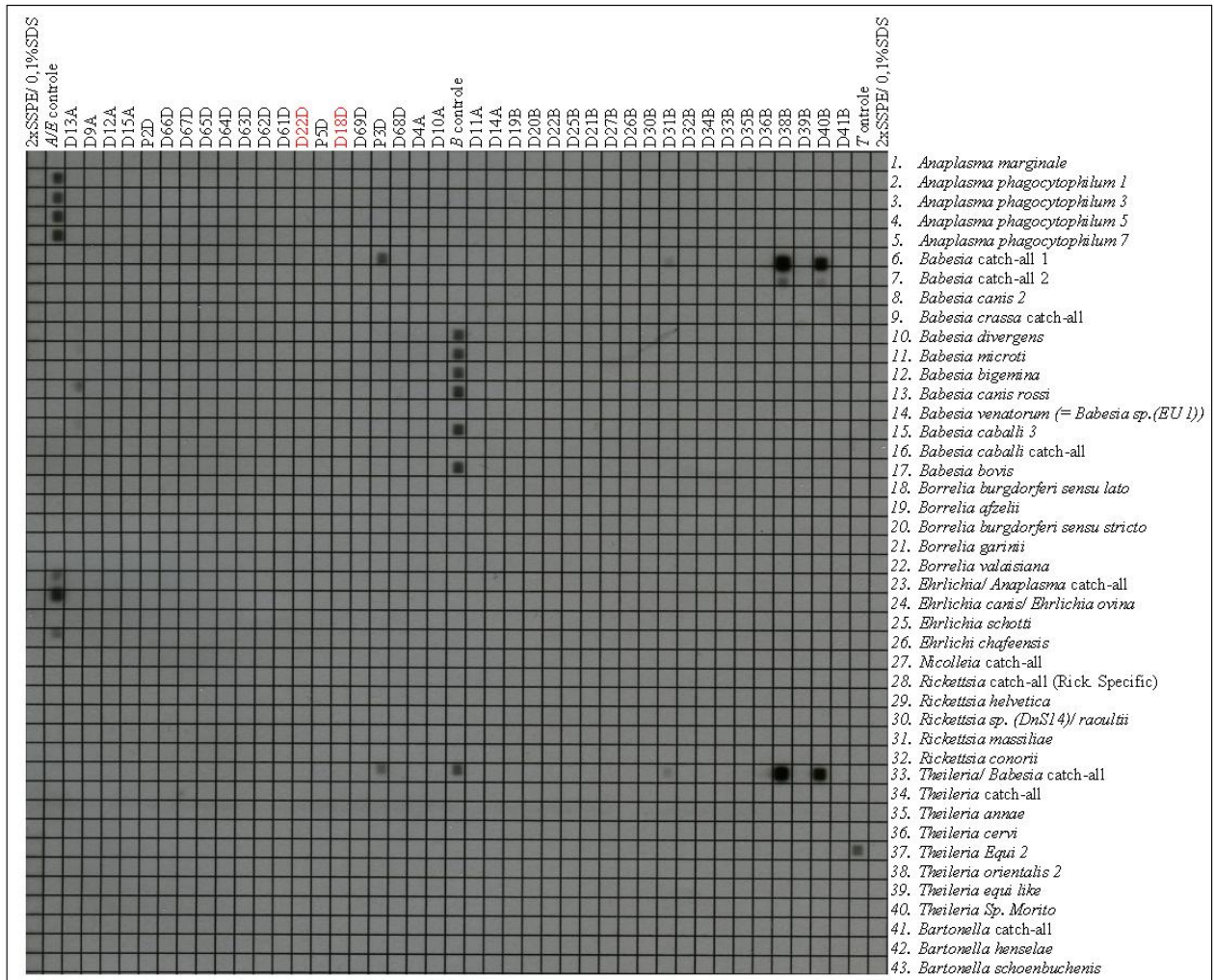
## RLB: membrane JB1.1 – 24-02-2011



Eerste 13 aangebrachte samples zijn DNA bloedsamples (D=dog, P= pup) afkomstig van honden van de klinieken uit Curaçao. Daarnaast 4 DNA teken samples (T=tick, T32B t/m T33C) afkomstig van de honden uit Curaçao. De overige aangebrachte samples (T34A t/m T40B) zijn DNA teken samples afkomstig van honden uit Aruba. Tot slot zijn er 4 positieve Anaplasma controles aangebracht, waarvan de 1<sup>e</sup> niet zichtbaar is. De andere met andere primers, of polymerase zijn wel duidelijk positief

