

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.a

Stadia van de proef:

09-04-2009	Aangemeld	
23-04-2009	Wijzigen	Secretaris van de DEC
24-04-2009	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door) en)

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek Ixodes ricinus kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (Borrelia burgdorferi sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende Borrelia soorten zijn gastheer specifiek, waarbij e in Nederland dominante Borrelia afzelii en de minder algemene Borrelia burgdorferi sensu stricto sterk aan knaagdieren gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van B. burgdorferi s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De borrelia bacteriën worden in Europa uitsluitend door Ixodes ricinus overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en

zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi sensu lato*, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseev et al 2000; Lefcort & Durden, 1996).

Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseev, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of teken aantallen en hun *Borrelia*-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor *Borrelia burgdorferi sensu lato* in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van *Borrelia* bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek *Ixodes ricinus*.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-*Borrelia* systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wieling, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-06-2009 tot 27-06-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 4	muizen	Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen	
Borrelia-vrij	4	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in "[REDACTED] (REDACTED)" gevangen voor de selectiegroep met behulp van 50 Longworth life-traps.

Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de *Borrelia* groep en de 4 geselecteerde muizen voor de *Borrelia* vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen *Borrelia* en *Borrelia*-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([REDACTED], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 tot meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 4 besmette en 4 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek. Aangezien leeftijd van volwassen bosmuizen moeilijk te schatten is, wordt in het aantal van 4 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)).

Literatuur:

Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Britain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]". In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [REDACTED] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

De selectiegroep wordt voor maximaal 24 uur in het veld in een knaagdiervrije omheining geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving. Binnen de omheining worden de muizen in groepen van maximaal 5 dieren met voldoende oppervlakte gehuisvest.

Muizen uit zowel de *Borrelia* als de *Borrelia*-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gasheer sterven teken sterven binnen uren bij en luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane *Borrelia burgdorferi* s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met haverhout. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 80 vallen in permanent open stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen.

Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden.

Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

- 1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.
- 2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.
- 3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder beschreven een oorbipt genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.
- 4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het bipt op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbipt:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbipt aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 5 individuen opgesloten in een omheind gebied, waarbij de omheining van voldoende hoogte is om ontsnapping te voorkomen. De bodem wordt voorzien van een bijt- en graaf-bestendig gaas om ontsnapping te voorkomen. Als kooiverrijking worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdieet en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De *Borrelia* en *Borrelia*-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooiverrijking in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest. Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met *Borrelia burgdorferi* sensu lato en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 8 muizen door middel van IM injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie gebracht. Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 *Borrelia*-vrije teken aangebracht (verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ([REDACTED])). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarin ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muizen wordt de kamer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het [REDACTED] door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IM injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) IM injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

- Borrelia D. Is wel toegepast.
- Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
- Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

- Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
- Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

- Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
- Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
- Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale dislocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] verkend. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]).

In deze proef is het van belang lavale teken te laten vervellen tot het volgende levensstadium (nimfen), waarvoor een bloedmaaltijd op een gastheer benodigd is.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest

Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):



Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.a (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	4					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	4					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.b

Stadia van de proef:

24-04-2009	Aangemeld	
27-04-2009	Wijzigen	Secretaris van de DEC
27-04-2009	Gekopieerd	

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door en

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek Ixodes ricinus kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam Borrelia burgdorferi sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende Borrelia soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante Borrelia afzelii en de minder algemene Borrelia burgdorferi sensu stricto sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van B. burgdorferi s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De borrelia bacteriën worden in Europa uitsluitend door Ixodes ricinus overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten

het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi sensu lato*, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Aleksseef et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag significant hoger vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken e gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseev, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in

opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of tekenaantallen en hun Borrelia-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor Borrelia burgdorferi sensu lato in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van Borrelia bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek Ixodes ricinus.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-Borrelia systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. Euro Surveillance 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-06-2009 tot 27-06-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 5	muizen	Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen	
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " " gevangen voor de selectiegroep met behulp van 50 Longworth life-traps.

Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de Borrelia groep en de 5 geselecteerde muizen voor de Borrelia vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen Borrelia en Borrelia-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën (Gassner et al, [REDACTED], 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 tot meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages, variërend van 5 tot 50% wordt een goep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek. Aangezien leeftijd van volwassen bosmuizen moeilijk te schatten is, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)).

Literatuur:

Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Brittain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]". In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [REDACTED] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

De selectiegroep wordt voor maximaal 24 uur in het veld in een knaagdiervrije omheining geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving. Binnen de omheining worden de muizen in groepen van maximaal 5 dieren met voldoende oppervlakte gehuisvest.

Muizen uit zowel de *Borrelia* als de *Borrelia*-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken binnen enkele uren bij en luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals

opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of tekenaantallen en hun *Borrelia*-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor *Borrelia burgdorferi sensu lato* in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van *Borrelia* bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek *Ixodes ricinus*.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-*Borrelia* systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-06-2009 tot 27-06-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia	5	muizen	Selectie van met <i>Borrelia</i> geïnfecteerde bosmuizen
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van <i>Borrelia</i> vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " " gevangen voor de selectiegroep met behulp van 50 Longworth life-traps.

Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de *Borrelia* groep en de 5 geselecteerde muizen voor de *Borrelia* vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen *Borrelia* en *Borrelia*-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [redacted]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën (Gassner et al, [redacted], 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 tot meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages, variërend van 5 tot 50% wordt een goep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [redacted] getransporteerd voor verder onderzoek. Aangezien leeftijd van volwassen bosmuizen moeilijk te schatten is, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)).

Literatuur:

Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Brittain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[redacted]". In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [redacted] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

De selectiegroep wordt voor maximaal 24 uur in het veld in een knaagdiervrije omheining geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving. Binnen de omheining worden de muizen in groepen van maximaal 5 dieren met voldoende oppervlakte gehuisvest.

Muizen uit zowel de *Borrelia* als de *Borrelia*-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [redacted] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken binnen enkele uren bij en luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals

in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met havermout, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meelworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane *Borrelia burgdorferi* s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met havermout. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 80 vallen in permanent open stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen.

Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden.

Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

- 1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.
- 2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.
- 3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder

beschreven een oorbipt genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.

4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het bipt op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbipt:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbipt aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 5 individuen opgesloten in een omheind gebied, waarbij de omheining van voldoende hoogte is om ontsnapping te voorkomen. De bodem wordt voorzien van een bijt- en graaf-bestendig gaas om ontsnapping te voorkomen. Als kooiverrijking worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdieet en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De Borrelia en Borrelia-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooiverrijking in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest.

Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met Borrelia burgdorferi sensu lato en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 5 muizen door middel van intradermale injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie gebracht. Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 Borrelia-vrije teken aangebracht (verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ([REDACTED])). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarin ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muizen wordt de kamer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het [REDACTED] door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IM injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) Intradermaal injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale disclocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale disclocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder

verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor *Ixodes ricinus* zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken (). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science* 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[Redacted names of directly involved persons]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.b (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.c

Stadia van de proef:

28-04-2009	Aangemeld	[redacted]
28-04-2009	Goedgekeurd	Secretaris van de DEC
12-05-2009	Wijzigen	[redacted]
12-05-2009	Gekopieerd	[redacted]

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project ([redacted] 08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door [redacted] en [redacted].

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; [redacted], Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek *Ixodes ricinus* kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam *Borrelia burgdorferi sensu lato*) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende *Borrelia* soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante *Borrelia afzelii* en de minder algemene *Borrelia burgdorferi sensu stricto* sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van *B. burgdorferi* s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De *borrelia* bacteriën worden in Europa uitsluitend door *Ixodes ricinus* overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte

van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi* sensu lato, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseef et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseef, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wieling, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of tekenaantallen en hun Borrelia-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor Borrelia burgdorferi sensu lato in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van Borrelia bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek Ixodes ricinus.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-Borrelia systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. Euro Surveillance 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-06-2009 tot 27-06-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 5	muizen	Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen	
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " " () gevangen voor de selectiegroep met behulp van 80 Longworth life-traps. Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de Borrelia groep en de 5 geselecteerde muizen voor de Borrelia vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen Borrelia en Borrelia-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten

in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het groeiseizoen, waardoor het aandeel van oudere muizen relatief kleiner is.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([REDACTED], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 to meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages in muizen, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht, waarbij muizen anders dan adulte of subadulte bosmuis direct worden vrijgelaten. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 met *Borrelia* besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek.

Aangezien leeftijd van bosmuizen zeer moeilijk te schatten is als ze eenmaal het geslachtsrijpe volwassen stadium bereikt hebben, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte van 1 dier gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)). Het aantal van ten minste 4 muizen dat tot het einde van het experiment in leven blijft is gekozen op basis van natuurlijke variatie van tekendichtheden op de muizen, welke tussen de 0 tot 200 teken per muis varieert en aangenomen natuurlijke variatie van capaciteit tot overdracht van *Borrelia* bacteriën naar voedende teken. Ondanks de onzekerheid omtrent de sterfkans van muizen gedurende het experiment, kan er van uitgegaan worden dat deze kans aanwezig, doch klein is. In [REDACTED] bleven twee veldgevangen nauwe verwanten van de bosmuis gedurende 40 maanden in het laboratorium in leven (Gern et al, 1993). Rekening houdende met de mogelijke lange overleving in het lab enerzijds en de korte overleving van de muizen in het veld anderzijds, wordt 1 dier per groep als compensatie voor mogelijk uitval als redelijk beschouwd.

Literatuur:

Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, and J. Moret (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *European Journal of Epidemiology* 10:75-80.
Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Brittain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]". In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [REDACTED] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

De selectiegroep wordt voor maximaal 24 uur in het veld in een knaagdiervrije omheining geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving. Binnen de omheining worden de muizen in groepen van maximaal 5 dieren met voldoende oppervlakte gehuisvest.

Muizen uit zowel de Borrelia als de Borrelia-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de kooi om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken sterven binnen enkele uren bij een luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt door een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendeels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met havermout, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meelworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane Borrelia burgdorferi s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met havermout. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 80 vallen in permanent open stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen.

Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden.

Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

- 1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.
- 2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.
- 3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder beschreven een oorbipt genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.
- 4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het bipt op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbipt:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbipt aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 5 individuen opgesloten in een omheind gebied, waarbij de omheining van voldoende hoogte is om ontsnapping te voorkomen. De bodem wordt voorzien van een bijt- en graaf-bestendig gaas om ontsnapping te voorkomen. Als kooiverrijking worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdieet en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De *Borrelia* en *Borrelia*-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooiverrijking in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest.

Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met *Borrelia burgdorferi sensu lato* en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 5 muizen door middel van subcutane injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie

gebracht. Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 Borrelia-vrije teken aangebracht (verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden (■■■■■)). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarin ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muizen wordt de kamer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het ■■■■ door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IM injectie en het nekstreken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) Subcutane injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (onverdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale disclocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale disclocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] ([REDACTED]) verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor Ixodes ricinus zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in [REDACTED] ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.c (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.d

Stadia van de proef:

12-05-2009	Aangemeld
13-05-2009	Goedgekeurd
23-06-2009	Wijzigen
24-06-2009	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door) en

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek Ixodes ricinus kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam Borrelia burgdorferi sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende Borrelia soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante Borrelia afzelii en de minder algemene Borrelia burgdorferi sensu stricto sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van B. burgdorferi s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De borrelia bacteriën worden in Europa uitsluitend door Ixodes ricinus overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte

van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi sensu lato*, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseev et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseev, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of teken aantallen en hun Borrelia-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor Borrelia burgdorferi sensu lato in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van Borrelia bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek Ixodes ricinus.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-Borrelia systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. Euro Surveillance 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 15-06-2009 tot 27-06-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 5	muizen	Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen	
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " " () gevangen voor de selectiegroep met behulp van 80 Longworth life-traps. Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de Borrelia groep en de 5 geselecteerde muizen voor de Borrelia vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen Borrelia en Borrelia-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten

in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het groeiseizoen, waardoor het aandeel van oudere muizen relatief kleiner is.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([REDACTED], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 to meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages in muizen, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht, waarbij muizen anders dan adulte of subadulte bosmuis direct worden vrijgelaten. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 met *Borrelia* besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek.

Aangezien leeftijd van bosmuizen zeer moeilijk te schatten is als ze eenmaal het geslachtsrijpe volwassen stadium bereikt hebben, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte van 1 dier gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)). Het aantal van ten minste 4 muizen dat tot het einde van het experiment in leven blijft is gekozen op basis van natuurlijke variatie van tekendichtheden op de muizen, welke tussen de 0 tot 200 teken per muis varieert en aangenomen natuurlijke variatie van capaciteit tot overdracht van *Borrelia* bacteriën naar voedende teken. Ondanks de onzekerheid omtrent de sterfkans van muizen gedurende het experiment, kan er van uitgegaan worden dat deze kans aanwezig, doch klein is. In [REDACTED] bleven twee veldgevangen nauwe verwanten van de bosmuis gedurende 40 maanden in het laboratorium in leven (Gern et al, 1993). Rekening houdende met de mogelijke lange overleving in het lab enerzijds en de korte overleving van de muizen in het veld anderzijds, wordt 1 dier per groep als compensatie voor mogelijk uitval als redelijk beschouwd.

Literatuur:

Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, and J. Moret (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *European Journal of Epidemiology* 10:75-80.
Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Brittain and Europe.* (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]".
In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [REDACTED] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

De selectiegroep wordt voor maximaal 24 uur in het veld in een knaagdiervrije omheining geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving. Binnen de omheining worden de muizen in groepen van maximaal 5 dieren met voldoende oppervlakte gehuisvest.

