

De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken in een in vitro voedingsstelsel



Naam student:	Milou Veldhuizen
Studentnummer:	3156230
Periode onderzoeksstage:	28 augustus t/m 28 november 2011
Locatie:	Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht Departement Infectieziekten & Immunologie Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten
Begeleider:	Prof. Dr. F. Jongejan

Inhoud

Samenvatting	4
Inleiding	5
Materiaal en Methoden	7
Het maken van een feeding unit	7
Het inzetten van een voeding	8
De gebruikte teken	8
De voeding	8
De experimentele opzet	9
Het stopzetten van een voeding	9
Verdere bewerking	9
DNA extractie	9
Polymerase Chain Reaction	10
Agarose Gel Electroforese	10
Reverse Lime Blot	10
Resultaten	12
Discussie	17
Conclusie	21
Aanbevelingen	22
Referenties	23
Bijlagen	24
1.1 Tabel experiment 1	24
1.2 RLB bloedmonsters experiment 1	25
2.1 Tabel experiment 2	26
2.2 RLB bloedmonsters experiment 2	27
2.3 RLB teken experiment 2	28
3.1 Tabel experiment 3	29
3.2 RLB experiment 3	30
4 Tabel experiment 4	31
5.1 Tabel experiment 5	31
5.2 RLB bloedmonsters experiment 5	32
5.3 RLB teken experiment 3 en 5	33
6.1 Tabel experiment 6	34
6.2 RLB bloedmonsters experiment 6	35
7.1 Tabel experiment 7	36
7.2 RLB bloedmonsters experiment 7	37
8.1 Tabel experiment 8	38
8.2 RLB bloedmonsters experiment 8	39
9.1 Tabel experiment 9	39
9.2 RLB bloedmonsters experiment 9	40
10. RLB's besmettingsgraad batches	41
11. Protocol in vitro voeden	42

Samenvatting

In dit onderzoek is gekeken naar de transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken. Hierbij is gebruik gemaakt van een in vitro voedingsstelsel dat het mogelijk maakt om de voeding van teken op een gastheer optimaal te simuleren en te volgen onder gecontroleerde omstandigheden. In dit stelsel wordt gebruik gemaakt van siliconen membranen die de elasticiteit van de huid imiteren en die specifiek zijn aangepast voor de *R. sanguineus* teek om een zo hoog mogelijk hechtingspercentage te bereiken.

Na verscheidene experimenten is aangetoond dat *Ehrlichia canis* binnen 8 uur wordt overgedragen door de *R. sanguineus* teek. Vervolgonderzoek is nodig om het exacte moment van hechting en transmissie nader te bepalen.

Ook is er eenmalig gewerkt met *Dermacentor reticulatus* teken waarbij er transmissie is aangetoond van *Babesia canis* binnen 22 uur na pre-feeding op een konijn.

Inleiding

Het in vitro voeden van teken

Sinds lange tijd wordt er gewerkt aan manieren om teken in vitro te voeden en gelijktijdig onderzoek te kunnen doen naar acaricide middelen en transmissie van pathogenen. Een in vitro systeem vergemakkelijkt het onderzoek en daarnaast wordt het benodigde aantal proefdieren tot een minimum gereduceerd wat ethisch gezien een zeer belangrijk aspect vormt in de samenleving (5).

De eerste documentatie wordt gevonden in 1956, waarbij Pierce en Pierce erin slaagden om larven van *Boophilus microplus* te cultiveren op membranen van geëmbryoneerde kippeneieren. Vervolgens voedde Kemp in 1975 dezelfde larven op dunne plakjes runderhuid (8), waarna Wallade in 1991 gebruik maakte van een met lijm geïmpregneerd Baudruche membraan voor de *Rhipicephalus appendiculatus* teek (17). In 1993 werd het siliconen membraan geïntroduceerd door Habedank en Hiepe wat een grote stap voorwaarts vormde voor het succesvol in vitro voeden van teken. Zo slaagde men er in 1995 in om de levenscyclus van de *Amblyomma hebraeum* te voltooien op een siliconen membraan (9). Sinds die tijd wordt het siliconen membraan constant gemodificeerd en aangepast aan specifieke tekensoorten. Voor een succesvolle in vitro voeding is het van groot belang dat de in vivo situatie zo exact mogelijk wordt nagebootst. In 2007 hebben Gröber en Guerin het in vitro model aangepast aan de *Ixodes ricinus* teek, waarbij het siliconen onderdeel van het membraan de elasticiteit van de huid imiteert. Hierdoor sluit het membraan zich wanneer een teek loslaat na een maaltijd waardoor er geen lekkage ontstaat op de hechtingsplaats. Hierdoor kunnen overige teken in alle rust doorvoeden (5). Deze opzet fungeert als basis voor tal van onderzoeken waarbij constant aanpassingen worden gedaan om de in vitro voedingsmethoden aan te passen aan verscheidene soorten teken.

Doel van het onderzoek

In dit onderzoek wordt getracht een optimaal in vitro voedingssysteem te ontwikkelen en te gebruiken voor de *Rhipicephalus sanguineus* teek waarmee gekeken kan worden naar transmissiedynamiek van pathogenen. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat het lastig is om de *R. sanguineus* teek te voeden op een membraan (1, 10). Echter zijn er hoge hechtingspercentages bereikt na verscheidene aanpassingen aan het membraan (5) en is er een start gemaakt met het bestuderen van transmissie van pathogenen, in dit geval *Ehrlichia canis*. In dit onderzoek wordt geprobeerd in dezelfde lijn door te gaan en zullen naast *R. sanguineus* teken ook *D. reticulatus* teken worden gebruikt in hetzelfde voedingssysteem.

Rhipicephalus sanguineus

De *R. sanguineus* teek, ook wel de bruine hondenteek genoemd, behoort tot de *Ixodidae* familie en komt voornamelijk voor in tropische of subtropische gebieden (13). Doordat er de laatste jaren vaker honden geïmporteerd worden uit endemische gebieden en omdat de hond als huisdier steeds vaker mee op vakantie gaat wordt de teek als vector steeds belangrijker in Nederland. De primaire gastheer van deze teek is de hond, maar de teken kunnen zich ook voeden op andere gastheren waaronder de mens. De teek is een driegastherige teek en moet zich dus drie keer voeden op een gastheer om via het larvale en nymfe stadium het adulte levensstadium te bereiken (4). De *R. sanguineus* teek is een vector voor pathogenen als *Ehrlichia canis* en *Babesia spp*, maar ook voor verscheidene *Rickettsia spp*. Deze pathogenen worden overgedragen op de gastheer wanneer de teek zijn hypostoom vasthecht in de huid waarna vervolgens periodes van bloed zuigen en regurgitatie zich afwisselen (4). Dit vormt een essentieel onderdeel voor de transmissie van pathogenen tijdens de bloedmaaltijd.

Canine monocyttaire ehrlichiose

Canine monocyttaire ehrlichiose bij de hond wordt veroorzaakt door de rickettsia *Ehrlichia canis* en is een potentiële levensbedreigende aandoening bij honden. Na besmetting infecteert de obligaat intracellulaire bacterie de monocyten en macrofagen in het lichaam. Na een incubatie periode van 8 tot 20 dagen kan een grote verscheidenheid aan symptomen gezien worden zoals depressie, lethargie, anorexie, pyrexie, lymfadenomegalie en hemorrhagische diathese. De aandoening omvat een acute, subklinische en een chronische fase en vereist een snelle en accurate diagnose om een slechte afloop te voorkomen (13). Canine monocyttaire ehrlichiose is wereldwijd één van de belangrijkste teken gebonden ziekten (6).

Dermacentor reticulatus

De *D. reticulatus* teek komt voornamelijk voor in zuid- en oost Europa maar wordt de laatste jaren steeds vaker in Nederland gezien (2). De teek vormt een vector voor *Babesia canis*, een veroorzaker van canine babesiose in de hond (18). De teek heeft net zoals de *R. sanguineus* teek drie gastheren nodig om het adulte levenstadium te bereiken. Alleen de adulte teek heeft de hond als gastheer en is dus epidemiologisch relevant (11). De larven en nimfen voeden zich voornamelijk op knaagdieren.

Canine Babesiose

Canine babesiose wordt veroorzaakt door *B. canis* en komt wijdverspreid door Europa voor. *B. canis* wordt overgedragen door adulte *D. reticulatus* teken. Naast *B. canis* bestaan ook nog de species *B. vogeli* en *B. rossi*, die allen verschillen in pathogeniciteit en geografische distributie (7, 12). De infectie varieert van een milde voorbijgaande ziekte tot een acute infectie door ernstige haemolyse die zonder instellen van therapie snel resulteert in de dood. De klinische verschijnselen bestaan uit anorexie, bleke slijmvliezen, icterus, pyrexie en een vergrote lever en milt (7). *Babesia spp.* worden zowel trans-stadieel als trans-ovarieel overgedragen, waardoor het mogelijk wordt om generaties van teken te infecteren zonder dat voeding op een gastheer noodzakelijk is (14).

Materiaal en methoden

Materiaal

- *Rhipicephalus sanguineus* adulten
- *Dermacentor reticulatus* adulten
- Voeding voor de teken (3.1 ml/well)
 - o Runderbloed (mechanisch onstolbaar gemaakt)
 - o Glucose (2g/L bloed)
- *Ehrlichia canis* cultuur DH82 (Dog Hybrid 1982, op monocyten van honden)
- Feeding units
 - o Membranen
 - Siliconengel E4
 - Siliconenolie
 - 15% Hexaanoplossing
 - Lens papier (70x120 mm)
 - Keukenfolie
 - Wacker FL colour paste
 - Proefhond 'Kelly' van de faculteit Diergeneeskunde
 - Micro Callipers
 - o Plexiglas buisjes
 - o Siliconendop
 - o Hondenhaar
 - o Ethanol (70%)
 - o Verfpenseel
- Celcultuurplaten (6 wells)
- Waterbad (37 °C)
- Kaliumsulfatoplossing
- Temperatuur- en luchtvochtigheidsmeter
- DNA isolatie kits voor bloed en tissue
- PCR reagentia apparaat
- Agarose gel
- Reverse Line Blot (RLB) hybridisatie kit

Methoden

Het maken van een feeding unit

Om teken in vitro te kunnen voeden wordt het protocol van Guerrin (2007) gevolgd. Ten eerste dient de elastische huid geïmiteerd te worden. Dit wordt gedaan door gebruik te maken van een siliconen mengsel bestaande uit 30 g siliconen lijm, 9 g siliconen olie, 5.8 g hexaan en 0.5 g witte kleurpasta. Dit mengsel wordt uitgestreken op 8 lens papiertjes van 70x120 mm die zijn gefixeerd op een glasplaat met opgespannen keukenfolie. Het doel is om siliconen membranen te creëren met een dikte tussen de 70 en 110 μm om er zeker van te zijn dat de *R. sanguineus* teek het membraan volledig kan penetreren met zijn hypostoom, welke bij de mannelijke teken een lengte heeft van 270 μm en bij de vrouwelijke teken 370 μm (5). De dikte van de membranen wordt gemeten met een micro callipers.

Omdat de specifieke gastheer van de *R. sanguineus* teek een hond betreft, is het essentieel dat het membraan de geur van een hond imiteert. Uit eerdere onderzoeken van onder andere drs. J. Lenssen (2010) en drs. M. Bonga (2011) is gebleken dat dit een essentiële factor is voor de *R. sanguineus* teek om zich te hechten aan het membraan. Dit wordt

gerealiseerd door de siliconen membranen 2 minuten te wrijven over de vacht van een hond. Voor de continuïteit van het onderzoek is gedurende alle experimenten dezelfde hond gebruikt.

Vervolgens wordt een plexiglas buisje op het membraan gelijmd met siliconen gel. Dit plexiglas buisje is op maat gemaakt en bevat een ring halverwege het buisje die blijft hangen op de rand van een 6-wellsplaat. Deze ring zorgt ervoor dat de bodem van het buisje met het aangebrachte membraan niet de bodem van de well aanraakt en tegelijkertijd zorgt de ring voor steriele afsluiting van de experimentele opzet. Ter controle op lekkage en voor desinfectie wordt het beschermende keukenfolie van het membraan verwijderd en wordt de unit gedurende 10 minuten in 70% alcohol geplaatst. Uiteindelijk wordt er een klein netje van hondenhaar op de bodem van het membraan geplaatst om zo de hond nog meer te imiteren en de teken dus een extra stimulans te geven.

Het inzetten van een in-vitro voeding

De gebruikte teken

Gedurende het onderzoek wordt voor het grootste deel de *R. sanguineus* teek gebruikt. Er zal gebruik worden gemaakt van twee stammen. De eerste stam is een schone stam en bevat adulte *R. sanguineus* teken Frankrijk en is al vele generaties in het lab. De andere stam is de Bloemfontein-stam en is afkomstig uit Zuid-Afrika. Deze stam bevatte oorspronkelijk nimfen. Deze nimfen zijn in Afrika gevangen en in een experimentele setting geïnfecteerd met *E. canis* door ze te voeden op besmette honden. Tijdens het onderzoek zijn de nimfen ontwikkeld naar adulten die vervolgens zijn gebruikt in het onderzoek. De besmettingsgraad van de nymfen is door het UCTD bepaald en ligt rond de 19% (bijlage 10).

Naast de *R. sanguineus* teek zal ook gebruik worden gemaakt van de *D. reticulatus* teek. Deze kolonie teken is ook al geruime tijd aanwezig bij het UCTD en zijn besmet met *B. canis*. De besmettingsgraad is ook in het UCTD bepaald en ligt rond de 70% (bijlage 10).

De teken verblijven in een stoof bij 25.3 °C en een luchtvochtigheid van 90%. Er wordt een lichtschema gehandhaafd van 16 uur licht gevolgd door 8 uur geen licht. Wanneer de teken het adulte stadium hebben bereikt worden zij naar een andere stoof verplaatst waar het constant donker is, een temperatuur heerst van 20.6 °C en een luchtvochtigheid van 35%. In deze stoof is geen licht nodig omdat de teek niet meer gestimuleerd hoeft te worden tot ongeveer 70% ontwikkeling.

Voor het starten van een experiment met 4 feeding units worden de teken gesorteerd naar geslacht en vitaliteit. In elke unit worden 5 mannelijke en 5 vrouwelijke teken geplaatst waarna de unit vervolgens wordt afgesloten met een siliconen dop die tot op 5 mm van het membraan wordt gedrukt. Bij een aantal experimenten worden de teken voorafgaand aan het starten van de voeding geïncubeerd bij 37 °C om de ontwikkeling van de bacterie in de teek te bevorderen voordat de bacterie overgedragen wordt op het schone bloed. Bacteriën vermenigvuldigen zich beter bij een hoge temperatuur en zodoende wordt de transmissie van de bacterie verhoogd. In het onderzoek van Stich et al, 2002 is in een soortgelijk experiment dit positieve effect van incubatie aangetoond bij de transmissie van *E. canis* door *R. sanguineus* teken (15).

De voeding

Gedurende alle experimenten wordt er vers bloed gehaald bij het departement Landbouwhuisdieren. Hiervoor worden 3 koeien gebruikt welke rouleren in het onderzoek om de last voor het proefdier tot een minimum te beperken. Het bloed wordt zo steriel

mogelijk afgenomen door de huid te desinfecteren en een steriel plastic slangetje te koppelen aan de naald wat het bloed naar de steriele glazen pot leidt. Vervolgens wordt het bloed mechanisch onstolbaar gemaakt met een steriele 10 ml pipet waarna er 2 g/L glucose aan toegevoegd wordt. Het bloed wordt vervolgens onderverdeeld in 50 ml falcon tubes en in de koelkast bewaard.

Er worden twee typen voedingen gebruikt in het onderzoek: de acquisitie en de transmissie voeding. De acquisitievoeding wordt gebruikt bij de batch met schone teken, waarbij er *E. canis* uit kweek wordt toegevoegd aan het bloed zodat de teken zich infecteren met de parasiet wanneer ze zich vasthechten aan het membraan en bloed opnemen. Per feeding unit wordt er 0.2 ml *E. canis* kweek toegevoegd aan het bloed in de well. De transmissievoeding is een voeding waarbij er schoon bloed aangeboden wordt aan de teek waarna getracht wordt overdracht vanuit de teek te realiseren.

De *E. canis* cultuur wordt door het UCTD zelf in kweek gehouden. De bacteriestam is afkomstig uit Atlanta en wordt hier in Nederland gekweekt op DH82 cellen (monocyten) van honden.