10 mei 2011

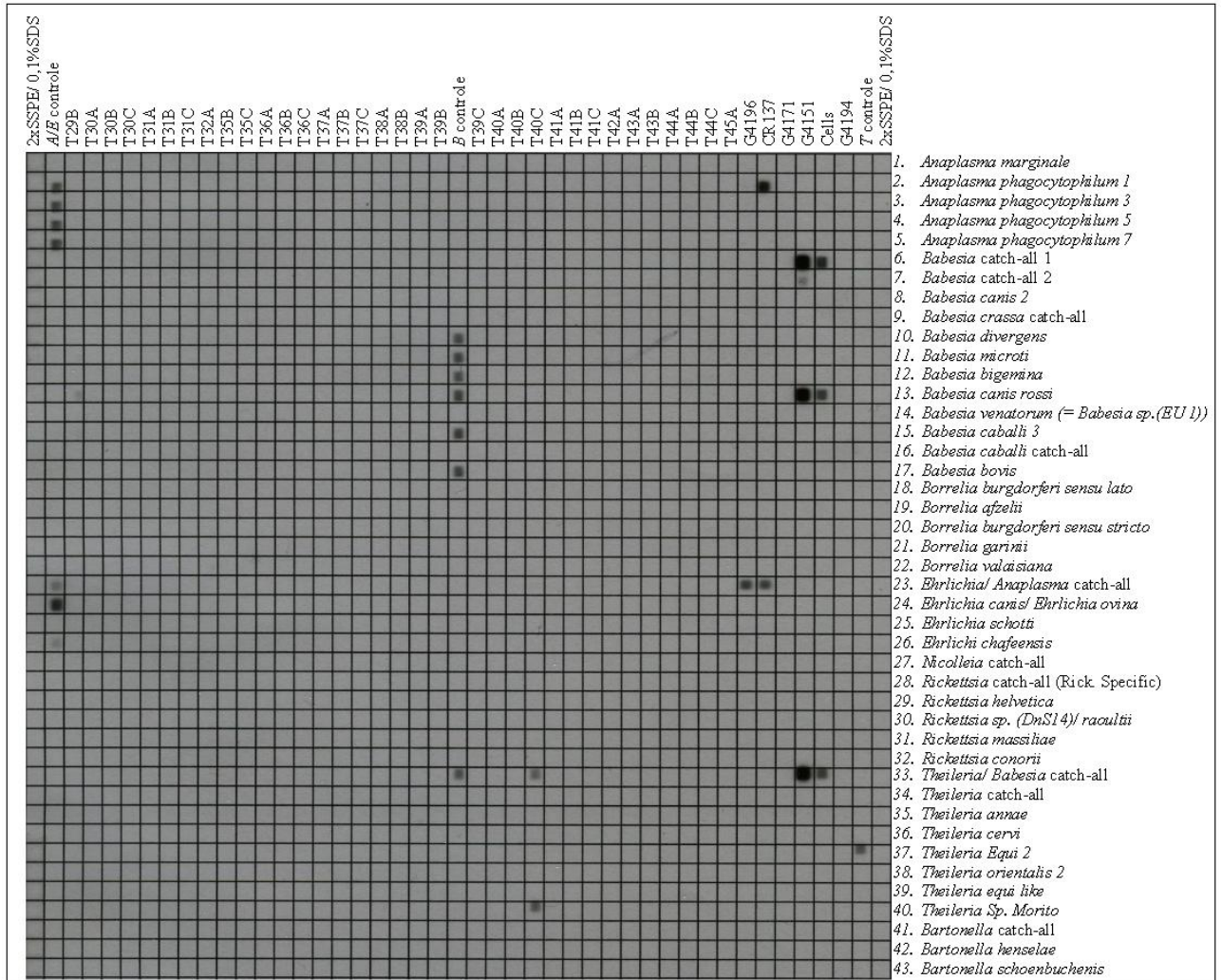
RLB: membrane JB1.1 – 02-03-2011



Dezelfde samples als RLB 11-02-2011 JB1.1, dit maal met andere Ehrlichia primers.

10 mei 2011

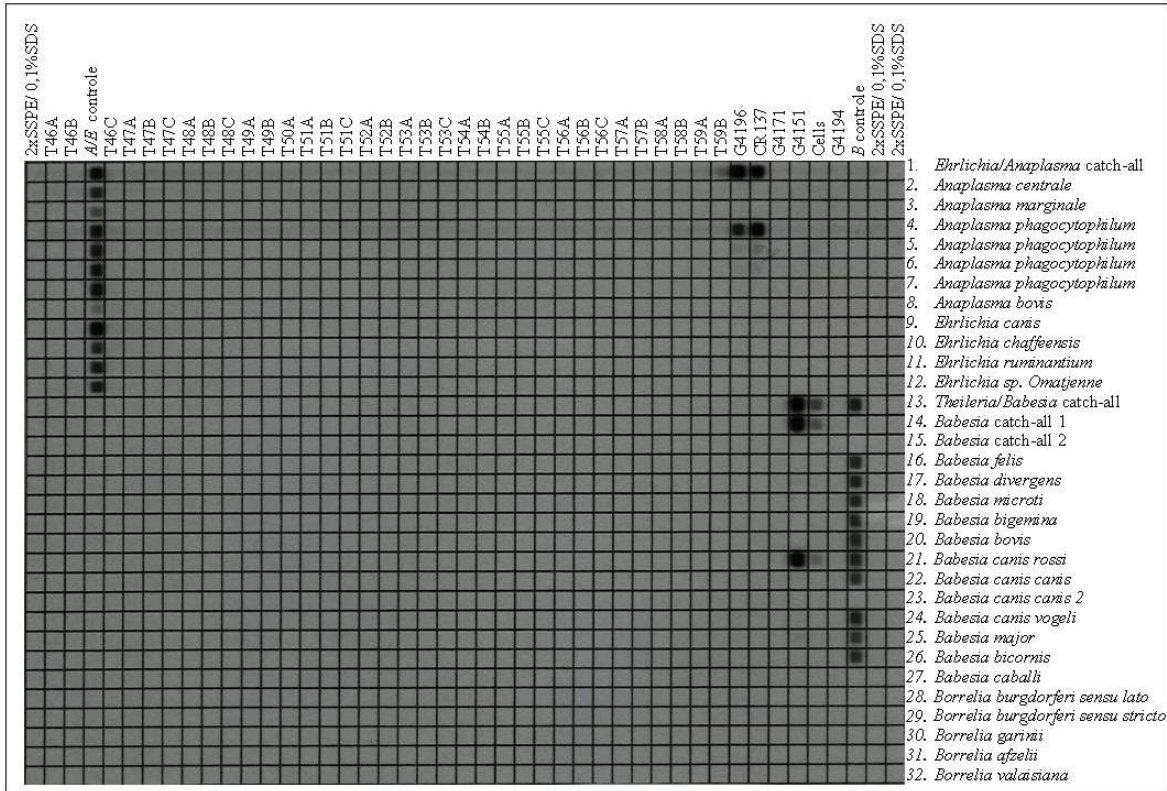
## RLB: membrane JB1.1 – 07-03-2011



Samples T29B t/m T32A afkomstig van teken van honden uit Curaçao. Overige teken samples T35B t/m T45A afkomstig van teken van honden uit Aruba. Laatste 6 zijn controle samples.