Muizen uit zowel de Borrelia als de Borrelia-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de kooi om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken sterven binnen enkele uren bij een luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendeels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met havermout, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meelworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane Borrelia burgdorferi s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met havermout. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 Borrelia-vrije teken aangebracht (verkrege uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ()). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waaij ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muzien wordt de amer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IP injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode va 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun

natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale disclocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale disclocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] ([REDACTED]) verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor Ixodes ricinus zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in [REDACTED] ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.d (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired *Borrelia* infections affect feeding and development of the sheep tick *Ixodes ricinus* under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.e

Stadia van de proef:

24-06-2009	Aangemeld
24-06-2009	Wijzigen
24-06-2009	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek *Ixodes ricinus* kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam *Borrelia burgdorferi* sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende *Borrelia* soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante *Borrelia afzelii* en de minder algemene *Borrelia burgdorferi* sensu stricto sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van *B. burgdorferi* s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De *borrelia* bacteriën worden in Europa uitsluitend door *Ixodes ricinus* overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten

het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi* sensu lato, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseev et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseev, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in

opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritme stoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of tekenaantallen en hun Borrelia-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor Borrelia burgdorferi sensu lato in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van Borrelia bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek Ixodes ricinus.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-Borrelia systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. Euro Surveillance 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 25-06-2009 tot 07-07-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 5	muizen	Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen	
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " ") gevangen voor de selectiegroep met behulp van 106 Longworth life-traps. Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de Borrelia groep en de 5 geselecteerde muizen voor de Borrelia vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen Borrelia en Borrelia-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het groeiseizoen, waardoor het aandeel van

oudere muizen relatief kleiner is.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([REDACTED], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 to meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatiedynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages in muizen, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht, waarbij muizen anders dan adulte of subadulte bosmuis direct worden vrijgelaten. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 met *Borrelia* besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek.

Aangezien leeftijd van bosmuizen zeer moeilijk te schatten is als ze eenmaal het geslachtsrijpe volwassen stadium bereikt hebben, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte van 1 dier gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)). Het aantal van ten minste 4 muizen dat tot het einde van het experiment in leven blijft is gekozen op basis van natuurlijke variatie van tekendichtheden op de muizen, welke tussen de 0 tot 200 teken per muis varieert en aangenomen natuurlijke variatie van capaciteit tot overdracht van *Borrelia* bacteriën naar voedende teken. Ondanks de onzekerheid omtrent de sterfkans van muizen gedurende het experiment, kan er van uitgegaan worden dat deze kans aanwezig, doch klein is. In [REDACTED] bleven twee veldgevangen nauwe verwanten van de bosmuis gedurende 40 maanden in het laboratorium in leven (Gern et al, 1993). Rekening houdende met de mogelijke lange overleving in het lab enerzijds en de korte overleving van de muizen in het veld anderzijds, wordt 1 dier per groep als compensatie voor mogelijk uitval als redelijk beschouwd.

Literatuur:

Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, and J. Moret (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *European Journal of Epidemiology* 10:75-80.
Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Britain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]".
In dit gebied wordt in het kader van verschillende projecten binnen [REDACTED] sinds 2006 onderzoek naar tekendichtheden en *Borrelia* besmettingen gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

Bosmuizen uit de selectiegroep worden voor maximaal 24 uur in het veld met maximaal drie individuen per kooi in Makrolon kooitype 3,5 geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving.

Muizen uit zowel de Borrelia als de Borrelia-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken sterven binnen enkele uren bij een luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefrun gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met havermout, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meelworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane Borrelia burgdorferi s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met havermout. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 106 vallen in permanent open

stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel (pindakaas met havermout en een stuk verse appel) om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen.

Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden.

Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.

2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.

3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder beschreven een oorbiopsie genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.

4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het biopsie op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbiopsie:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbiopsie aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 3 individuen opgesloten in een Makrolon type 3.5 kooi. Als kooi-omheining worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdiets en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De *Borrelia* en *Borrelia*-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooi-omheining in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest.

Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met *Borrelia burgdorferi* sensu lato en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 5 muizen door middel van IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie gebracht. Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 *Borrelia*-vrije teken aangebracht (verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ([REDACTED])). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarna ze onder toezicht bijkomen. Voor

het bijkomen van de muizen wordt de amer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het [] door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IP injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale dislocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de

Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] ([REDACTED]) verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor Ixodes ricinus zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in [REDACTED] ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.e (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.f

Stadia van de proef:

24-06-2009	Aangemeld
24-06-2009	Positief advies
10-07-2009	Wijzigen
14-07-2009	Gekopieerd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door) en

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek Ixodes ricinus kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam Borrelia burgdorferi sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende Borrelia soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante Borrelia afzeli en de minder algemene Borrelia burgdorferi sensu stricto sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van B. burgdorferi s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De borrelia bacteriën worden in Europa uitsluitend door Ixodes ricinus overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte

van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi* sensu lato, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseef et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseef, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Teken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of teken aantallen en hun *Borrelia*-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor *Borrelia burgdorferi sensu lato* in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van *Borrelia* bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek *Ixodes ricinus*.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-*Borrelia* systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wieling, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 25-06-2009 tot 07-07-2009

3. Specificatie diergroepen:

Infectie groepen			
Borrelia 5	muizen		Selectie van met Borrelia geïnfecteerde bosmuizen
Borrelia-vrij	5	muizen	Selectie van Borrelia vrije bosmuizen
Selectie groep	40	muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " ") gevangen voor de selectiegroep met behulp van 106 Longworth life-traps. Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de *Borrelia* groep en de 5 geselecteerde muizen voor de *Borrelia* vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen *Borrelia* en *Borrelia*-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten

in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het groeiseizoen, waardoor het aandeel van oudere muizen relatief kleiner is.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [REDACTED]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([REDACTED], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 to meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatiedynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages in muizen, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht, waarbij muizen anders dan adulte of subadulte bosmuis direct worden vrijgelaten. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 met *Borrelia* besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [REDACTED] getransporteerd voor verder onderzoek.

Aangezien leeftijd van bosmuizen zeer moeilijk te schatten is als ze eenmaal het geslachtsrijpe volwassen stadium bereikt hebben, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte van 1 dier gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)). Het aantal van ten minste 4 muizen dat tot het einde van het experiment in leven blijft is gekozen op basis van natuurlijke variatie van tekendichtheden op de muizen, welke tussen de 0 tot 200 teken per muis varieert en aangenomen natuurlijke variatie van capaciteit tot overdracht van *Borrelia* bacteriën naar voedende teken. Ondanks de onzekerheid omtrent de sterfkans van muizen gedurende het experiment, kan er van uitgegaan worden dat deze kans aanwezig, doch klein is. In [REDACTED] bleven twee veldgevangen nauwe verwanten van de bosmuis gedurende 40 maanden in het laboratorium in leven (Gern et al, 1993). Rekening houdende met de mogelijke lange overleving in het lab enerzijds en de korte overleving van de muizen in het veld anderzijds, wordt 1 dier per groep als compensatie voor mogelijk uitval als redelijk beschouwd.