Experimentele opzet

Voor de start van elk experiment wordt een steriele 6-wells plaat gevuld met 4 x 3.1 ml en 1 x 2.0 ml runderbloed, waarvan laatstgenoemde well fungeert als controle well. Vervolgens wordt de plaat geplaatst in een waterbad van 37 °C bij een luchtvochtigheid van 88% om op temperatuur te komen. De teken worden per tental in een feeding unit geplaatst en vervolgens in een met bloed gevulde well gezet. De 6-wells plaat wordt gedurende het hele experiment in een waterbad met kaliumsulfaat geplaatst wat de luchtvochtigheid in het bad bevordert. Een essentieel onderdeel van de proefopzet is zowel het binnen- als het buitenbad tijdig bij te vullen met resp. kaliumsulfaat als gedestilleerd water. Het bloed wordt elke dag om 9:00 u en om 17:00 u verversd waarna er monsters in duplo worden genomen van elke afzonderlijke well. Deze monsters worden ingevroren voor latere bewerking. Ook worden de units elke 24, 48 en 68 uur na starten van de proef volledig maar snel bekeken om de mate van hechting vast te stellen en het percentage sterfte te calculeren. Deze gegevens worden overzichtelijk genoteerd in tabellen.

Het beëindigen van een voeding

Wanneer de voeding wordt beëindigd worden de teken geteld en voorzichtig verwijderd van het membraan. Hierbij is het zeer belangrijk dat de monddelen intact blijven om te teek te kunnen hergebruiken voor een eventuele volgende voeding. De teken met opgedroogde bloedresten worden schoongemaakt met een pincet en vervolgens terug in de stoof geplaatst. De teken die worden gebruikt voor DNA extractie worden schoongemaakt en verder bewerkt volgens het protocol van het UCTD (Bijlage 1). De feeding units worden schoongemaakt, ontdaan van siliconen resten, gedesinfecteerd en hergebruikt.

Verdere bewerking

DNA extractie

De bloedmonsters worden ontdooid en verwerkt met behulp van de Nucleospin® DNA extractie kit voor bloed volgens het protocol van de fabrikant waarop aanpassingen zijn gedaan door het UCTD (19). De verkregen DNA monsters worden opnieuw ingevroren voor verdere verwerking mbv. de PCR techniek.

De teken worden volgens het UCTD protocol verwerkt met behulp van de Nucleospin DNA extractie kit voor tissue materiaal.

Polymerase Chain Reaction

Voor de PCR wordt er gebruik gemaakt van de Arktik™ Thermal Cycler PCR om het DNA materiaal te amplificeren. De DNA extractie producten worden verdund volgens het UCTD protocol (19, tabel 3) en in de machine geplaatst waarna het juiste programma wordt geselecteerd om het DNA specifiek voor *Ehrlichia spp.* te amplificeren. De hiervoor gebruikte primers worden weergegeven in tabel 1. Doordat de monsters achtereenvolgend worden verhit en gekoeld volgens het PCR programma in tabel 2, wordt het DNA eerst gedenateerd waarna de primers binden aan het gewenste deel DNA dat vervolgens wordt geamplificeerd. Door deze cyclus vele malen te herhalen ontstaat een exponentiële vermenigvuldiging van de doelsequentie.

Table 1: primers and their sequence

Pathogen	Primers	Sequence
<i>Ehrlichia</i>	Ehr-F	5'-GGA ATT CAG AGT TGG ATC MTG GYT CAG
	Ehr-R	5'-Biotin-CGG GAT CCC GAG TTT GCC GGG ACT TYT TCT
<i>Babesia</i>	RLB-F2	5'-GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G
	RLB-R2	5'-Biotin-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT

Component	Volume
H2O	15.875 µl
5x Phire reaction buffer	5.0 µl
F primer (20 pmol/ul)	0.5 µl
R primer (20 pmol/ul)	0.5 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
DNA polymerase	0.125 µl

Table 2: thermo cycler program PCR

No Cycles	Time	Temperature
1 cycle	30 sec	98°C
	05 sec	98°C
10 cycles	05 sec	67→57°C
	07 sec	72°C
50 cycles	05 sec	98°C
	05 sec	57°C
	07 sec	72°C
	1 cycle	60 sec

Agarose Gel Electroforese

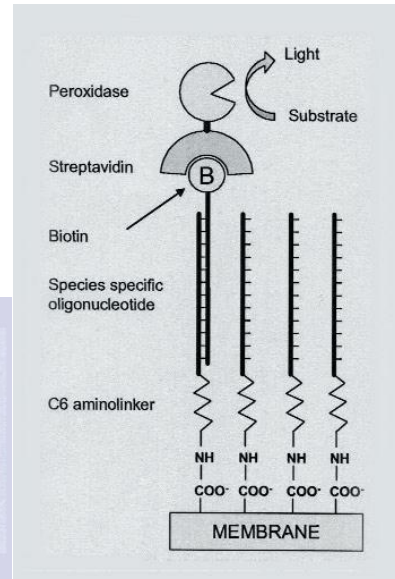
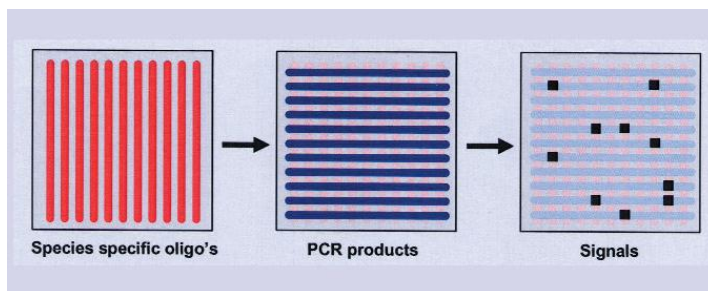
Om te controleren of de PCR succesvol is wordt er een positieve en negatieve controle gerund in een agarose 1.5% gel gemaakt volgens UCTD protocol (19). De PCR producten worden gekleurd met loading dye, aangebracht in de gel en vervolgens 45 minuten onder stroom gezet. Het negatief geladen DNA zal richting de positieve kant van de gel migreren waardoor de grote en kleine fragmenten in het DNA zich scheiden en deze vergeleken kunnen worden met een gelijktijdig aangebrachte DNA ladder. De negatieve controle zal indien alles correct is uitgevoerd vanzelfsprekend geen resultaat tonen. De positieve controle zal een fragment tonen van ± 500 bp bij aanwezigheid van *E. canis* (*Ehr/Ana*).

Reverse Line Blot Hybridisatie

De PCR producten worden verder bewerkt met de Reverse Line Blot techniek volgens het protocol van het UCTD (19). Met behulp van deze techniek kunnen verscheidene species worden geïdentificeerd met een species-specifieke oligonucleotide probe voor *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Theileria spp.* en *Rickettsia spp.* Deze probes zijn covalent gelinkt aan het RLB membraan. Door de PCR producten dwars aan te brengen op deze probes zal er een signaal ontstaan op de plek waar het DNA materiaal matcht aan de bepaalde probe (Figuur 1).

De RLB techniek combineert PCR amplificatie met een hybridisatie stap die de sensitiviteit tot 1000 keer verhoogd (16). De gehybridiseerde PCR producten worden zichtbaar gemaakt

met behulp van chemiluminescentie (Figuur 2). De PCR mix bevat biotine in de R primer waar het streptavidine aan bindt tijdens de wasstappen van het RLB membraan. Vervolgens vindt er een reactie plaats tussen het streptavidine en de in de laatste stap toegevoegde peroxidase wat ervoor zorgt dat de signalen op de RLB zichtbaar worden nadat de foto tien minuten is belicht en vervolgens is ontwikkeld in een foto apparaat.



Figuur 1 (links): Schematic representation of the RLB assay (16)

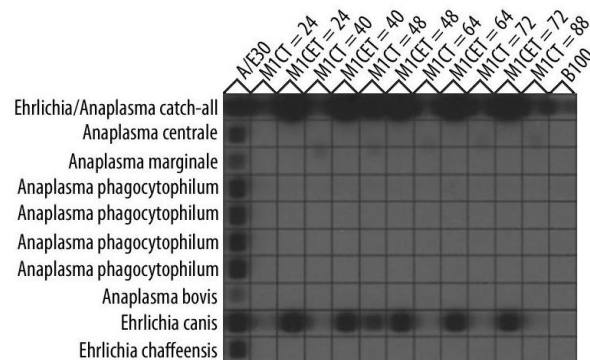
Figuur 2 (rechts): Schematic representation of the hybridisation principle (16)

Resultaten

Experiment 1: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus*

Het doel van dit experiment was om de schone *R. sanguineus* teken de *E. canis* voldoende te laten opnemen om met dezelfde teken in de volgende voeding transmissie aan te kunnen tonen. Om de bacteriecultuur te sparen is er pas *E. canis* toegevoegd aan het bloed op het moment dat er een zekere mate van hechting was vastgesteld. In bijlage 1.1 zijn de resultaten van de tellingen tijdens deze voeding te zien. Het gemiddelde hechtingspercentage gedurende de hele voeding lag rond de 53% met een maximum van 66% op t=40. Drie van de vier feeding units deden het goed qua hechting en hadden een lage mortaliteit. Deze teken zijn dan ook gebruikt voor experiment 2. De voeding is gestopt na 88 uur.

Om te controleren dat er daadwerkelijk *E. canis* is aangeboden zijn er twee maal daags bloedmonsters genomen nadat het bloed gemengd was met de *E. canis* en voordat het aan de teken is aangeboden. Zoals te zien is in bijlage 1.2 is dit duidelijk aangetoond met de RLB dat er een overmaat aan *E. canis* is aangeboden aan de teken.

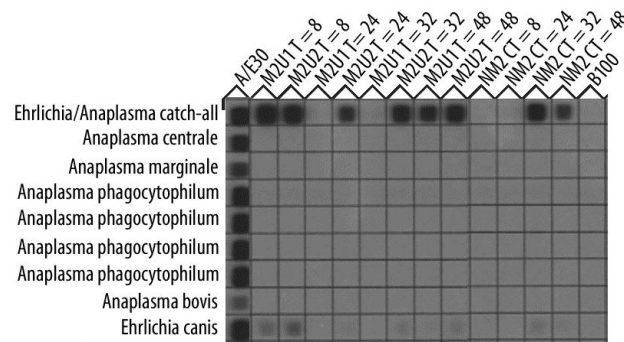


Experiment 2: Transmissievoeding met de adulte *R. sanguineus* uit Exp. 1

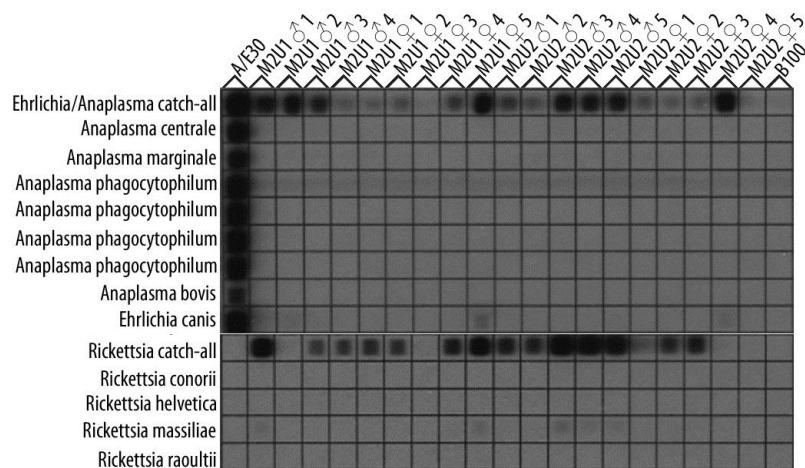
Het doel van dit experiment was om de in vitro geïnfecteerde teken uit experiment 1 *E. canis* te laten overbrengen naar het schone bloed. Een gebrek in dit experiment was de onbekende infectiegraad. Het was mogelijk geweest om een aantal teken te testen maar er is besloten dit te bewaren tot het einde van het tweede experiment zodat de maximale capaciteit aan besmette teken werd benut. Er zijn twee feeding units ingezet met elk opnieuw 5 mannelijke en 5 vrouwelijke teken. Zoals te zien is in bijlage 2.1 deden beide units het erg goed. Het gemiddelde hechtingspercentage lag gedurende de hele voeding rond de 73%, waarbij er geen duidelijk verschil bestond tussen de mannelijke en de vrouwelijke teken. Toen de voeding werd gestopt na 48 uur zaten er in beide units een aantal volgezogen teken die vastzaten maar vervolgens dood bleken te zijn.

Op de RLB in bijlage 2.2 is te zien dat 6 van de 8 bloedmonsters een positief signaal geven voor *Ehrlichia/Anaplasma* Catch-all, namelijk: U1 en U2 op t=8, U2 op t=24, U2 op t=32 en U1 en U2 op t=48. Daarnaast geven alleen U1 en U2 op t=8 ook een positief signaal voor *E. canis*. U2 op t=32 en t=48 geeft een heel licht signaal voor *E. canis*. Er mogen geen conclusies getrokken worden op basis van de signalen op t=32 en t=48, omdat op deze tijden de controle wells ook positief scoorden op het RLB membraan.

De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken in een in vitro voedingssysteem



Na afloop van experiment 2 zijn alle teken uit de voeding getest. Op de RLB in bijlage 2.3 is duidelijk te zien dat 4 van de 9 teken uit U1 een duidelijk signaal geven voor *Ehrlichia/Anaplasma* Catch-all. In U2 was dit bij 4 van de 10 teken het geval. Er geeft echter slechts een teek een licht signaal voor *E. canis*, namelijk M2U1 ♀5. Ook is op deze RLB te zien dat bijna alle teken *Rickettsia spp.* bij zich dragen. Dit is niet overgedragen naar het bloed.

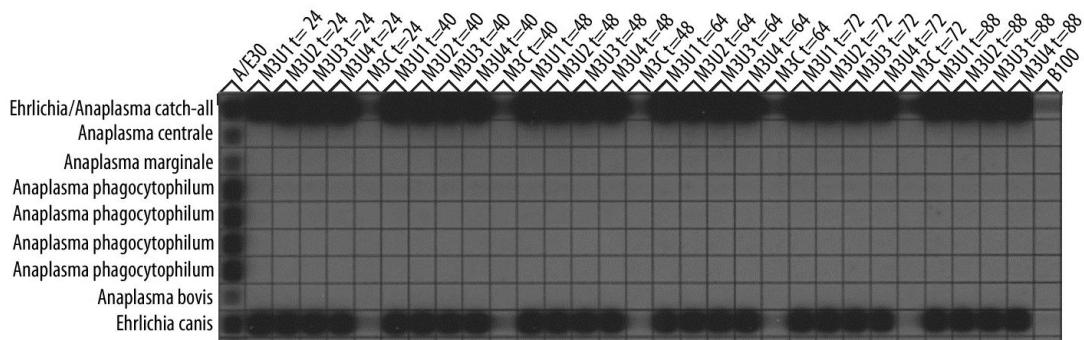


Experiment 3: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus*

Dit experiment was een herhaling van experiment 1 met nieuwe teken van dezelfde batch. Het gemiddelde hechtingspercentage van deze voeding lag op 30.5 % en deed het dus beduidend minder dan experiment 1. Een opvallend verschil lag in het feit dat de mannelijke teken constant een hoger hechtingspercentage bereikten dan de vrouwelijke teken, wat gemiddeld op 53.4 % lag. Na beëindiging van de voeding na 88 uur bleek dat alle vastgehechte teken uit U3 veel gezogen hadden maar niet meer leefden, zodat ze helaas niet ingezet konden worden in experiment 4. Wel zijn deze dode teken bewaard voor DNA extractie en verdere bewerking. Voor de overige gegevens zie tabel in bijlage 3.1.

Op de RLB van de bloedmonsters van experiment 2 in bijlage 3.2 is wederom aangetoond dat het bloed dat aangeboden werd aan de teken ook daadwerkelijk *E. canis* bevatte.

De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken in een in vitro voedingsysteem



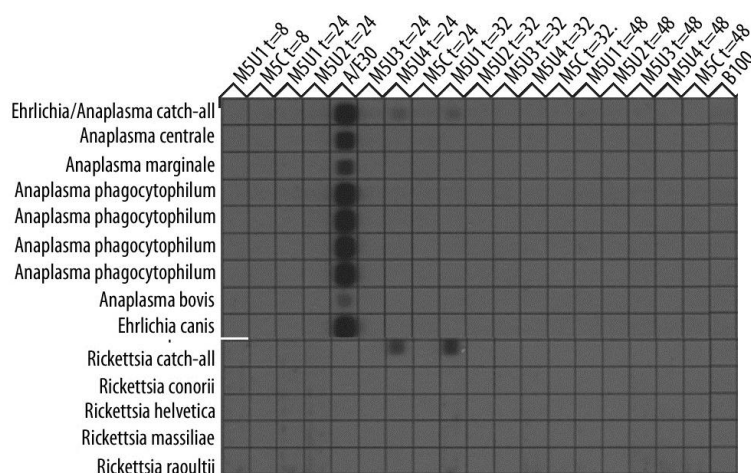
Experiment 4: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *B. vogeli*

Dit experiment was een herhaling van experiment 1 maar ditmaal met *R. sanguineus* teken die besmet waren met *B. vogeli*. De teken zijn 97 uur geïncubeerd in het waterbad bij 37 °C voorafgaand aan het starten van deze voeding. Het doel was om te kijken of er een mogelijkheid bestond om gelijktijdige transmissie en acquisitie te laten plaatsvinden van resp. *B. vogeli* en *E. canis*, maar omdat het hechtingspercentage de hele voeding op 0% lag en er een zeer hoge mortaliteit in beide units optrad, is deze voeding na 24 uur vroegtijdig beëindigd (Bijlage 4).

