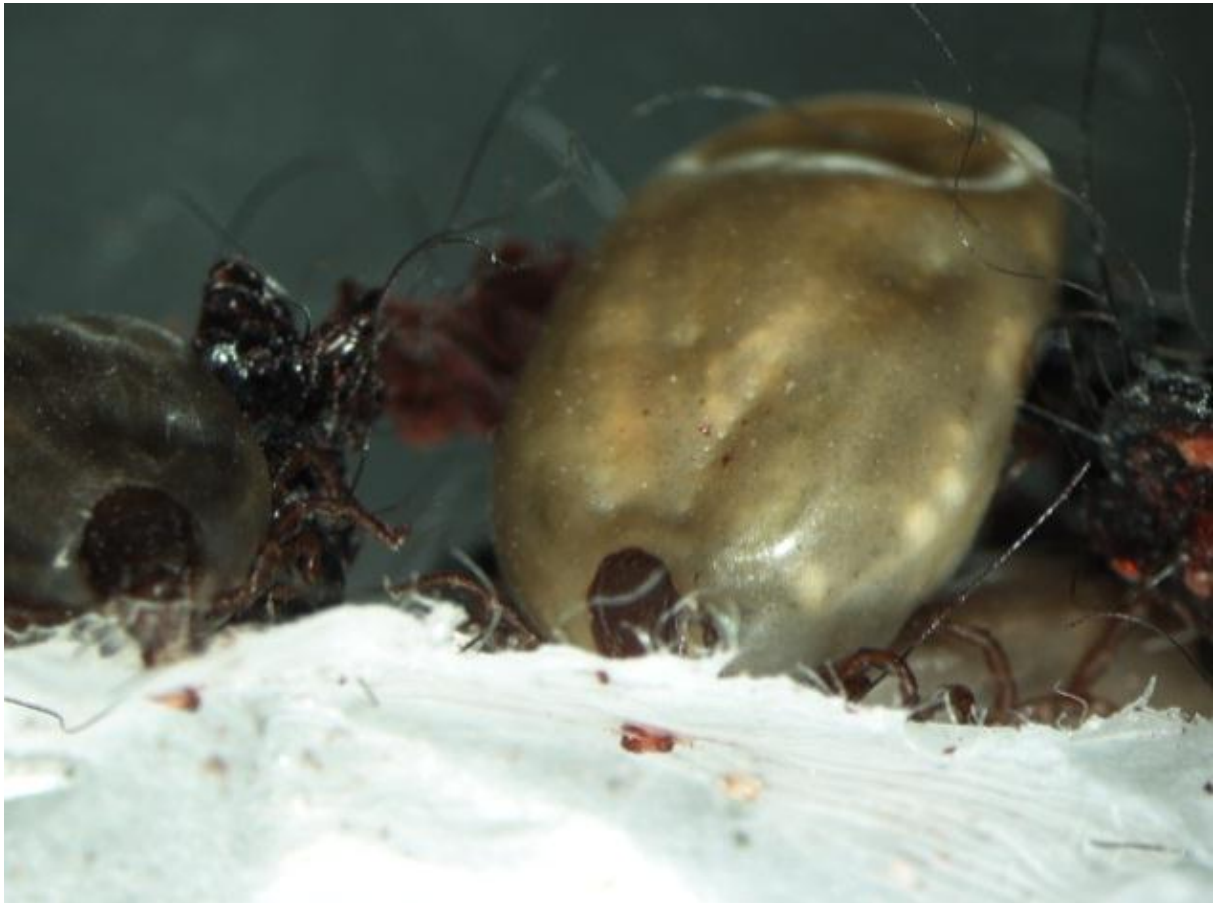


***Rhipicephalus sanguineus* en de transmissiedynamiek van *Ehrlichia canis* in een in vitro voeding systeem**



Naam: Nathanie van Dijk
Studentnr.: 3154815
Periode: 28 augustus 2011 – 28 november 2011
Lokatie: Faculteit Diergeneeskunde Utrecht;
Departement Infectieziekten & Immunologie
Utrecht Centrum voor Teken-gebonden Ziekten (UCTD)
Begeleider: Prof. dr. F. Jongejan

Voorkant: Afbeelding 1 R. Sanguineus voedt op een siliconen membraan^[bron: Eigen afbeelding]

Inhoudsopgave

Samenvatting	blz.	5
Introductie	blz.	6
- <i>In vitro</i> voedingen	blz.	6
- <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	blz.	6
- <i>Ehrlichia canis</i>	blz.	6
- <i>Babesia vogeli</i>	blz.	7
- Doel van het onderzoek	blz.	7
Materiaal en methoden	blz.	8
- Teken en pathogenen	blz.	8
- <i>In vitro</i> voeding	blz.	8
- Voorbereiden voeding	blz.	9
- Inzetten voeding	blz.	9
- Monstername en monitoring van de hechting	blz.	10
- Stopzetten voeding	blz.	10
- DNA-extractie	blz.	11
- PCR	blz.	11
- Gel-elektroforese	blz.	12
- Reverse Lime Blot hybridisatie	blz.	12
Resultaten	blz.	13
- Experiment N1	blz.	13
- Experiment N2	blz.	14
- Experiment N3	blz.	15
- Experiment N4	blz.	16
- Experiment N5	blz.	16
- Experiment N6	blz.	16
- Experiment N7	blz.	17

- Experiment N8	blz.	17
- Experiment N9	blz.	18
Discussie	blz.	19
Conclusie	blz.	22
Literatuur	blz.	23
Appendix I Tabellen en RLB's experimenten N1 t/m N9	blz.	26
Appendix II RLB besmettingsgraad <i>R. sanguineus</i> met <i>E. canis</i>	blz.	44
Appendix III RLB besmettingsgraad <i>R. sanguineus</i> met <i>B. vogeli</i>	blz.	45
Appendix IV Protocol in vitro voedingen	blz.	46

Samenvatting

In dit onderzoek is er gekeken naar de transmissie van *Ehrlichia canis*. Dit is gedaan met behulp van adulte *Rhipicephalus sanguineus* teken in een vitro voeding systeem met siliconenmembranen. Er zijn zowel teken besmet met *E. canis* via in vitro voeding gebruikt als teken ‘natuurlijk’ besmet op honden onder gecontroleerde omstandigheden in het laboratorium. Vervolgens werden de besmette teken overgebracht op niet geïnfecteerd (schoon) runderbloed en is er gekeken of en zoja wanneer er transmissie optrad.

Uit de experimenten is gebleken dat de transmissie van *Ehrlichia canis* via *Rhipicephalus sanguineus* teken binnen 8 uur, zonder voor voeden op konijnen, kan plaatsvinden. Echter hoe snel de transmissie daadwerkelijk verloopt binnen die 8 uur dient nog nader bepaald te worden.

Daarnaast is er ook gekeken naar het belang van het vooraf incuberen van de teken voordat zij in de feeding unit in een waterbad van 37 °C werden geplaatst. Opvallend was dat de geïncubeerde teken beter leken te hechten. Of de daadwerkelijke transmissie van *E. canis* bevordert wordt door het incuberen zou nog nader bepaald moeten worden door te kijken of de teek kwantitatief meer *E. canis* bevatte en of er daadwerkelijk ook meer *E. canis* op het schone bloed werd overgebracht.

Introductie

In vitro voedingen

Het in vitro voeden van teken is tot stand gekomen via het idee om teken te voeden zonder dat daar een gastheer voor nodig is. Namelijk voor het in vivo uitvoeren van de experimenten zijn proefdieren nodig. Daarbij komt het feit dat de dieren last hebben van het uitvoeren van de proeven met teken. Naast de beperking in het proefdiergerbruik, is het belangrijkste voordeel van het gebruik van in vitro voedings methoden dat de transmissie van pathogenen zonder de tussenkomst van de gastheer bestudeerd kan worden.^[7,9]

Het eerste begin wat betreft het in vitro voeden begint in 1956 met de *Boophilus microplus* larven op een luchtzak membraan van geëmbryoneerde kippen eieren^[10]. Larven van dezelfde soort werden in 1975 op dunne plakjes huid van runderen gevoed, via een weefselcultuur medium^[6,7]. Hierna zijn verschillende opties voor verschillende teken de revue gepasseerd, maar pas in 1993 werd er door Habedank en Hiepe een siliconen membraan voor het in vitro voeden van harde teken met succes toegepast^[4,7]. Verdere ontwikkelingen waren de elasticiteit van het membraan, waardoor na loslating van de teken lekkage werd voorkomen door het terugveren van het membraan^[8]. Vele teken kunnen inmiddels gevoed worden middels in vitro voeding, onder andere de harde teek *Rhipicephalus sanguineus*^[1,9].



Afb.2 *Rhipicephalus* teken: man links; vrouw rechts^[17]

Rhipicephalus sanguineus

Rhipicephalus sanguineus oftewel de bruine hondenteek is een harde teek, behorende tot de familie Ixodidae. Harde teken hebben in tegenstelling tot de zachte teken een gesclerotiseerd schild aan de dorsale zijn; bij mannelijke teken bedekt dit de gehele dorsale zijde, bij vrouwtjes slechts gedeeltelijk^[2]. De bruine hondenteek is de meest wijdverspreide teek over de wereld en kan zich in verschillende klimaten

handhaven, echter niet kouder dan subtropisch^[3]. De *Rhipicephalus* is een drie gastheren teek, wat wil zeggen dat de teek tijdens zijn levenscyclus, van ei naar larve naar nymfe naar adult, drie keer op een gastheer moet voeden. Als gastheer gebruikt *R. sanguineus* voornamelijk de hond, maar soms ook andere gastheren waaronder de mens. De pathogenen die *R. sanguineus* onder andere bij zich draagt zijn *Ehrlichia canis* en *Babesia canis*, welke beide hieronder nader zullen worden toegelicht^[2].

Ehrlichia Canis

De intracellulaire rickettsia van het genus *Ehrlichia* veroorzaakt ehrlichiose bij honden, ook wel bekend als CME (Canine Monocytic Ehrlichiosis.) De target cellen van *E. canis* zijn dan ook vrijwel altijd de monocytten. De ziekte heeft vaak een subklinisch asymptomatisch verloop, tot er voor de parasiet gunstige omstandigheden ontstaan, waardoor er acute of chronische Ehrlichiose ontstaat. In de acute vorm van CME hebben de dieren meestal koorts, apathie, zwakte met ademhalingsmoeilijkheden, verlamming en verminderde coagulatie van het bloed. De chronische vorm van CME heeft meer specifieke symptomen^[5,11].

Babesia vogeli

Babesiose bij de hond wordt veroorzaakt door verschillende *Babesia spp.* en is een protozoaire teek gebonden ziekte. *Babesia* infecties in honden worden vastgesteld op basis van de morfologische aanwezigheid van de parasiet in de erythrocyten^[13].

Babesia vogeli laat bij jonge honden vaak hemolytische anemie zien en bij oudere honden predisponerende factoren voor hemolytische anemie zoals splenomegalie of immuun gecompromitteerde condities. Dit in tegenstelling tot *Babesia canis* die als acuut klinische verschijnselen dehydratie, apathie, anorexie en koorts laat zien. Verder is er sprake van milde tot ernstige trombocytopenie, hyperfibrinogenemie, normocytische-normochrome non-regeneratieve anemie, hemolyse en neutropenie^[14].

Doel van het onderzoek

Dit onderzoek is opgezet in navolging van de onderzoeken van drs. M. Bonga en drs. J. Lenssen^[1,9]. In deze onderzoeken is getracht het in vitro voeden van *R. sanguineus* te perfectioneren. Daarnaast is in het onderzoek van drs. M. Bonga gekeken naar de acquisitie en transmissie van *E. canis*. Doel van dit onderzoek is om verder in te gaan op met name de transmissie van *E. canis*. Er wordt gekeken of en zo ja binnen welke tijd *E. canis* van de teken op het bloed kan worden overgedragen. Dit zal gebeuren met teken die onder gecontroleerde omstandigheden via een hond besmet zijn met *E. canis* en met teken die via in vitro voeding besmet zijn met *E. canis*.

Daarnaast zal in dit onderzoek geëxperimenteerd worden met het incuberen van teken. In het artikel van Stich *et al.* kwam naar voren dat geïncubeerde (80 uur bij 37 °C) teken een duidelijker PCR-signaal gaven en vaker positief werden bevonden op *E. canis*. Mogelijk zou deze incubatie op deze manier ook een gunstig effect hebben op de transmissie van *E. canis*^[15].

Materiaal en methoden

Teken en pathogenen

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van verschillende teken. De eerste batch zijn ‘schone’ adulte *R. sanguineus* teken. De teken zijn van origine afkomstig van een Franse stam, welke nu al vele generaties in het laboratorium van het UCTD aanwezig zijn.

De tweede batch teken bestaat ook uit adulte teken. Deze zijn echter deels besmet met *Ehrlichia canis*, de Bloem-Fontein stam (besmettingsgraad 19%). De teken zijn afkomstig uit Zuid-Afrika; de besmetting met *E. canis* heeft daar plaatsgevonden in het laboratorium onder gecontroleerde omstandigheden op met *E. canis* geïnfecteerde honden. De teken zijn op het UCTD aangekomen als nymfen en hier verveld.

De laatste batch bestaat uit adulte teken afkomstig uit Zuid-Afrika en is besmet met *Babesia vogeli* (besmettingsgraad 40%).

Alle teken worden bewaard in de stoof bij een bepaalde temperatuur en een luchtvochtigheid. In dit geval zijn alle teken (met uitzondering van de nymfen) bewaard bij een temperatuur van 20.6 °C en een luchtvochtigheid van 35%. Het lichtschema van de stoof bestaat uit 24 uur donker. De nymfen zijn tot de vervelling bewaard bij een temperatuur van 25.3 °C en een luchtvochtigheid van 29%. Het lichtschema van deze stoof bestaat uit 16 uur licht en 8 uur donker.