Literatuur:

Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, and J. Moret (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *European Journal of Epidemiology* 10:75-80.
Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Britain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[REDACTED]". In dit gebied werden tussen maart en september 2005 door [REDACTED] onderzoek naar tekendichtheden, *Borrelia* besmettingen en muizenpopulaties onder invloed van

runderbegrazing gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

Bosmuizen uit de selectiegroep worden voor maximaal 24 uur in het veld met maximaal drie individuen per kooi in Makrolon kooitype 3,5 geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving.

Muizen uit zowel de Borrelia als de Borrelia-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken sterven binnen enkele uren bij een luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met haverworm, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meelworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane Borrelia burgdorferi s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met haverworm. Aangezien het vangen van insectivore spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 106 vallen in permanent open stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel (pindakaas met havermout en een stuk verse appel) om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen. Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden. Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

- 1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.
- 2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.
- 3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder beschreven een oorbipt genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.
- 4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het bipt op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbipt:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbipt aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 3 individuen opgesloten in een Makrolon type 3.5 kooi. Als kooiverrijking worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdieet en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De *Borrelia* en *Borrelia*-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooiverrijking in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest.

Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met *Borrelia burgdorferi sensu lato* en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 5 muizen door middel van IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie gebracht. Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 *Borrelia*-vrije teken aangebracht.

(verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ([REDACTED])).

Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarin ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muizen wordt de kamer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het [REDACTED] door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IP injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbipt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel

van cervicale dislocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale dislocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] [REDACTED] verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor Ixodes ricinus zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in [REDACTED] ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.f (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Aanmeldingsformulier voor proeven met gewervelde dieren.

Secretariaat DEC

Aanvrager:

Afdeling:

Titel dierproef: Do naturally acquired Borrelia infections affect feeding and development of the sheep tick Ixodes ricinus under laboratory conditions?

Aanmeldcode / Protocol: 2009036.g

Stadia van de proef:

29-07-2009	Aangemeld
07-09-2009	Positief advies
07-09-2009	Proef beëindigd
07-09-2009	Welzijnsevaluatie aangemaakt
08-09-2009	Welzijnsevaluatie aangemeld
11-09-2009	Welzijnsevaluatie goedgekeurd

Is deze proef wetenschappelijk getoetst en goedgekeurd? Ja

Toelichting: experimenten worden uitgevoerd in het kader van een AIO project (08017) en zijn als zodanig beoordeeld door een speciale wetenschappelijke commissie bestaande uit drie aan het onderzoeksveld gerelateerde referenten.

Het voorstel is verder gevalideerd door) en).

1.a. Met dit onderzoek te beantwoorden concrete vraag:

. Wetenschappelijke vraag m.b.t. ziekten bij de mens

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia op grote delen van het noordelijk halfrond sterk in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen (Hofhuis et al. 2006). Ook bleek dat besmettingspercentages van teken in Nederland veel hoger konden liggen dan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek kon worden aangetoond (Takken et al, 2008; , Gassner et al, 2008, van Overbeek et al, 2008).

De schapenteek Ixodes ricinus kent een levenscyclus van 4 stadia, namelijk ei, larve, nimf en volwassene. Een teek neemt gedurende haar leven 3 maal een bloedmaaltijd, die gebruikt wordt voor vervelling naar een volgend stadium, of als volwassen vrouwtje voor productie van tot 2000 eieren, waarna ze sterft. De jongere levensstadia (larven en nimfen) voeden zich met name op knaagdieren en vogels, waarbij bij iedere bloedmaaltijd de bacteriële veroorzakers van de ziekte van Lyme (met de verzamelnaam Borrelia burgdorferi sensu lato) kunnen worden opgenomen. Deze bacterie blijft de teek de rest van haar leven bij zich dragen en kan bij een volgende bloedmaaltijd haar nieuwe gastheer besmetten. De meeste van de 12 bekende Borrelia soorten zijn gastheer specifiek, waarbij de in Nederland dominante Borrelia afzeli en de minder algemene Borrelia burgdorferi sensu stricto sterk aan knaagdieren, maar ook aan medische gevallen van Lyme borreliose in mensen gerelateerd zijn. Nimfen en volwassen teken hebben voorkeur voor grotere gastheren, waaronder met name reeën. Deze gastheren hebben meestal geen rol in de verspreiding van B. burgdorferi s.l.. De levenscyclus neemt in Nederland tussen de 2 en 7 jaar in, met name afhankelijk van meteorologische omstandigheden. De borrelia bacteriën worden in Europa uitsluitend door Ixodes ricinus overgedragen, waarbij specifieke moleculaire interacties tussen de teek en

de bacteriën aantonen dat beide organismen al lange tijd samen geëvolueerd zijn.

Vele aspecten op het gebied van interacties tussen de teken en de bacteriële veroorzaker van de ziekte van Lyme blijven onderbelicht. Zoals bij veel gastheer-parasiet interacties bekend is, kunnen parasieten het gedrag of fysiologie van hun gastheer en/of vector aanpassen. Bijvoorbeeld bij besmette malariamuggen en zandvliegen, die vaker bijten dan hun onbesmette soortgenoten en daarmee de kans op overdracht van de in hun lichaam aanwezige parasieten vergroten (Hurd, 2006). Naast insecten zijn aanpassingen van gastheer gedrag ook bij andere taxa bekend, zoals bij mijten onder invloed van bacteriën en bijvoorbeeld gedragsveranderingen in zoogdieren onder invloed van rabiës. Bij teken zijn door parasieten geïnduceerde veranderingen tot heden zelden onderzocht. Er zijn echter spaarzame aanwijzingen in de literatuur die wijzen op aangepast gedrag van teken onder invloed van besmetting met *Borrelia burgdorferi sensu lato*, waar resultaten behaald werden als nevenobservatie of met teken en *Borrelia* stammen die voor Nederland minder relevant zijn (Alekseef et al 2000; Lefcort & Durden, 1996). Recentelijk werd in een pilot experiment in het [REDACTED] aangetoond dat besmette Nederlandse schapenteken (*Ixodes ricinus*) onder invloed van besmetting met *B. burgdorferi* s.l. ten gunste van het vinden van een gastheer ander gedrag vertonen ([REDACTED]). Ook werd geobserveerd dat besmette teken significant hogere gehalten aan lipiden bevatten. Deze lipiden zijn voor de teek tussen de bloedmaaltijden in de enige vorm van energiebron en zijn daarom sterk bepalend in onder andere de gastheerzoekactiviteit en droogteresistentie van teken (Randolph and Storey 1999). Dit onderzoeksvoorstel richt zich op de vragen:

- a) Zijn *B. burgdorferi* s.l. infecties die de teek via natuurlijke weg oploopt van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus*?
- b) Wat is de overdrachtsefficiëntie van *B. burgdorferi* s.l. van van nature besmette wilde bosmuizen naar onbesmette *I. ricinus* larven?
- c) Is de *Borrelia*-infectiestatus van bosmuizen van invloed op de ontwikkeling van *I. ricinus* die op deze bosmuizen voeden?