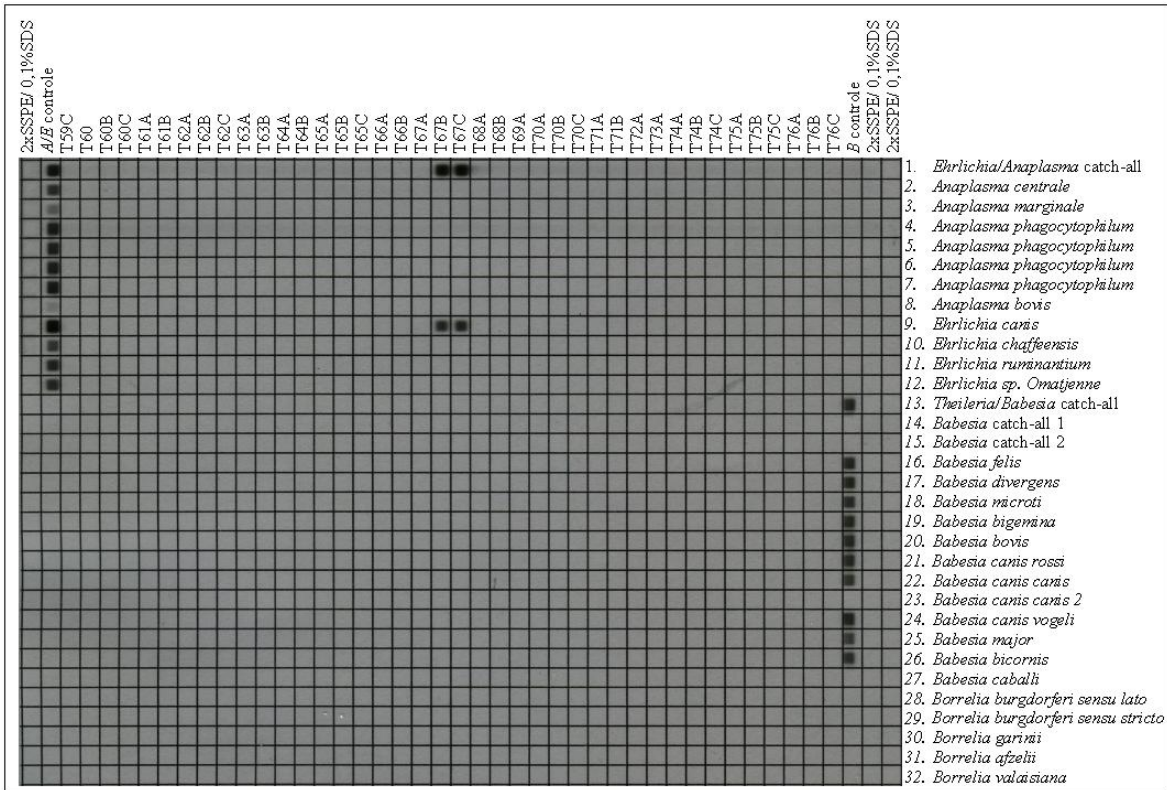
10 mei 2011

**RLB: membrane ML3 – 21-03-2011**



T46A t/m T59B; samples teken van honden uit Aruba en 6 positieve controles op nieuw membraan (ML3)