In vitro voeding

- Voeding voor de teken (3.1 ml/well)
 - o Runderbloed (mechanisch onstolbaar gemaakt).
 - o Glucose (2g/L bloed)
- *E. canis* cultuur DH82 (Dog Hybrid 1982)
- Feeding units
 - o Membranen
 - Siliconengel E4 (Elastocil[®], Wacker)
 - DC 200 siliconenolie (Sigma-Aldrich[®])
 - 15% Hexaan oplossing (Sigma-Aldrich[®])
 - Lens papier (70x120 mm) (EK1546027T, Tiffen[®])
 - Keukenfolie
 - Wacker FL colour paste (Elastocil[®], Wacker)
 - o Micro Caliper
 - o Plexiglas feeding unit (handgemaakt door WSV Kunststoffen BV)
 - Diameter 26 mm
 - Rand dikte 2 mm
 - Hoogte 45 mm
 - Op 4 mm van de bodem bevindt zich een ‘ring’ van plexiglas
 - o Siliconen dop
 - o Gaas
 - o Hondenhaar
 - o Labrador Retriever
 - o Ethanol (70%)
 - o Verfpenseel
- Celcultuurplaten 6 wells
- Waterbad (37 °C)
- Kaliumsulfatoplossing (120 g/L)

Hieronder volgt de beschrijving van de in vitro voeding van de teken. Dit is grotendeels gebaseerd op het protocol 'Feeding hard ticks in vitro' wat als bijlage (Appendix II) is bij gevoegd.

Vorbereiden voeding

Als basis voor de feeding units wordt gebruik gemaakt van het model in het artikel van Krober en Guerin. Voor het maken van de voeding moet allereerst het siliconenmembraan geprepareerd worden. Belangrijk is hierbij de dikte van het membraan dat tussen de 70 en 100 μm moet zitten. Deze dikte is van belang in verband met de lengte van de hypostoom van de teek^[7]. Nadat de membraan 24 uur gedroogd hebben worden zij op een proefhond (Labrador Retriever) gewreven, die steeds het zelfde is om de omstandigheden voor de teken in de verschillende experimenten zo constant mogelijk te houden. Vervolgens kunnen de feeding units op de membranen geplakt worden. Deze dienen drie uur te drogen voordat er controle op lekkage kan plaats vinden. Deze controle vindt plaats in een petrieschaal met ethanol 70%. Hier worden de feeding units gedurende 10 minuten in geplaatst. Hierdoor wordt naast de lekkage controle het membraan ook meteen ontsmet.

Verdere voorbereiding betreft het maken van dopjes voor de units, zodat deze de teken vlakbij



het membraan houden. Dit verkleint de loopgelegenheid en bevordert zo mogelijk een snellere hechting.

In de feeding units wordt daarna nog een 'matje' van hondenhaar geplaatst als mechanische stimulatie. Naast het maken van de feeding units dient ook het waterbad op 37 °C aangezet te worden. In het waterbad bevindt zich een 'aquarium' waarbinnen de temperatuur en luchtvochtigheid nauwkeurig gemeten kunnen worden. De luchtvochtigheid wordt gereguleerd door gebruik te maken van KSO_4 oplossing. Tijdens de proeven was de temperatuur in de binnenste ruimte gemiddeld rond de 34°C en een luchtvochtigheid van 85%. De teken worden uiteindelijk in de binnenste bak geplaatst.

Afb.3 *Rhipicephalus Sanguineus* voedt op een siliconen membraan^[bron: Eigen afbeelding]

Inzetten voeding

In alle experimenten is gepoogd gebruik te maken van vijf vrouwelijk en vijf mannelijke teken per feeding unit; een totaal van tien adulte teken per feeding unit. Afwijkingen kwamen voort uit het niet voldoende op voorraad hebben van de teken. Indien de teken geïncubeerd dienen te worden voor het experiment, worden deze vantevoren in kleine potjes in een 6 wells plaat in het waterbad geplaatst.

Er worden twee verschillende soorten voedingen ingezet. De eerste is de acquisitie voeding, waarbij geprobeerd wordt de teken *E. canis* op te laten nemen uit het bloed, de tweede voeding is de transmissie voeding, waarbij overdracht van *E. canis* in de teek naar het bloed geprobeerd wordt aan te tonen. Het bloed wat voor de voedingen wordt gebruikt is runderbloed, afkomstig van het Departement Landbouwhuisdieren op de faculteit voor Diergeneeskunde te Utrecht. Het bloed wordt zo steriel mogelijk gehouden door bij afname de te prikken plek te reinigen met alcohol. Daarna wordt het bloed opgevangen via een steriel slangetje in een steriele pot. Na het opvangen van voldoende bloed wordt het mechanisch onstolbaar gemaakt door te roeren met een 10ml pipet gedurende 20 minuten. Het stolsel wordt verwijderd en er wordt 2 g/L glucose aan het bloed toegevoegd.

Het bloed wordt verdeeld over de vier buitenste wellletjes van een 6 wells plaat. Elke well wordt voorzien van 3.1 ml bloed (transmissie voeding). Daarnaast wordt er een extra well gevuld met 2.5 ml bloed. Dit is een well waarop geen feeding unit wordt geplaatst voor controle op schoon werken. Bij de acquisitie voedingen wordt er aan het bloed, voordat het bloed over de wellletjes wordt verdeeld, Ehrlichia Canis (CDC-stam afkomstig van het Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta) toegevoegd. De hoeveelheid E. Canis kweek per welletje is 0.2 ml; dit wordt aangevuld met 2.9 ml bloed.

Voor alle voedingen is het belangrijk om te zorgen dat het bloed minstens 15 minuten de kans heeft gekregen om op te warmen naar 37 °C, zodat de teken lichaamswarm bloed aangeboden krijgen. Als het bloed is opgewarmd kunnen de teken in de units worden geplaatst en de units vervolgens in het opgewarmde bloed. Hierbij moet erop gelet worden dat er zich geen luchtballen bevinden tussen het membraan en het bloed. Het waterbad wordt hierna afgedekt met een grote doek, zodat de teken gedurende de gehele voeding (met als uitzondering bij het verversen van het bloed en de telling) in het donker zitten.

Monsternamen en monitoring van de hechting

1) Acquisitie voeding

Bij de acquisitie voeding wordt de bloedbuis waaraan de E. Canis stam is toegevoegd bemonsterd vóór de verdeling over de wellletjes. Dit gebeurt tweemaal per dag, om 09:00u 's ochtends en om 17:00u 's avonds. Hierbij wordt tweemaal een monster van 200 µl genomen in de flowkast en in twee verschillende epjes bewaard. Daarnaast wordt tweemaal een monster van 200 µl van de controle-well genomen. Voor het nemen van de monsters wordt het bloed eerst meerdere keren op en neer gepipetteerd om zo een homogene samenstelling te verkrijgen.

2) Transmissie voeding

De bemonstering bij de transmissievoedingen gebeurt bij elke verversing van het bloed. Dit wil zeggen om 09:00u 's ochtends en om 17:00u 's avonds. Van elke well worden twee monsters van 200 µl genomen in de flowkast en in twee verschillende epjes bewaard. Daarnaast wordt ook tweemaal een monster van 200 µl van de controle-well genomen. Voor het nemen van de monsters wordt het bloed eerst meerdere keren op en neer gepipetteerd om zo een homogene samenstelling te verkrijgen.

De monitoring van de hechting van de teken wordt bij beide voedingen eenmaal per 24 uur uitgevoerd, dit gebeurt tijdens de ochtend verversing. Bij de controle op hechting wordt gekeken of er teken vastzitten, zoja of dit mannen of vrouwen zijn, en worden eventuele dode teken genoteerd en verwijderd. Alle data wordt in een Excell-bestand genoteerd.

Stopzetten voeding

Als de voeding beëindigd moet worden, worden de teken nog een laatste maal beoordeeld op hechting. De teken worden vervolgens uit de unit verwijderd. Vastzittende teken dienen voorzichtig 'los getrokken' te worden om beschadiging aan de monddelen te voorkomen. Indien de teken gebruikt gaan worden voor DNA-extractie, worden zij hier volgens het protocol van het UCTD 'DNA isolatie uit de teek mbv Tissue Kit' op voorbereid. Dode en minder vitale teken worden verwijderd en in de alcohol geplaatst. De overige teken worden in de stoof geplaatst.

DNA-extractie

Uit de verkregen bloedmonsters van de verschillende experimenten wordt met behulp van de NucleoSpin® Blood kits (Macherey-Nagel) het DNA geëxtraheerd. Dit gebeurt volgens het protocol van het UCTD ‘DNA isolatie uit bloed mbv Blood Kit’. De cellen worden eerst gelyseerd, waarna vervolgens ongewenste bestanddelen worden verwijderd. Het DNA blijft in de oplossing en hecht daarna aan de kolom. Voor de DNA-extractie uit de teken is gebruik gemaakt van de NucleoSpin® Tissue kits (Macherey-Nagel). Dit gebeurt volgens het protocol van het UCTD ‘DNA isolatie uit de teek mbv Tissue Kit’; dit is gebaseerd op de handleiding van de fabrikant met enkele aanpassingen. Na DNA-extractie werden de monsters opgeslagen bij -20 °C tot de verdere verwerking^[16].

PCR

Het verkregen DNA-extract moet vervolgens geamplificeerd worden. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van het PCR-apparaat ‘Arktik™ Thermal Cycler PCR’ (TCA 0096, Thermo scientific). Deze doorloopt vervolgens verschillende cycli met bijbehorende temperaturen (zie tabel 2) om het DNA te denatureren en vervolgens met behulp van de juiste primers te amplificeren (zie tabel 1). Er vindt amplificatie plaats van een variabele regio op het 16S ribosomaal RNA gen in het geval van de *Ehrlichia* en *Anaplasma* of het 18S ribosomaal RNA gen in het geval van de *Theileria* en *Babesia*. De DNA-extracten worden voorbereid op de PCR volgens het UCTD-protocol ‘PCR ter behoeve van de Reverse Line Blot (RLB) Hybridisatie’. Voor de mix van de reactie wordt per sample gebruikt gemaakt van de onderdelen weergegeven in tabel 3^[16].

Tabel 1: Primers en hun sequentie

Pathogeen	Primers	Sequentie
<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

Tabel 2: Temperatuur cycli van het PCR programma

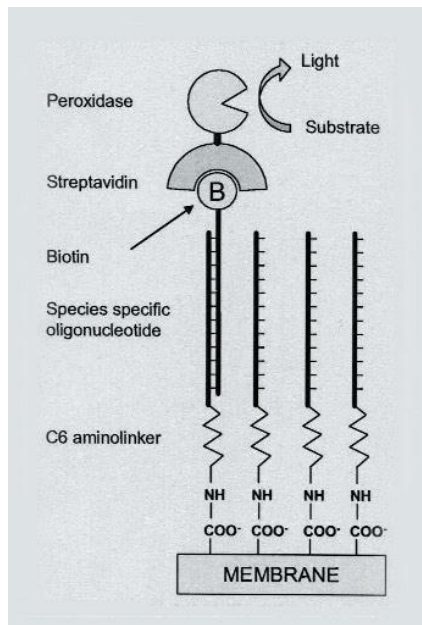
Aantal cycli	Tijd	Temperatuur
1 cyclus	30 sec	98°C
	05 sec	98°C
10 cycli	05 sec	67→57°C
	07 sec	72°C
	05 sec	98°C
50 cycli	05 sec	57°C
	07 sec	72°C
	05 sec	98°C

Tabel 3: PCR mix

Volledige mix voor 1 reactie	
5.0 µl	5x Phire reaction buffer
0.5 µl	10 mM dNTPS
0.5 µl	F primer (20pmol/µl)
0.5 µl	R primer (20pmol/µl)
	2U/µl Phire Hot Start II
0.125 µl	DNA polymerase
15.875 µl	H ₂ O

Agarose gel-elektroforese

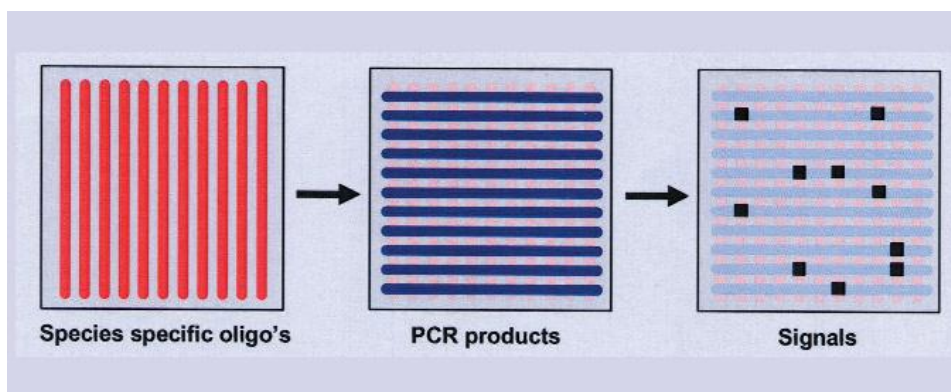
Om vervolgens te controleren of de PCR gewerkt heeft en er geen contaminatie is opgetreden, worden de positieve en negatieve controle middels elektroforese gerund op een 1.5% gel. Deze wordt daarna gecontroleerd op het voorkomen van het juiste geamplificeerde PCR product (positieve controle) en eventuele vervuilingen (negatieve controle) met behulp van UV-licht. De gel wordt gemaakt en gerund volgens het UCTD-protocol 'Agarose gel electroforese'. Hierbij wordt als buffer gebruik gemaakt van 1x TAE-buffer en wordt aan de gel Ethidiumbromide (10mg/ml) toegevoegd.



Reverse Line Blot hybridisatie (RLB)

Na het vermenigvuldigen van de DNA-extracten moeten de DNA-samples in kaart gebracht worden. Dit gebeurt met behulp van de zogenaamde Reverse Lime Blot. Hiermee is het mogelijk om tegelijkertijd verschillende pathogenen die mogelijk aanwezig zijn in de teken te detecteren en te differentieren. De PCR-producten worden gehybridiseerd op een blot waarop specifieke oligonucleotiden voor elke (bekende) *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Theileria* en *Babesia* soort covalent aan gelinkt zijn. Na verschillende wastappen, waarin onder andere losse DNA-fragmenten worden verwijderd, kunnen vervolgens via chemilluminiscentie wat weergegeven wordt in afbeelding 4, de DNA-fragmenten op een foto zichtbaar worden gemaakt ^[12,16].

Afb 4. Schematische weergave van chemilluminiscentie ^[12]



Afb 5. Schematische weergave van het RLB-principe ^[12]

Resultaten

In totaal zijn er negen experimenten uitgevoerd; allen met adulte *R. sanguineus* teken. Hieronder worden de resultaten kort per experiment uiteen gezet; uitgelegd worden het doel van het experiment, de belangrijkste opmerkingen en bevindingen bij het experiment en de hechtingspercentages. De gehele tabellen en RLB's zijn als bijlage bijgevoegd.