Als bijkomend resultaat wordt voor het eerst in het betreffende gebied een inschatting gemaakt wordt van de aanwezige knaagdierpopulaties en *Borrelia* besmettingen in bosmuizen, die de belangrijkste *Borrelia* reservoirs vormen in de Nederlandse natuur.

Literatuur:

- Alekseef, A. N., P. M. Jensen, H. V. Dubinina, L. A. Smirnova, N. A. Makrouchina, and S. D. Zharkov (2000). Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. *Folia parasitologica* 47:147-153.
- Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
- Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wielinga, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 60622.
- Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Lefcort, H., and L. A. Durden (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 97-103.
- Randolph, S. E., and K. Storey (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of medical entomology* 36: 741-748.
- Takken, W., A. J. H. v. Vliet, L. S. v. Overbeek, F. Gassner, F. Jacobs, W. A. Bron, and S. Mulder. 2008. Tekken, tekenbeten en *Borrelia* infecties in Nederland deel II : april 2008: update met gegevens van 2006 en 2007. Wageningen Universiteit.
- van Overbeek, L., F. Gassner, C. Lombaers van der Plas, P. Kastelein, U. Nunes-da Rocha, and W. Takken (2008). Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiology Ecology* 66:72-84.

1.b. Het uiteindelijk doel (Maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie):

De ziekte van Lyme is een door teken overgedragen zoonose die in de laatste decennia wereldwijd in opmars is. Tussen 1994 en 2005 verdrievoudigde het aantal geïnfecteerde mensen in Nederland tot ongeveer 17.000 gevallen. (Hofhuis et al. 2006). De ziekte van Lyme uit zich in eerste instantie in de meeste gevallen als rode vlek op de huid (erythema migrans), die vaak gepaard gaat met griepachtige verschijnselen. Veel besmettingen blijven echter in eerste instantie onopgemerkt, of kunnen moeilijk behandeld worden met antibiotica. In deze gevallen kan de ziekte zich ontwikkelen in onder andere huiduitslag, gewrichtsklachten, hersenvliesontsteking en hartritmestoornissen. Aangezien teken in de meeste Nederlandse bosgebieden en zelfs veelal in tuinen worden gevonden (Takken et al, 2008), leeft de ziekte zeer sterk in de maatschappij. De geobserveerde toename in incidentie in Nederland kan nog niet verklaard worden. Als mogelijke oorzaken worden onder andere toename in reëenstand, klimaatverandering, toename in recreatie en afname in gebruik van bestrijdingsmiddelen zoals DDT genoemd. Of teken aantallen en hun *Borrelia*-besmettingen werkelijk toenemen, moet langjarig onderzoek op verschillende vaste locaties uitwijzen. Ook zullen risicovoorspellingen gemaakt moeten worden, waarbij de overdracht efficiëntie van door teken overdraagbare pathogenen in de natuur en naar de mens essentieel zijn.

Het hier voorgestelde experiment draagt daar aan bij doordat:

- a) in een natuurgebied met sterke recreatiedruk een schatting wordt gemaakt van de graad van besmetting van de bosmuis, welke wordt beschouwd als het belangrijkste reservoir voor *Borrelia burgdorferi sensu lato* in de Nederlandse natuur.
- b) de transmissie efficiëntie van *Borrelia* bacteriën van bosmuizen naar tekenlarven wordt geschat.
- c) wordt vastgesteld of besmetting van muizen en teken van invloed is op de biologie van de schapenteek *Ixodes ricinus*.

Deze factoren zijn van groot belang om inzicht te krijgen in enkele parameters van het muis-teek-*Borrelia* systeem onder natuurlijke omstandigheden.

Literatuur:

Hofhuis, A., J. W. van der Giessen, F. H. Borgsteede, P. R. Wieling, D. W. Notermans, and W. van Pelt (2006). Lyme borreliosis in the Netherlands: strong increase in GP consultations and hospital admissions in past 10 years. *Euro Surveillance* 11:E060622 060622.

1.c. Lekensamenvatting:

2. Gepland vanaf: 30-07-2009 tot 12-08-2009

3. Specificatie diergroepen:

Borrelia 5	muizen	Selectie van met <i>Borrelia</i> geïnfecteerde bosmuizen
Borrelia-vrij	5 muizen	Selectie van <i>Borrelia</i> vrije bosmuizen
Selectie groep	40 muizen	Alle gevangen bosmuizen voorselectie

4.a. Nadere aanduiding gebruikte dieren:

In totaal 40 mannelijke (sub adulte en adulte) bosmuizen (*Apodemus sylvaticus*) worden in " ") gevangen voor de selectiegroep met behulp van 106 Longworth life-traps. Overige gevangen knaagdieren worden direct na inspectie van de valinhoud in hun oorspronkelijke leefomgeving vrijgelaten.

Met uitzondering van de geselecteerde muizen voor de *Borrelia* groep en de 5 geselecteerde muizen voor de *Borrelia* vrije groep worden alle individuen uit de selectiegroep na maximaal 24 uur in hun natuurlijke leefgebied vrijgelaten.

De groepen *Borrelia* en *Borrelia*-vrij worden op exact dezelfde manier behandeld. Het betreft in beide gevallen mannelijke sub adulte en mannelijke adulte bosmuizen.

In het aantal van 5 per groep, wordt rekening gehouden met uitval van 1 dier per groep. Dergelijke uitval is gebaseerd op ervaringen van zeer geringe mortaliteit van wilde muizen gedurende eerdere experimenten in het veld. Daarnaast worden de muizen gevangen in het groeiseizoen, waardoor het aandeel van oudere muizen relatief kleiner is.

4.b. Motivatie waarom is gekozen voor deze diersoort:

De bosmuis (*Apodemus sylvaticus*) wordt gezien als de belangrijkste gasheer voor larvale tekenstadia en voor overdracht van *Borrelia* bacteriën in Europa. Ook in Nederland wordt deze soort algemeen aangetroffen in bosgebieden (Gassner et al, 2008; [redacted]; Smit et al, 2004). In Nederlandse natuurgebieden is de bosmuis ook vaak besmet met *Borrelia* bacteriën ([redacted], Gassner et al, 2008, Smit et al, 2003) en worden bosmuizen in het algemeen met hoge dichtheden voedende teken aangetroffen (0 to meer dan 200 teken per muis).

