



Bijt je vast experimenten met teken voor onderzoek naar de ziekte van Lyme

Jasmin I. Ersöz¹, Jeroen Coumou¹, Alexandra S. van Gaalen²,
Joppe W. R. Hovius¹

1 Center for Experimental and Molecular Medicine. 2 Animal Research Institute AMC Academic Medical Center Amsterdam, Universiteit van Amsterdam, j.i.ersoz@amc.uva.nl

In het Academisch Medisch Centrum (AMC) in Amsterdam wordt onderzoek gedaan naar de ziekte van Lyme, een ziekte die overgedragen kan worden tijdens een tekenbeet. In dit artikel worden de verschillende diermodellen in muizen en konijnen, die gebruikt worden voor de ontwikkeling van vaccins tegen de ziekte van Lyme, beschreven.

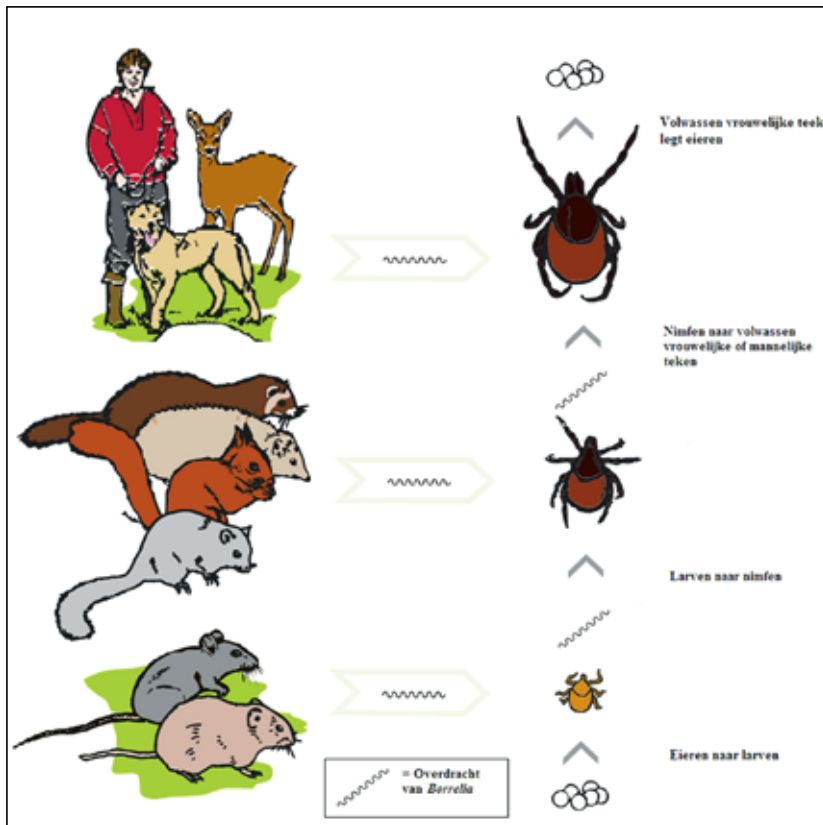
De ziekte van Lyme

De ziekte van Lyme is de meest voorkomende door teken overdraagbare ziekte in Europa en het noordoosten van de Verenigde Staten (VS). De ziekte van Lyme wordt veroorzaakt door de bacterie *Borrelia burgdorferi* sensu lato – vanaf hier *Borrelia* genoemd - welke behoort tot de spirocheten (1). *Borrelia* wordt overgedragen door *Ixodes* teken, in West-Europa betreft dit voornamelijk *Ixodes ricinus* en in de VS betreft dit *Ixodes scapularis* (1).