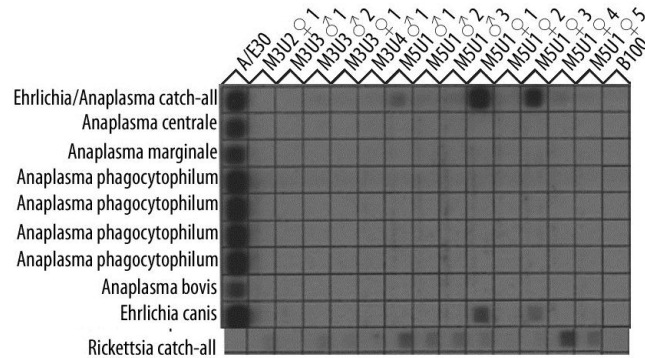
Experiment 5: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

In dit experiment zijn 3 units gestart met adulte teken uit een batch die besmet was met *E. canis*, waarvan het besmettingspercentage rond de 19% lag. Daarnaast is er een unit gestart met de overgebleven meest volgezogen teken uit de acquisitie voeding van experiment 3 (U1 in bijlage 5.1). Al de teken zijn eerst 46 uur geïncubeerd in het waterbad bij 37 °C en vervolgens op schoon bloed geplaatst met de verwachting dat ze *E. canis* zouden overbrengen. Het gemiddelde hechtingspercentage van deze voeding die 48 uur heeft geduurd lag rond de 27.5%. Hierbij lag het percentage bij de mannelijke teken beduidend hoger; gemiddeld 45%. Tijdens deze voeding was er geen duidelijk verschil in de mate van hechting of het percentage mortaliteit tussen U1 en de andere units. Wel deed unit 2 het vanaf de tweede dag slecht; de mortaliteit steeg en het hechtingspercentage daalde in die unit tot 0%.

Zoals te zien is op de RLB in bijlage 5.2 is er op geen enkel tijdstip *E. canis* overgedragen van de teken naar het bloed. Wel is er in M5U4 t=24 en in M5U1 t=32 een *Rickettsia* catch-all signaal te zien, waarbij ook een heel licht *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all signaal oplicht.



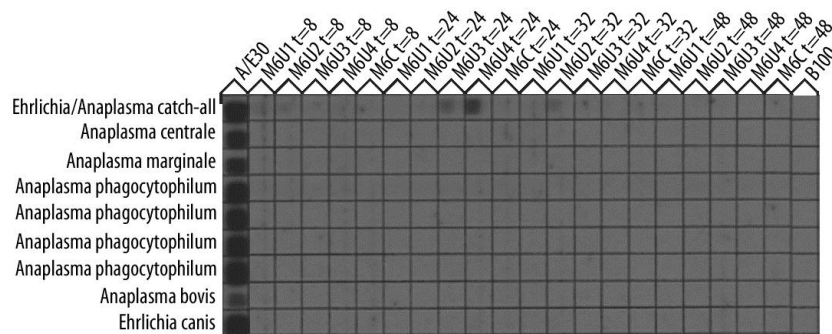
De teken uit unit 1 van experiment 5 zijn samen met de volgezogen dode teken uit experiment 3 getest ter controle van de acquisitie voeding. Op de RLB van deze teken (bijlage 5.3) is te zien dat de acquisitie succesvol is geweest en in tenminste twee teken, namelijk M5U1 ♀1 en ♀3. Deze twee teken geven zowel een positief catch-all signaal als een *E. canis* signaal. Ook is te zien dat de meeste teken Rickettsia catch-all positief zijn, al zijn het lichte signalen.



Experiment 6: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

Dit experiment is een herhaling van experiment 5 waarbij alle teken die nog in leven waren zijn hergebruikt. De teken uit unit 1 zijn vervangen door nieuwe teken en ook de overige units zijn aangevuld tot ze elk weer 10 teken bevatten. Alle teken zijn dit keer 116 uur geïncubeerd bij 37 °C in het waterbad. Tijdens het 48-uur durende experiment lag het gemiddelde hechtingspercentage op 20.7 %, waarbij er geen duidelijk verschil was tussen mannelijke en vrouwelijke teken (bijlage 6.1). In unit 3 was er een hoge mortaliteit met gelijktijdig een laag hechtingspercentage (Bijlage 6.1).

Op de RLB van de bloedmonsters van deze voeding (bijlage 6.2) zijn een tweetal lichte *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all signalen te zien bij M6U3 t=24 en M6U4 t=24 waarvan het signaal op M6U4 t=24 het sterkst oplicht. Verder zijn er geen signalen aanwezig voor *E. canis*.

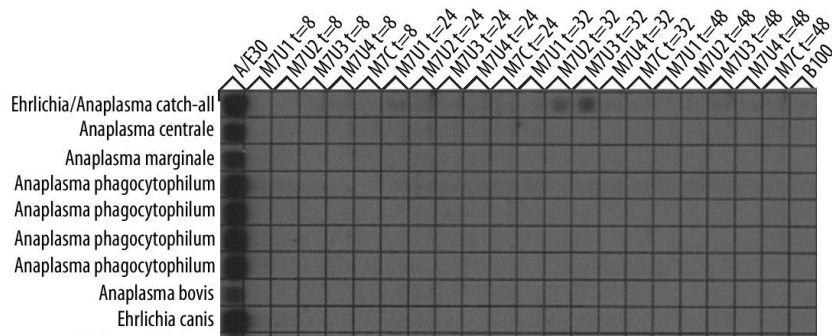


Experiment 7: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

In dit experiment is experiment 5 herhaald. Er zijn 40 nieuwe teken uit dezelfde batch geselecteerd die 119 uur geïncubeerd zijn in het waterbad bij 37 °C. Deze voeding is opnieuw 48 uur lang doorgezet waarbij het gemiddelde hechtingspercentage op 28.7% lag. Het sterftepercentage lag bij deze voeding opvallend laag (bijlage 7.1)

De RLB van de bloedmonsters (bijlage 7.2) van dit experiment laat alleen lichte *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all signalen zien bij M7U2t=32 en M7U3 t=32.

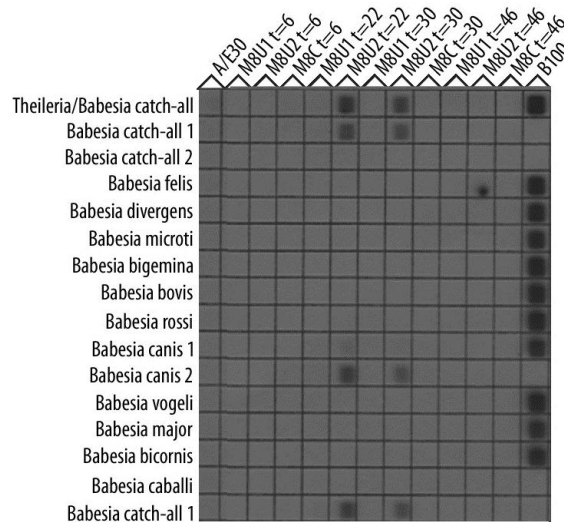
De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken in een in vitro voedingssysteem



Experiment 8: Transmissievoeding met adulte *D. reticulatus* geïnfecteerd met *B. canis*

In dit experiment is een andere soort teek gebruikt, namelijk de *D. reticulatus* teek. Gemiddeld 70% van de teken in deze batch was besmet met *B. canis*. Voordat de teken in de voedingsunit werden geplaatst zijn ze eerst 120 uur op een konijn gezet om zich alvast gedeeltelijk te voeden, zodat ze extra snel zouden hechten wanneer ze op het membraan geplaatst zouden worden. Op het moment van starten waren er 13 mannelijke teken en 5 vrouwelijke teken die zich gedeeltelijk hadden volgezogen. Deze teken zijn verdeeld over 2 units en 46 uur doorgezet. Het hechtingspercentage lag gemiddeld op 34 %, maar 1 van de twee units deed het vele malen beter dan de ander (bijlage 8.1).

Op de RLB in bijlage 8.2 is te zien dat er een duidelijk signaal oplicht bij M8U2 t=22 en M8U2 t=30 voor zowel de *Theileria/Babesia* catch-all en de *Babesia* catch-all 1 als bij *B. canis* 2.



Experiment 9: Transmissievoeding met *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

Dit experiment is een herhaling van experiment 7 waarbij dezelfde teken zijn gebruikt. Wel zijn alle units aangevuld tot 10 teken met nieuwe teken uit de stoof. Alle teken zijn opnieuw sinds het stoppen van de voeding de week ervoor gedurende 95 uur geïncubeerd bij 37 °C tot het starten van de voeding.

Het gemiddelde hechtingspercentage lag op 22.9% waarbij opnieuw de mannelijke teken het beter deden dan de vrouwelijke teken. Opvallend was de hoge mortaliteit vergeleken met eerdere experimenten (bijlage 9.1)

De RLB van de bloedmonsters laat geen resultaat zien (bijlage 9.2).

Discussie

Experiment 1: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus*

De voeding van het eerste experiment boekte direct goede resultaten wat betreft hechtingspercentage van de teken. Vanaf het eerste telmoment op $t=24$ is de hechting min of meer stabiel gebleven tot aan het eind van de voeding. Unit 2 was de enige unit met slechte resultaten en een hoog percentage sterfte. De proefopzet voor alle units is exact hetzelfde geweest, dus de oorzaak van deze slechte resultaten is niet precies te achterhalen. Mogelijk was het membraan in unit 2 dikker dan in de overige units zodat de teken er niet doorheen konden komen, of is dat deel van het membraan minder goed over de hond gewreven dan de overige delen waardoor het minder aantrekkelijk werd voor de teken om te hechten. Het bloed dat is gebruikt in unit 2 was ook exact hetzelfde bloed als in de overige units dus ook daar kan de oorzaak niet liggen.

De resultaten op de RLB hebben aangetoond dat deze proefopzet succesvol kan worden gebruikt om bloed zodanig te infecteren met *E. canis* dat het DNA zichtbaar wordt op de RLB. Deze manier geeft dus een goed uitgangspunt om teken in vitro te infecteren met *E. canis*.

Een dubieus resultaat op de RLB betreft de controle van tijdstip $t=48$. Dit controle monster is genomen van een schone well en had dus geen *E. canis* mogen bevatten. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat er iets mis is gegaan bij de monsternamen of dat er niet schoon gewerkt is tijdens het vullen van de 6-wellsplaat. Desondanks heeft dit resultaat geen invloed op het verdere verloop in experiment 2.

Experiment 2: Transmissievoeding met de adulte *R. sanguineus* uit Exp. 1

De voeding tijdens dit experiment is goed verlopen; zowel unit 1 als 2 boekte goede resultaten wat betreft hechting. Op meetpunt $t=24$ was de controle well zwart geworden waardoor verwacht werd dat er mogelijk bacteriële groei had plaatsgevonden maar uiteindelijk gaf het bloedmonster alsnog een negatief resultaat op de RLB.

Wel zijn er twee controle monsters op $t=32$ en $t=48$ welke een positief signaal geven op de RLB. Het bloed dat aangeboden werd aan de teken was zo steriel mogelijk afgenomen en direct in tubes onderverdeeld en in de koelkast bewaard. Ook werd er geen *E. canis* aan het bloed toegevoegd dus is het volledig onbekend waar het positieve *E. canis* signaal vandaan moet zijn gekomen. De monsternamen gebeurde met de grootste zorgvuldigheid, maar het kan bijna niet anders dat hier mogelijk iets mis is gegaan. Herhaaldelijk onderzoek zou uit moeten wijzen of de controle monsters daadwerkelijk positief waren. Uit dit experiment kan wel geconcludeerd worden dat de teken minder dan 8 uur nodig hebben om de parasiet over te dragen op het schone bloed.

De teken uit unit 2 hebben constant *E. canis* overgedragen naar het bloed op alle meetmomenten, in tegenstelling tot de teken uit unit 1. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat het bloed in de well niet voldoende is gemengd tot een homogene vloeistof tijdens de monsternamen zodat de parasiet mogelijk 'gemist' is.

Een laatste punt van discussie op de RLB van de bloedmonsters van experiment 2 is het feit dat er duidelijke catch-all signalen oplichtten maar dat lang niet al die monsters ook oplichtten voor *E. canis*. Mogelijk is het signaal niet sterk genoeg voor het specifieke *E. canis* signaal, of zijn er deels andere DNA fragmenten gehecht aan de specifieke probe van het catch-all signaal.

De resultaten van de RLB uit bijlage 3.3 waarop de teken uit experiment 2 getest zijn ondersteunen de transmissieresultaten. In beide units van experiment 2 zijn teken aanwezig geweest die duidelijk geïnfecteerd waren met *E. canis*. Wat hier opnieuw opvallend is, is dat het catch-all signaal zeer sterk is bij 8 van de 19 teken, maar er geen signaal oplicht voor *E.*

canis. Wel gaven 14 van de 19 teken een positief signaal op de *Rickettsia* catch-all, die in 10 van de 19 gevallen overeen komen met de signalen op de *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all. Mogelijk is er sprake geweest van een kruisreactie tussen *Rickettsia* spp. en *Ehrlichia* spp.

Experiment 3: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus*

Wanneer we de resultaten van dit experiment vergelijken met experiment 1, zit het voornaamste verschil in het hechtingspercentage. Omdat het teken uit exact dezelfde batch als in experiment 1 betreffen, moet de oorzaak hoogstwaarschijnlijk liggen in de feeding unit. Mogelijk zijn de membranen niet attractief genoeg geweest voor de teken; misschien zat de hondengeur er niet voldoende aan of hadden de teken geen behoefte om zich te voeden. Het bloed lijkt geen mogelijke oorzaak omdat dezelfde koe gebruikt is in experiment 1 en 3.

Zowel op t=64 als op t=88 was het bloed in de controle well donker geworden. Ten eerste heeft dit te maken met uitdroging overnacht, maar mogelijk ook door bacteriële groei die gestimuleerd wordt doordat de units gedurende de hele voeding bij 37 graden gehouden worden. Het bloed is niet 100% vrij van pathogenen doordat er geen volledige steriliteit gegarandeerd kan worden tijdens de afname. Daarnaast wordt er geen bacteriocide middel toegevoegd aan het bloed, dus het is heel goed mogelijk dat de aanwezige bacteriën zich exponentieel vermenvuldigen bij 37 C. Ook het bloed in unit 2 op t=88 was donker gekleurd en er was een hoog sterftepercentage onder de teken, wat hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt werd door het net beschreven fenomeen.

Op de RLB van experiment 3 zijn naast de overduidelijke signalen in alle units gedurende de hele voeding voor *E. canis*, ook hele lichte signalen te zien voor *Borrelia vailaisiana*. Gezien het feit dat er tijdens het hele experiment niet gewerkt is met danwel getest op *Borrelia*, zijn deze signalen niet te wijten aan een kruisreactie met *E. canis*. Hoogstwaarschijnlijk is er gewerkt met een vervuilde mini blotter of een niet juist gestript membraan. Zowel de blotter als de membranen worden veelvuldig gebruikt door verschillende personen en dus is de wijze van schoonmaken niet constant te controleren.

Experiment 4: Acquisitievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *B. vogeli*

Dit experiment heeft geen enkel positief resultaat opgeleverd. Mogelijk was de batch met teken te oud, niet vitaal genoeg of wilden ze zich niet voeden op het siliconen membraan door onvoldoende attractiviteit. Het hoge sterftepercentage in beide units ondersteunen de gedachte dat de batch niet vitaal genoeg was om zich te handhaven in de experimentele proefcondities. Het bloed van de koe in dit experiment was hetzelfde bloed als in experiment 2 en is ook niet donker gekleurd naarmate de proef vorderde, dus hoogstwaarschijnlijk ligt hier geen oorzaak voor het slechte hechtingspercentage.

Experiment 5: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

De voeding van dit experiment is soepel verlopen. De omstandigheden voor alle units waren gelijk en ook is het bloed in alle wells gedurende alle meetmomenten niet donker gekleurd. De slechte resultaten van unit 2 zijn dan ook waarschijnlijk niet te wijten aan de proefopzet. Mogelijk zijn er bij toeval minder vitale teken in de unit geplaatst dan in de andere units waardoor ze minder hechtten.

Vanaf experiment 5 is er gebruik gemaakt van een andere batch *R. sanguineus* teken dan in experiment 1,2, en 3. Over het algemeen hebben de teken van deze tweede batch over alle experimenten genomen constant een beduidend lager hechtingspercentage bereikt dan de eerst gebruikte batch. Mogelijk voelden de teken uit deze batch zich minder aangetrokken tot het membraan, waren ze minder vitaal of was de drang tot voeden veel lager.

Zoals de RLB laat zien is er in dit experiment geen *E. canis* overgedragen. Dit lag in de lijn der verwachting gezien het lage hechtingspercentage maar ook gezien de lage besmettingsgraad van deze batch uit Zuid-Afrika.