Experiment N1: *Adulte Rhipicephalus sanguineus* voeden op *Ehrlichia canis* besmet bloed
(aquisitie voeding)

Gestart: 19-09-2011 17:00u

Beëindigd: 23-09-2011 09:00u

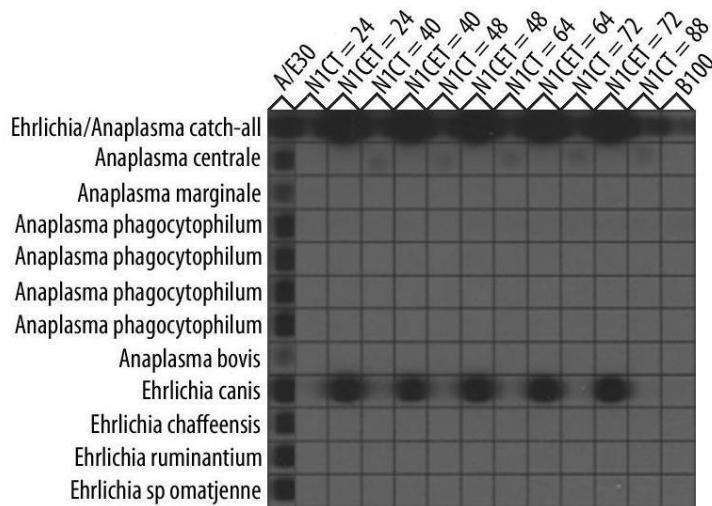
Tabel: bijlage pag. 23

RLB: bijlage pag. 24

	T=16	T=40	T=64	T=88
Hechtingspercentage ♂	55	58	79	50
Hechtingspercentage ♀	40	50	80	80
Gemiddeld:	49	55	79	59

In deze voeding hebben de teken eerst de kans gekregen om zich te hechten, voordat er *E. canis* aan het bloed is toegevoegd (op T=16). In unit 4 echter, was er slechts één teek gehecht, daarom is besloten hier pas op T=40 *E. canis* aan toe te voegen. Opvallend bij deze voeding was dat bij het stopzetten van de voeding in zowel unit 3 als in unit 4 alle teken die vastzaten dood waren. Echter er was geen lekkage op getreden.

Experiment N1:
Adulte Rhipicephalus sanguineus voeden op *Ehrlichia canis* besmet bloed



Op de RLB is te zien dat het bloed bij elke verversing een duidelijk *E. canis* signaal geeft (CET=Controle Ehrlichia Tijd). Ook is te zien dat alle controles geen signaal geven (CT=Controle well Tijd).

Experiment N2: *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* in experiment N1 voeden; 70 uur geïncubeerd op schoon bloed

Gestart: 29-09-2011 09:00u

Beëindigd: 01-10-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag.25

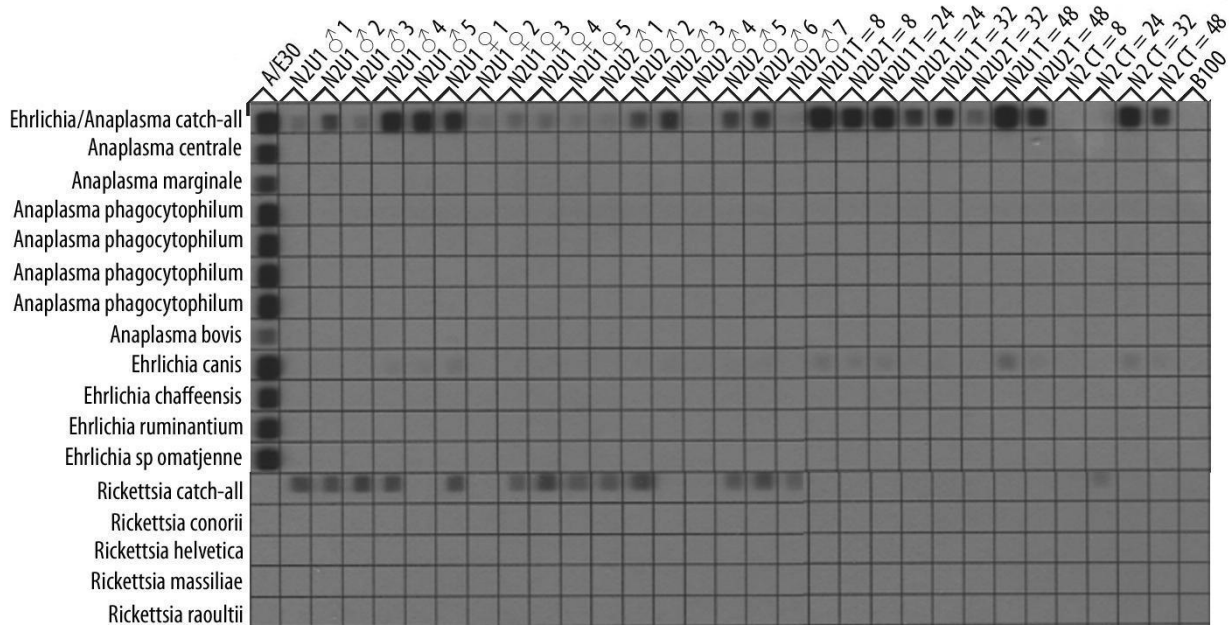
RLB: bijlage pag. 26

	T=24	T=48
Hechtingspercentage ♂	83	70
Hechtingspercentage ♀	80	75
Gemiddeld:	82	71

De overige teken van N1 zijn in dit experiment ingezet om te proberen transmissie van *E. canis* te bewerkstelligen. Er zijn slecht twee units ingezet, waarvan er één alleen mannelijke teken bevatte (7 teken). Op de RLB is te zien dat 15 van de 17 teken, sommige een heel licht, een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal geven. Slecht bij één teek, unit 1 vrouw vijf, (N2U1 ♀5) is een heel licht *E. canis* signaal te zien. Daarnaast geven 13 van de 17 teken een Rickettsia catch-all signaal. Ook de meeste bloedsamples geven een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal; sommigen daarvan geven ook een *E. canis* signaal: unit 1 en 2 op T=8 en (heel licht) en unit 1 op T=48. Opvallend is dat ook twee van de controles (op T=32 en T=48) een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal geven en op T=32 zelfs licht een *E. canis* signaal.

Experiment N2:

Adulte Rhipicephalus sanguineus geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* in experiment N1 voeden op schoon bloed



Experiment N3
(transmissie voeding)

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* voeden op schoon bloed; U1 en U2 140 uur geïncubeerd

Gestart: 04-10-2011 09:00u

Beëindigd: 07-10-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 27

RLB: bijlage pag. 28

	T=24	T=48	T=72
Hechtingspercentage ♂	68	53	50
Hechtingspercentage ♀	40	35	33
Gemiddeld:	54	44	41

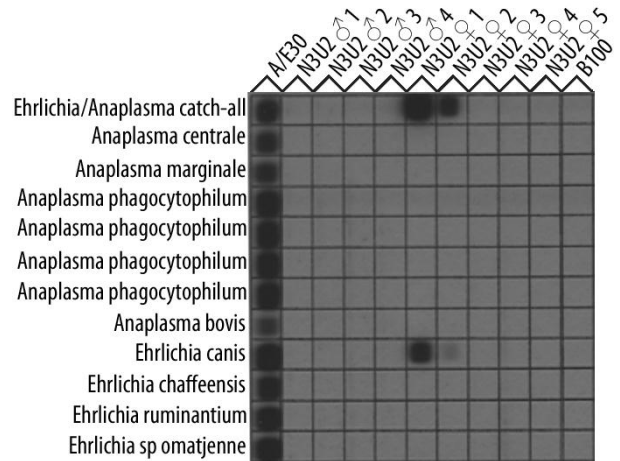
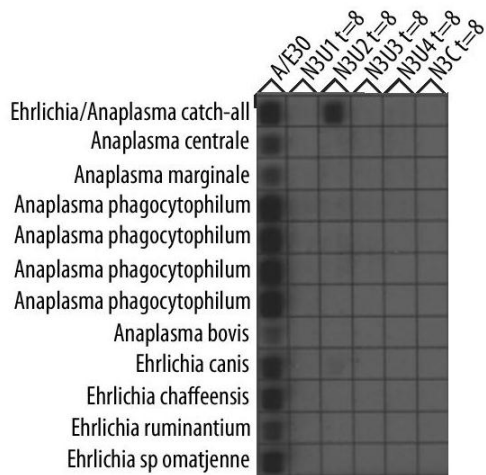
In experiment N3 wordt gebruik gemaakt van de batch *R. sanguineus* die met *E. canis* geïnfecteerd is. Om het effect van incubatie te bekijken, zijn unit 1 en 2 wel geïncubeerd (140 uur) en unit 3 en 4 zijn niet geïncubeerd. De hechting van de geïncubeerde units is in de eerste 24 uur ook aanzienlijk hoger. Dit verschil in hechtingspercentage is op T=48 al minder beduidend aanwezig.

Experiment N3:

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* voeden op schoon bloed; U1 en U2 140 uur geïncubeerd

Experiment 3:

Teken van unit 2



Op de RLB van experiment N3 is op T=8 bij unit 2 een duidelijk Ehrlichia/ Anaplasma catch-all signaal in het bloed te zien. Ook het signaal bij *E. canis* is aanwezig. Omdat er een signaal aanwezig is, zijn alle teken uit de corresponderende unit ook getest op de aanwezigheid van *E. canis*. Op de RLB van deze teken is te zien dat er twee vrouwelijke teken uit de unit zijn die heel duidelijk een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal en een *E. canis* signaal geven.

Experiment N4 *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met
(transmissie voeding) *Babesia vogeli*

Gestart: 11-10-2011 09:00u

Beëindigd: 12-10-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 29

RLB: bijlage pag. 30

	T=24
Hechtingspercentage ♂	25
Hechtingspercentage ♀	0
Gemiddeld:	7.7

Vanwege de slechte hechtings resultaten is besloten de voeding vroegtijdig stop te zetten en de genomen monsters niet verder te verwerken.

Experiment N5 *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia*
(transmissie voeding) *canis*; 46 uur geïncubeerd

Gestart: 19-10-2011 09:00u

Beëindigd: 21-10-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 31

RLB: bijlage pag. 32

	T=24	T=48
Hechtingspercentage ♂	39	50
Hechtingspercentage ♀	15	15
Gemiddeld:	26	32

De gemiddelde hechting bij dit experiment is beduidend lager dan bij de voorgaande experimenten. Opvallend is dat met name de vrouwelijke teken zich slechter hechten dan de mannelijke teken.

Op de RLB zijn geen duidelijke signalen waar te nemen.

Experiment N6 *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia*
(transmissie voeding) *canis*; 116 uur geïncubeerd; Teken zijn hergebruikt van
experiment N5

Gestart: 26-10-2011 09:00u

Beëindigd: 28-10-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 33

RLB: bijlage pag. 34

	T=24	T=48
Hechtingspercentage ♂	60	17
Hechtingspercentage ♀	28	7.1
Gemiddeld:	42	12

Te zien is dat de gemiddelde hechting van de teken hoger is dan toen zij gebruikt werden voor experiment N5. De hechting van de vrouwelijke teken is weer minder dan die van de mannelijke teken.

Ook op deze RLB zijn geen signalen die oplichten.

Experiment N7 *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnficeerd met *Ehrlichia*
(transmissie voeding) *Canis*; 119 uur geïncubeerd

Gestart: 02-11-2011 09:00u

Beëindigd: 04-11-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 35

RLB: bijlage pag. 36

	T=24	T=48
Hechtingspercentage ♂	59	39
Hechtingspercentage ♀	25	6.7
Gemiddeld:	41	21

Opvallend bij dit experiment is, dat de hechting na 24 uur vrij goed is, met name bij de mannelijke teken. Echter op het volgende meetpunt zijn veel van de teken weer los geraakt. Op de RLB zijn geen duidelijk waarneembare signalen te zien.

Experiment N8 *Adulte Rhipicephalus sanguineus* geïnficeerd met *Babesia*
(transmissie voeding) *vogeli*, nadat deze voorgevoed hebben op een konijn (5 dagen)

Gestart: 02-11-201 11:00u

Beëindigd: 04-11-201 09:00u

Tabel: bijlage pag. 37

RLB: bijlage pag. 38

	T=22	T=46
Hechtingspercentage ♂	50	50
Hechtingspercentage ♀	43	57
Gemiddeld:	46	55

Bij experiment N8 wordt gebruik gemaakt van dezelfde teken (*R. sanguineus* geïnficeerd met *B. vogeli*) als bij N4. Echter nu hebben de teken eerst 5 dagen voor gevoed op een konijn. De teken zijn al aardig volgezogen, met name de vrouwtjes. De hechting in dit experiment ligt nu beduidend hoger; gemiddeld 46% tegenover 7.7 % op T=22 bij N4. Er zijn monsters genomen tot en met T=46, daarna is de voeding nog 72 uur doorgezet om te proberen te teken volledig te laten volzuigen. Op T=22 is er geen monster genomen van de controle well, omdat deze volledig uitgedroogd was.

Op de RLB zijn geen signalen te zien.