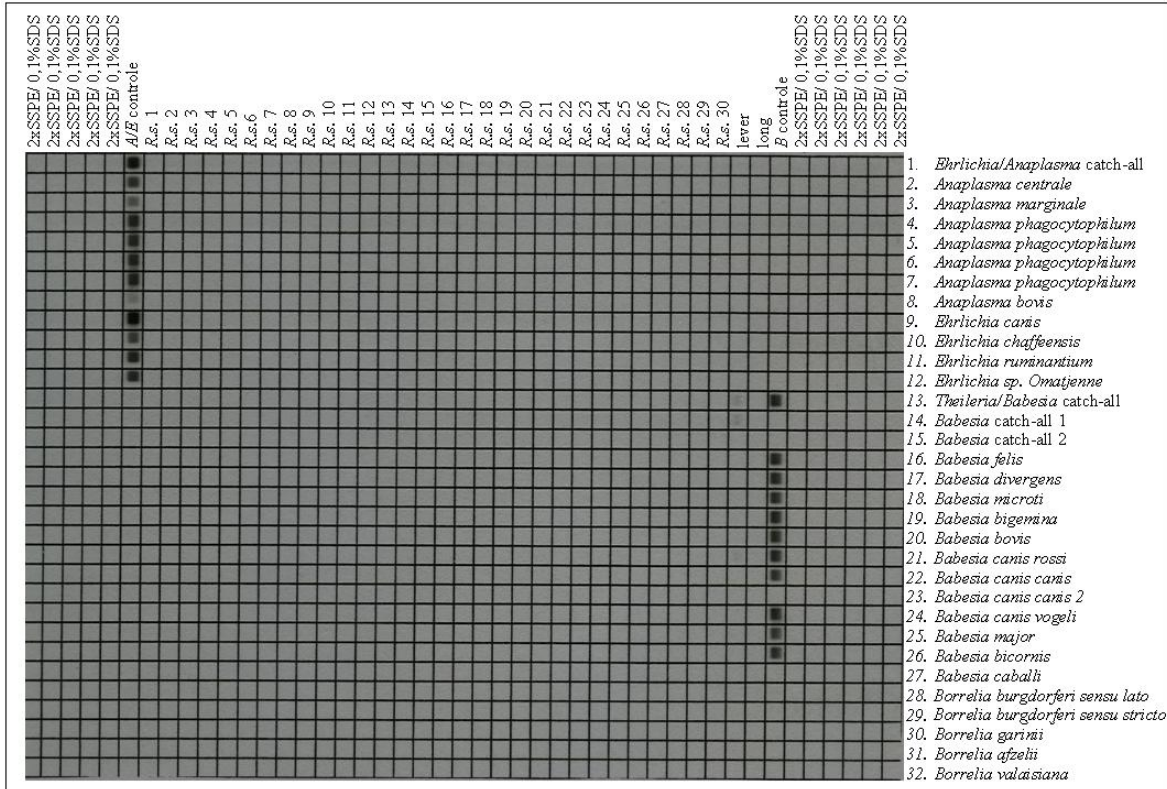
**RLB: membrane ML3 – 22-03-2011**



T59C t/m T76C; samples teken van honden uit Aruba

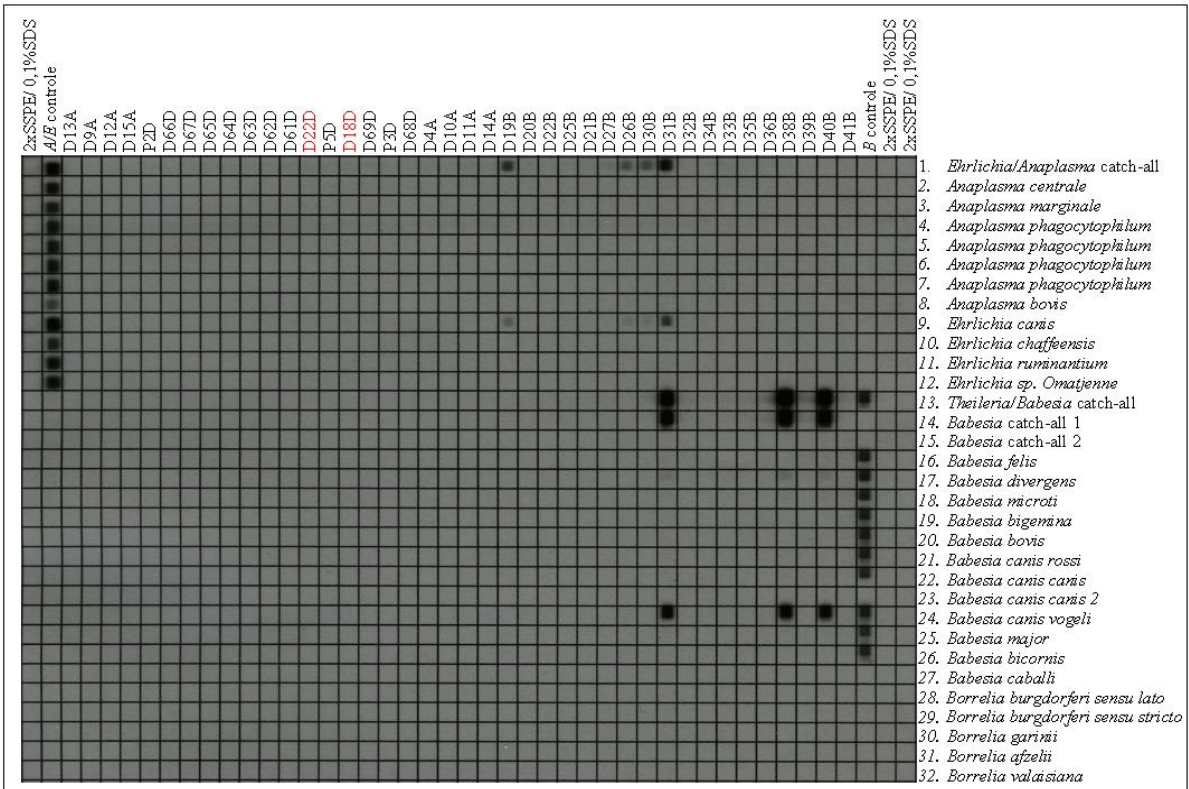
10 mei 2011

RLB: membrane ML3 – 24-03-2011