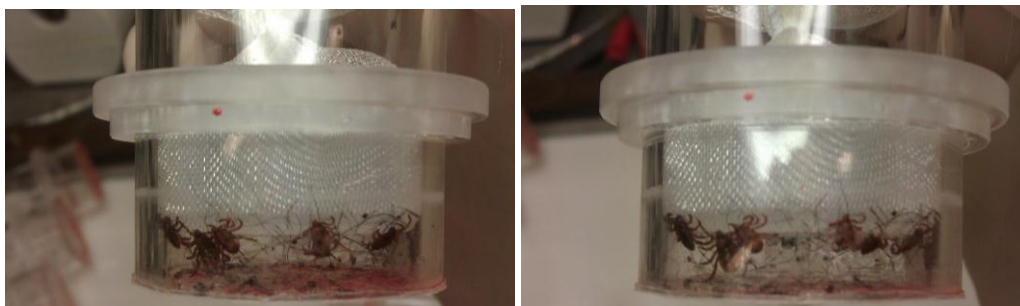
Het *Rickettsia* catch-all signaal dat oplicht op $t=24$ bewijst dat er *Rickettsia* stammen aanwezig zijn binnen deze batch en dat deze parasiet binnen 24 uur kan worden overgedragen. De lichte *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all signalen die corresponderen met de *Rickettsia* signalen zijn hoogstwaarschijnlijk te wijten aan een kruisreactie tussen beide. Gezien de tijdslimiet van deze onderzoeksstage is er verder geen aandacht besteed aan de *Rickettsia* spp.

De 2 positieve signalen voor *E. canis* van de twee vrouwelijke teken uit M5U1 geven aan dat er maar 2 van de 9 teken in de betreffende unit besmet waren via de acquisitie voeding in experiment 3. Dit verklaart dat er geen overdracht heeft plaatsgevonden omdat dit een erg laag percentage is en dat er daarnaast een laag hechtingspercentage bereikt is. De kans is klein dat de vastgezogen teken ook daadwerkelijk de besmette teken waren.

Het lage aantal *E. canis* signalen bij de overige teken op de RLB geeft aan dat de acquisitie in experiment 3 niet heel succesvol is geweest. Wel is opnieuw bewezen dat de teken uit de eerst gebruikte batch teken *Rickettsia* spp. bij zich dragen, wat overigens in dit experiment ook opnieuw is overgedragen naar het schone bloed in Unit 1 op $t=32$.

Experiment 6: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

Vergeleken met experiment 5 boekten dezelfde teken opnieuw slechte resultaten. Het verschil tussen de beide proeven lag in het feit dat de teken voor de start van dit experiment 116 uur zijn geïncubeerd in tegenstelling tot de 46 uur van experiment 5. De incubatie heeft als doel om de bacterievermenigvuldiging in de teek te stimuleren om zo meer materiaal te ontwikkelen dat overgedragen kan worden. Helaas is het effect van de incubatie onvoldoende te beoordelen omdat zowel het hechtingspercentage als het besmettingspercentage in beide proeven erg laag lag. Opnieuw is het maar de vraag of het weinige aantal teken dat vastgehecht zat ook daadwerkelijk de besmette teken waren. Zoals eerder genoemd bij experiment 5 is deze batch nooit echt heel succesvol geweest qua hechting, terwijl de proefopzet in optimale conditie verkeerde met vers bloed en recentelijk gemaakte feeding units. De batch is hoogstwaarschijnlijk niet vitaal genoeg geweest of voelden ze zich niet aangetrokken tot het membraan. Op sommige telmomenten was zelfs te zien dat de teken zich vast leken te willen hechten aan het deksel in plaats van aan het membraan.



De RLB geeft aan dat er wel degelijk *Ehrlichia* spp DNA aanwezig waren in de bloedmonsters van M6U3 $t=24$ en M6U4 $t=24$, maar opnieuw is er geen signaal opgelicht voor *E. canis*. Hier valt geen exacte verklaring voor te geven.

Experiment 7: Transmissievoeding met adulte *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

Dit experiment is qua resultaten te vergelijken met experiment 6. De 40 nieuwe teken zijn 116 uur geïncubeerd en leverden vergelijkbare resultaten op qua hechtingspercentage en overdracht. Het verschil is dat de lichte catch-all signalen te zien zijn op tijdstip t=32 en niet herhaaldelijk op t=24 zoals in voeding 6. Mogelijk zijn de besmette teken op een later tijdstip vastgehecht waardoor het ook langer heeft geduurd voor de bacterie is overgedragen, of de teken hebben zich langzamer gevoed. Opnieuw is het missende *E. canis* signaal onder het catch-all signaal onverklaarbaar.

Experiment 8: Transmissievoeding met adulte *D. reticulatus* geïnfecteerd met *B. canis*

Deze teken hebben zich voorafgaand aan het experiment 5 dagen kunnen voeden op een konijn. Dit heeft ervoor gezorgd dat de teken zoekende waren naar voeding op het moment van plaatsen in de feeding unit omdat de voeding op het konijn halverwege is onderbroken. Dit heeft een positief effect op de hechting aan het membraan. Dit is echter alleen in unit 2 tot uiting gekomen, waar het hechtingspercentage veel hoger lag dan in unit 1. De teken zijn voor het starten van de voeding gesorteerd naar geslacht en grootte om twee zo gelijk mogelijke groepen te creëren, maar desondanks zijn de resultaten niet gelijk. Mogelijk heeft dit te maken met het feit dat er feeding units gebruikt zijn die in opslag lagen. De recent gemaakte feeding units vertoonden lekkage waardoor overgestapt moest worden op niet zelf gemaakte units die al een aantal maanden opgeslagen lagen in een bak met hondenhaar. Van deze units was de dikte van de membranen en de datum van wrijven op de hond onbekend. Een voordeel in dit experiment was dat de *D. reticulatus* teek minder gastheer specifiek is dan de *R. sanguineus* teek (3), waardoor de hondengeur aan het membraan waarschijnlijk een minder relevant en essentieel onderdeel vormde. Desondanks kan door de weinige informatie die bekend was over de units, niks gezegd worden over mogelijke afwijkingen waardoor de teken in unit 1 niet goed hechtten.

De RLB geeft een zeer duidelijk resultaat voor transmissie van *B. canis* na 22 uur. Beide signalen op zowel t=22 als t=30 komen uit bloedmonsters van unit 2, wat in de lijn der verwachting lag gezien het feit dat het hechtingspercentage in die unit substantieel hoger lag dan in unit 1. Bij het meetmoment op t=46 was het hechtingspercentage verlaagd ten opzichte van de dag ervoor wat een mogelijke verklaring vormt voor het feit dat er op t=46 geen overdracht meer zichtbaar is op de RLB.

Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat *B. canis* succesvol overgedragen wordt door *D. reticulatus* teken binnen 22 uur in een in vitro proefopzet.

Experiment 9: Transmissievoeding met *R. sanguineus* besmet met *E. canis*

Bij dit experiment zijn de teken gebruikt uit experiment 7 waar opnieuw slecht resultaat mee geboekt is. De mortaliteit lag hoger dan in de voorgaande experimenten met teken uit deze batch, wat aangeeft dat de batch in kwaliteit achteruit ging naarmate de tijd vorderde. Het bloed is gedurende de voeding niet donker verkleurd en was ook erg vers dus daar ligt waarschijnlijk geen aanwijsbare oorzaak voor de hoge mortaliteit.

Zoals verwacht ontstonden er geen positieve signalen op het RLB membraan. Het lijkt niet raadzaam om met deze batch teken vervollexperimenten in te zetten.

Conclusie

In dit onderzoek is aangetoond dat er succesvol acquisitie en transmissie kan plaatsvinden van *E. canis* door *R. sanguineus* teken in een in vitro voedingssysteem. Een acquisitievoeding van 88 uur geeft de teken genoeg tijd om voldoende *E. canis* op te nemen om deze vervolgens over te dragen op schoon bloed.

De transmissie van *E. canis* wordt bereikt binnen 8 uur na starten van de voeding in de experimentele proefopzet.

Tijdens de voedingen dient er constant gestreefd te worden naar optimale condities. Zo dient het membraan de juiste dikte te hebben voor penetratie en moet de geur van de voornaamste gastheer van de *R. sanguineus* teek zo adequaat mogelijk geïmiteerd worden om de attractiviteit te verhogen. Ook is hygiëne een belangrijk aspect. Het bloed dient zo steriel mogelijk afgenomen en opgeslagen te worden om het zo lang mogelijk vers en dus attractief te houden voor de teken. Daarnaast is uiterste zorgvuldigheid noodzakelijk betreffende de monsternamen om eventuele besmetting te voorkomen.

Het effect van het incuberen van teken vereist nader onderzoek. De gebruikte teken uit de batch uit Zuid-Afrika hebben een dusdanig laag hechtingspercentage bereikt dat er geen uitspraak kan worden gedaan over het eventuele positieve effect van incubatie op de transmissie van pathogenen.

In dit onderzoek is ook aangetoond dat er transmissie kan plaatsvinden van *B. canis* door *D. reticulatus* teken in hetzelfde in vitro voedingssysteem als de *R. sanguineus* teek. Wel was het in dit onderzoek nodig om de teken eerst vijf dagen te voeden op konijnen, het zgn. 'pre-feeding', voordat de teken vervolgens werden doorgezet in de in vitro proefopzet.

De transmissie van *B. canis* wordt binnen 22 uur na starten van de voeding in de experimentele proefopzet bereikt. Aangezien in dit onderzoek niet uitgebreid gewerkt is met de *D. reticulatus* teek kan er weinig gezegd worden over de benodigde factoren om optimale voedingscondities te bereiken.

In dit onderzoek is ook eenmalig de overdracht van *Rickettsia spp* aangetoond, maar door de tijdslimiet van deze onderzoeksstage is geen nader onderzoek naar aanleiding van deze resultaten gedaan. Deze overdracht is tot stand gekomen binnen 24 uur na starten van de in vitro voeding.

Aanbevelingen

Voor wat betreft de transmissie van *E. canis* door *R. sanguineus* teken is een vervolgonderzoek is nodig om het exacte moment van hechting en exacte moment van overdracht nader te bepalen. In de optimale situatie zouden de teken 24 uur per dag gemonitord moeten worden zodat precies kan worden vastgesteld wanneer de teken zich vasthechten. Op die manier kan er nauwkeuriger uitspraak worden gedaan over momenten van transmissie. Ook kan er frequenter worden gemonsterd om het interval tussen hechting en transmissie te verkleinen.

Voor de volgende in vitro voedingen is het aan te raden dat er teken worden gebruikt die in een optimale conditie verkeren. Hierdoor wordt waarschijnlijk een hoger hechtingspercentage bereikt waardoor er meer kans is op transmissie van de bacterie. Vervolgens zou het mogelijk zijn om het effect van incubatie nader te bestuderen door een parallel experiment op te zetten met 2 feeding units met geïncubeerde teken en 2 feeding units met teken die direct uit de stoof komen. Zo ontstaat er meteen een negatieve controle groep. Wanneer er gewerkt wordt met besmette kolonies uit het veld moet er gestreefd worden naar een zo hoog mogelijke besmettingsgraad om zeker te zijn van overdracht.

Tenslotte is vervolgonderzoek is nodig om te kijken naar de mogelijkheden van volledige in vitro voeding voor transmissie van *B. canis* door *D. reticulatus* om zo het voeden op een levend proefdier te kunnen omzeilen.

Referenties

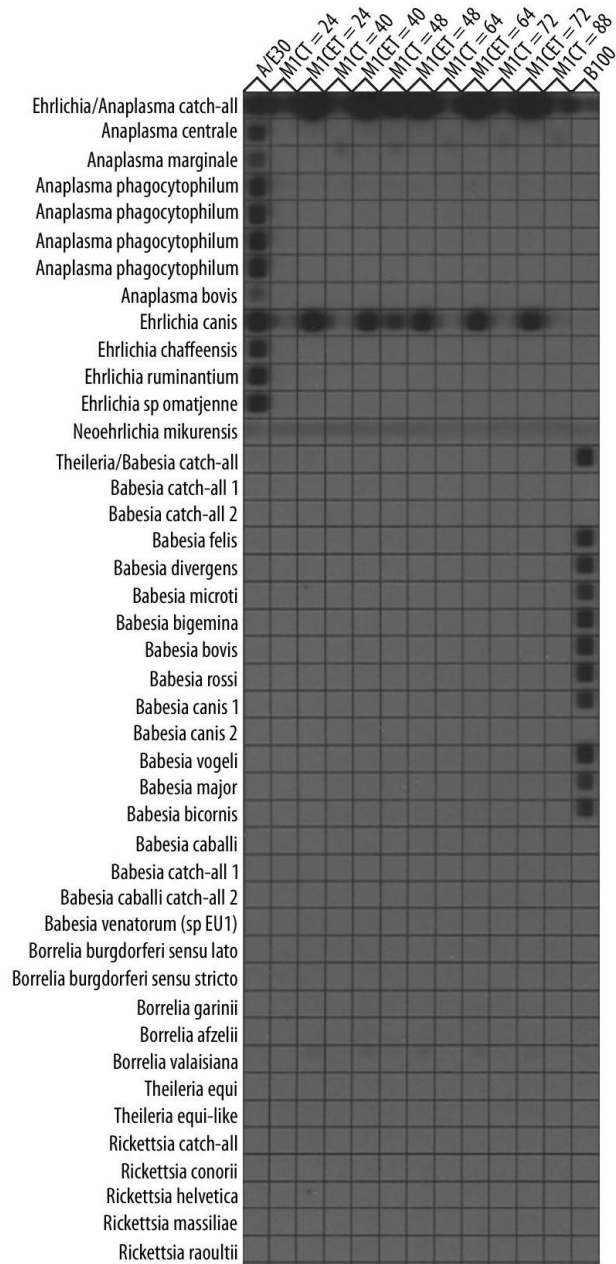
1. **Blaauw, F.** (2009) Pilotstudie naar de transmissie van *Ehrlichia canis* met behulp van in vitro membraanvoeding en capillairvoeding & Het voorkomen van *Ehrlichia canis* en *Rhipicephalus sanguineus* in Europa en Nederland. *Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht, Departement Infectieziekten & Immunologie*.
2. **Bodaan, C., Nijhof, A.M., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jansen, S., Jongejan, F.** (2007) Teken en door teken overdraagbare pathogenen bij gezelschapsdieren. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 132 (13) 517-523
3. **Bonga, M.** (2011) Transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken. *Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht, Departement Infectieziekten & Immunologie*.
4. **Dantas-Torres, F.** (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* **152**, 173-185
5. **Guerin, P.M., Krober, T.** (2007) In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, **23**(9), 445-449
6. **Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A.W.C.A.** (1999) Recent advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**-9, 2745-2749
7. **Jongejan, F., Fourie, J.J., Chester, S.T., Manavella, C., Mallouk, Y., Pollmeier, M.G., Baggot, D.** (2011) The prevention of transmission of *Babesia canis canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs using a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene. *Veterinary Parasitology* **179**, 343-350
8. **Kemp, D.H., Koudstraal, D., Roberts, J.A., Kerr, J.D.** (1975) Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology*, 70-2, 243-254
9. **Kuhnert, F. et al.** (1995) The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro. *Int. J. Parasitol.*, **25**, 887-896
10. **Lenssen, J.** (2011) The transmission dynamics of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus* ticks using an in vitro feeding system. *Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht, Departement Infectieziekten & Immunologie*
11. **Martinod, S., Brossard, M., Moreau, Y.** (1985) Immunity of dogs against *Babesia canis*, its vector tick *Dermacentor reticulatus*, and *Ixodes ricinus* in endemic area. *J. Parasit.* **71**(3) 269-273
12. **Schoeman, J.P.** (2009) Canine babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **76** 59-66
13. **Skotarczak, B.** (2003) Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med.* **10**-2 137-141
14. **Solano-Gallego, L., Baneth, G.** (2011) Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology* **181**, 48-60
15. **Stich, R.W., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Needham, G.R., Grover, D.L., Jittapalapong, S.** (2002) Detection of *E. canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally infected Ticks with a p30-Based PCR Assay. *J Clin Microbiol.* **40**(2) 540-546
16. **Taoufik, A. et al.** (2004) Reverse Lime Blot Hybridisation in the detection of tick-borne diseases. Published by Isogen Life science in Bio tech international, sept 2004
17. **Waladde, S.M. et al.** (1991) Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. *Exp. Appl. Acarol.*, **11**, 297-306
18. **Zygnier, W., Gorski, P., Wedrychowicz, H.** (2009) New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. *Pol J Vet Sci.* **12**(4) 549-555
19. UCTD protocollen (2011) *Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht*