**Experiment N9
(transmissie voeding)**

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*; 95 uur geïncubeerd; Teken zijn hergebruikt van experiment N7

Gestart: 08-11-2011 09:00u

Beëindigd: 10-11-2011 09:00u

Tabel: bijlage pag. 39

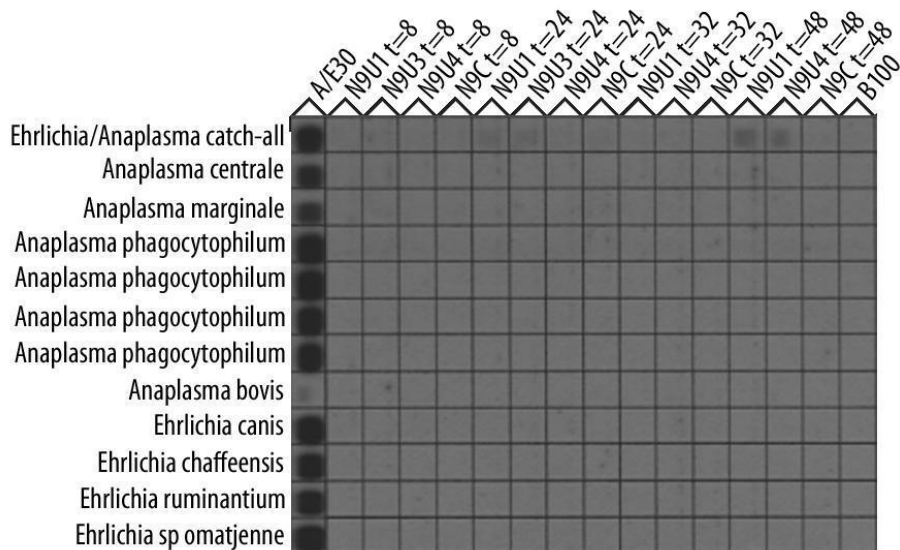
RLB: bijlage pag. 40

	T=24	T=48
Hechtingspercentage ♂	39	33
Hechtingspercentage ♀	29	9.1
Gemiddeld:	33	20

De gemiddelde hechting van de hergebruikte teken van experiment N7 ligt in experiment N9 wat lager dan toen zij de eerste keer gebruikt werden. Dit is voornamelijk te wijten aan het feit dat er in unit 2 totaal geen hechting is opgetreden. Monsters van deze unit zijn daarom ook niet meegenomen voor de RLB. Ook het laatste monster van unit 3 is om dezelfde reden niet meegenomen voor de RLB.

Experiment N9:

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*; 95 uur geïncubeerd; Teken zijn hergebruikt van experiment N7



Op de RLB is te zien dat er zowel bij unit 1 als bij unit 4 op T=48 een heel licht Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal te zien is. Echter er is geen signaal voor *E. canis* zichtbaar.

Discussie

De opzet van de allereerste voeding, experiment N1 acquisitie voeding, was om de 40 ingezette *R. sanguineus* teken (20 ♂ en 20 ♀) *E. canis* op te laten nemen, zodat vervolgens in experiment N2 de transmissie van *E. canis* in kaart kon worden gebracht. Zoals op de RLB van experiment N1 ook te zien is, werd er voldoende *E. canis* aangeboden. Ook werd er een goed hechtingspercentage verkregen zodat er optimale omstandigheden waren om de acquisitie van *E. canis* door de teken voor elkaar te krijgen.

Echter bij het stopzetten van de voeding bleken alle aangehechte teken in zowel unit 3 als in unit 4 dood te zijn. Aangezien dit 12 van de op dat moment 22 aangehechte teken waren, was dit een flinke tegenslag in de acquisitievoeding. Een mogelijke verklaring voor het sterven van de teken zou verstikking door eventuele lekkage kunnen zijn. Echter beide units vertoonden geen tekenen van lekkage. Ook het bloed zag er nog fris uit en vertoonde geen tekenen van mogelijke bacteriële- of schimmelinfecties. Toch is het mogelijk dat er iets in het bloed van de twee units heeft gezeten, aangezien de drie losse teken in unit 4 er nog goed uitzagen.

De overlevende teken van N1 zijn in stoof 2 geplaatst (12 ♂ en 5 ♀). Echter voordat zij opnieuw ingezet werden in de transmissie voeding, hebben zij 70 uur geïncubeerd in het waterbad van 37 graden celsius. Dit om er voor te zorgen dat de *E. canis* in de teken de mogelijkheid had zich goed te handhaven en te vermenigvuldigen^[15]. Op de RLB van de teken is te zien dat er vele een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal geven. Echter slechts één van de 17 teken geeft een *E. canis* signaal (heel licht unit 1 ♀1). Ook is te zien dat 13 van de 17 teken een Rickettsia catch-all signaal geven. Een mogelijke verklaring voor sommige van de teken die zowel een Rickettsia catch-all als een Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal geven zou kunnen zijn dat de Ehrlichia/Anaplasma catch-all een kruisreactie is aangegaan met een *Rickettsia spp.*. Dit is al eerder gezien in dezelfde batch teken bij de experimenten van drs. M. Bonga^[11]. Op T=8 is daarnaast bij beide units een duidelijk Ehrlichia/Anaplasma catch-all signaal te zien en licht ook een *E. canis* signaal. Dit zou betekenen dat er al heel vroeg transmissie plaatsvindt. De teken van unit 2 zelf geven ieder apart geen *E. canis* signaal, alleen catch-all. Het zou mogelijk kunnen zijn dat iedere teek apart geen duidelijk signaal voortbrengt, maar dat de verzameling van de *E. canis* in het bloed wel voldoende was om een signaal te geven. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de teken alle *E. canis* die zij bevatten hebben afgegeven aan het bloed. Op deze manier geven zij zelf geen signaal meer, maar geeft het bloed nog wel een positief signaal. Wat verder opvalt is dat de controle wel op T=24 een licht Rickettsia catch-all signaal geeft. Dit zou kunnen komen door besmetting van het controle bloed met bloed van één van de andere units, echter deze geven geen rickettsia spp. signaal. De besmetting zou dus van teken zelf zijn af moeten gekomen. Ook de controle op T=32 toont besmetting aan. Deze is echter waarschijnlijk verkeerd bemonsterd; er is met een vieze pipetpunt van één van de andere units in de controle well gezeten. Het controle monster op T=48 toont eveneens besmetting, deze is waarschijnlijk ook verkeerd bemonsterd.

Het derde experiment is opgezet met *R. sanguineus* teken die al besmet zijn met *E. canis* (besmettingsgraad 19%). In dit experiment wordt er naast de transmissie van *E. canis* ook gekeken naar het feit of er verschil is tussen wel en niet geïncubeerde teken. Dit zowel op het feit dat de hechting beter zou kunnen verlopen omdat de teken al gewend zijn aan de omstandigheden in het waterbad, als ook dat de parasiet in de teken beter zou kunnen gedijen en dus de transmissie beter zou kunnen verlopen.

Opvallend was bij het begin van het experiment dat alle teken erg actief waren. Het zou kunnen dat mede hierdoor een erg hoog hechtingspercentage werd bereikt (geïncubeerde teken 74% en niet geïncubeerde teken 35% op T=24). Echter zoals bij de resultaten ook al genoemd is, neemt het verschil in hechtingspercentage tussen wel en niet geïncubeerd af naarmate de tijd vordert. Dit zou kunnen komen omdat beiden units teken nu gewend zijn aan het waterbad en het niet meer aankomt op een aantal uur extra incubatie.

De transmissie van *E. canis* is in één van de vier units (unit 2; geïncubeerd) tot stand gekomen en wel in het bloed van T=8. Dit zou kunnen betekenen dat incubatie inderdaad gunstig is voor de transmissie van *E. canis*. Echter omdat de batch teken slechts een besmettingsgraad van 19% heeft, is het ook mogelijk dat er zich in de andere units geen besmette teken bevonden; deze zijn niet getest. Echter de teken van unit 2 zijn wel getest en daar bleken twee vrouwelijke teken besmet te zijn met *E. canis*.

Experiment N4 is gebaseerd op de batch *R. sanguineus* teken besmet met *B. vogeli* (besmettingsgraad %). Toen er gestart werd met deze voeding kwamen de teken uit een pot die al lange tijd (om en nabij maart) in stoof 2 stond. Er zaten slechts enkele nog levende teken in, vandaar dat er ook maar twee units gestart zijn. Ook deze teken zijn van tevoren geïncubeerd om te proberen de transmissie te bevorderen. Helaas bleek na 24 uur het hechtingspercentage dusdanig slecht dat besloten is de voeding stop te zetten. Deze slechte resultaten zouden mogelijk een gevolg kunnen zijn van het feit dat de teken al te lang in de stoof stonden en de feeding units niet aantrekkelijk genoeg vonden. Besloten is toen om de teken eerst te laten voorvoeden op konijnen voor een aantal dagen en ze daarna hun voeding te laten voltooiën op de membranen. Het doel was om in de daarop volgende dagen in de feeding unit alsnog te proberen de transmissie van *B. vogeli* naar het bloed aan te tonen. Dit is uitgevoerd in experiment N8. Na de teken 5 dagen op konijnen te hebben gezet, zijn zij vervolgens overgeplaatst in de feeding units; zij waren op dit moment al gedeeltelijk volgezogen, met name de vrouwelijke teken. Te zien is dat hechting aanzienlijk beter is dan eerst, met name in de eerste unit, waar vijf van de zes teken zich vastgehecht hadden. In de tweede unit viel op dat alle teken loszaten en zij zich als een bal op elkaar clusterden. Later is er alsnog één vrouwtje vast gaan zitten. Echter in beide units is er geen sprake geweest van transmissie *B. vogeli* naar het bloed, aangezien er op de RLB geen signaal te zien is. Dit zou mogelijk kunnen komen doordat de teken geen *B. vogeli* bevatten, de besmettingsgraad is slechts 40%, of omdat de *B. vogeli* door het voorvoeden op de konijnen ‘verloren’ is gegaan.

Voor experiment N5 is nogmaals gebruik gemaakt van de batch *R. sanguineus* besmet met *E. canis*. Ook dit maal zijn de teken weer geïncubeerd, dit keer slechts 46 uur. Extra toegevoegd bij dit experiment is een monitoring moment op T=8, hierbij werd bij het overzetten van het bloed ook naar de hechting van de teken gekeken. Dit gebeurde echter zodanig dat de teken niet of nauwelijks gestoord werden. Opvallend was dat bij dit experiment op T=8 nog geen enkele teek gehecht had; ook later in het experiment blijft de hechting wat tegenvallen (gemiddeld 32% op T=48). Dit zou mogelijk kunnen komen door de korte incubatie tijd, waardoor de teken wat langer de tijd nodig hadden om te wennen aan de omstandigheden in het waterbad. Op de RLB van dit experiment waren helaas geen transmissie signalen van *E. canis* te zien. Echter door de lage hechting van de teken en de lage besmettingsgraad was dit te verwachten.

Dezelfde teken zijn in experiment N6 nogmaals ingezet na 116 uur incubatie, het aantal aangevuld met verse teken uit de stoof voor de 2 dode teken. Het idee hierachter was omdat de teken nu hongerig zijn en al een keer op het membraan gezeten hebben zij misschien sneller zouden hechten. Na 24 uur was het hechtingspercentage ook inderdaad hoger dan bij experiment N5, echter daarna hebben in alle units behalve unit 2 alle teken losgelaten. Een

mogelijke verklaring zou een verstoring van de teken kunnen zijn geweest, hetzij door het verversen van het bloed, of door het 'oud' worden van het bloed. Het verversen van het bloed is net zoals bij de andere experimenten uitgevoerd en aan het bloed is niks opgevallen in de zin van donkerverkleuring. De precieze reden van de verstoring blijft dan ook onbekend. Niet geheel onverwacht zijn er dan ook op de RLB geen resultaten van transmissie uitgekomen.

De opzet van N7 en N9 is in basis hetzelfde als die van N5 en N6. Teken uit de batch besmet met *E. Canis*, ingezet in experiment N7 en hergebruikt bij experiment N9. De incubatie bij N7 bedroeg dit maal 119 uur en bij N9 95 uur. Wat opvalt is dat er in N7 eigenlijk hetzelfde gebeurt als bij N5; de teken lijken zich aardig te hechten (41% op T=24) en laten daarna weer los (21% op T=48). De precieze reden hiervoor blijft onduidelijk; de verversing van het bloed wordt elke keer op dezelfde manier uitgevoerd en ook het bloed zag er goed uit. Mogelijk verdwijnt de geur van de hond van het membraan of wordt het bloed te oud voor de teken. Ook op de RLB van experiment N7 is er geen signaal te bekennen. Waarschijnlijk door dezelfde redenen als bij N5 en N6: slechte hechting en een laag besmettingspercentage. Het hergebruik van de teken in N9 laat eigenlijk alleen in de eerste unit een goede hechting zien (6 van de 8 teken op T=24 en 4 van de 7 op T=48). Verder valt op dat er veel teken doodgaan uit de verschillende units. Mogelijk komt dit omdat de teken nu te lang in de stoof hebben gestaan en 'oud' en uitgedroogd worden. Op de RLB van experiment N9 is zoals bij de resultaten te zien is alleen een licht *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all signaal te zien op T=48 bij unit 1 en unit 4. Dit zou kunnen komen doordat er zich een nog nader te specificeren *Ehrlichia* of *Anaplasma spp.* in de teken zit. Dit vergt verder onderzoek. Daarnaast zou het ook zo kunnen zijn dat er a-specifieke binding met losse DNA-fragmenten is opgetreden.

Conclusie

Na het uitvoeren van de verschillende experimenten is uit de resultaten gebleken dat het mogelijk is om met behulp van een in vitro voeding systeem de adulte *R. sanguineus* te voeden op runderbloed. Doel van het onderzoek echter was om de transmissiedynamiek van *E. canis* in kaart te brengen. Uit de resultaten blijkt dat er transmissie van *E. canis* mogelijk is, zowel bij *R. sanguineus* teken die via een eigen acquisitie zijn besmet als bij *R. sanguineus* nimfen besmet met *E. canis* welke zijn overgegaan naar een volwassen stadium.

De overdracht van *E. canis* hebben we op verschillende tijdstippen tot stand zien komen. Zo is er transmissie te zien op T=48 bij experiment N2, maar ook al transmissie van *E. canis* op T=8 bij zowel experiment N2 als bij experiment N3 zonder voor voeden op konijnen. Dit betekent dat *E. canis* binnen zeer korte tijd na aanhechting van de teek kan worden overgedragen. Belangrijk is nu om dit tijdstip nog gedetailleerder in kaart te brengen en de intervallen tussen de meetmomenten te gaan verkleinen. Daarnaast is het aan te bevelen om bij eventuele volgende experimenten teken batches te gaan gebruiken met een hogere besmettingsgraad.

Of er een conclusie getrokken kan worden uit het feit dat incuberen voordelig zou zijn voor de transmissie is nog maar de vraag. In experiment N3 leek in eerste instantie de hechting van de geïncubeerde groep beduidend hoger te zijn. Om zeker te zijn van deze snellere aanhechting zou de proef nogmaals herhaald moeten worden. Daarnaast zou incuberen een voordeel hebben voor de instandhouding en vermenigvuldiging van het pathogeen in de teek. Echter in de experimenten is niet kwantitatief de hoeveelheid *E. canis* gemeten in niet en wel geïncubeerde teken. Om dit te bevestigen is verder onderzoek nodig.