De levenscyclus van *Ixodes* teken bestaat uit de stadia ei, larve, nimf en volwassen (afb. 1). Nadat de larven uit de eitjes zijn gekomen, kunnen deze zich vastbijten en voeden zich op kleine zoogdieren, zoals muizen en vogels. Na het voeden laten de larven los en vervellen ze vervolgens tot nimf. Een tweede voeding op een nieuwe gastheer zorgt ervoor dat een nimf vervelt tot een volwassen teek. Tenslotte, wanneer een volwassen vrouwelijke teek tijdens een derde voeding wordt bevrucht door een volwassen mannelijke teek (welke geen bloedmaaltijd neemt), zal zij na afloop van een bloedmaaltijd duizenden eitjes leggen. De gehele cyclus van de teek duurt ongeveer twee tot drie jaar.

Larven die op een *Borrelia*-geïnfecteerd dier voeden, kunnen geïnfecteerd raken met *Borrelia* en blijven geïnfecteerd als nimf en volwassen teek. *Borrelia*-geïnfecteerde nimfen en volwassen teken kunnen *Borrelia* vervolgens weer overdragen op een andere gastheer, waaronder mensen. *Borrelia* kan echter niet van volwassen teek naar eitjes (transovarieel) worden overgedragen. Van de verschillende tekenstadia zijn nimfen verantwoordelijk voor de meeste *Borrelia*-infecties in mensen, omdat deze kleiner zijn dan volwassen teken en dus lastig zijn op te merken. Behalve *Borrelia* kunnen ook andere pathogenen zoals parasieten en virussen door teken worden overgedragen.

De ziekte van Lyme wordt behandeld met antibiotica en heeft een goede prognose. Echter, een »



Afbeelding 1:
Levenscyclus van de teek. Uit de eieren komen larven. Hierna is voor de ontwikkeling naar een volgend stadium een bloedmaaltijd op een gastheer (waaronder muizen, konijnen of mensen) nodig. De overdracht van *Borrelia* vindt plaats wanneer larven of nimfen zich voeden op een geïnfecteerde dier. Ontwerp: K. Emil Hovius. Tekening: Jos de Brie.

deel van de patiënten houdt langdurig klachten na antibiotische behandeling. Een oplossing hiervoor zou een vaccin zijn om de ziekte van Lyme te voorkómen. Momenteel bestaat zo'n vaccin nog niet. Een vaccin zou gericht kunnen zijn tegen eiwitten van de teek. Een 'anti-teken' vaccin zou dan *Borrelia*-overdracht kunnen voorkómen (1). Een andere toepassing van een anti-teken vaccin is gericht tegen het succesvol voeden van volwassen teken waardoor de teken geen of minder nakomelingen krijgen.

Onderzoek binnen het AMC

In het Academisch Medisch Centrum (AMC) in Amsterdam houdt de onderzoeksgroep 'Tick and Tick borne diseases', onder leiding van dr. Joppe W.R. Hovius, internist-infectioloog, zich o.a. bezig met onderzoek naar een anti-teken vaccin om de ziekte van Lyme te voorkómen. Dit onderzoek vindt plaats binnen een groot Europees project genaamd ANTIDotE in samenwerking met onderzoekers uit Tsjechië, Duitsland, Spanje en Slowakije waarvan het AMC de wetenschappelijk coördinator is. Meer informatie over ANTIDotE is te vinden op www.antidote-fp7.org.

Een onderdeel van het project is het onderzoek naar tekeneiwitten die in de speekselklieren van de teek zitten. Een teek 'spuugt' speeksel in de huid tijdens het voeden. In het speeksel bevinden zich belangrijke eiwitten die de teek beschermen doordat de eiwitten voorkomen dat het opgenomen bloed stolt of dat het afweersysteem van de gastheer de teek aanvalt. Tot nu toe zijn een aantal eiwitten ontdekt die hier een belangrijke rol in spelen, maar deze zijn tot op heden niet effectief genoeg gebleken om de ziekte van Lyme te voorkómen. Het doel van ANTIDotE is om nieuwe eiwitten te identificeren die als kandidaten voor een anti-teken vaccin kunnen worden gebruikt (1, 2, 3).