Bijlagen

1.1 Tabel experiment 1

Experiment nr. M1: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> feeding on blood infected with Ehrlichia														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
19-9-'11 17:00 t=0	U1				5	5	10				5	5	10	
	U2				5	5	10				5	5	10	
	U3				5	5	10				5	5	10	
	U4				5	5	10				5	5	10	
	Mean													
	%													
20-9-'11 9:00 t=16	U1	3	1	4	2	4	6	0	0	0	5	5	10	<i>E. canis</i> added to the blood
	U2	1	0	1	4	4	8	0	1	1	5	4	9	
	U3	2	4	6	3	1	4	0	0	0	5	5	10	
	U4	3	3	6	2	2	4	0	0	0	5	5	10	Ticks had black crusts on them. No leakage visible.
	Mean	2	2	4,25	3	3	5,5							
	%	45	42	44	55	58	56							
21-9-'11 9:00 t=40	U1	3	2	5	2	2	4	0	1	1	5	4	9	
	U2	1	0	1	3	2	5	1	2	3	4	2	6	
	U3	4	5	9	1	0	1	0	0	0	5	5	10	2 clustered groups, leakage visible in 1 group
	U4	4	4	8	1	1	2	0	0	0	5	5	10	same as U3.
	Mean	3	3	5,75	2	1	3							
	%	63	69	65,7	37	31	34,3							
22-9-'11 9:00 t= 64	U1	4	0	4	1	3	4	0	1	1	5	3	8	
	U2	1	0	1	2	2	4	1	0	1	3	2	5	
	U3	4	3	6	1	2	3	0	0	0	5	5	10	Decided not to replace, ticks became bigger and seemed to have space.
	U4	3	3	6	2	2	4	0	0	0	5	5	10	At least 1 big male tick, visible white line. Therefore keeping the unit.
	Mean	3	2	4,5	2	2	3,75							
	%	66	40	54,5	33	60	45,4							
23-9-'11 9:00 t=88	U1	3	0	3	1	3	4	1	0	1	4	3	7	Stopped feeding M1
	U2	0	0	0	3	1	4	1	0	1	3	1	4	Ticks are not being used for transmission feeding
	U3	4	2	6	1	2	3	0	1	1	5	4	9	Surprisingly a lot of attached ticks survived
	U4	3	1	4	1	2	3	1	2	3	4	3	7	Surprisingly a lot of attached ticks survived
	Mean	3	1	3,25	2	2	3,5							
	%	63	27	48,1	38	73	51,9							

1.2 RLB experiment 1

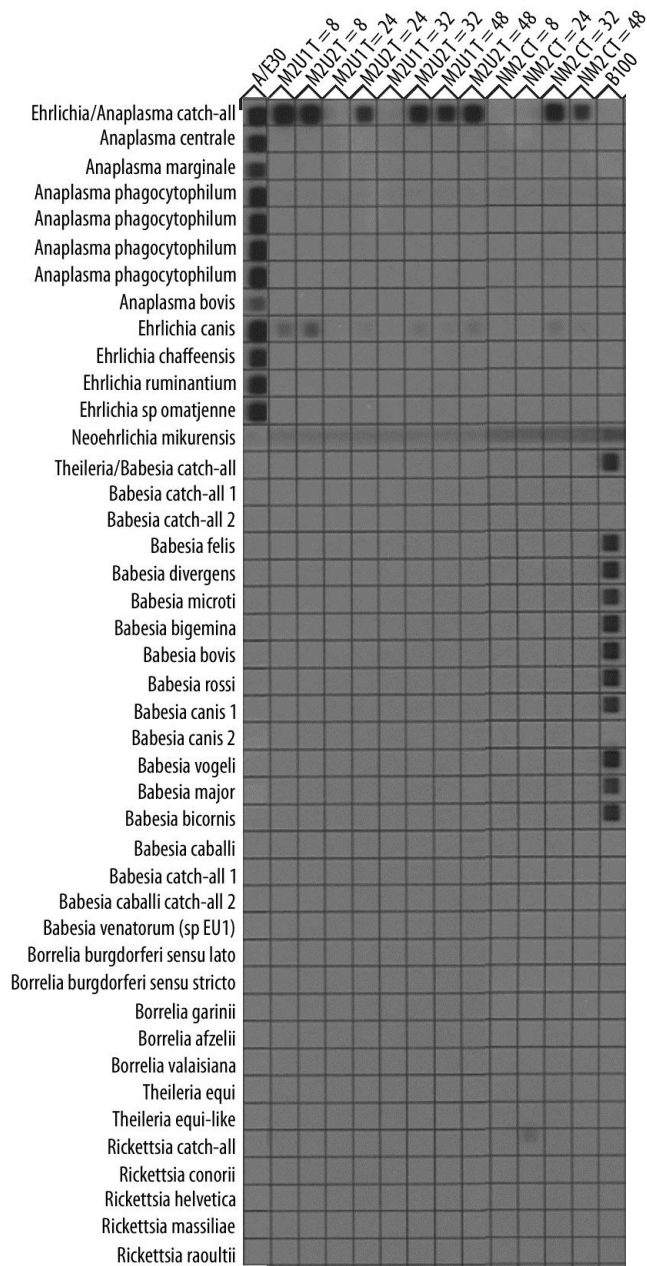


De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus*
teken in een in vitro voedingsstelsel

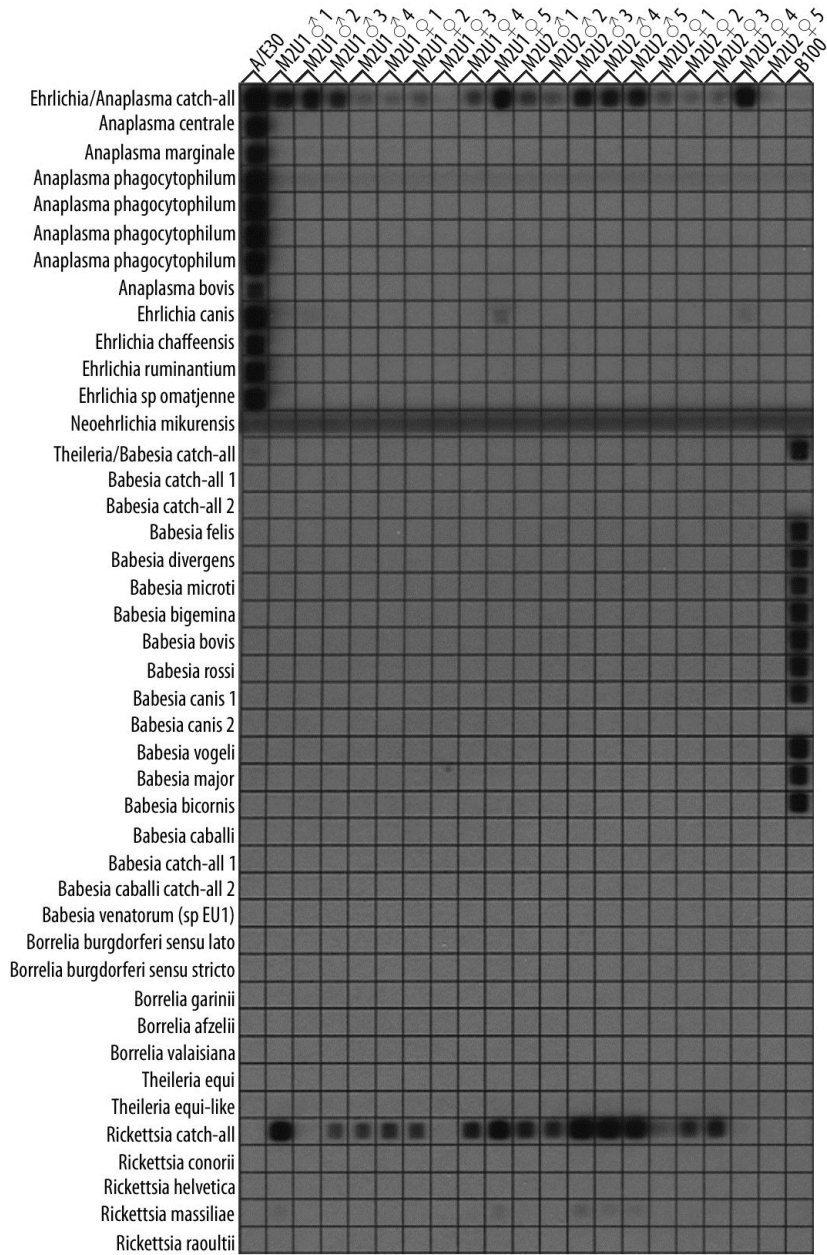
2.1 Tabel experiment 2

Experiment nr. M2: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> from M1: transmission feeding on clean blood														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
29-9-'11 9:00 t=0	U1										5	5	10	
	U2										5	5	10	
	Mean													
	%													
30-9-'11 9:00 t=24	U1	2	4	6	2	1	3	1	0	1	4	5	9	Leakage, not near to ticks, keeping the unit.
	U2	5	2	7	0	3	3	0	0	0	5	5	10	
	Mean	3.5	3	6.5	1	2	3							Control well: blood turned dark
	%	78	60	68	22	40	32							
1-10-'11 9:00 t=48	U1	2	2	4	1	0	1	1	3	4	3	2	5	Dead ticks were all part of the attached
	U2	4	2	6	1	1	2	0	2	2	5	3	8	Dead ticks were all part of the attached
	Mean	3	4	5	1	0.5	1.5							
	%	75	80	76,9	25	20	23,1							

2.2 RLB experiment 2



2.3 RLB teken experiment 2



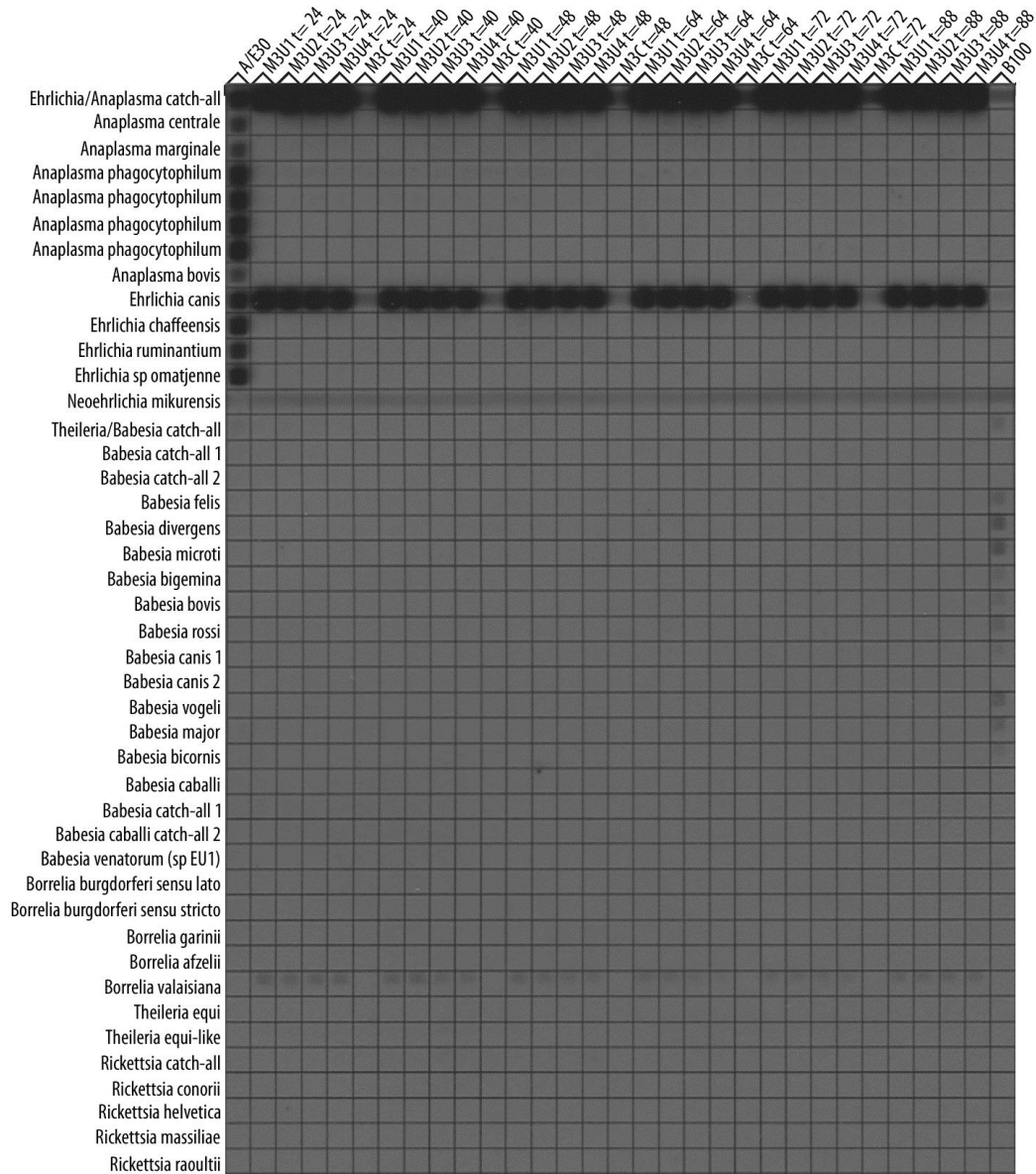
De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus*
teken in een in vitro voedingssysteem

3.1 Tabel experiment 3

Experiment nr. M3: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> feeding on blood infected with <i>E. canis</i>														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
3-10-'11 17:00 t=0	U1										5	5	10	
	U2										3	7	10	Not enough males available
	U3										5	5	10	
	U4											5	5	10
	Mean													
	%													
4-10-'11 9:00 t=16	U1	3	0	3	1	5	6	1	0	1	4	5	9	
	U2	2	3	5	1	4	5	0	0	0	3	7	10	
	U3	0	2	2	5	3	8	0	0	0	5	5	10	
	U4	2	0	2	2	5	7	1	0	1	4	5	9	
	Mean	2	1	3	2	4	6,5							
	%	44	23	32	56	77	68							
5-10-'11 9:00 t=40	U1	0	0	0	4	5	9	0	0	0	4	5	9	
	U2	3	1	4	0	6	6	0	0	0	3	7	10	
	U3	2	1	3	3	4	7	0	0	0	5	5	10	
	U4	2	1	3	2	4	6	0	0	0	4	5	9	
	Mean	1.8	0.8	2.5	2.3	4.8	7							
	%	44	14	26	56	86	74							
6-10-'11 9:00 t=64	U1	2	1	3	2	4	6	0	0	0	4	5	9	
	U2	3	1	4	0	6	6	0	0	0	3	7	10	
	U3	4	1	5	1	4	5	0	0	0	5	5	10	
	U4	2	1	3	2	4	6	0	0	0	4	5	9	
	Mean	2.8	1	4	1.3	4.5	7.3							Control well turned dark
	%	69	18	40	31	82	60							
7-10-'11 9:00 t=88	U1	3	1	4	1	3	4	0	1	1	4	4	8	
	U2	1	1	2	0	6	6	2	0	2	1	7	8	The attached female was extremely engorged
	U3	0	0	0	1	3	4	4	2	6	1	3	4	Blood turned dark, dead Ticks were all part of the engorged
	U4	0	0	0	1	4	5	2	2	4	1	4	5	
	Mean	1	0.5	1.5	0.8	4	4.8							Control well turned dark, couldn't be sampled.
	%	57	11	24	43	89	76							

Comment: From U3 en U4 I saved the most engorged ticks, they are in the unit box but dead, maybe for testing?
U3: 3 thickest ticks saved, 1 big female
U4: 1 thick male saved

3.2 RLB experiment 3



De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus*
teken in een in vitro voedingsstelsel

4. Tabel experiment 4

Experiment nr. M4: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>B. vogelii</i> feeding on blood infected with <i>E. Canis</i>														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
10-10-'11 17:00 t=0	U1										4	6	10	
	U2										3	6	9	
	Mean													
	%													
11-10-'11 9:00 t=16	U1	0	0	0	4	4	8	0	2	2	4	4	8	Ehrlichia added to U1 and U2
	U2	0	0	0	3	3	6	0	3	3	3	3	6	
	Mean													
	%													
12-10-'11 9:00 t=40	U1	0	0	0	2	4	6	2	2	4	2	4	6	
	U2	0	0	0	1	1	2	2	2	4	1	1	2	
	Mean													Feeding ended; no ticks attached, high mortality