In experiment N4 en nogmaals in N8 is ook geprobeerd om de transmissiedynamiek van *B. vogeli* in kaart te brengen. Helaas heeft er in beide experimenten, ondanks de goede hechting in N8 geen transmissie plaatsgevonden. Om de transmissie van *B. vogeli* alsnog te kunnen beschrijven zullen verdere experimenten moeten worden uitgevoerd.

Literatuur

1. **Bonga, M.** (2011). The transmission dynamics of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks
2. **Dantas-Torres, F.** (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* **152**, 173-185
3. **Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Otranto, D.** (2011) Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* **In Press**
4. **Habedank, B., Hiepe, T.** (1993). *In-vitro*-Fütterung von Zecken, *Dermacentor nuttalli*, Olenev 1928 (Acari: Ixodidae) über eine Silikonmembran. *Dermatologisches Monatsschreiben* **179**, 292-295
5. **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
6. **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
7. **Kröber, T., Guerin, P.M.** (2007). *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology* **23-9**, 445-449
8. **Kröber, T., Guerin, P.M.** (2004). The tick blood meal: From living animals or from a silicone membrane? *3R-Info-Bulletin* **27**
9. **Lenssen, J.** (2010). The transmission dynamics of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks using an *in vitro* feeding system.
10. **Pierce, A.E., Pierce, M.H.** (1956). A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. *Australian Veterinary Journal* **32**, 144-146
11. **Procajlo, A., Skupieñ, E.M., Bladowski, M., Lew, S.** (2011) Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Polish Journal of Veterinary Science* **14(3)**, 515-20
12. **Published by Isogen** (2004) Reverse lime blot hybridisation in the detection of tick-borne diseases, *Bio Tech international*
13. **Solano-Gallego, L., Baneth, G.** (2011). Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology* **181**, 48-60
14. **Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T.** (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology* **157(3-4)**, 211-221
15. **Stich, R.W., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Needham, G.R., Grove, D.L., Jittapalapong, S.** (2002) Detection of *Ehrlichia canis* in Canine Carrier Blood and in Individual Experimentally Infected Ticks with a *p30*-Base PCR Assay, *Journal of Clinical Microbiology*, **Feb.**, 540-546
16. **Utrecht Centre for Tick-borne Diseases**, UCTD Protocollen Aug-2011.
17. <http://www.lewellenservices.com/browndogtick.html>

Appendices I tot en met IV

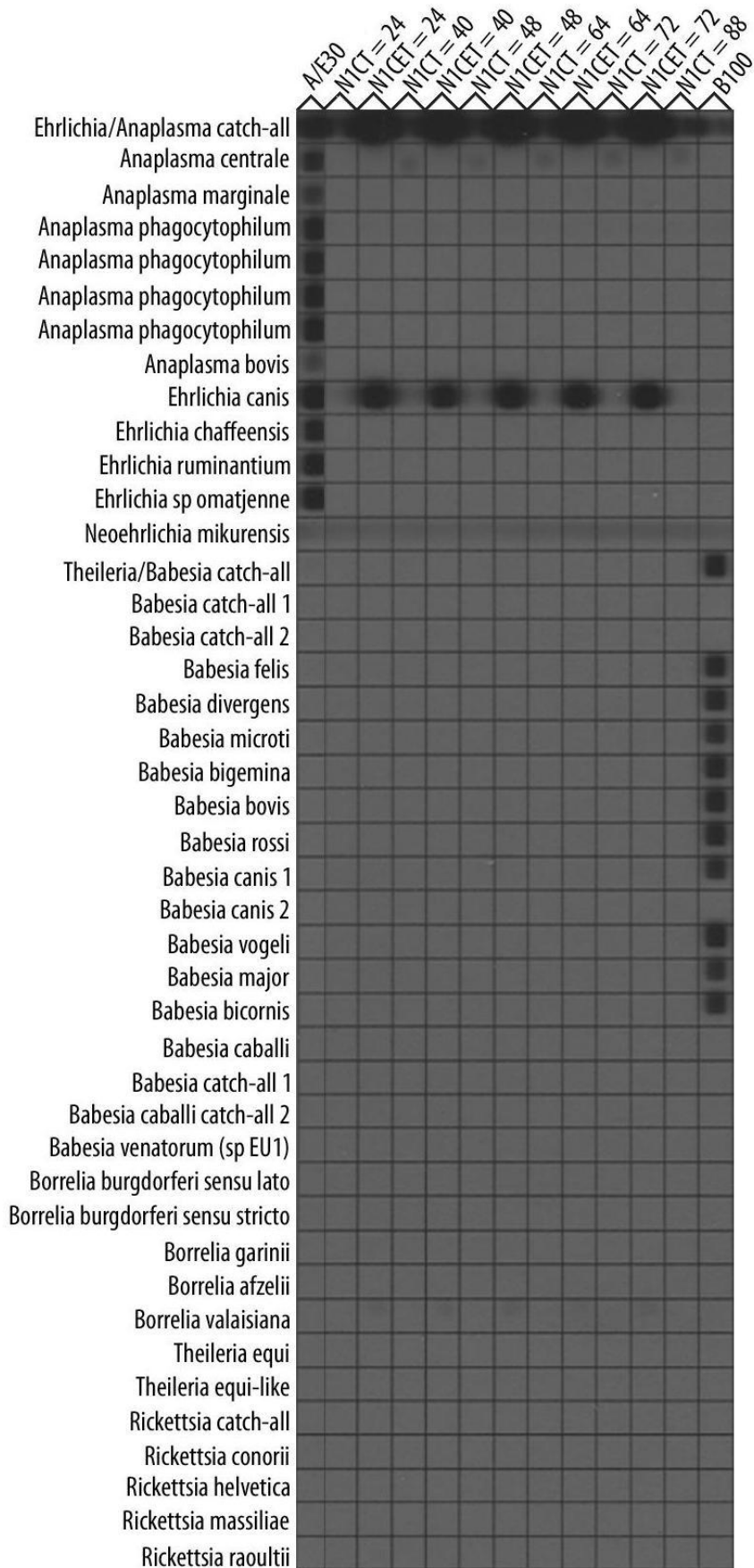
Appendix I Tabellen en RLB's experimenten N1 t/m N9

Experiment number N1: adult <i>R. sanguineus</i> feeding on <i>E. canis</i> infected blood (acquisition)														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
19-9-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	<i>R. sanguineus</i>
t=0	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	<i>R. sanguineus</i>
(17:00)	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	<i>R. sanguineus</i>
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	<i>R. sanguineus</i>
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
20-9-'11	FU1	3	4	7	2	1	3	0	0	0	5	5	10	<i>Ehrlichia canis</i> added
t=16 (09:00)	FU2	4	1	5	1	3	4	0	1	1	5	4	9	<i>Ehrlichia canis</i> added
	FU3	3	1	4	2	3	5	0	1	1	5	4	9	<i>Ehrlichia canis</i> added
	FU4	1	0	1	4	2	6	0	3	3	5	2	7	
	Mean	2,8	1,5	4,3	2,3	2,3	4,5							
	%	55	40	49	45	60	51							
21-9-'11	FU1	2	2	4	3	1	4	0	2	2	5	3	8	
t=40 (09:00)	FU2	5	1	6	0	2	2	0	1	1	5	3	8	
	FU3	2	1	3	2	3	5	1	0	1	4	4	8	
	FU4	2	2	4	3	0	3	0	0	0	5	2	7	<i>Ehrlichia canis</i> added
	Mean	2,8	1,5	4,3	2	1,5	3,5							
	%	58	50	55	42	50	45							
22-9-'11	FU1	4	3	7	1	0	1	0	0	0	5	3	8	Lots of faeces
t=64 (09:00)	FU2	4	1	5	1	0	1	0	2	2	5	1	6	Ticks have crusts
	FU3	4	4	8	0	0	0	0	0	0	4	4	8	
	FU4	3	0	3	2	2	4	0	0	0	5	2	7	
	Mean	3,8	2	5,8	1	0,5	1,5	0						
	%	79	80	79	21	20	21	0						
23-9-'11	FU1	2	3	5	3	0	3	0	0	0	5	3	8	Feeding ended
t=88 (09:00)	FU2	4	1	5	1	0	1	0	0	0	5	1	6	Feeding ended
	FU3	0	0	0	0	0	0	4	4	8	0	0	0	Dead ticks were all attached ; Feeding ended
	FU4	0	0	0	2	1	3	2	2	4	2	1	3	Dead ticks were all attached ; Feeding ended
	Mean	0,8	0,5	2,5	0,8	0,3	0,9							
	%	50	80	59	50	20	41							

Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from *E. canis* tubes and from the control well with every refreshment; All living ticks (12 ♂ and 5 ♀) were transferred into the stove

Experiment N1:

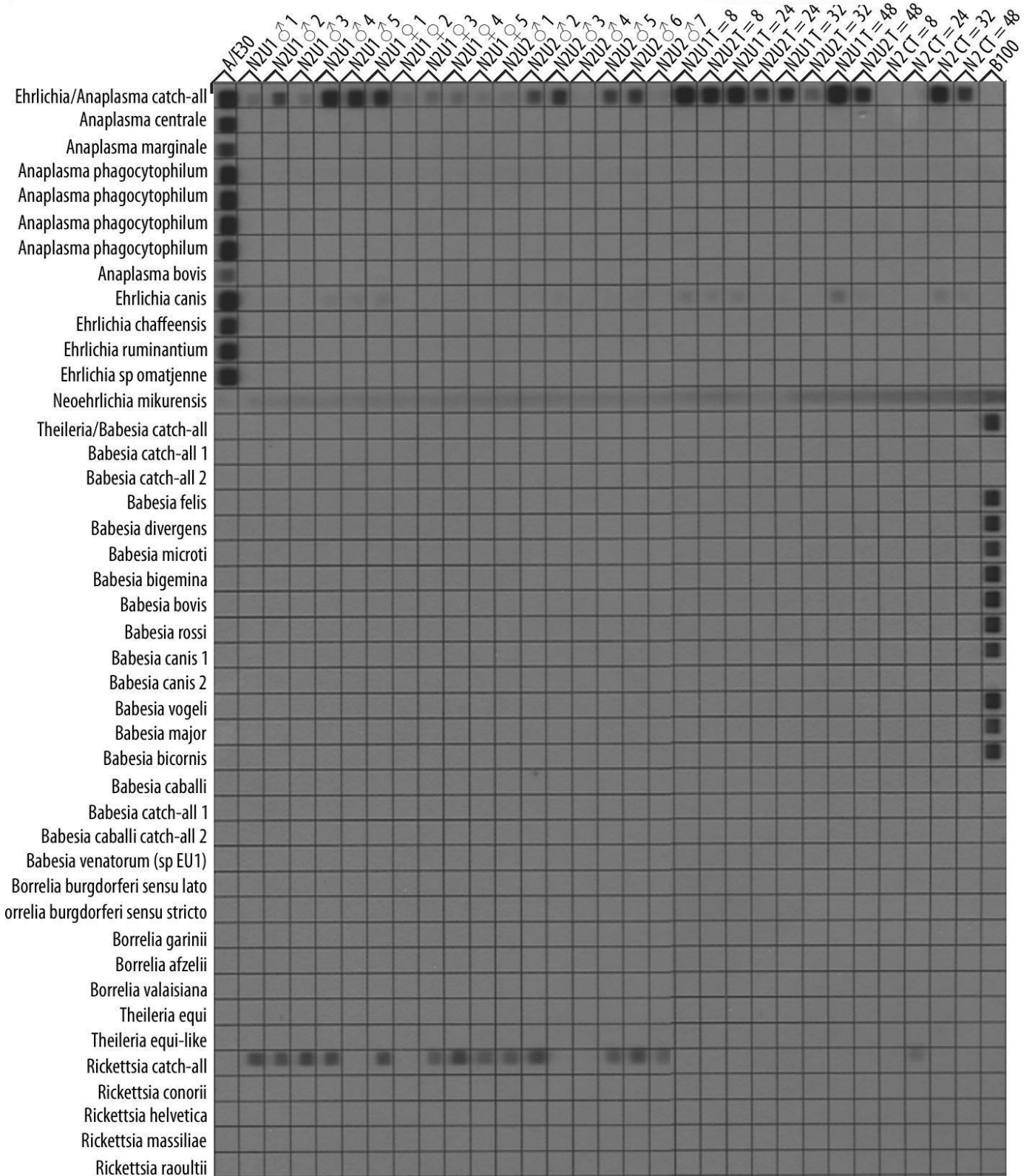
Adulte *Rhipicephalus sanguineus* voeden op *Ehrlichia canis* besmet bloed



Experiment number N2: adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> (N1) transmission feeding; 70 hours incubated														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
29-09-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	7	0	7	0	0	0	7	0	7	Only male adults
	Mean	0	0	0	6	2,5	8,5							
	%	0	0	0	100	100	100							
30-9-'11	FU1	4	4	8	1	1	2	0	0	0	5	5	10	Blood of the control well was dark
T=24 (09:00)	FU2	6	0	6	1	0	1	0	0	0	7	0	7	
	Mean	5	2	7	1	0,5	1,5							
	%	83	80	82	17	20	18							
1-10-'11	FU1	4	3	7	0	1	1	1	1	2	4	4	8	Feeding ended
T=48 (09:00)	FU2	3	0	3	3	0	3	1	0	1	6	0	6	Feeding ended
	Mean	3,5	1,5	5	1,5	0,5	2							
	%	70	75	71	30	25	29							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														

Experiment N2:

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* in experiment N1 voeden op schoon bloed;
70 uur geïncubeerd



Experiment number N3: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> (naturally) transmission feeding														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
4-10-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	Ticks are very active; ticks were incubated 140 hours at 37 degrees
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	Ticks are very active; ticks were incubated 140 hours at 37 degrees
	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	Ticks are very active
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	Ticks are very active
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
5-10-'11	FU1	4	2	6	0	3	3	1	0	1	4	5	9	
T=24 (09:00)	FU2	4	4	8	1	1	2	0	0	0	5	5	10	Two of the (eight) attached ticks didn't move
	FU3	1	2	3	4	3	7	0	0	0	5	5	10	
	FU4	4	0	4	1	5	6	0	0	0	5	5	10	
	Mean	3,3	2	5,3	1,5	3	4,5							
	%	68	40	54	32	60	46							
6-10-'11	FU1	1	0	1	3	5	8	0	0	0	4	5	9	
T=48 (09:00)	FU2	4	3	7	1	2	3	0	0	0	5	5	10	
	FU3	1	2	3	4	3	7	0	0	0	5	5	10	
	FU4	4	2	6	1	3	4	0	0	0	5	5	10	
	Mean	2,5	1,8	4,3	2,3	3,3	5,5							
	%	53	35	44	47	65	56							
7-10-'11	FU1	1	0	1	2	4	6	1	1	2	3	4	7	Feeding ended
T=72 (09:00)	FU2	3	4	7	1	1	2	1	0	1	4	5	9	Feeding ended
	FU3	1	0	1	1	5	6	3	0	3	2	5	7	Feeding ended
	FU4	2	2	4	3	2	5	0	1	1	5	4	9	Feeding ended
	Mean	1,8	1,5	3,3	1,8	3	4,8							
	%	50	33	41	50	67	59							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														