Identificatie en onderzoek naar de functie van eiwitten gebeurt deels *in vitro*, maar om te onderzoeken of een teken speeksel-eiwit geschikt is als vaccin tegen tekenvoeding en *Borrelia*-overdracht is daarnaast *in vivo* onderzoek hoofdzakelijk. Hiervoor hebben wij verschillende dierexperimenten opgezet in het AMC waaronder het infecteren van muizen met *Borrelia* met behulp van een injectie, het voeden van larven en nimfen op (*Borrelia*-geïnfecteerde) muizen en voeding van nimfen of volwassen teken op konijnen. Hierdoor zijn wij in de toekomst in staat ons vaccin-onderzoek te doen tegen tekenvoeding en *Borrelia*-overdracht. Verder is het nodig voor het vaccin-onderzoek om een tekenkolonie in het AMC in stand te houden, waarbij alle verschillende levenscyclen van de teek aanwezig zijn. Hieronder staan de technieken van enkele dierexperimenten met teken beschreven.

Dierexperimenten met teken worden uitgevoerd in het Animal Research Institute AMC (ARIA) binnen de animal biosafety level 3 (ABSL-3) unit. Deze experimenten worden in nauwe samenwerking met diervverzorgers, medewerkers van het ARIA, proefdierdeskundigen en de biologische veiligheidsfunctionaris uitgevoerd.

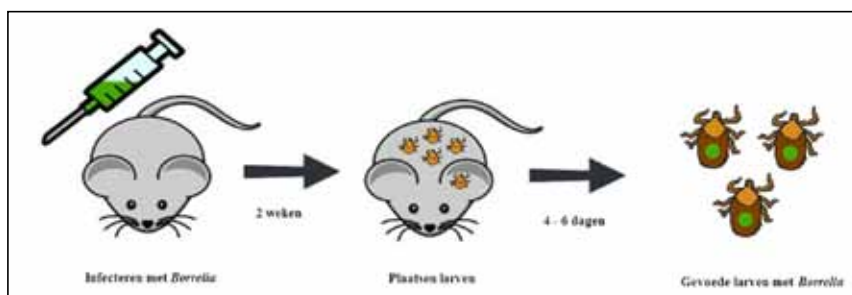
Infectie van muizen met *Borrelia*

Het infecteren van muizen met *Borrelia* gebeurt door een subcutane inoculatie met *Borrelia* tussen de schouderbladen. *Borrelia* wordt hiervoor opgegroeid bij 33 °C in speciaal kweekmedium. Het duurt ongeveer twee tot drie weken voordat de *Borrelia*-geïnfecteerde muizen gebruikt kunnen worden om er larven op te voeden. Voordat de larven worden geplaatst, wordt met behulp van een Polymerase Chain Reaction (PCR) op DNA, geïsoleerd uit een biop van het oor, bepaald of de muis daadwerkelijk is geïnfecteerd met *Borrelia*.

Het voeden van larven op (*Borrelia*-geïnfecteerde) muizen

Muizen van ongeveer zes tot acht weken oud, eventueel geïnfecteerd met *Borrelia* (zie boven), worden eerst licht verdoofd met 1 mg/kg Dexmedetomidine hydrochloride (Dexdomitor, Elanco Animal Health - Orion Pharma). Daarna worden 100 tot 300 larven met een pincet of kwastje in de nek aangebracht. Een schematisch overzicht is te zien in (afb. 2). De larven hebben een voorkeur voor de oren van de muis omdat daar veel oppervlakkige bloedvaten zijn. Het duurt ongeveer 10 tot 15 minuten voordat de larven zich hebben vastgebeten. Hierna worden de muizen weer bijgebracht met 0,5 mg/kg Atipamezole hydrochloride (Anti-Sedan, Jansen Animal Health - Orion Pharma).