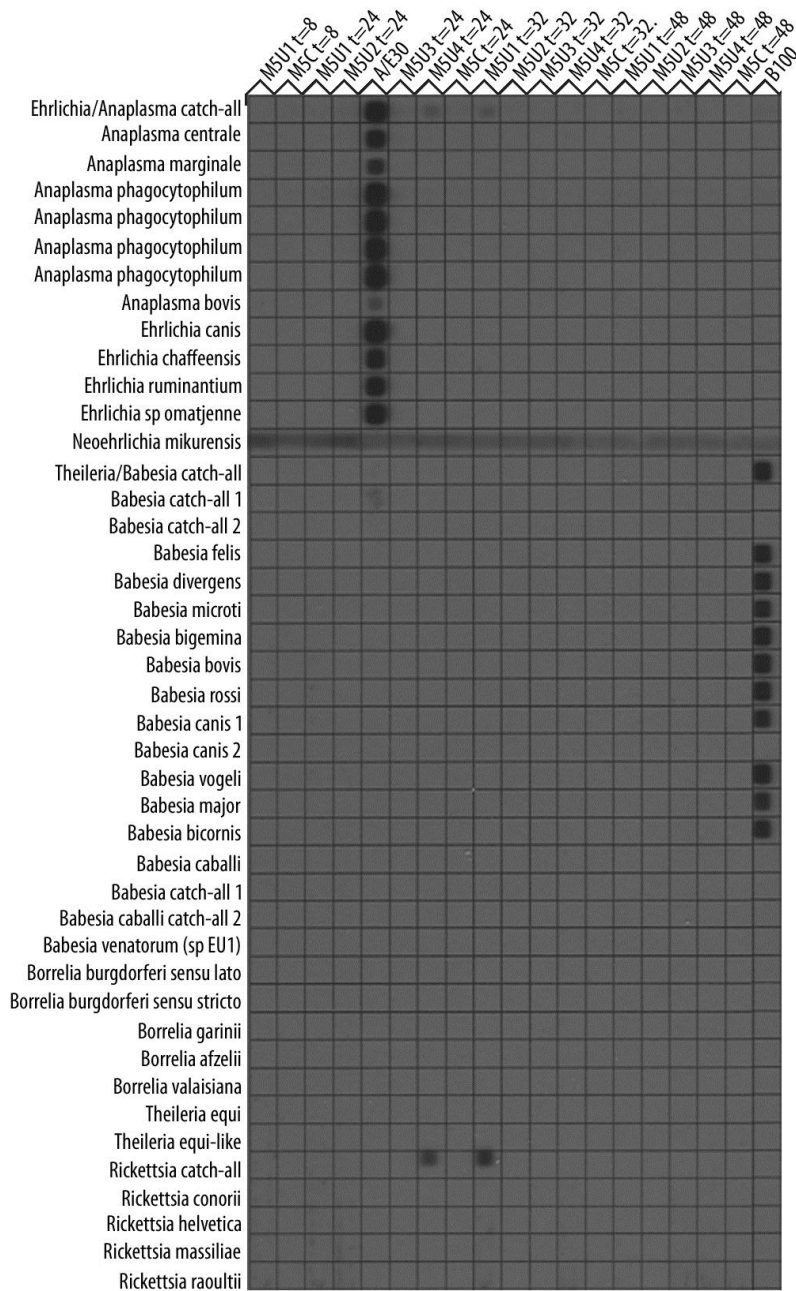
Comments: All ticks have been incubated at 38 C for 97 hours

5.1 Tabel experiment 5

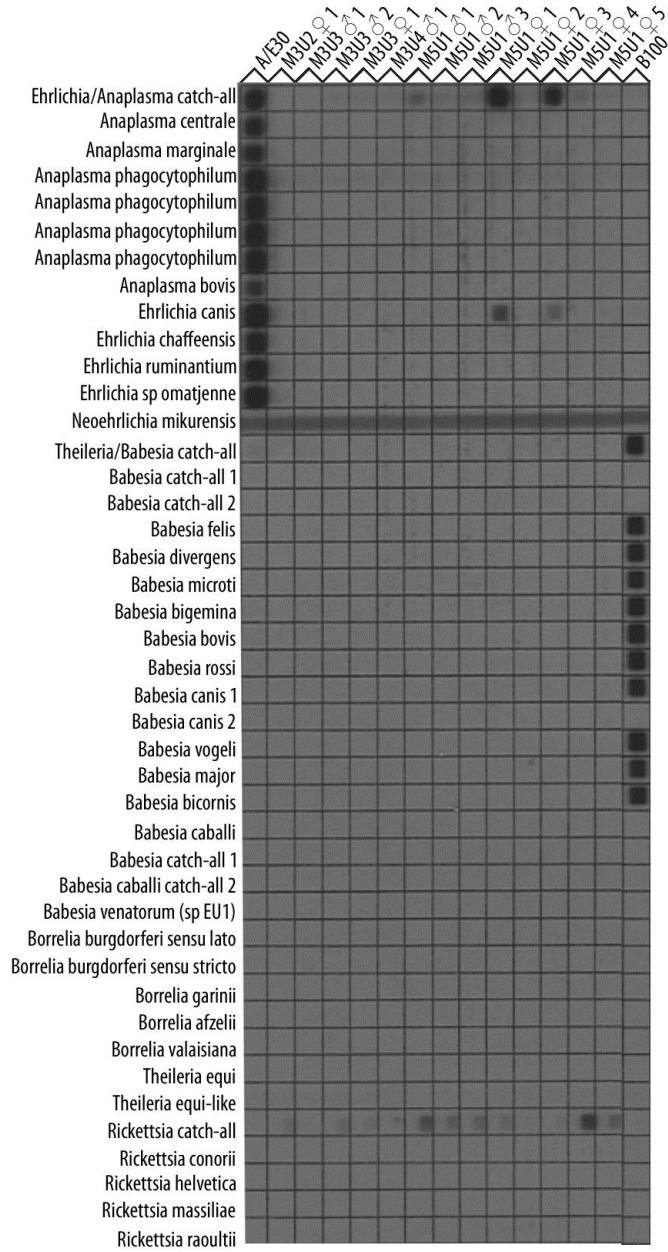
Experiment nr. M5: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infected with <i>E.Canis</i> feeding on clean blood															
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details	
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total		
19-10-'11 9:00 t=0	U1										3	5	8	Ticks from M3: M3U1: 1♀3♂, M3U2: 4♀	
	U2										5	5	10		
	U3										5	5	10		
	U4										5	5	10		
	Mean														
	%														
20-10-'11 9:00 t=24	U1	3	0	3	0	4	4	0	1	1	3	4	7		
	U2	1	1	2	2	3	5	2	1	3	3	4	7		
	U3	3	1	4	2	4	6	0	0	0	5	5	10		
	U4	1	0	1	3	5	8	1	0	1	4	5	9		
	Mean	2	0.5	2.5	1.8	4	5.8	0.8	0.5	1.3	3.8	4.5	8.3		
	%	53	11	30	47	89	70								
21-10-'11 9:00 t=48	U1	2	1	3	1	3	4	0	0	0	3	4	7		
	U2	0	0	0	2	4	6	1	0	1	2	4	6		
	U3	2	2	4	3	3	6	0	0	0	5	5	10		
	U4	1	0	1	3	5	8	0	0	0	4	5	9		
	Mean	1.3	0.8	2	2.3	3.4	6								
	%	36	17	25	64	83	75								

Comments: All ticks have been incubated at 38 C for 46 hours
At t=8 we couldn't find any attachment

5.2 RLB experiment 5



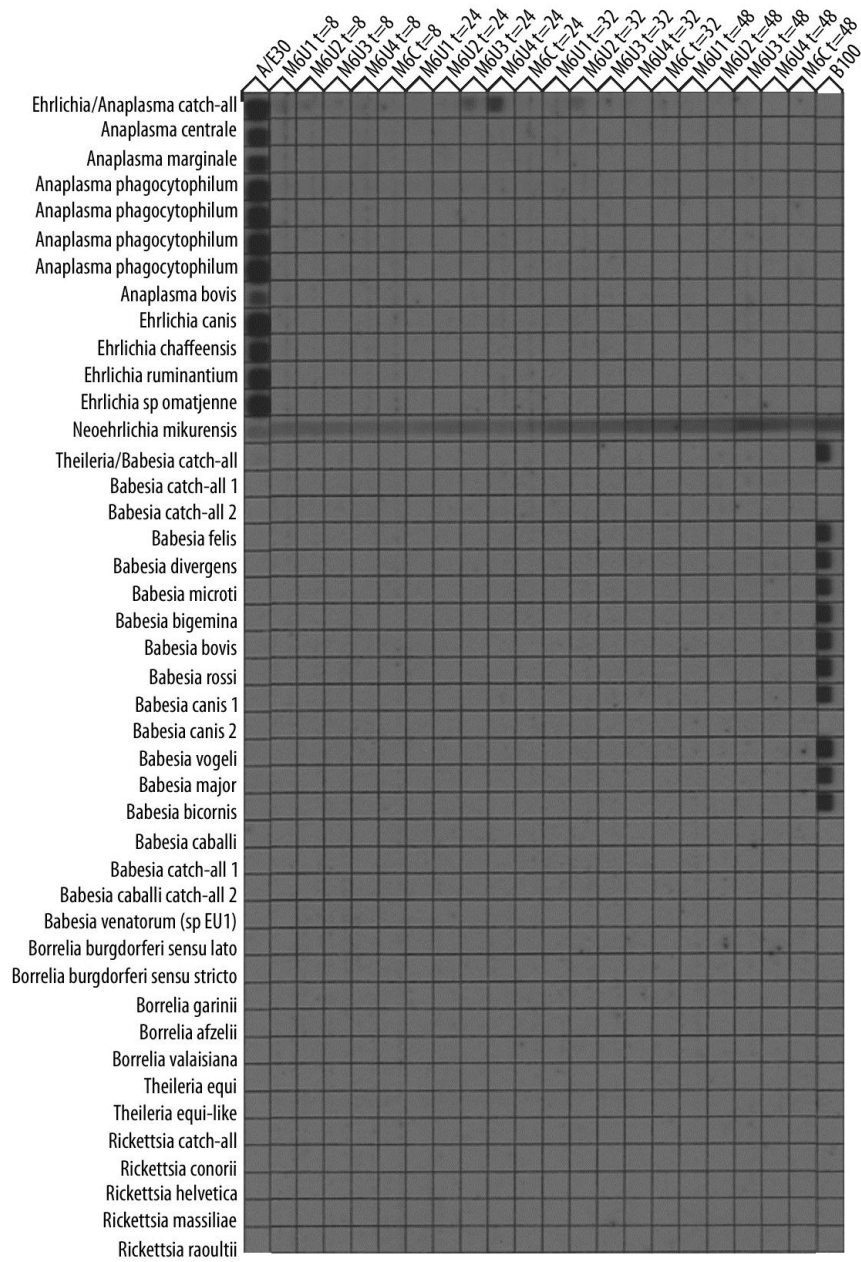
5.3 RLB teken experiment M3 en M5



6.1 Tabel experiment 6

Experiment nr. 6: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infected with <i>E. Canis</i> feeding on clean blood														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
26-10-'11 9:00 t=0	U1										5	5	10	Well with 10 fresh ticks
	U2										5	5	10	
	U3										5	5	10	
	U4										5	5	10	
	Mean													
	%													
27-10-'11 9:00 t=24	U1	2	1	3	3	3	6	0	1	1	5	4	9	
	U2	0	1	1	5	4	9	0	0	0	5	5	10	
	U3	0	1	1	2	3	5	3	1	4	2	4	6	
	U4	1	2	3	4	3	7	0	0	0	5	5	10	
	Mean	0.8	1.3	2	3.5	3.3	6.8							
	%	18	27	23	82	73	77							
28-10-'11 9:00 t=48	U1	1	0	1	3	4	7	1	0	1	4	4	8	
	U2	1	1	2	2	3	5	2	1	3	3	4	7	
	U3	0	0	0	1	3	4	1	1	2	1	3	4	
	U4	1	1	2	2	4	6	2	0	2	3	5	8	
	Mean	0.8	0.5	1.3	2	3.5	5.5							
	%	27	13	19	73	87	81							
Comments: Incubated for 116 hours, ticks from M5 were used, dead ticks replaced with new ones At t=8 we could barely find some attachment														

6.2 RLB experiment 6

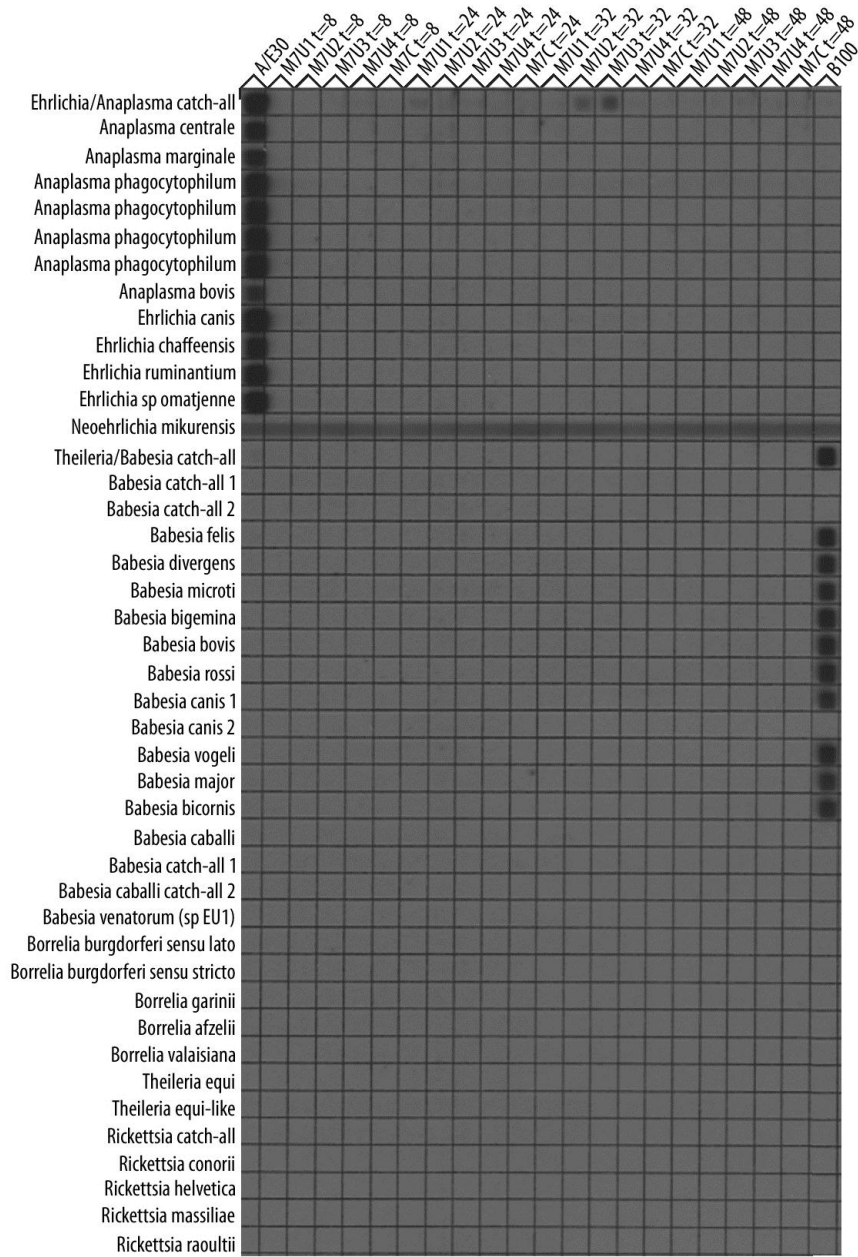


De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus*
teken in een in vitro voedingsstelsel

7.1 Tabel experiment 7

Experiment nr. M7: New Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infected with <i>E.canis</i> feeding on clean blood														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
2-11-'11 9:00 t=0	U1										4	6	10	
	U2										5	5	10	
	U3										5	5	10	
	U4										5	5	10	
	Mean													
	%													
3-11-'11 9:00 t=24	U1	0	1	1	3	4	7	1	1	2	3	5	8	
	U2	0	2	2	5	3	8	0	0	0	5	5	10	
	U3	2	2	4	2	3	5	1	0	0	4	5	9	
	U4	3	1	4	2	4	6	0	0	0	5	5	10	
	Mean	1.3	1.5	2.8	3.3	3.3	6.5							
	%	28	32	30	72	68	70							
4-11-'11 9:00 t=48	U1	2	1	3	1	4	5	0	0	0	3	5	8	
	U2	2	1	3	2	4	6	1	0	1	4	5	9	
	U3	2	1	3	2	4	6	0	0	0	4	5	9	
	U4	1	0	1	4	5	9	0	0	0	5	5	10	
	Mean	1.8	0.8	2.3	2.3	4.3	6.5							
	%	44	15	28	56	85	72							
Comments: All ticks have been incubated for 119 hours at 37 C On t=8 there was some attachment: U1:0 U2:0 U3:2 U4:1														