Rhipicephalus sanguineus en de transmissiedynamiek van Ehrlichia canis in een in vitro voeding systeem

Experiment N3:

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis* voeden op schoon bloed;
U1 en U2 140 uur geïncubeerd

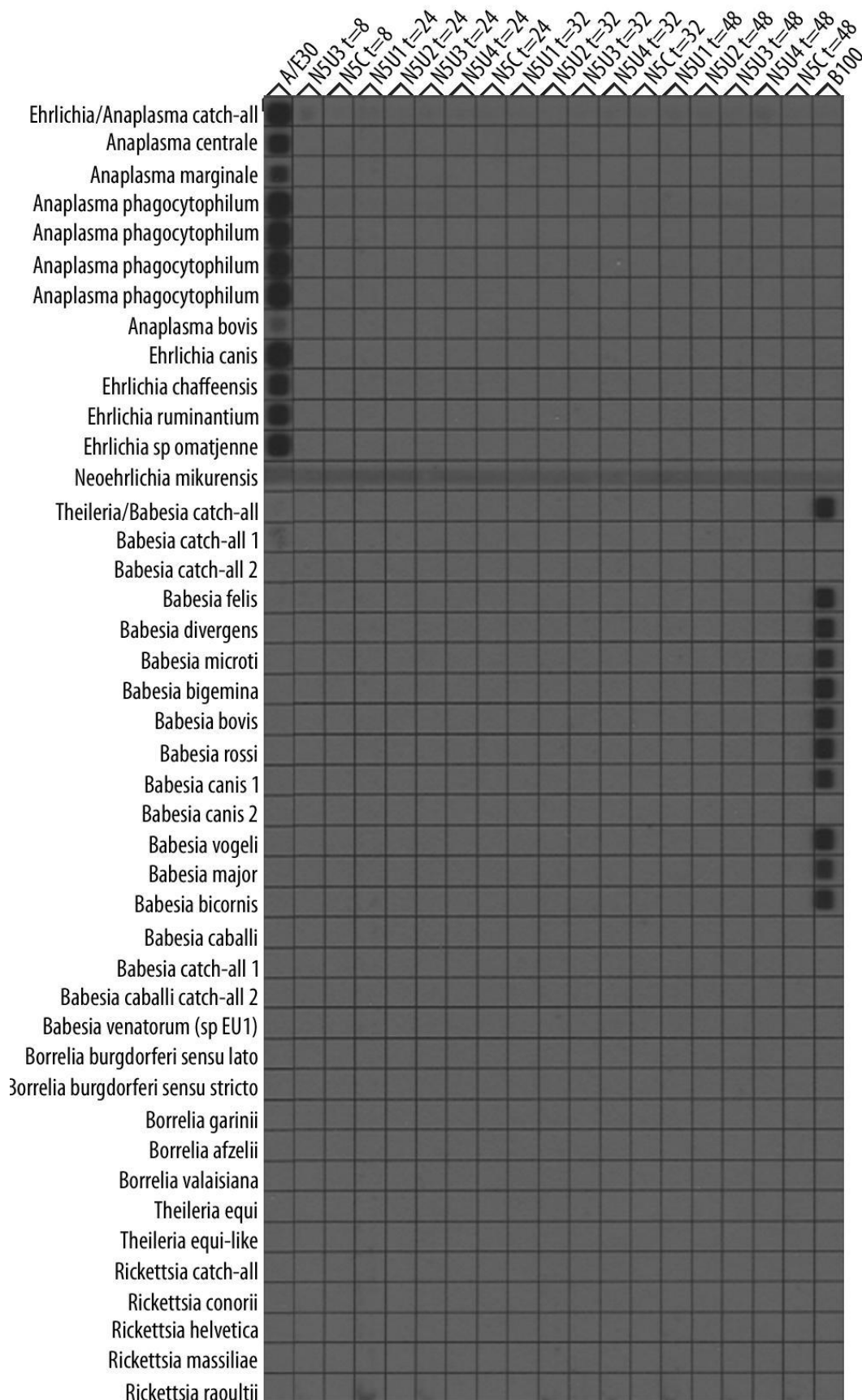
	A/E30	N3U1 t=8	N3U2 t=8	N3U3 t=8	N3U4 t=8	N3C t=8	N3U1 t=24	N3U2 t=24	N3U3 t=24	N3U4 t=24	N3C t=24	N3U1 t=32	N3U2 t=32	N3U3 t=32	N3U4 t=32	N3C t=32	N3U1 t=48	N3U2 t=48	N3U3 t=48	N3U4 t=48	N3C t=48	N3U1 t=56	N3U2 t=56	N3U3 t=56	N3U4 t=56	N3C t=56	N3U1 t=72	N3U2 t=72	N3U3 t=72	N3U4 t=72	N3C t=72	B100		
Ehrlichia/Anaplasma catch-all																																		
Anaplasma centrale																																		
Anaplasma marginale																																		
Anaplasma phagocytophilum																																		
Anaplasma phagocytophilum																																		
Anaplasma phagocytophilum																																		
Anaplasma phagocytophilum																																		
Anaplasma bovis																																		
Ehrlichia canis																																		
Ehrlichia chaffeensis																																		
Ehrlichia ruminantium																																		
Ehrlichia sp omatjenne																																		
Neoehrlichia mikurensis																																		
Theileria/Babesia catch-all																																		
Babesia catch-all 1																																		
Babesia catch-all 2																																		
Babesia felis																																		
Babesia divergens																																		
Babesia microti																																		
Babesia bigemina																																		
Babesia bovis																																		
Babesia rossi																																		
Babesia canis 1																																		
Babesia canis 2																																		
Babesia vogeli																																		
Babesia major																																		
Babesia bicornis																																		
Babesia caballi																																		
Babesia catch-all 1																																		
Babesia caballi catch-all 2																																		
Babesia venatorum (sp EU1)																																		
Borrelia burgdorferi sensu lato																																		
Borrelia burgdorferi sensu stricto																																		
Borrelia garinii																																		
Borrelia afzelii																																		
Borrelia valaisiana																																		
Theileria equi																																		
Theileria equi-like																																		
Rickettsia catch-all																																		
Rickettsia conorii																																		
Rickettsia helvetica																																		
Rickettsia massiliae																																		
Rickettsia raoultii																																		

Experiment number N4: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>B. vogeli</i> transmission feeding														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
11-10-'11	FU1	0	0	0	3	5	8	0	0	0	3	5	8	Ticks were incubated 113h at 37 degrees
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	2	6	8	0	0	0	2	6	8	Ticks were incubated 113h at 37 degrees
	Mean	0	0	0	2,5	5,5	8	0	0	0	2,5	5,5	8	
	%	0	0	0	100	100	100							
12-10-'11	FU1	0	0	0	2	5	7	1	0	1	2	5	7	Feeding ended due to none attachment
T=24 (09:00)	FU2	1	0	1	1	4	5	0	2	2	2	4	6	Feeding ended due to barely any attachment
	Mean	0,5	0	0,5	1,5	4,5	6							
	%	25	0	7,7	75	100	92							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														

Geen RLB uitgevoerd van experiment N4

Experiment number 5: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> transmission feeding after 46 hours of incubation														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total		Details	
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀		Total
19-10-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 None of the ticks seems to be attached
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 None of the ticks seems to be attached
	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 None of the ticks seems to be attached
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 None of the ticks seems to be attached
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
20-10-'11	FU1	2	1	3	3	4	7	0	0	0	5	5	10	
T=24 (09:00)	FU2	3	1	4	2	4	6	0	0	0	5	5	10	One of the attached males didn't seem to move
	FU3	0	0	0	3	5	8	2	0	2	3	5	8	
	FU4	2	1	3	3	4	7	0	0	0	5	5	10	
	Mean	1,8	0,8	2,5	2,8	4,3	7							
	%	39	15	26	61	85	74							
21-10-'11	FU1	2	1	3	3	4	7	0	0	0	5	5	10	
T=48 (09:00)	FU2	2	1	3	3	4	7	0	0	0	5	5	10	
	FU3	1	0	1	2	5	7	0	0	0	3	5	8	
	FU4	4	1	5	1	4	5	0	0	0	5	5	10	
	Mean	2,3	0,8	3	2,3	4,3	6,5							
	%	50	15	32	50	85	68							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														

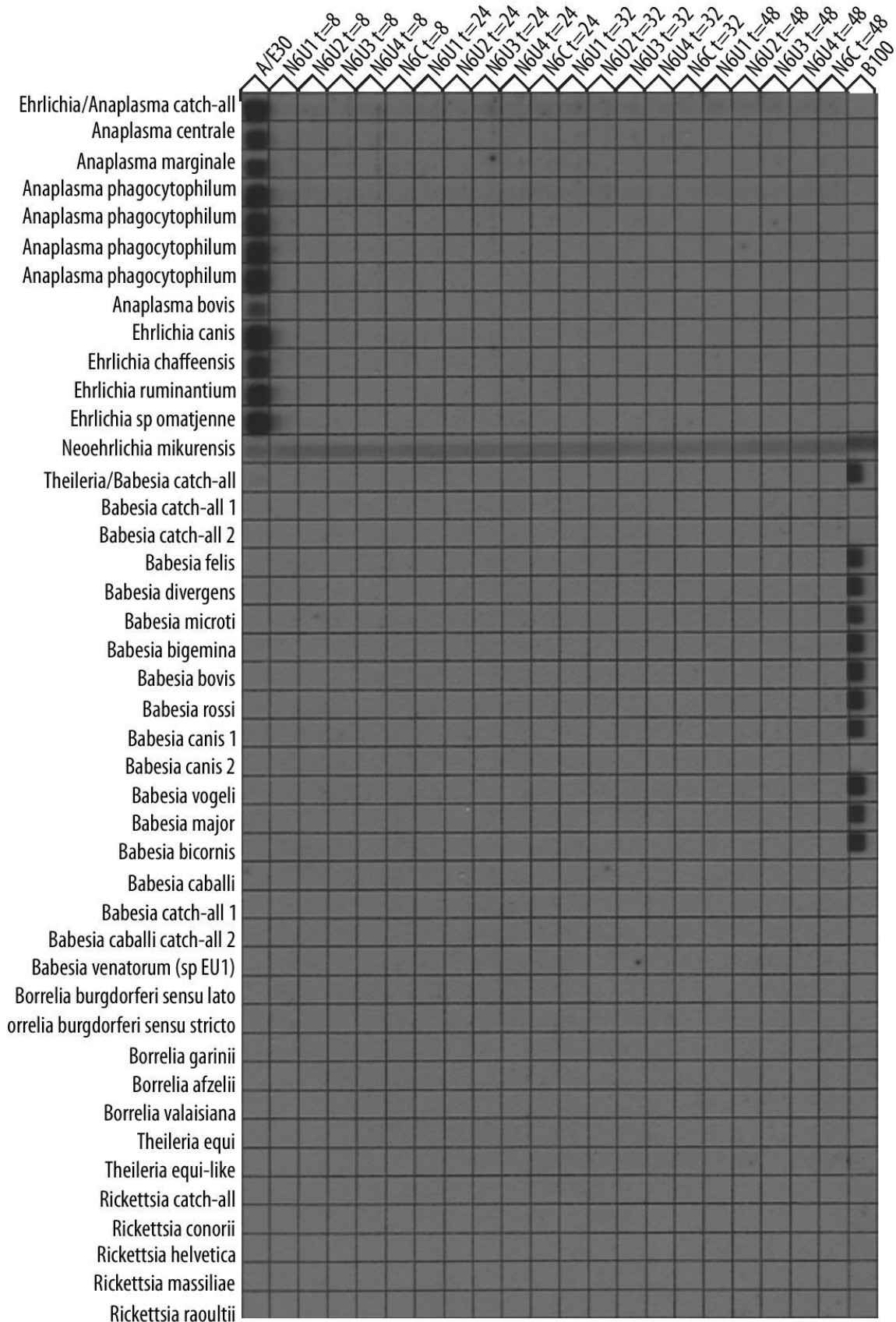
Experiment N5:
 Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*;
 46 uur geïncubeerd



Experiment number 6: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> transmission feeding after 116 hours of incubation														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
26-10-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Maybe one tick attached
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Maybe one tick attached
	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Maybe one tick attached
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Maybe one tick attached
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
27-10-'11	FU1	0	0	0	2	4	6	3	1	4	2	4	6	
T=24 (09:00)	FU2	3	2	5	1	3	4	1	0	1	4	5	9	One of the attached ticks didn't seem to move
	FU3	3	0	3	1	5	6	1	0	1	4	5	9	
	FU4	3	3	6	2	1	3	0	1	1	5	4	9	
	Mean	2,3	1,3	3,5	1,5	3,3	4,8							
	%	60	28	42	40	72	58							
28-10-'11	FU1	0	0	0	2	3	5	0	1	0	2	3	5	
T=48 (09:00)	FU2	2	1	3	1	4	5	1	0	1	3	5	8	Attached ticks are very engorged
	FU3	0	0	0	2	2	4	2	3	5	2	2	4	
	FU4	0	0	0	5	4	9	0	0	0	5	4	9	All the ticks gathered on the lid
	Mean	0,5	0,3	0,8	2,5	3,3	5,8							
	%	17	7,1	12	83	93	89							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment; ticks were re-used from N5														

Experiment N6:

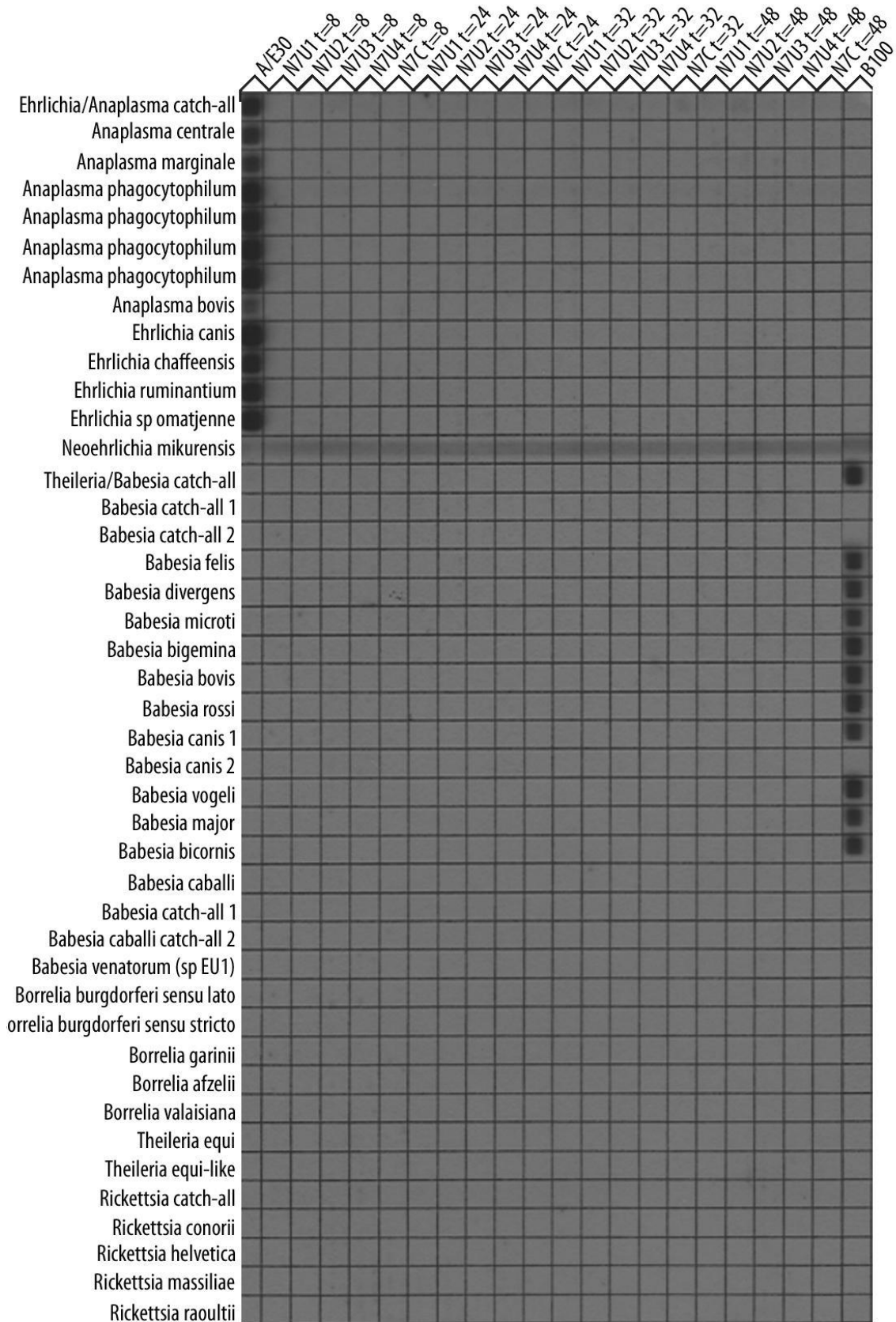
Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*;
116 uur geïncubeerd; Teken zijn hergebruikt van experiment N5



Experiment number 7: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> transmission feeding after 119 hours of incubation														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
02-11-'11	FU1	0	0	0	4	6	10	0	0	0	4	6	10	T=8 Two ticks seem to be attached
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Three ticks seem to be attached
	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 One of the ticks seems to be attached
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 None of the ticks seem to be attached
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
03-11-'11	FU1	4	3	7	0	3	3	0	0	0	4	6	10	
T=24 (09:00)	FU2	4	1	5	0	4	4	1	0	1	4	5	9	
	FU3	1	0	1	3	4	7	1	1	2	4	4	8	
	FU4	1	1	2	4	4	8	0	0	0	5	5	10	
	Mean	2,5	1,3	3,8	1,8	3,8	5,5							Control well was dark and dried out, so only one sample was taken
	%	59	25	41	41	75	60							
04-11-'11	FU1	2	1	3	2	5	7	0	0	0	4	6	10	Feeding ended
T=48 (09:00)	FU2	1	0	1	3	4	7	0	1	1	4	4	8	Feeding ended, all ticks were very active
	FU3	0	0	0	1	1	2	3	3	6	1	1	2	Feeding ended
	FU4	2	0	2	2	4	6	1	1	2	4	4	8	Feeding ended
	Mean	1,3	0,3	1,5	2	3,5	5,5							
	%	39	6,7	21	62	93	79							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														

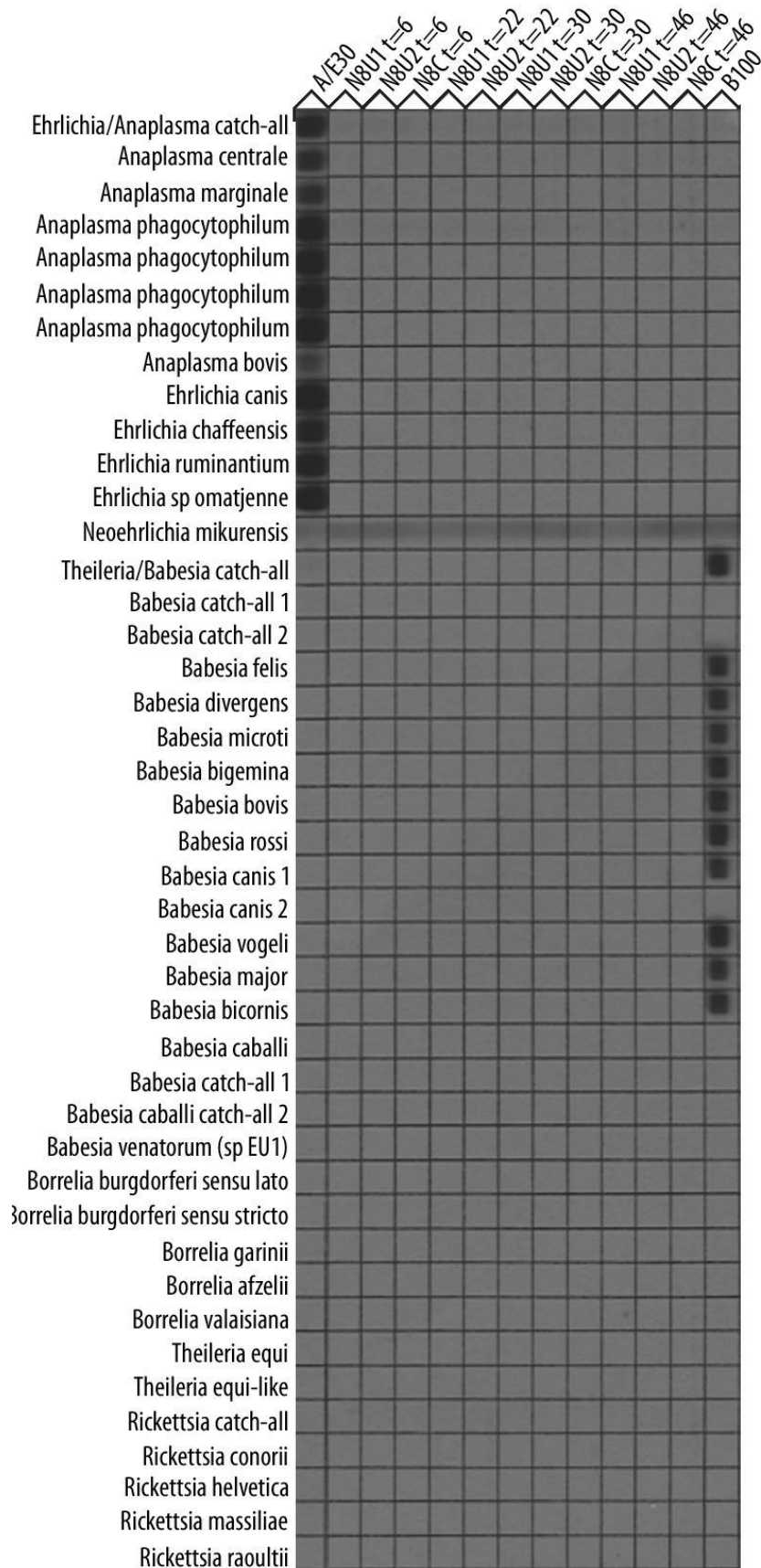
Experiment N7:

Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*;
119 uur geïncubeerd



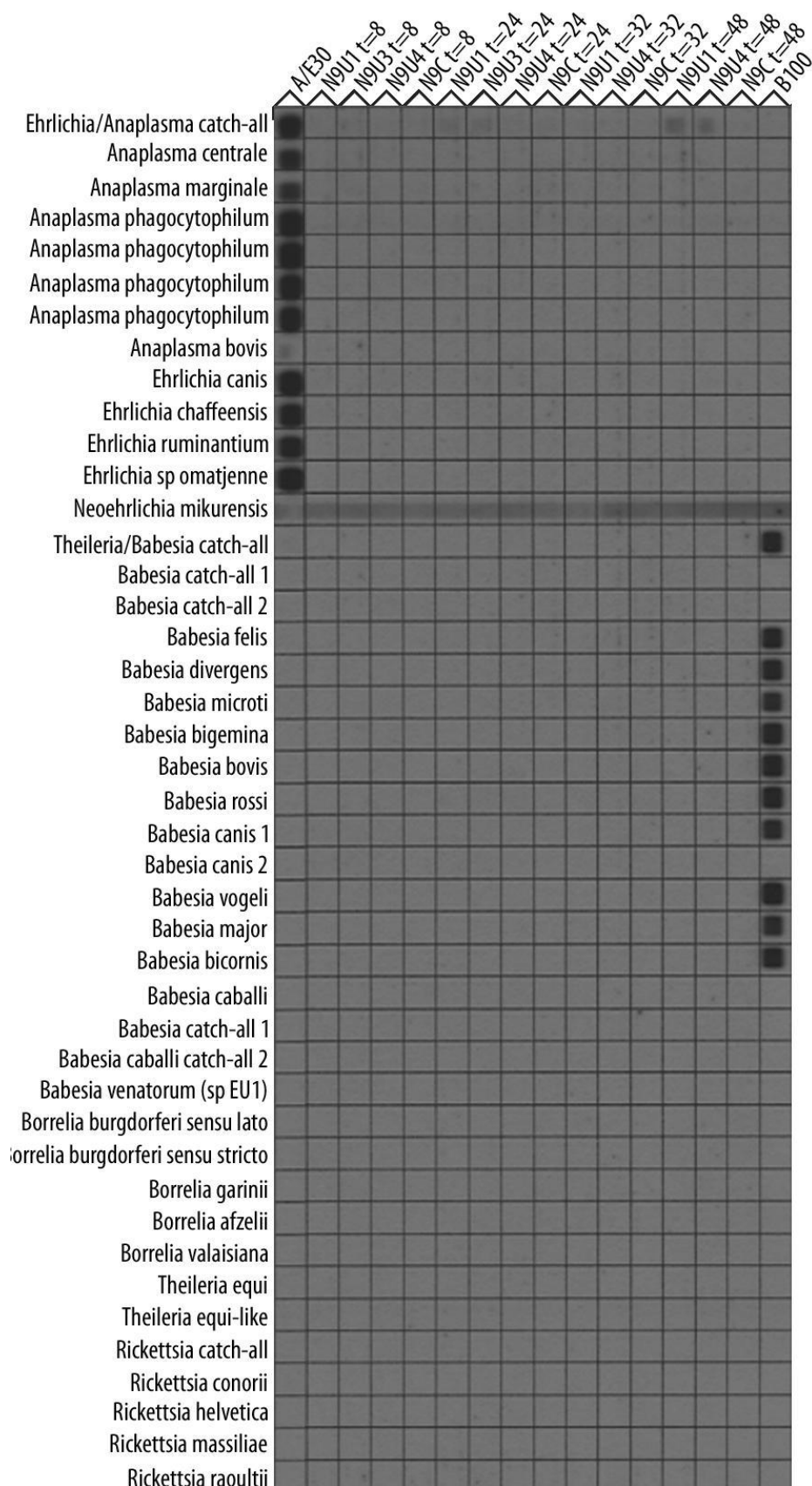
Experiment number N8: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>B. Vogeli</i> after prefeeding on a rabbit														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
2-11-'11	FU1	0	0	0	2	4	6	0	0	0	2	4	6	T=8 One of the ticks seems to be attached
T=0 (11:00)	FU2	0	0	0	3	3	6	0	0	0	3	3	6	T=8 Two of the ticks seem to be attached
	Mean	0	0	0	2,5	3,5	6							
	%	0	0	0	100	100	100							
3-11-'11	FU1	2	3	5	0	1	1	0	0	0	2	4	6	
T=22 (09:00)	FU2	0	0	0	2	3	5	1	0	1	2	3	5	All ticks are not attached, clustering on eachother
	Mean	1	1,5	2,5	1	2	3							Control well was dark and dried out, so there wasn't a sample taken
	%	50	43	46	50	57	55							
4-11-'11	FU1	2	3	5	0	1	1	0	0	0	2	4	6	One attached female is very engorged
T=46 (09:00)	FU2	0	1	1	2	2	4	0	0	0	2	3	5	The attached female is very engorged
	Mean	1	2	3	1	1,5	2,5							
	%	50	57	55	50	43	46							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment														
Feeding continued during the weekend to fully engorge the ticks, feeding ended at the 7th of November														

Experiment N8:
 Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Babesia vogeli*;
 voorgevoed op konijn (5 dagen)