Zolang de teken voeden worden de muizen individueel gehuisvest in speciale huisvesting. De reden dat muizen individueel gehuisvest worden, is om te voorkomen dat muizen de teken bij elkaar verwijderen. De muizen zitten in een open kooi met een plastic huisje op een roosterbodem met daaronder een laagje water (afb. 5A). Dit zorgt ervoor dat wanneer de larven loslaten ze in het water vallen en niet ontsnappen. Om zeker te zijn dat er geen larven kunnen ontsnappen zijn er extra veiligheidsmaatregelen genomen, zoals het plaatsen van de kooi in een grotere kooi met daarin een laagje water met zeep en met randen die ingesmeerd zijn met vaseline. Het voeden van larven duurt drie tot vijf dagen waarbij de teken door de opname van bloed



Afbeelding 2:
Een schematisch
overzicht van het
voeden van larven
op een muis.

»

Tecnilab- BMI

info@tecnilab-bmi.nl . +31(0)493-440706 . www.tecnilab-bmi.nl

Service Support Supply Solutions



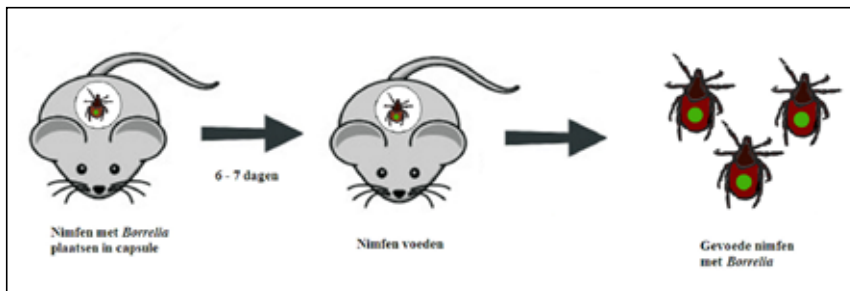
Caging &
Washing Equipment

Disinfection
systems

Diets &
Special Diets

Bedding &
Enrichment

Veterinary
Products



Afbeelding 3:
Een schematisch overzicht van het voeden van nimfen op een muis.

langzaam opzwellen tot 1-2 mm. Dagelijks worden de muizen gecontroleerd op afwijkend gedrag, wordt het water ververst en worden gevoede larven uit het water verzameld. De gevoede larven worden in een stoof van 23 °C bewaard waarin ze na drie tot zes weken vervellen tot nimf. De nimfen of *Borrelia*-geïnfecteerde nimfen kunnen vervolgens gebruikt worden voor experimenten waarbij nimfen *Borrelia* overdragen naar muizen.

Het voeden van nimfen op muizen

De methode zoals beschreven voor larven, werkt minder goed voor nimfen. Uit onze pilotexperimenten bleek dat nimfen die ‘vrij’ op verdoofde muizen werden geplaatst zich onvoldoende hadden vastgebeten voordat de muis wakker werd, waardoor de nimfen er vroegtijdig af vielen. Daarom hebben wij in samenwerking met Tsjechische onderzoekers een alternatieve methode opgezet voor onze dierexperimenten met nimfen.

Bij deze methode worden nimfen in een capsule geplaatst die is bevestigd op de rug van de muis. De capsule bestaat uit een plastic cilinder van 1-2 cm met een rubber dekseltje dat op een stukje schuim is geplakt (afb. 5B). Voordat de capsule, door middel van lijm, op de muis wordt geplaatst, worden de haren verwijderd van flank en rug. De capsule wordt met medisch tape extra op zijn plek gehouden. Vrijwel alle nimfen zijn na vijf tot zes dagen volledig gevoed. Een schematisch overzicht is te zien in (afb. 3). Door het gebruik van de capsule kunnen de muizen in een groep gehuisvest worden met zaagsel en tissues. Indien de teken geïnfecteerd waren met *Borrelia* worden de muizen na afloop van het teken voeden nog twee weken geobserveerd om het verloop van *Borrelia*-infectie in muizen te onderzoeken.