30 Rhipicephalus sanguineus teken (Zuid-Afrika)

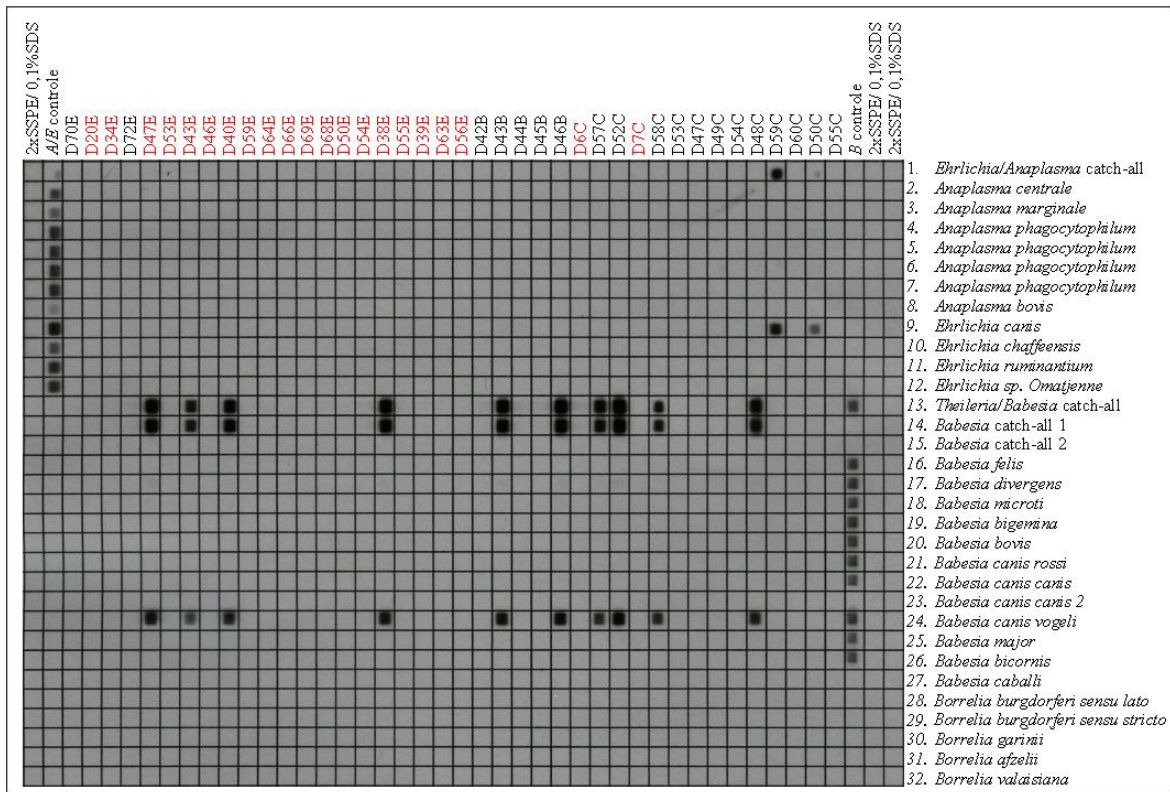
RLB: membrane ML3 – 25-03-2011



Dezelfde samples als RLB 11-02-2011 JB1.1 en RLB 02-03-2011 JB 1.1, maar ditmaal op nieuw membraan