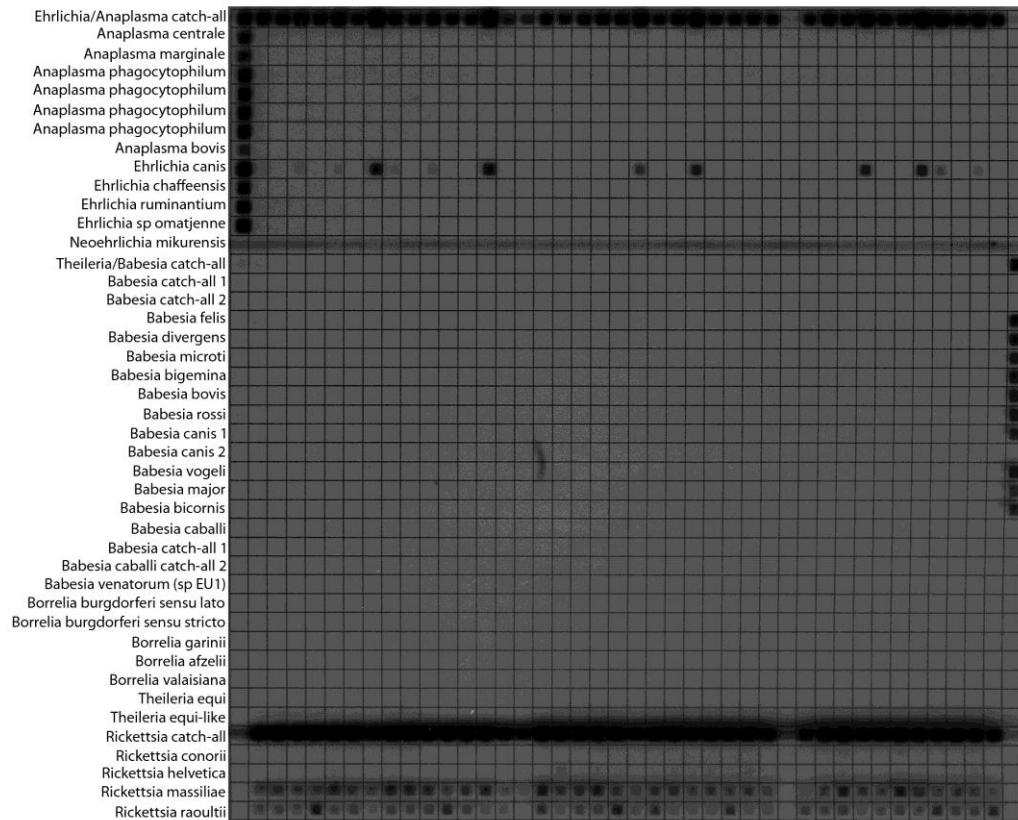
Experiment number 9: Adult <i>R. sanguineus</i> infected with <i>E. canis</i> transmission feeding after 95 hours of incubation														
Date	Unit	Attached			Unattached			Mortality			Total			Details
		♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	
08-11-'11	FU1	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 Three of the ticks seem to be attached
T=0 (09:00)	FU2	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 No ticks attached
	FU3	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 One of the ticks seems to be attached
	FU4	0	0	0	5	5	10	0	0	0	5	5	10	T=8 One of the ticks seems to be attached
	Mean	0	0	0	5	5	10							
	%	0	0	0	100	100	100							
09-11-'11	FU1	3	3	6	0	2	2	2	0	2	3	5	8	
T=24 (09:00)	FU2	0	0	0	2	3	5	3	2	5	2	3	5	
	FU3	0	0	0	3	4	7	2	1	3	3	4	7	
	FU4	2	1	3	3	1	4	0	3	3	5	2	7	
	Mean	1,3	1	2,3	2	2,5	4,5							
	%	39	29	33	62	71	67							
10-11-'11	FU1	3	1	4	0	3	3	0	1	1	3	4	7	Feeding ended
T=48 (09:00)	FU2	0	0	0	2	2	4	0	1	1	2	2	4	Feeding ended
	FU3	0	0	0	1	3	4	2	1	3	1	3	4	Feeding ended
	FU4	0	0	0	3	2	5	2	0	2	3	2	5	Feeding ended
	Mean	0,8	0,3	1	1,5	2,5	4							
	%	33	9,1	20	67	91	80							
Comments: Blood refreshed at 9:00h and 17:00h; samples taken from all the wells with every refreshment; ticks were re-used from N7														
Samples from Unit 2 were taken but due to none attachment not examined. Also samples T=32 and T=48 from Unit 3 were excluded.														

Experiment N9:
Adulte *Rhipicephalus sanguineus* geïnfecteerd met *Ehrlichia canis*;
95 uur geïncubeerd; Teken zijn hergebruikt van experiment N7



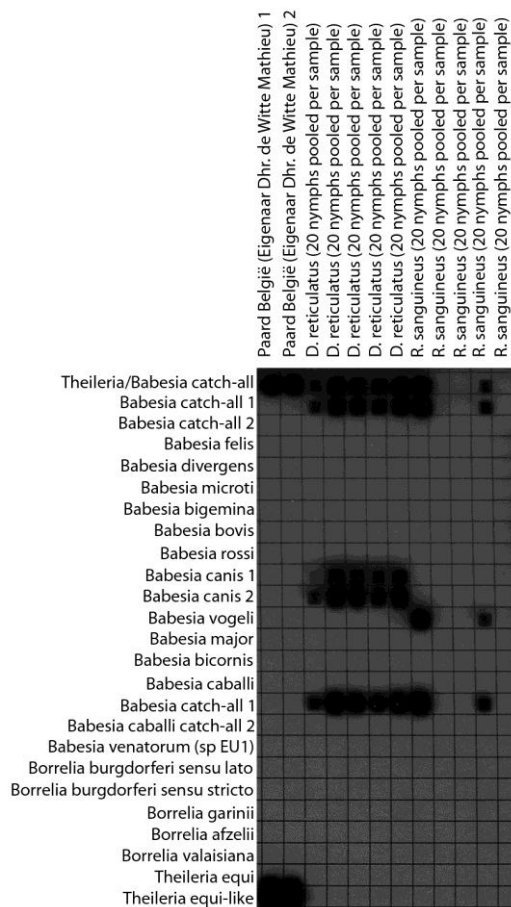
Appendix II RLB besmettingsgraad *R. sanguineus* met *E. canis*

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



Appendix III RLB besmettingsgraad *R. sanguineus* met *B. vogeli*

19-10-2011: *R. sanguineus* + *B. vogeli* Batch: E49BE7



Appendix IV Protocol in vitro voedingen

- 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 (KUHNERT *ET AL.* 1995, KUHNERT 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

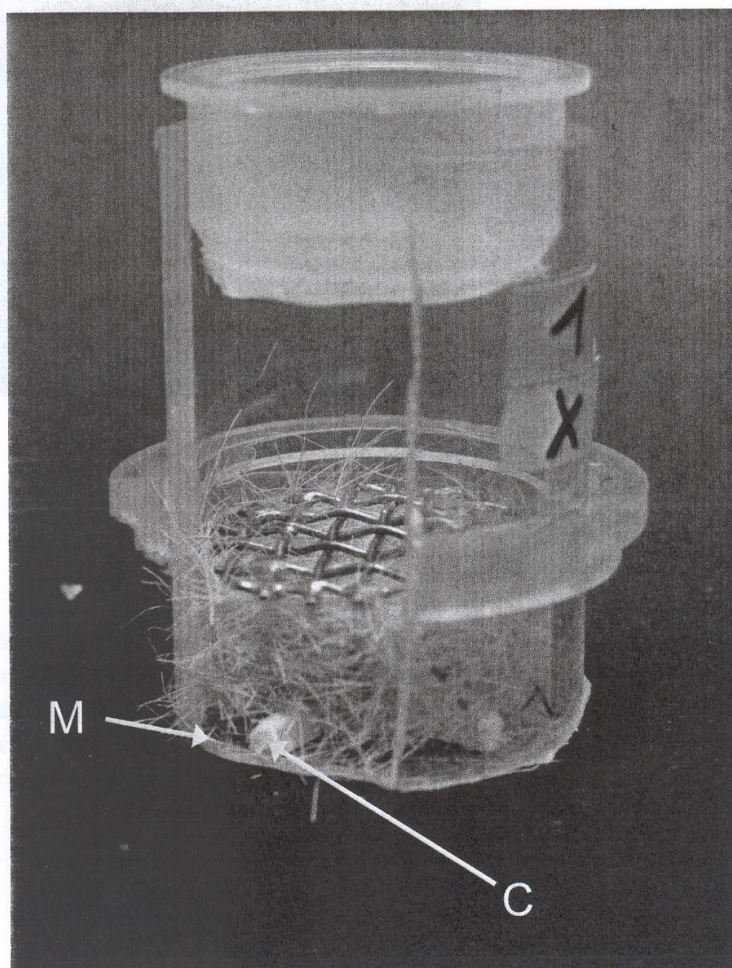


Figure 1

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 -

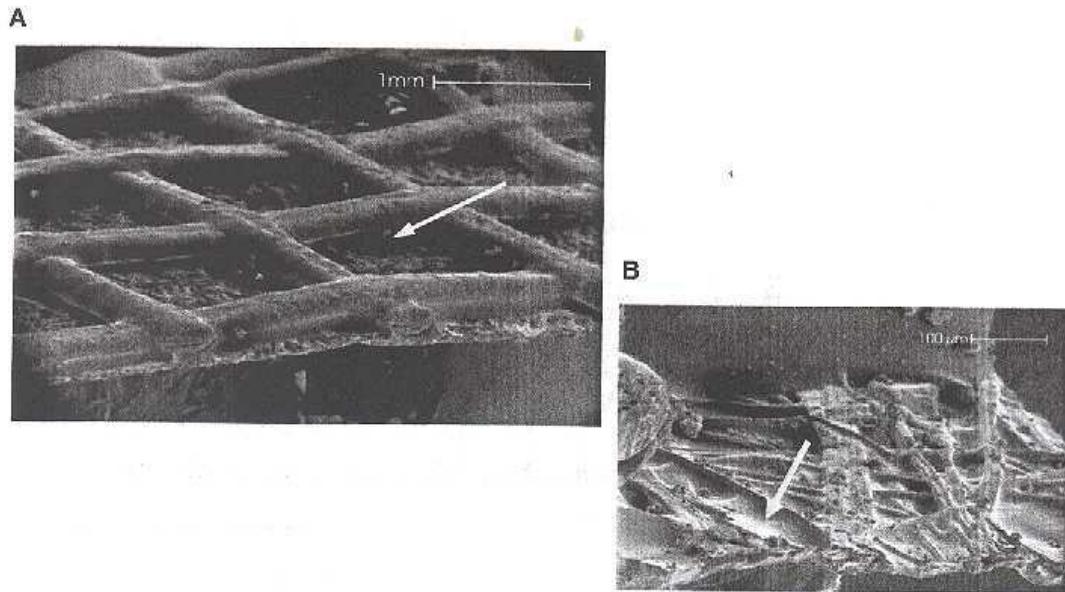


Figure 2

(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.

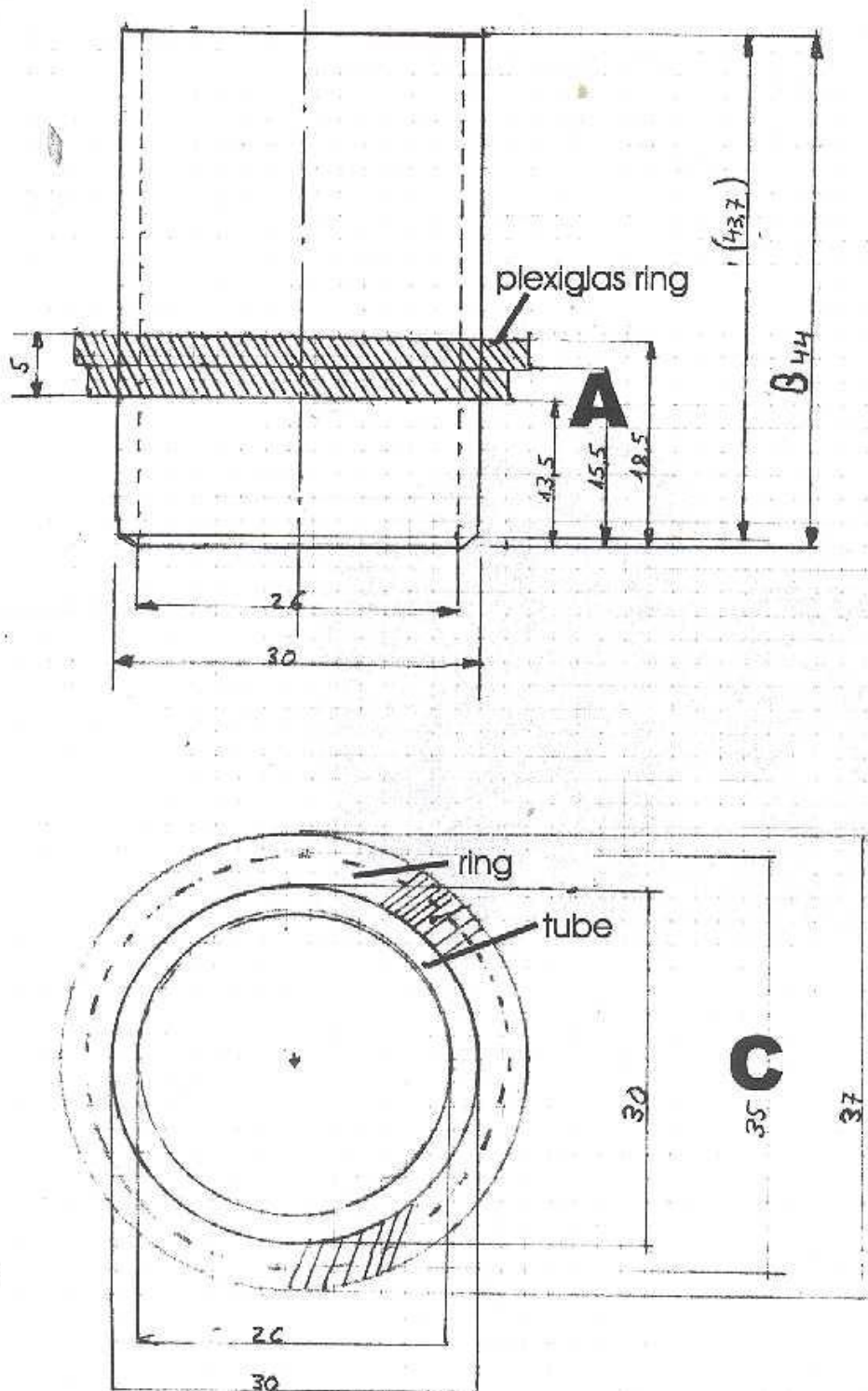


Figure 3

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.