Literatuur:

Gassner, F., P. Verbaarschot, R. C. Smallegange, J. Spitzen, S. E. Van Wieren, and W. Takken (2008). Variations in *Ixodes ricinus* Density and *Borrelia* Infections Associated with Cattle Introduced into a Woodland in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7138-7144.
Smit, R., F. Dijk, F. Kruidbos, L. M. Schouls, I. v. d. Pol, B. Docters van Leeuwen, M. Helinski, R. Holtkamp, and W. Takken (2003). Populatie dynamiek en fenologie van teken in Nederland. *Infectieziekten bulletin* (in Dutch) 14:167-170.

4.c. Toelichting voor het aantal gebruikte dieren:

Op basis van in de Nederlandse natuur voorkomende *Borrelia* infectiepercentages in muizen, variërend van 5 tot 50% wordt een groep van 40 bosmuizen gevangen. Deze worden in een omheinde kooi ter plaatse ondergebracht, waarbij muizen anders dan adulte of subadulte bosmuis direct worden vrijgelaten. Door middel van een oorpunctie wordt binnen 24 uur bepaald welke muizen met *Borrelia* besmet zijn. Op basis van deze test wordt aangenomen dat in de selectiegroep minstens 5 met *Borrelia* besmette en 5 onbesmette muizen geselecteerd kunnen worden. Deze worden naar het [redacted] getransporteerd voor verder onderzoek.

Aangezien leeftijd van bosmuizen zeer moeilijk te schatten is als ze eenmaal het geslachtsrijpe volwassen stadium bereikt hebben, wordt in het aantal van 5 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte van 1 dier gedurende de twee weken van het experiment (naar schatting worden bosmuizen in hun natuurlijke biotoop maximaal 3 maanden oud (Macdonald and Barret, 1993)). Het aantal van ten minste 4 muizen dat tot het einde van het experiment in leven blijft is gekozen op basis van natuurlijke variatie van tekendichtheden op de muizen, welke tussen de 0 tot 200 teken per muis varieert en aangenomen natuurlijke variatie van capaciteit tot overdracht van *Borrelia* bacteriën naar voedende teken. Ondanks de onzekerheid omtrent de sterfkans van muizen gedurende het experiment, kan er van uitgegaan worden dat deze kans aanwezig, doch klein is. In Zwitserland bleven twee veldgevangen nauwe verwanten van de bosmuis gedurende 40 maanden in het laboratorium in leven (Gern et al, 1993). Rekening houdende met de mogelijke lange overleving in het lab enerzijds en de korte overleving van de muizen in het veld anderzijds, wordt 1 dier per groep als compensatie voor mogelijk uitval als redelijk beschouwd.

Literatuur:

Gern, L., M. Siegenthaler, C. M. Hu, S. Leuba-Garcia, P. F. Humair, and J. Moret (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *European Journal of Epidemiology* 10:75-80.
Macdonald D. W. and Barret P., *Collins field guide Mammal of Brittain and Europe*. (Harpercollins, London, 1993).

4.d. Herkomst:

Borrelia	E. andere herkomst
Borrelia-vrij	E. andere herkomst
Selectie groep	E. andere herkomst

Toelichting:

De muizen zijn afkomstig van wildvang in bosgebied "[redacted]"

████████████████████. In dit gebied werden tussen maart en september 2005 door de onderzoek naar tekendichtheden, *Borrelia* besmettingen en muizenpopulaties onder invloed van runderbegrazing gedaan.

5.a. Accommodatie: Elders

Bosmuizen uit de selectiegroep worden voor maximaal 24 uur in het veld met maximaal drie individuen per kuoi in Makrolon kooitje 3,5 geplaatst. Water en voer worden ad libitum verstrekt. In het bos aanwezig strooisel, vegetatie en dood hout worden aangeboden als kooiverrijking voor een nabootsing van de natuurlijke leefomgeving.

Muizen uit zowel de Borrelia-als de Borrelia-vrij groep worden individueel in macrolon type 3 kooien met beperkte kooiverrijking (rood kunststof buis) en houtsnippers gehuisvest. De kooien worden in een speciaal aangepaste kamer op het [REDACTED] ondergebracht, waar iedere kooi op een bassin met 5 cm water wordt geplaatst om volgezogen teken op te vangen. Beperkte kooiverrijking wordt toegepast om teken buiten de muiz om minimale schuilplaats te bieden. Indien niet vastzittend aan een gastheer sterven teken sterven binnen enkele uren bij een luchtvochtigheid onder 80%.

De temperatuur in de kamer is constant op kamertemperatuur (en kan verhoogd worden ivm ontwaken van verdoofde muizen) en luchtvochtigheid wordt dmv een luchtbevochtiger optimaal (55% +/- 5% RH zoals in een proefruimte gemeten) gehouden. Beide factoren worden online bijgehouden door een op een computer aangesloten datalogger.

De lichtintensiteit wordt met een op een dimmer aangesloten goeilamp ingesteld op 500 Lux (daglichtintensiteit in beboste omgeving) bij een cyclus van 17,5 uur dag en 6,5 uur nacht (vergelijkbaar met dag nacht ritme in juni).

De kamer is grotendels afgesloten van direct daglicht en is voorzien van barrières tegen binnendringen / ontsnappen van knaagdieren.

5.b. Huisvesting & Verzorging:

Een welzijnsdagboek zal worden bijgehouden gedurende het experiment.

Een werkprotocol zal in de kamer op het Laboratorium aanwezig zijn.

5.c. Voeding:

De Longworth vallen die gebruikt worden bij de vangsten worden voorzien van een klont pindakaas met haverhout, een levende meelworm en een stuk vers appel voor voedsel en watervoorziening tijdens opsluiting in de vallen. Daarnaast wordt als nestmateriaal een pluk hooi in de vallen aangebracht. De meeworm dient als voedsel voor eventueel gevangen insectivore spitsmuizen.

In de het veldonderkomen worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen *ad libitum* aangeboden.

In de kamer op het [REDACTED] worden water en standaard dieet voor laboratoriummuizen ad libitum aangeboden.

6.a. Proefschema / proefbehandelingen:

In een parallel aangevraagd experiment (2009039) worden 2 Balb-C muizen gebruikt om tekenlarven van een bloedmaaltijd te voorzien. Daar zijn de muizen zelf zijn als zodanig niet onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, maar zijn ze essentieel voor uitvoer van het onderzoek naar het gedrag van teken. In het hier beschreven experiment zijn de in het wild gevangen bosmuizen onderdeel van de wetenschappelijke vraagstelling, waarbij het effect van natuurlijk opgedane *Borrelia burgdorferi* s.l. besmettingen worden bekeken.