Ook bij deze methode maken we gebruik van een dubbele kooiconstructie met een laag water en een vaseline rand als inperking. Dit model zal in de toekomst worden gebruikt binnen het Europese ANTIDoE project om te onderzoeken welke vaccins de overdracht van *Borrelia* van de teek naar de muis kunnen voorkómen. Muizen worden dan voorafgaand aan het voeden van *Borrelia*-geïnfecteerde nimfen gevaccineerd tegen een tekeneiwit.

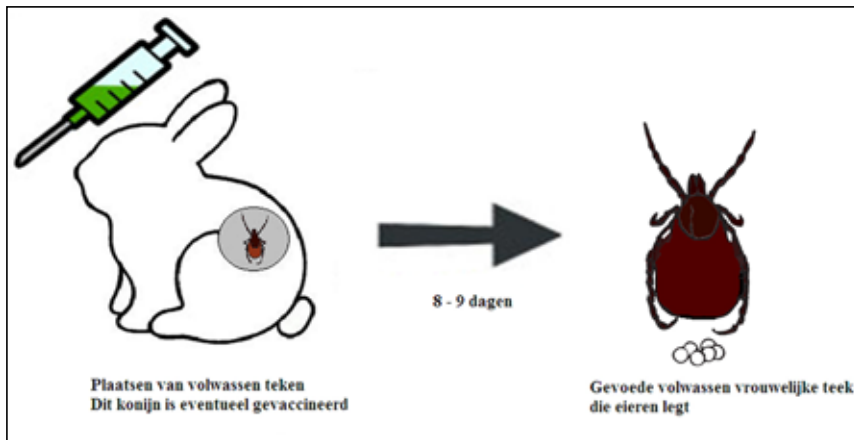
Het voeden van nimfen of volwassen teken op konijnen

Voor het voeden van volwassen teken is de muis een te kleine gastheer. Daarom hebben wij, in navolging van andere onderzoeksgroepen, een model opgezet waarbij volwassen teken op konijnen worden gevoed. Naast volwassen teken kunnen ook nimfen voeden op konijnen, met als voordeel dat er 100 tot 200 nimfen tegelijk kunnen voeden. Net zoals bij nimfen hebben wij ervoor gekozen om de volwassen teken op een afgesloten manier op de konijnen te plaatsen. Dit heeft als voordeel dat de konijnen de teken niet kunnen verwijderen door te krabben en dat de mannelijke teken – die niet bijten – bij de vrouwelijke teken blijven. Daarnaast is het inperken van de teken op het konijn belangrijk omdat het isoleren van de kooien vanwege de grootte lastig is. Tenslotte, door de teken op één plek te isoleren kunnen de teken tijdens het voeden goed geobserveerd worden.

Afhankelijk van het doel van het experiment kunnen de teken op de oren of de flank van het »



Afbeelding 5: Benodigheden voor het capsule model voor teken voeden op muis of konijn.
 A: De muizen zitten in een open kooi met plastic huisje op een roosterbodem met daaronder een laagje water. B: De capsule met een rubber dekseltje dat op een stukje schuim is geplakt. C: Het konijn krijgt een zachte kraag om de nek. D: De capsule – een eyepatch – voor het voeden van teken op konijnen. E: Om de capsule te beschermen tegen krabben krijgen de konijnen een jasje aan.



Afbeelding 4:
Een schematisch
overzicht van het
voeden van nimfen
of volwassen teken
op een konijn.

konijn geplaatst worden. Indien de teken op de oren worden geplaatst, worden de oren afgeschermd met een katoenen sok. De sok wordt bij de basis van het oor aan de huid bevestigd met medisch tape. Het konijn krijgt vervolgens een zachte kraag (afb. 5C) om te voorkómen dat de sok wordt verwijderd door het konijn. Er is voor een zachte kraag gekozen omdat deze weinig invloed heeft op de mobiliteit van de konijnen. Het nadeel van een zachte kraag is dat deze na ongeveer vier tot zes dagen te beschadigd raakt, waardoor de konijnen er soms in slagen om de sok los te krabben. Deze methode is daarom vooral geschikt voor kortere periode van tekenvoeding, van bijvoorbeeld 24 of 72 uur.