7.2 RLB experiment 7

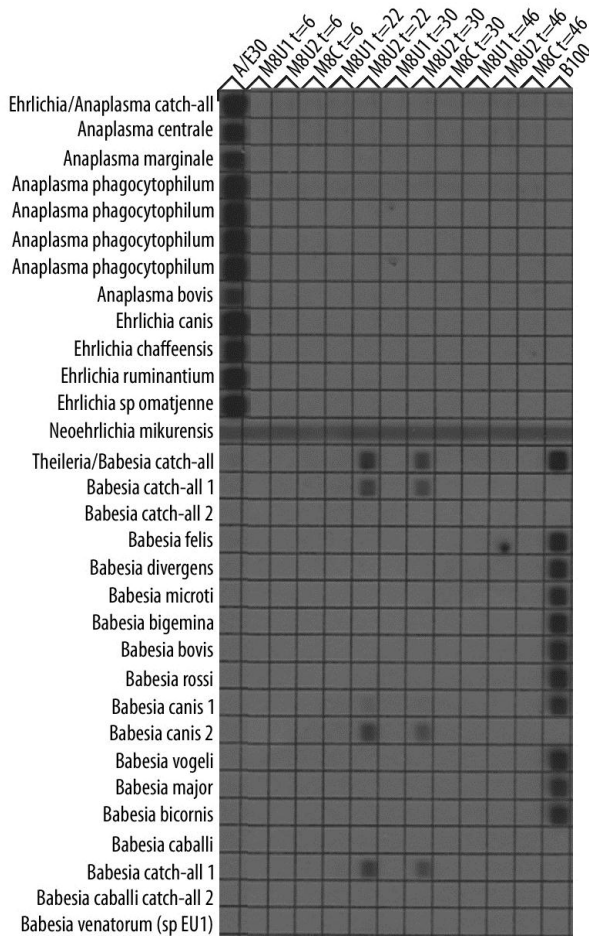


8.1 Tabel experiment 8

Experiment nr. M8: Adult <i>Dermacentor reticulatus</i> infected with <i>B. canis</i> feeding on clean blood														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
2-11-'11 11:00 t=0	U1										6	3	9	At t=8 0 attached
	U2										7	2	9	At t=8 2 attached
	Mean													
	%													
3-11-'11 9:00 t=22	U1	0	1	1	6	2	8	0	0	0	6	3	9	
	U2	4	2	6	3	0	3	0	0	0	7	2	9	
	Mean	2	1.5	3.5	4.5	1	5.5							
	%	31	60	39	69	40	61							
4-11-'11 9:00 t=46	U1	1	0	1	4	3	7	1	0	1	5	3	8	
	U2	2	2	4	5	0	5	0	0	0	7	2	9	
	Mean	1.5	1	2.5	4.5	1.5	6							
	%	25	40	29	75	60	71							

Comment: All ticks have been put on a rabbit for 120 hours
On t=8 there was some attachment: U1: 0 U2:2

8.2 RLB experiment 8



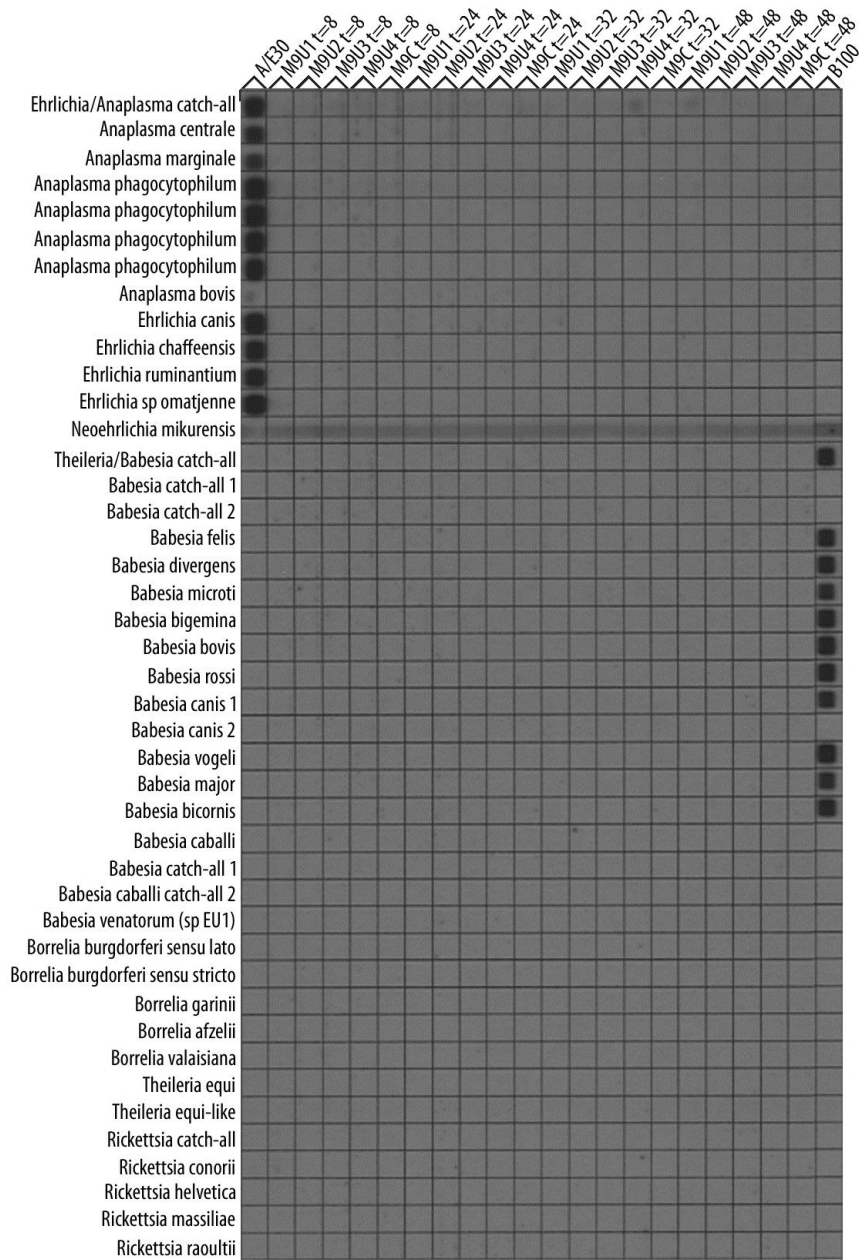
De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus*
teken in een in vitro voedingssysteem

9.1 Tabel experiment 9

Experiment nr. M9: Adult <i>Rhipicephalus sanguineus</i> from M7 infected with <i>E.canis</i> feeding on clean blood														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
8-11-'11 9:00 t=0	U1										5	5	10	At t=8 1 attached
	U2										4	6	10	At t=8 2 attached
	U3										5	5	10	At t=8 2 attached
	U4										5	5	10	At t=8 1 attached
	Mean													
	%													
9-11-'11 9:00 t=24	U1	0	0	0	4	4	8	1	1	2	4	4	8	
	U2	2	2	4	2	4	6	0	0	0	4	6	10	
	U3	1	1	2	3	3	6	1	1	2	4	4	8	
	U4	2	1	3	1	3	4	2	1	3	3	4	7	
	Mean	1.3	1	2.3	2.5	3.5	3.5							
	%	33	22	28	67	78	72							
10-11-'11 9:00 t=48	U1	0	1	1	3	3	6	0	1	1	3	4	7	
	U2	1	0	1	3	3	6	0	3	3	4	3	7	
	U3	1	0	1	2	3	5	1	1	2	3	3	6	
	U4	2	0	2	1	4	5	0	0	0	3	4	7	
	Mean	1	0.3	1.8	2.3	3.3	5.5							
	%	32	7	18	68	93	82							

Comment: All ticks have been incubated for 95 hours

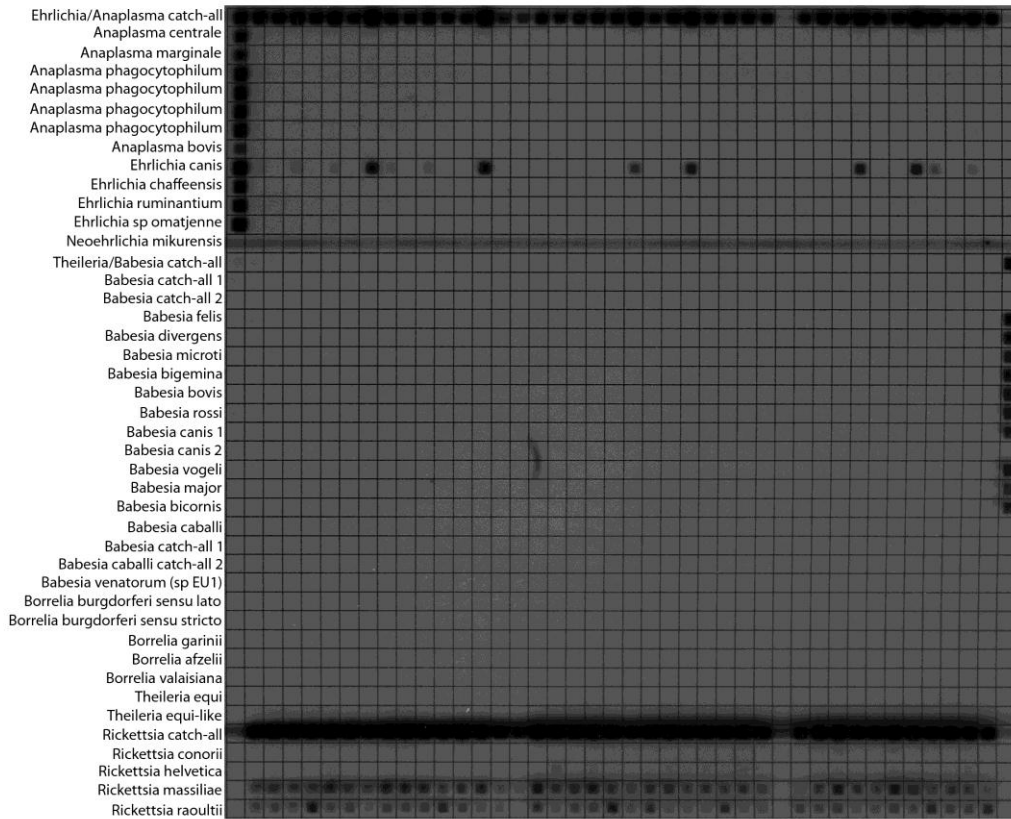
9.2 RLB experiment 9



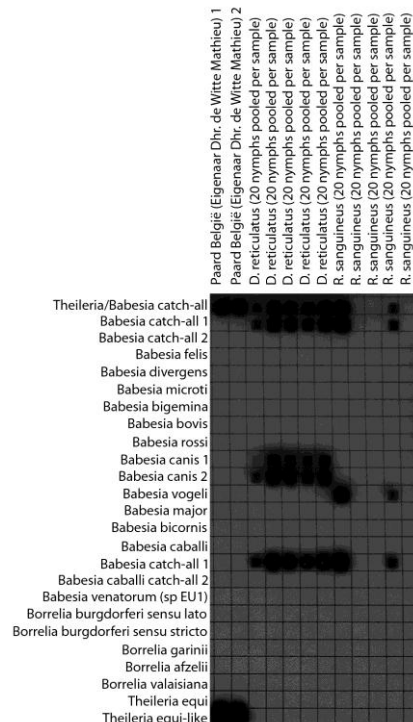
De acquisitie en transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* door *Rhipicephalus sanguineus* teken in een in vitro voedingsysteem

Bijlage 10. Besmettingsgraad *R. Sanguineus* met *E.canis* en *Dermacentor reticulatis* B.canis

18-10-2011: *R. sanguineus* + *E. canis* Batch #:E17636



19-10-2011: *D. reticulatus* + *B. canis* Batch: 600582
R. sanguineus + *B. vogeli* Batch: E49BE7



Bijlage 11: Protocol in vitro voeden

- 2 -

Materials & methods

1. Ticks: *preconditioning adult Ixodes ricinus to enhance attachment*

- 3 – 6 month post ecdysis ticks are used: obtained from a laboratory rearing at the University of Neuchâtel. Before placing them in the feeding chamber, they must be preconditioned for **at least one week**, better **3 weeks**, at 20 to 23°C and 85 to 98 % relative humidity, with 10 to 16 h light per day.

! Important: it is critical to avoid low temperatures (i.e. < 14°C) in autumn and wintertime to prevent ticks going into diapause.

2. Blood: *defibrinated blood collection and preparation*

2.1 Blood collection

- Blood is collected weekly from an abattoir, defibrinated manually, by stirring rapidly for twenty minutes with a big spoon to collect the clot which will form attached to the spoon. Blood is poured into 1 litre sterilized bottles and supplemented immediately with 2g/l glucose and stored at 4°C (KUHNER ET AL. 1995, KUHNER 1996).

2.2 Preparation of blood for feeding

- All blood preparation is carried out in a sterile hood (Scan USE-2000-120). Gentamycine and ATP are added to the blood just before the blood is exchanged in the wells. ATP must be applied freshly in order to act as attachment and/or feeding stimulus before being metabolised.

A 5 µl aliquot of a Gentamycine solution (Sigma, Germany, 10 mg/ml in sterile deionised water) is added to 10 ml of blood to achieve a final concentration of 5 µg/ml blood.

A 100 µl aliquot of ATP (Fluka, Switzerland) solution (0.1 molar in NaCl 0.9%), sterile filtered (at 0.2 µm) is added to 10 ml of blood to achieve a final concentration of 10⁻³ molar in the blood.

- The well plates are then covered with the well lid and warmed to 37°C in the water bath prior to adding the feeding units.

! Important: in all experiments, blood must be exchanged twice daily at 12 hour intervals (max interval 14 h) in each well.

- During an experiment, the membrane surface facing the blood is rinsed with sterile saline (9 g NaCl pa, Fluka, in demineralised water) before placing the feeding unit in a fresh well (with ticks still attached).
- Fungal infections under the membrane are treated daily with Nystatin solution (Sigma, Germany, 10,000 units/ml DPBS) for 10 min during the blood exchange when the daily evaluation of ticks is made.

- 3 -

- The amount of blood required for each well is 3.1 ml. For calculated examples for a whole experiment see spread sheet 'blood calc' in file 'IVF Ir method'.

3. Blood treatments: *compound preparation for adding to the blood*

The blood treatments are: control (nothing added), dimethyl sulfoxide as placebo (DMSO, Fluka, Switzerland) at 2.5 µl/ml blood, the reference agent fipronil (Pestanal, Riedel de Haën, Germany) and the test compounds made up at 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 µg in DMSO/ml blood. Four feeding units are used for each treatment concentration.

Worked example: 15 ml of blood is required for 4 feeding units, i.e. 3.1 ml/feeding unit. 37.5 µl of DMSO stock solution (containing 4 mg test product/ml) is added to give 10 µg test compound/ml blood (see spread sheet 'prod conc's' in file 'IVF Ir method').

4. Membrane preparation: *silicone membrane preparation for the tick feeding unit*

Ixodes ricinus is fed on bovine blood through a silicone membrane reinforced by Kodak® lens cleaning paper, similar to that already developed in this laboratory (Kuhnert *et al.* 1995, Guerin *et al.* 2000). This membrane is modified to increase the attachment rate of *I. ricinus* by rendering the silicone soft such that it mimics the elasticity of skin. This ensures closure of tick penetration sites on the membrane to prevent bleeding. A silicone glue is selected with a low shore hardness A (expressed in degrees) - a measure of the indentation hardness of soft materials.

4.1 Silicone preparation for the membranes

The silicone glue RTV-1 Elastosil E4, (Wacker-Chemie GmbH, München Germany) with a very low shore hardness A of about 16° is used. Mixing silicone oil (30% DC 200, ~ 10 mPa.s, Fluka, Switzerland) to the silicone glue further increases softness and reduces 'frog grip' - the sticky nature of the resulting silicone surface. 15 % Hexane is added to render the glue more fluid for application to the matrix.

Note: the mixing should be done under dry conditions (as a low relative humidity as possible) to reduce the polymerisation of the silicone to a minimum.

- **Worked example**

Quantities for a smaller amount (i.e. a quarter) given in brackets

60 g (15 g) Wacker silicone E4

0.6 g (0.15 g) Wacker FL colour paste (1 % of the silicone)

18 g (4.5 g) FLUKA DC 200 silicone oil (30 % of the silicone)

11.7 g (2.9 g) Hexane (technical quality, 15 % extra weight)

- Kodak lens cleaning paper (70 x 120 mm), a non-woven tissue made of regenerated cellulose rayon (Eastman Kodak, Rochester, NY) is used as the matrix. The lens paper is placed on a layer of kitchen plastic film (30 cm wide) which has been laid on a glass sheet, making sure that there is a 30 mm working space between each lens paper. The lens

- 4 -

paper is held down with sticky tape. The silicone mixture is spread evenly over the lens paper using a 80 mm wide scraper made from a sheet of silicone (3mm thick).

- Membranes are left to polymerize for 12 h at room conditions, or to accelerate polymerisation, for 4 to 6 h in 80 to 90 % humidity at 25°C.
- The thickness of every membrane is measured using micro callipers, and only those between 70 to 110 µm are used.

5. Feeding Units: *preparation*

See figures at back of manual

- The feeding units are made of Plexiglas® tubing (26 mm i.d., 2 mm wall thickness, 45 mm high) with a ring made of acrylic glass fixed around each tube to limit the depth (4 mm) to which the unit sinks into the blood in the wells (Fig 1). The feeding membrane is attached to the angled (1 deg) lower end of the tube (Fig 3) using silicone glue (Wacker Elastosil E4) and left to dry (min. 3 h). See Fig. 3 for a construction drawing of an acrylic feeding unit **at the end of the manual**.
- To improve the attachment rate of the ticks to the membrane, a piece of glass fibre mosquito netting (1.4 mm mesh, 25 mm diameter) is cut out by using a 25 mm cutting tool. The netting is glued to the membrane in the feeding unit with silicone glue (WACKER Elastosil E4) and left to dry (Fig. 2).
- Following this, the membranes are cut flush with the outer wall of the feeding unit using scissors and the feeding units are checked for leaks by sitting them in Petri dishes with 70% ethanol for 20 min.
! Important: it is critical that the ethanol does not enter the feeding unit.
- Check for any holes in the membrane under a stereo microscope and repair any small holes using Wacker E41 silicone diluted with 40% toluene with a fine paint brush. Strictly avoid applying thick drops of silicone.
- A plastic tile spacer (2 mm thick tile spacer, size of the 4 arms adjusted to the 26 mm diameter of the feeding unit) is placed on the membrane to create additional borders where ticks prefer to attach (Fig 1).