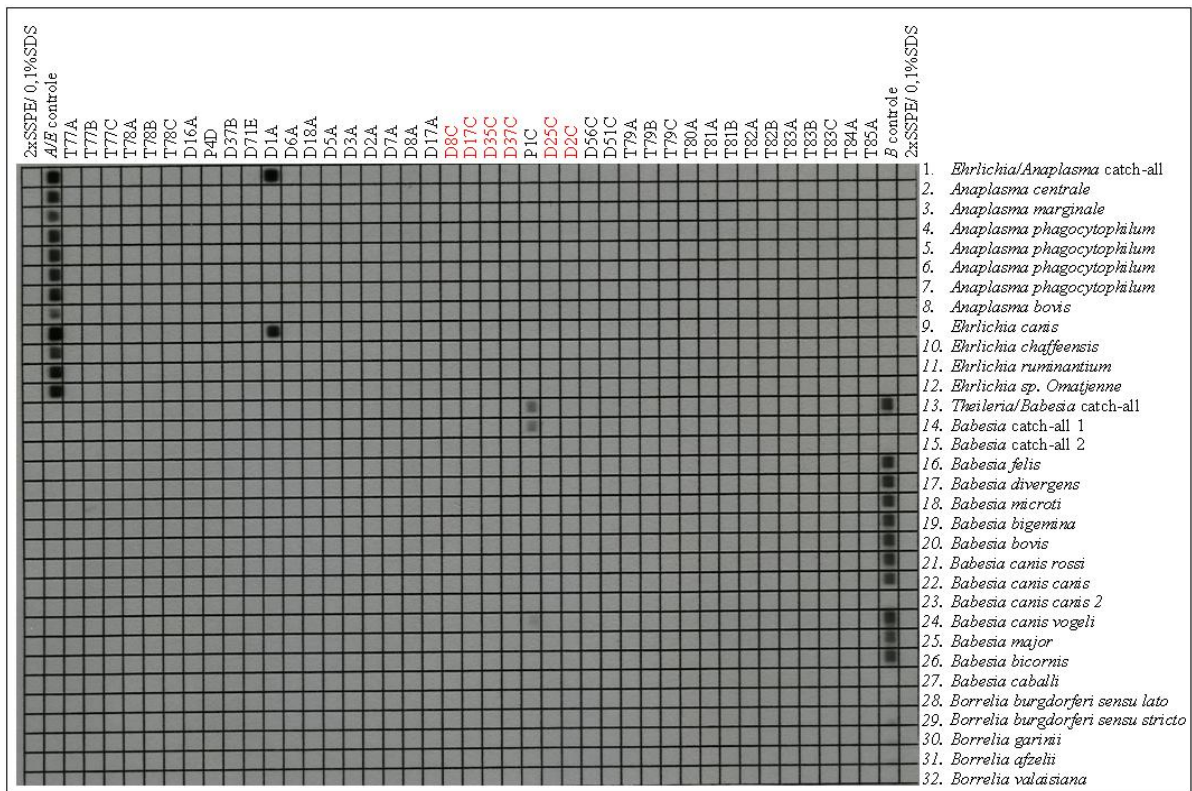
10 mei 2011

**RLB: membrane ML1 – 25-03-2011**



Dezelfde samples als RLB 15-02-2011 JB 1.1, nieuw membraan

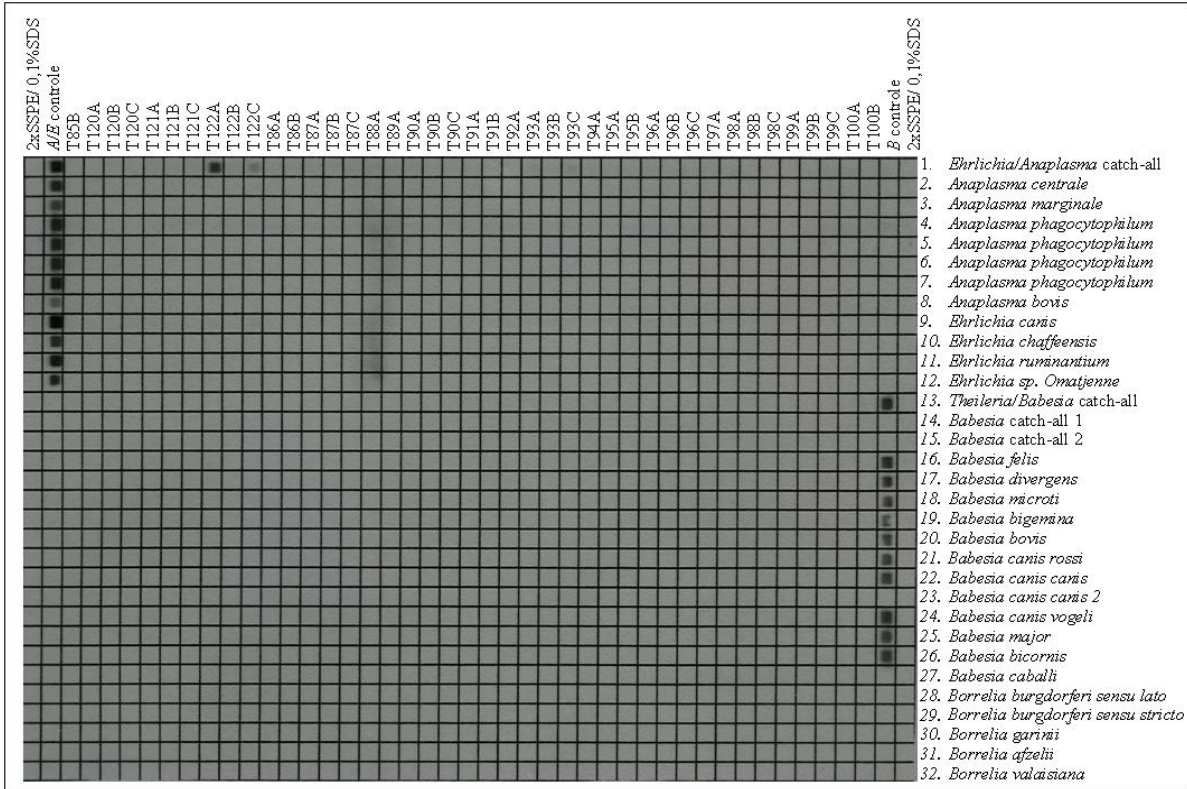
**RLB: membrane ML2 – 01-04-2011**



DNA teken samples Aruba en DNA honden samples Curaçao (in het rood 2<sup>e</sup> bloedafname na therapie met doxycycline)