In samenwerking met Tsjechische onderzoekers is daarnaast een andere methode opgezet om teken gedurende zeven tot acht dagen op konijnen te voeden. Met deze nieuwe methode wordt gebruik gemaakt van capsules, gemaakt uit eyepatches (afb. 5D) die bevestigd zijn op een rubberen ring. De rubberen ring zorgt voor een vergroting van de ruimte tussen de huid en de capsule waardoor er voldoende ruimte voor de teken ontstaat, omdat de volwassen vrouwelijke teken meer dan 1 cm groot kunnen worden tijdens het voeden. Na het scheren van de flanken wordt de capsule door middel van lijm op een of beide flanken aangebracht. Een schematisch overzicht is te zien in (afb. 4). Om de capsule tegen krabben beschermen krijgen de konijnen een jasje aan (afb. 5E).

De konijnen zitten individueel in een kooi om te voorkomen dat de dieren de sokken, kragen of jasjes bij elkaar kapot maken. Echter hebben de konijnen wel gezelschap nodig en worden daarom met twee of meer tegelijkertijd in een proef gehouden. Onder de kooi bevindt zich een lade met een laag water met zeep en vaseline op de randen als extra inperkende maatregel.

Na zeven tot acht dagen laten de volwassen vrouwelijke teken los en worden ze verwijderd uit de sok of capsule. De vrouwelijke teken worden bewaard in een stoof van 23 °C en leggen na enkele weken eieren. Met de eieren die de vrouwelijke teek legt kunnen wij voorzien in de aanvoer van nieuwe larven. Door de teken te laten voeden op konijnen die gevaccineerd zijn tegen een bepaald tekeneiwit, kunnen wij ook het effect van een anti-tekenvaccin onderzoeken op het voorkómen van succesvol voeden van teken en de eiproductie van volwassen vrouwelijke teken.

Conclusie en perspectief

Het opzetten van diverse dierexperimenten met *Ixodes* teken op het AMC is belangrijk voor vernieuwend onderzoek naar de ziekte van Lyme in Nederland als ook voor de ontwikkeling van een anti-teken vaccin dat erop gericht is de ziekte van Lyme – en mogelijk ook andere door teken overdraagbare aandoeningen – te voorkómen. De komende jaren zullen wij verschillende vaccins gaan uittesten in onze muizen- en konijnen experimenten. Daarnaast hopen wij met »



MOUSEMONITOR™

SURGICAL MONITORING MOUSE AND RAT MADE EASY



HEART RATE • SPO2 • TEMPERATURE • ECG • WARMING

Better Results

Get better study results while improving surgery quality & survival rate.

Superior Data

Ultra low-noise, high-resolution ECG, SpO2 & Respiration

Easy to Use

Durable stainless steel surgical platform AND intuitive touch display

Stable Prep

Maintain body temp. & monitor vital signs during surgery

UNO BV - POB 15 - 6900AA ZEVENAAR - The Netherlands

PHONE: +31 316 524451 - EMAIL: INFO@UNOBV.COM - WWW.UNOBV.COM

behulp van de beschreven modellen een beter inzicht te krijgen in het ontstaan en het verloop van de ziekte van Lyme.

Literatuurlijst

- 1 Schuijt TJ, Hovius JW, van der Poll T *et al.* (2011) *Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future.* Trends in Parasitology 27(1): 40-47
- 2 Sprong H, Trentelman J, Seemann I *et al.* (2014) *ANTIDotE: anti-tick vaccines to prevent tick-borne diseases in Europe.* DOI: 10.1186/1756-3305-7-77
- 3 Hovius JW, Levi M, Fikrig E (2008) *Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agent in Tick Saliva Salivating.* DOI: 10.1371/journal.pmed.0050043



«

Triple A Trading

Wilt u wel de voordelen van IVC en niet de nadelen van IVC?



www.tripleatrading.nl