MUIZENVANGSTEN:

Knaagdieren worden gevangen in Longworth life traps. Dergelijke vallen worden algemeen toegepast voor het vangen van wilde knaagdieren en bieden een beschermde leefomgeving met voldoende bewegingsruimte tijdens het verblijf van een gevangen knaagdier. Iedere val wordt voorzien van een pluk hooi, een meelworm en een brok pindakaas met havermost. Aangezien het vangen van insectivore

spitsmuizen niet voorkomen kan worden, wordt ook een meelworm aan de val toegevoegd om eventueel gevangen spitsmuizen van voldoende voer te voorzien.

In een 4 daagse periode voorafgaand aan de vangst ("pre-baiting") worden 106 vallen in permanent open stand dagelijks voorzien van vers hooi en voedsel (pindakaas met havermout en een stuk verse appel) om aanwezige knaagdieren te laten wennen. De vallen worden met ca. 5 meter tussenruimte over het gebied verspreid, bij voorkeur nabij mogelijke fourageer en nestplaatsen van bosmuizen.

Voorafgaand aan het eerste vangstmoment worden om 18:00 de vallen op "scherp" gezet en van vers hooi en voer voorzien zodat binnentredende knaagdieren gevangen kunnen worden.

Nadien wordt om de 4 uur (3 keer in totaal) alle vallen geïnspecteerd op aanwezige knaagdieren.

Bij inspectie van iedere val wordt de volgende procedure uitgevoerd:

- 1) overbrengen van het knaagdier vanuit de val in een transparante kunststof zak om de muis op de juiste manier te kunnen hanteren.
- 2) hanteren van het knaagdier, selectie op soort, geslacht en leeftijd.
- 3) Directe vrijlating indien soort, geslacht en leeftijd anders zijn dan adulte en subadulte bosmuizenmannetjes; indien het gevangen individu een (sub) adult mannetje is wordt zoals hieronder beschreven een oorbiopsie genomen waarna de muis in de omheining wordt ondergebracht.
- 4) Geselecteerde muizen worden middels de keuze van het oor, de plaats van het biopsie op het oor en een specifieke knip in de vacht gemarkeerd voor latere identificatie.

Het nemen van een oorbiopsie:

Ter voorkoming van beschadiging van een centrale tak van de oorvene wordt het oorbiopsie aan de buitenzijde van het oor genomen.

De gebruikte chirurgische schaar wordt na ieder knip oppervlakte-gesteriliseerd met het afbranden van 99% ethanol.

Opsluiting van muizen in het veld:

Geselecteerde muizen worden met maximaal 3 individuen opgesloten in een Makrolon type 3.5 kooi. Als kooiverrijking worden strooisel, vegetatie en dood hout in de omheining gebracht. Een standaard knaagdierdieet en water worden ad libitum verstrekt. De omheining wordt van boven voorzien van gaas om predatie door natuurlijke vijanden van de bosmuis te voorkomen.

Tijdens alle handelingen met de knaagdieren worden chirurgische handschoenen gedragen.

Gezien het geringe oppervlakte van het bemonsterde gebied (ongeveer 500 vierkante meter), de immigratie van muizen buiten het bemonsterde gebied en de snelle voortplantingscyclus van de muizen wordt verwacht dat de muizenpopulatie niet onder de vangsten zullen leiden.

VERDERE EXPERIMENTELE HANDELINGEN:

De *Borrelia* en *Borrelia*-vrije groep muizen wordt in verduisterde Makrolon type 3 kooien (1 per muis) met zaagsel en beperkte kooiverrijking in de vorm van een transparant rode buis naar het [REDACTED] vervoerd.

Aldaar worden de kooien in de geprepareerde kamer als elders beschreven gehuisvest.

Gedurende 5 dagen wordt aan natuurlijk aanwezige teken (in eerder onderzoek blijken aantallen teken per muis tussen 0 en meer dan 200 teken per individu te liggen) gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen, waarna ze zich laten vallen en uit zichzelf uit de kooi kruipen om zich in een onderstaand water bassin te laten vallen. Daar kunnen de teken 4 maal per dag verzameld worden, waarna ze voor verdere experimentele handelingen (zonder betrokkenheid van de knaagdieren) gebruikt kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar: duur en grootte van de bloedmaaltijd, duur van vervellingsproces, verschijningsgrootte en gewicht van de uit volgezogen larven verschenen nimfen. Tenslotte worden infectiestatus met *Borrelia burgdorferi sensu lato* en vetgehalte (een maat voor energievoorraad) van de nimfen bepaald.

Nadat de muizen vrij zijn van teken worden de 5 muizen door middel van IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) (toegediend met twee aparte injectiespuiten) onder sedatie gebracht.

Tijdens de sedatie worden alle kooien vervangen door schone kooien met vergelijkbare inrichting. Op de nog steeds verdoofde muizen wordt per muis een groep van 200 Borrelia-vrije teken aangebracht (verkregen uit een laboratorium waar teken in een kweek onderhouden worden ()). Alle muizen worden vervolgens individueel in hun kooi gelegd, waarin ze onder toezicht bijkomen. Voor het bijkomen van de muizen wordt de kamer op iets hogere temperatuur gebracht. Gedurende een periode van 5 dagen wordt de teken als bovenstaand gelegenheid gegeven een volledige bloedmaaltijd te nemen.

Na afloop van de 2e periode van 5 dagen wordt op alle knaagdieren euthanasie toegepast.

De betrokken functionaris wordt op het () door een deskundige geïnstrueerd in het toedienen van een IP injectie en het nekstrekken van muizen.

6.b. Mate van ongerief:

Borrelia C. Matig
Borrelia-vrij C. Matig
Selectie groep B. Gering/Matig

6.c. Waaruit bestaat het ongerief en hoe bent u tot uw inschatting van de mate van ongerief gekomen?

Ongerief voor alle groepen bestaat uit:

- a) het gevangen worden in een val
- b) inspectie door de onderzoeker voor soort, leeftijd en geslacht
- c) het nemen van een oorbiopt
- d) gedurende 24 uur met 5 soortgenoten opgesloten te zitten in een omheining.

Aanvullend ongerief voor de Borrelia en Borrelia-vrije groep bestaat uit:

- e) transport naar het laboratorium
- f) IP injectie van Hypnorm (1:6 verdund)-Dormicum (1:6 verdund) toegediend met twee aparte injectiespuiten.
- g) het bijkomen uit sedatie
- h) opsluiting in Makrolon type 3 kooien gedurende 10 dagen
- i) euthanasie na afloop van het experiment

7. Welke maatregelen heeft u getroffen om het ongerief tot een minimum te beperken?

Anesthesie:

Borrelia D. Is wel toegepast.
Borrelia-vrij D. Is wel toegepast.
Selectie groep A. Niet toegepast (geen aanleiding).

Pijnbestrijding:

Borrelia A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Borrelia-vrij A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.
Selectie groep A. Wordt niet toegepast omdat hiertoe geen aanleiding bestaat.