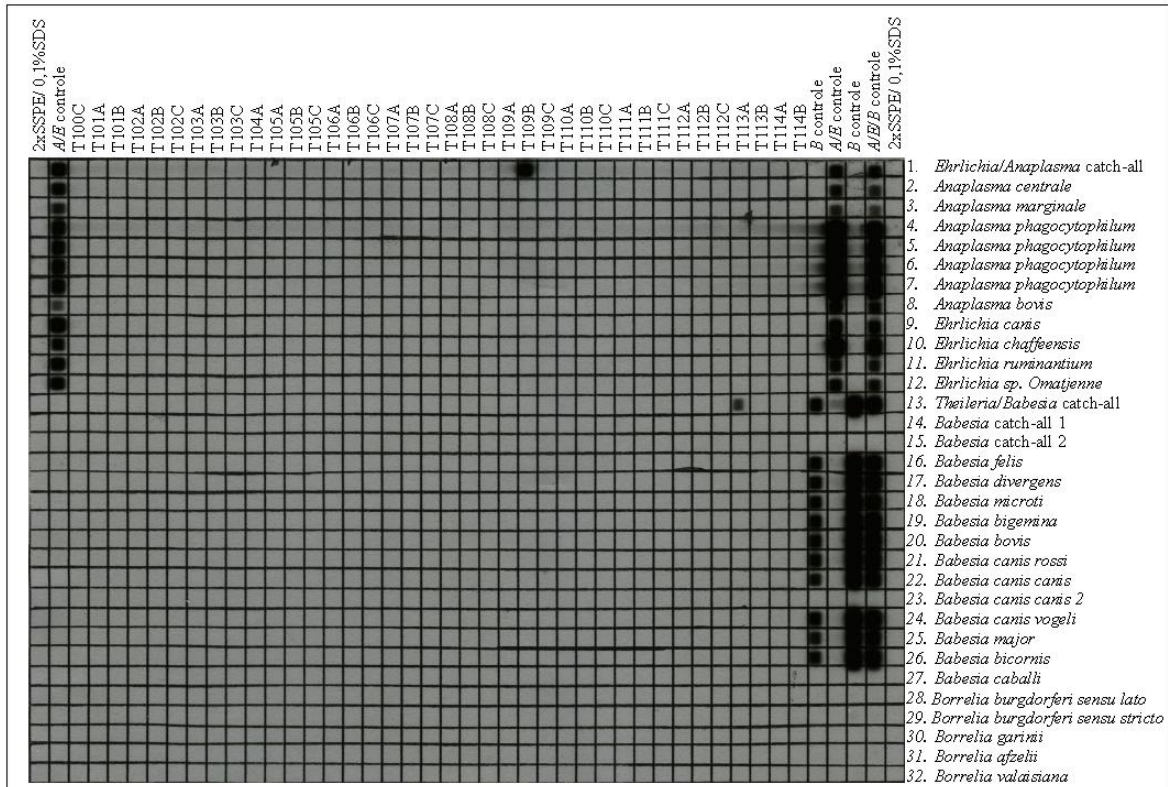
10 mei 2011

**RLB: membrane ML3 – 01-04-2011**



DNA teken samples Aruba

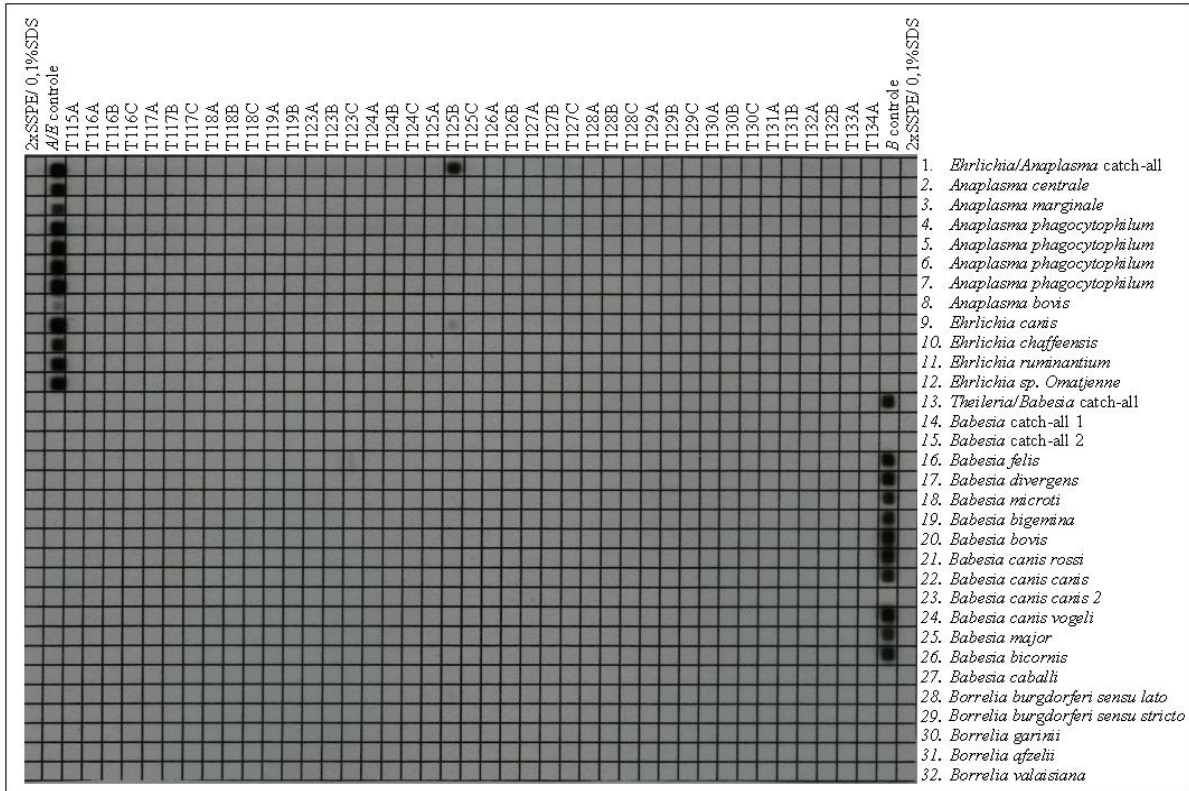
**RLB: membrane ML3 – 06-04-2011**



DNA teken samples Aruba

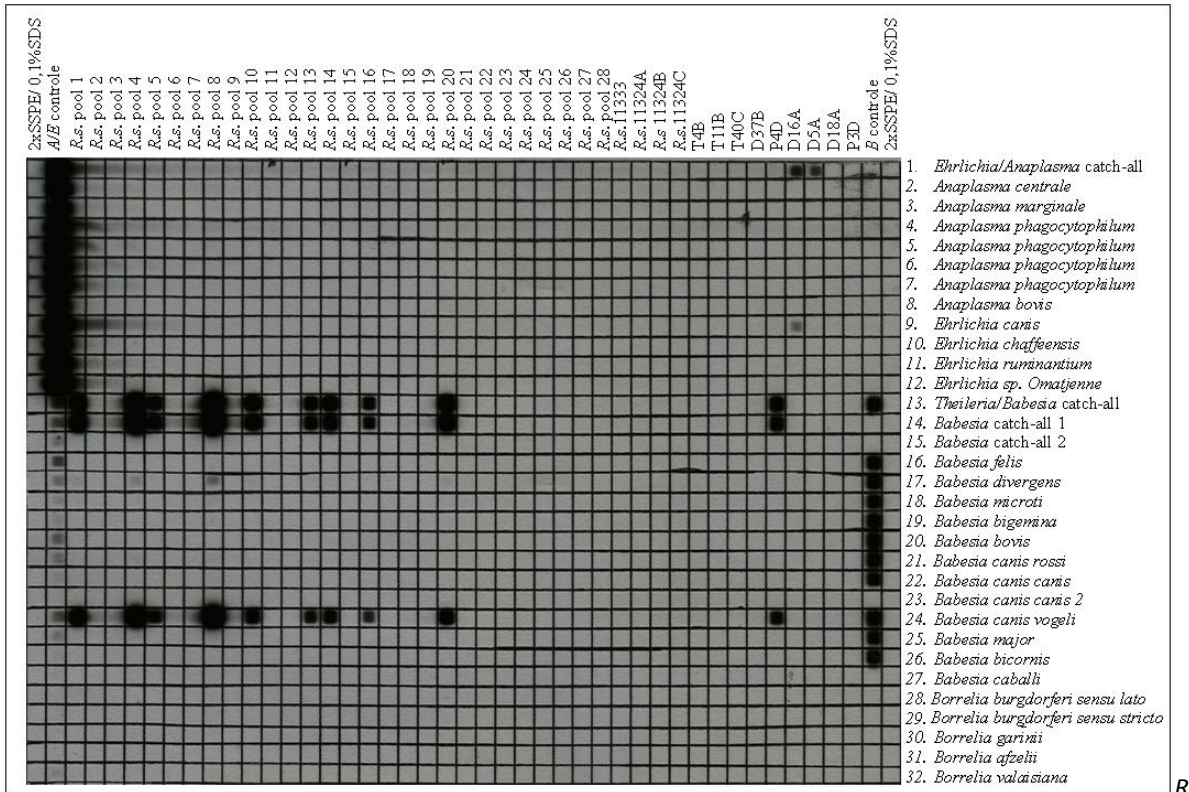
10 mei 2011

RLB: membrane ML3 – 07-04-2011



DNA teken samples Aruba

RLB: membrane ML3 – 14-04-2011



*R. sanguineus* teken per 5 gepooled, afkomstig uit Zuid-Afrika. 4 R.s. teken uit NL. En een aantal samples herhaald.



10 mei 2011

**10.3. Bijlagen – Positieve samples weergegeven in tabel**

RLB datum, Membraan	Sample D= dog, P= pup T= tick	Afkomst hond	ID	RLB uitslag	Opmerkingen
08-02, JB	D16A	Huisdier		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
1.1	P4D	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D37B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	T4B	Huisdier	♂	<i>T/B</i> catch all	
	T11B	Asiel	♀	<i>T/B</i> catch all	
10-02, JB	D1A	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
1.1	D18A	Huisdier		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D5A	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all	
11-02, JB	P3D	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>T/B</i> catch-all	
1.1	D31B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>T/B</i> catch-all	
	D38B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D40B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
15-02, JB	D47E	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
1.1	D43E	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D40E	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D38E	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D43B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D46B	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D57C	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D52C	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D58C	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
	D48C	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	
02-03, JB	P3D	Asiel		<i>B</i> catch-all1, <i>T/B</i> catch-all	Dezelfde samples
1.1	D31B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>T/B</i> catch-all	gebruikt als op 11-02 JB
	D38B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	1.1,
	D40B	?		<i>B</i> catch-all1, <i>B</i> catch-all2, <i>T/B</i> catch-all	alleen met nieuwe
					<i>Ehrlichia</i> primers.
					Resultaat dus identiek
					Herhaling later