6. Attachment stimuli: *preparation*

White or light coloured bovid hair is shaven from a non treated animal. The colour of the hair is important in order to see the ticks in the feeding units, but unimportant for the extract (below). Hair is cut into 4 to 7 mm pieces and kept frozen (-20°C) in a jar for adding to the feeding unit and for preparing the cow hair extract.

Preparation of cow hair extract

Hair (50 g) is cut off a young light-coloured cow on one side and collected in a beaker. The hair is extracted in three successive 20 minute steps to increase the yield:

- 5 -

- add 250 ml of dichlormethane (DCM, Merck, extra pure grade), leave for 20 minutes then remove the solution (about 100 ml) and replace it with a fresh 100 ml of DCM. Leave this for a further 20 minutes, then remove the DCM solution (about 100 ml). Repeat this extraction with 100 ml DCM one more time.
- The three 100 ml extracts are combined. Either the extract is centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes and the supernatant is removed or the extract is filtered (Macherey & Nagel glass fiber filter MN GF-2, 0.5- μ m pores, Düren, Germany). This is then concentrated by roto-evaporation to about 100 ml and stored in a freezer at -80°C. The amount of material of low volatility per unit volume (henceforth indicated as the 'low volatile mass', LVM) is estimated by evaporating 1 ml of extract on a glass slide and weighing after 30 min at room temperature. The stock solution is adjusted to 100 mg LVM/ml.
- Prepare a working solution of 7 mg LVM/ml by diluting the stock with DCM. The working solution is kept at -20°C prior to application on to the feeding membrane.

(If the lipid extraction is carried out using methanol or hexane the evaporation time lasts a minimum of 30 minutes).

7. Attachment: application of attachment stimuli and placing ticks in feeding units

- 75 μ l of bovid hair extract (0.5 mg LVM lipids extracted from freshly shaven bovid hair with DCM applied in 75 μ l DCM per feeding unit) is applied to the membrane with a micropipette. The feeding units are placed for 15 to 30 min on a metal grid placed on top of a hot plate at 40°C to evaporate the solvent (DCM).
- The feeding units are placed in six-well cell culture plates (COSTAR, 34.8 mm diameter) with 3.1 ml of the test blood and warmed to 37°C using a thermostat-controlled water bath (740 mm long x 540 mm deep x 215 mm high) with a sloping Perspex hood to keep the air above the feeding units near 100% R.H. A warm plate may also be used but stable temperature in the blood must be assured and high humidity around the feeding units must be maintained.

! Important: the bath must subject to a **16:8 h light: dark cycle**, this is critical for attachment.

- The six-well plates with the feeding units sit on a metal support submerged 15 mm below the water surface in the water bath.
- Ten female and five male *I. ricinus* ticks are put into each feeding unit with soft forceps, covered with a 1 cm layer of cow hair, cut to a length of 4 to 7 mm, and the ensemble held down with a brass grid (25 mm diam., 3 mm mesh, 0.55 mm wire). Each feeding unit is closed with a perforated stopper (0.5 mm Sefar plastic mesh, Fig. 1).

! Important: placing the ticks in the feeding units must be carried out towards the end of the 16:8 h light: dark cycle to encourage attachment.

8. Recording data on compounds tested

- Four feeding units are used for each compound at each dose level.
- The ticks are evaluated once a day to count the number of living and dead ticks attached to the membrane as well as the unattached living and dead ticks. All dead ticks are removed from the feeding units. Knock down observations are also made.
- If a large amount of tick faeces accumulates this can be removed by gently tapping the feeding unit upside down, being careful not to dislodge any of the ticks. Sometimes faeces get stuck, especially to mating ticks and need to be removed. This is done by dislodging the faeces with a pair of forceps, being careful not to dislodge the feeding ticks.
- The feeding experiments are complete after nine days, or earlier, depending on the experimental protocol.

9. Statistical analysis

Survival curves are calculated from the numbers of dead ticks recorded per day over the different doses of each treatment using the Kaplan-Meier Statistics (KLEINBAUM 1995) with Peto test of the survdiff algorithm in S-plus (V6.2 build 6713).

10. Relevant references

Detailed accounts of this hard tick feeding assay have already been published (KRÖBER AND GUERIN 2007a and 2007b). See section 12 (Literature) of this manual

11. List of materials and suppliers

Chemicals, catalogue numbers and suppliers

NaCl (Fluka 71380, pa, > 99.5 % (AT)), for saline at 9 g/l (<http://www.sigmaaldrich.com>)

Glucose (D(+)-Glucose Monohydrate, Fluka 49159, >99 % (HPLC))

ATP (Fluka 02060, > 95.0 % (HPLC)), 10^{-3} mmolar in the blood

Gentamycine solution (Sigma G1272, sterile filtered 10 mg/ml), 5 µg/ml blood or
Gentamycine sulfate (Sigma G3632)

DMSO (dimethyl sulfoxide, Fluka 41650, > 99.0 % (GC)), 2.5 µl/ml blood as solvent for test products

Fipronil (Riedel de Haen, Pestanal 46451, > 97.5 % (HPLC)), reference acaricide

Nystatin solution (SIGMA N-1348, 100 units/ml) for treatment of fungi, 10 min daily when necessary (<http://www.sigmaaldrich.com>)

Hexane (technical grade)

Toluene (Merck, supraSolv, No 1.08389.1000)

- 7 -

Dichlormethane (DCM, Merck, SupraSolv, No 1.06054.1000)

Silicone oil DC200 ~10 mPa.s 250 ml FLUKA No. 85411

Feeding units, catalogue numbers and suppliers

Tubes Plexiglas® XT clear 29070 (<http://www.roehm.de/en/plexiglas.html>)

External diameter 30 mm, internal 26 mm, wall 2 mm (for corpus)

External diameter 40 mm, internal 30 mm, wall 5 mm (for ring)

ACRIFIX® 106, glue for ring around the feeding unit, from Plexiglas or Rhoem

Stopper (PE-Caps), 26 mm with 15 mm hole, PET netting glued with hot glue (BOSCH)

Polyester Netting Sefar, Switzerland, PET 1000 18-180W PW (www.sefar.com)

Glass fiber mosquito netting, grey, HSB Phifer Inc. Tuscaloosa, AL, USA (www.phifer.com),
Art-No 257251, on membrane

Tile spacer, 2 mm cross, white plastic, Germany

Filters

Glass fiber filter MN GF-2, 0.5-µm pore (Macherey & Nagel, Germany) or other.

Membranes, catalogue numbers and suppliers

Kitchen roll of PE cling film (Tangan No11, house brand from Migros Switzerland)

Silicone oil DC 200, ~10 mPa.s, Fluka 85411, Switzerland,

Wacker ELASTOSIL® E4 RTV-1 Silicone Rubber

(<http://www.wacker.com/internet/noc/Products/ProductsAZ>)

Wacker ELASTOSIL® COLOR PASTE FL white RAL

Wacker ELASTOSIL® E41 RTV-1 Silicone Rubber (contains Toluene, used for repairing small holes in the membrane or the sealing between the acrylic glass and membrane.

Ticks

Ixodes ricinus from lab rearing at Neuchâtel (www.unine.ch) 10 females + 5 males per feeding unit.

Illustrations

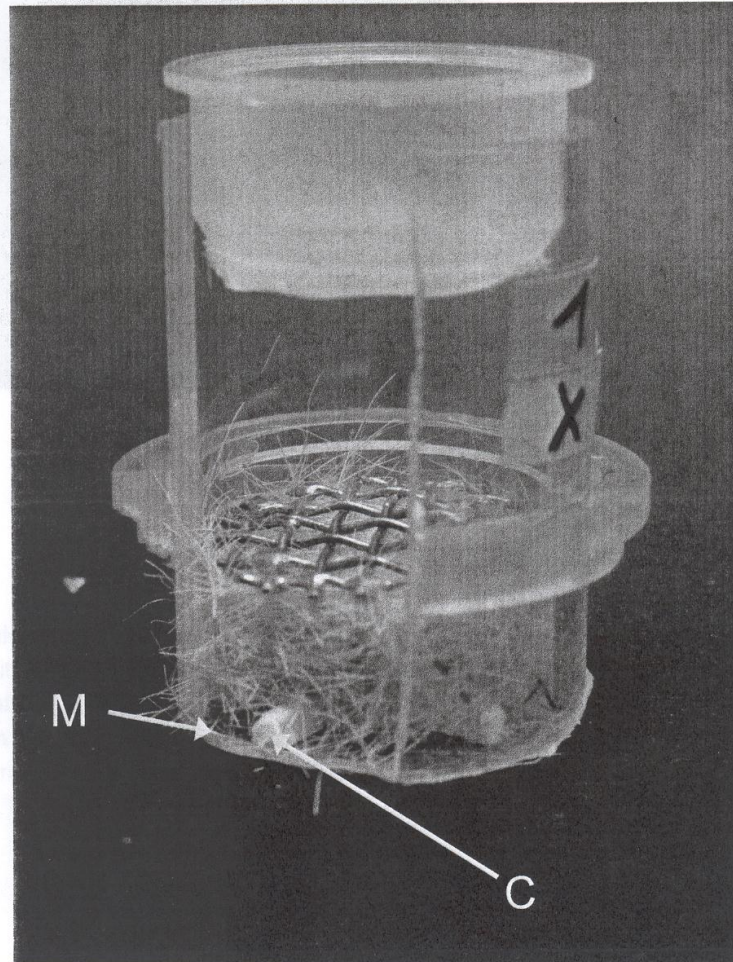


Figure 1

Cut out view of the *in vitro* feeding unit for *Ixodes ricinus* made from an acrylic glass tube (45 mm high x 30 mm o.d., 2 mm thick wall). Part of the plastic cross (C) placed on the membrane (M) is visible, and the layer of cow hair placed on the membrane is held lightly down with a brass grid. The ring around the unit assures that a layer of 2 mm of blood lies under the membrane when placed in the well. A perforated plastic stopper is inserted on top.

- 10 -

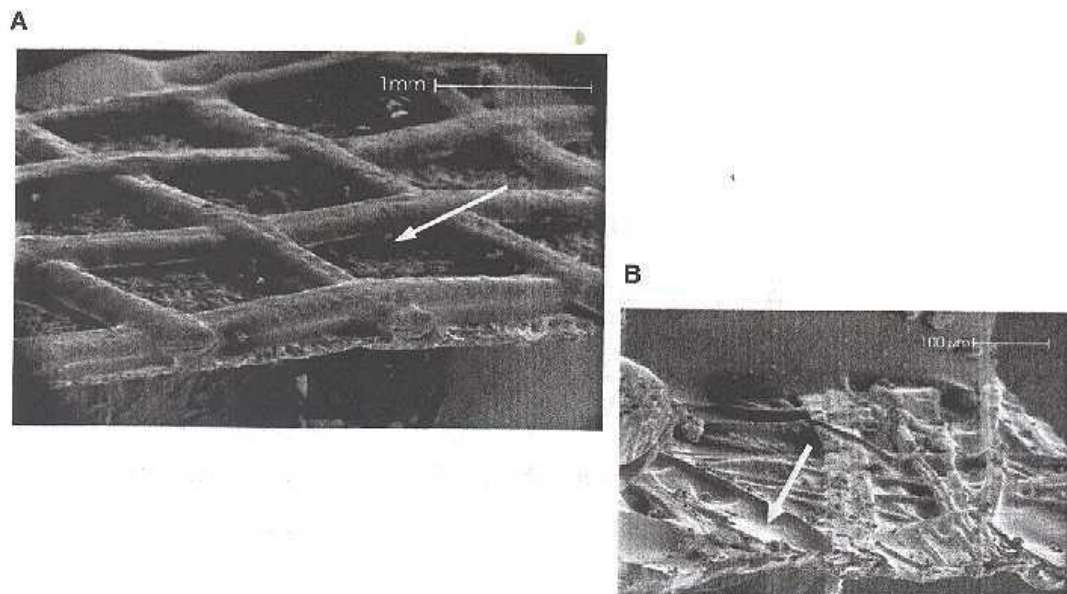


Figure 2

(A) Scanning micrograph of a feeding membrane with mosquito netting glued on to it. Only a minimum quantity of glue was used to attach the netting to the membrane so as to leave cavities (arrow) which allow the ticks to obtain a perch with their mouthparts in the membrane. (B) The spaces between the cellulose fibres of the lens cleaning paper are only partly filled with silicone providing small regions where the membrane is even thinner (arrow) than the thickness of the paper.

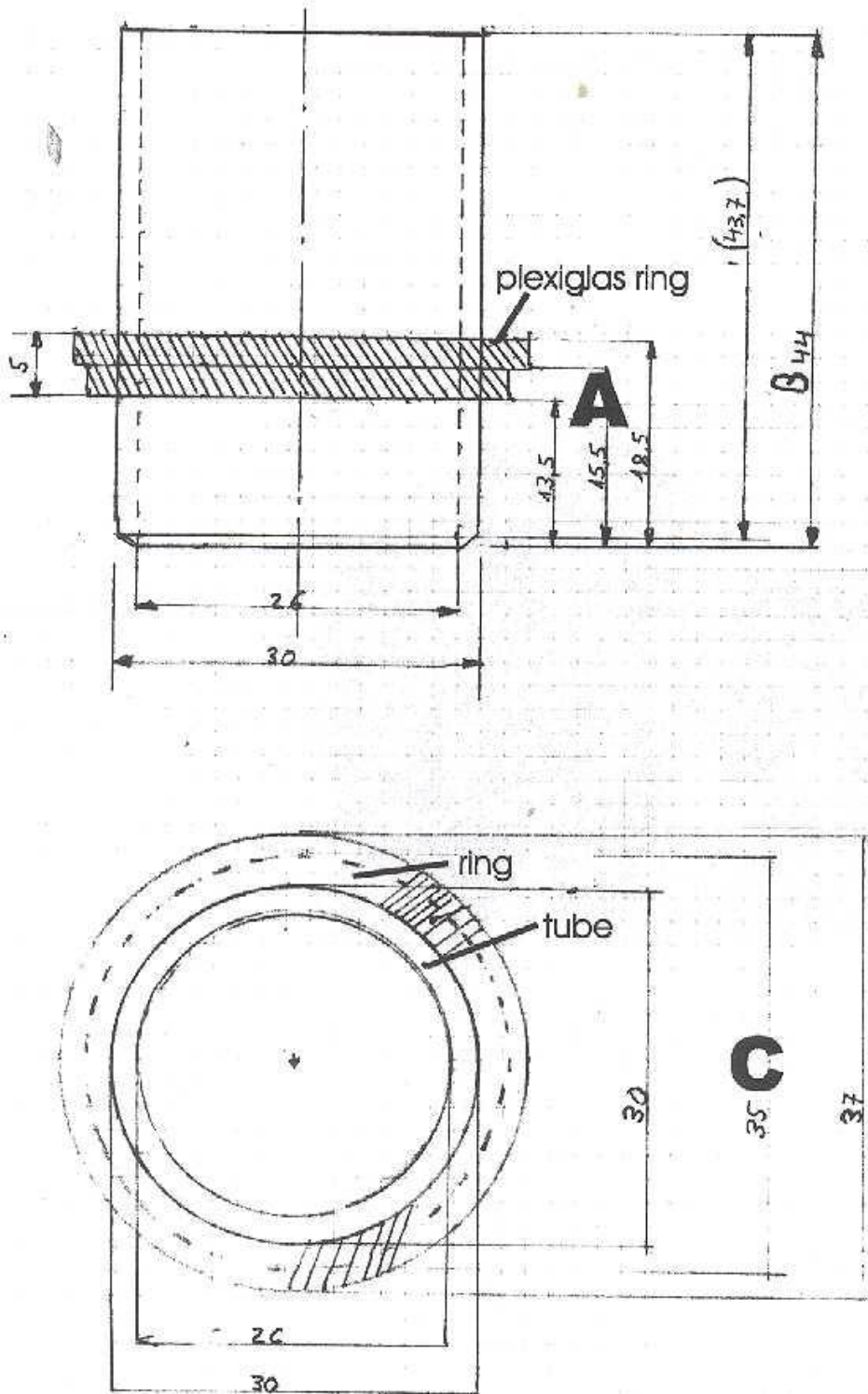


Figure 3

Construction drawing of the feeding unit made from acrylic glass tubing, scale 2 : 1 in mm; measure (A) should have ≤ 0.1 mm tolerance to ensure an equalized layer of blood under the membrane. Measure (C) should be checked for easy fitting without too much play in the well.