Door de selectie groep onder te brengen in een onderkomen in hun natuurlijke leefomgeving wordt ongerief voor de in het wild gevangen bosmuizen beperkt.

Tijdens de vangstprocedure wordt gebruik gemaakt van Longworth life traps, voorzien van nestmateriaal en voldoende voedsel voor overbrugging van een periode van 6 uur tussen inspectie van de vallen.

8. Toestand van dieren na einde van de proef:

Borrelia Het dier is gedood na het einde van de proef.
Borrelia-vrij Het dier is gedood na het einde van de proef.
Selectie groep Het dier is na de proef in leven gelaten.

Toelichting:

Muizen uit de selectiegroep worden, met uitzondering van de Borrelia- en Borrelia-vrije groep, in hun

natuurlijke omgeving vrijgelaten (maximaal 24 uur na vangst). Mochten de muizen onverhoopt toch door een gevecht ernstige verwondingen hebben opgelopen, worden ze terplekke geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie.

Na afloop van het experiment wordt dmv cervicale dislocatie euthanasie gepleegd op de muizen in de Borrelia- en de Borrelia-vrije groep. De betreffende artikel 9 functionaris wordt op het [REDACTED] in deze handeling getraind.

9. Welke alternatieven (vervanging, verfijning, vermindering) zijn voor de beschreven experimenten overwogen en waarom zijn deze verworpen?

Om het natuurlijke proces van voeding van teken in Nederland in kaart te brengen zijn in het wild gevangen knaagdieren onmisbaar. Hiervoor zijn geen alternatieven mogelijk. Ten behoeve van het voeden van teken is overwogen een membraanvoedingstechniek toe te passen (Kröber & Guerin, 2007). Deze is tijdens een bezoek aan een in het kweken van teken gespecialiseerd laboratorium in [REDACTED] ([REDACTED]) verkend. Deze techniek maakt gebruik van een silliconen membraan waaronder verwarmd bloed wordt aangeboden om een gastheer te stimuleren. Overige kunstmatige voedingstechnieken voor Ixodes ricinus zijn niet beschikbaar. De door de medewerkers van het laboratorium beschreven techniek blijkt echter niet geschikt voor het kweken van teken, maar is eerder bedoeld voor experimenten op voedende teken ([REDACTED]). Het probleem ligt met name in het feit dat teken welliswaar een volledige bloedmaaltijd kunnen nemen, maar dat de teek na de bloedmaaltijd geen succesvolle vervelling tot het volgende levensstadium kan doorlopen. Bovendien werd de methode in [REDACTED] ingezet voor het voeden van de vanuit medisch oogpunt relevante nimfe en volwassen tekenstadia. De techniek is niet voldoende ontwikkeld voor het voeden van tekenlarven.

Literatuur:

Kröber, T. and P. M. Guerin (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. Pest Management Science 63(1): 17-22.

10. Namen van direct betrokkenen bij de dierproef (artikel 9- en 12-functionarissen):

[REDACTED]

Tabel registratiecode opties voor aanvraag 2009036.g (K14):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
					33	1	1	01					
Borrelia	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Borrelia-vrij	3	01	5	5					01	4	1	3	2
Selectie groep	3	01	5	40					01	1	1	2	3

Uw aanvraag 2009036.a, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

De DEC is van mening dat het wetenschappelijke doel van de proef opweegt tegen het te verwachten maximaal gering/ matige ongerief dat de dieren ondergaan. De DEC stelt het op prijs, dat u literatuurverwijzingen aangeeft bij uw proefplan en acht dit zeer informatief. Voorafgaand aan een definitieve afweging heeft de DEC de volgende vragen en opmerkingen ter verheldering van de aanvraag:

De DEC verzoekt u toe te lichten, wat u bedoelt met de tekst onder 4.c (toelichting aantal dieren): ".... wordt in het aantal van 4 per groep rekening gehouden met natuurlijke sterfte gedurende de twee weken van het experiment.....".

Daarnaast verzoekt de DEC u de IM-injectie te vervangen door een subcutane injectie (6.a., proefbehandelingen), aangezien dat bij deze diersoort gemakkelijker uitvoerbaar is.

Tevens verzoekt de DEC u bij 6.c. (bronnen van ongerief) het doden toe te voegen.

Tenslotte heeft de DEC nog een redactionele opmerking:

Bij 5.c. (voeding) ontbreekt een deel van de eerste zin. De DEC verzoekt u dit aan te vullen.

Uw antwoorden zullen door de secretaris van de DEC in overleg met de proefdierdeskundige worden afgehandeld.

Uw aanvraag 2009036.b, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Uw toelichting m.b.t. het aantal dieren is de DEC nog niet helemaal duidelijk en zij verzoekt u dit alsnog te verduidelijken, mede gezien het feit, dat u in eerste instantie aangaf aan 4 dieren genoeg te hebben.

Bovendien ontbreekt een deel van de laatste zin bij 4.a. (nadere aanduiding gebruikte dieren).

Daarnaast heeft de DEC u verzocht de IM-injectie te vervangen door een subcutane injectie (6.a., proefbehandelingen), aangezien dat bij deze diersoort gemakkelijker uitvoerbaar is. U geeft in uw voorstel aan, dat er een intradermale injectie wordt toegepast. Aangezien dit niet hetzelfde is, verzoekt de DEC u dit te wijzigen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2009036.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

De DEC is van mening dat het doel van de proef opweegt tegen het te verwachten maximaal matige ongerief dat de dieren ondergaan en dat de vraag m.b.t. alternatieven voldoende is beantwoord.

Met vriendelijke groet,


Secretaris DEC

Uw aanvraag 2009036.c, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Wijzigen' gekregen.

Veranderen IM/SC injectie in IP injectie.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de DEC de status: 'Goedgekeurd' gekregen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.d, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de PD de status: 'Wijzigen' gekregen.

Graag de methode van tijdelijke huisvesting wijzigen, als besproken aan de telefoon.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.e, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de PD de status: 'Wijzigen' gekregen.

Graag ook de herkomst van de muizen wijzigen ([REDACTED] ipv de [REDACTED])

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.f, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de PD de status: 'Positief advies' gekregen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.f, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de PD de status: 'Wijzigen' gekregen.

Datum wijzigen.

Indien de status op 'wijzigen' is gezet en u wilt deze aanvraag gaan wijzigen, dan selecteert u deze aanvraag en kiest u vanuit het menu 'proef', en dan de optie 'wijzigen'. Er wordt dan een kopie van de originele aanvraag gemaakt. Deze kopie kunt u vervolgens wijzigen, en opnieuw aanmelden.

Na aanmelding wordt de aanvraag behandeld door de proefdierdeskundige.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Proefdierdeskundige

Uw aanvraag 2009036.g, door u aangemeld vanuit DRS heeft van de PD de status: 'Positief advies' gekregen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Proefdierdeskundige