07-03, JB	T40C	Huisdier	♂	<i>T/B</i> catch-all, <i>Theileria sp Morito</i> ?	
1.1					
22-03, ML3	T67B	Huisdier	♀	<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	Nieuw membraan
	T67C	Huisdier	♀	<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
25-03, ML3	D19B	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	Dezelfde samples
	D26B	?		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	gebruikt als op 02-03 JB
	D30B	Asiel		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	1.1 en
	D31B	?		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i> , <i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	11-02 JB 1.1 alleen dit
	D38B	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	maal op nieuw
	D40B	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	membraan
					met nieuwe probes (P3D
					negatief nu)
					D31B → co-infectie
25-03, ML1	D47E	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	Dezelfde samples
	D43E	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	gebruikt als op 15-02, JB

10 mei 2011

	D40E	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	1.1, alleen dit maal op nieuw membraan met nieuwe probes. Op dit membraan zijn ook de samples D59C en D50C positief
	D38E	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D43B	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D46B	Asiel		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D57C	Asiel		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D52C	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D58C	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D48C	?		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
	D59C	?		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
	D50C	?		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
01-04, ML2	D1A	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
	P1C	Asiel		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	
01-04, ML3	T122A	Zwerfdier	♂	<i>E/A</i> catch-all	
	T122C	Zwerfdier	♂	<i>E/A</i> catch-all	
06-04, ML3	T109B	Zwerfdier	♂	<i>E/A</i> catch-all	
	T113A	Zwerfdier	♂	<i>T/B</i> catch-all	
07-04, ML3	T125B	Zwerfdier	♂	<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
14-04, ML3	P4D	Asiel		<i>T/B</i> catch-all, <i>B</i> catch-all1, <i>B. vogeli</i>	T4B, T11B, T40C, D37B, D18A en P3D op het oude membraan JB 1.1 positief, op dit nieuwe membraan ML3 negatief
	D16A	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all, <i>E. canis</i>	
	D5A	Huisdier		<i>E/A</i> catch-all	