

Artikelen

Blootstelling aan *Borrelia miyamotoi* door tekenbeten

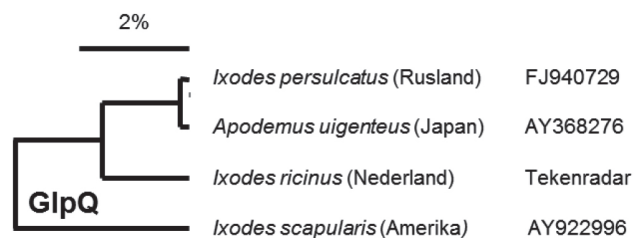
M. Fonville, P. Hengeveld, A. Docters van Leeuwen, S. Jahfari, M.G. Harms, A.J.H. van Vliet, W. van Pelt, H. Sprong en C.C. van den Wijngaard

Naast *Borrelia burgdorferi sensu lato*, de veroorzaker van de ziekte van Lyme, blijkt ook *Borrelia miyamotoi* in Nederlandse teken aanwezig. Het is nog onduidelijk in hoeverre *B. miyamotoi* ziekteverschijnselen veroorzaakt. Van de 1040 geteste teken, verwijderd van mensen die door deze teken waren gebeten, bleken 37 teken (3,6%) positief voor *B. miyamotoi*. Meer dan de helft van alle teken en 23 van de 37 teken die besmet waren met *B. miyamotoi* waren zichtbaar vergroot en hadden zich dus enige tijd gevoed. *B. miyamotoi* werd in alle levensstadia van de teek gevonden, ook in larven. Onze bevindingen tonen voor het eerst aan dat mensen in Nederland, via tekenbeten, naast *Borrelia burgdorferi sl.* kunnen worden blootgesteld aan *B. miyamotoi*. Recentelijk is de eerste patiënt gemeld die vermoedelijk via een tekenbeet is geïnfecteerd met *B. miyamotoi*.⁽¹⁾

Een teek is een spinachtige die in verschillende levensstadia bloed van een gastheer nodig heeft en daarbij micro-organismen kan overbrengen. ⁽²⁾ In Nederland is de meest voorkomende harde teek de schapenteek (*Ixodes ricinus*). De meest voorkomende tekenoverdraagbare aandoening in Nederland is de ziekte van Lyme. Deze wordt veroorzaakt door de *Borrelia burgdorferi sensu lato*-bacterie, een spirocheet. Ongeveer 20% van de teken die mensen bijten in Nederland, is besmet met de *Borrelia burgdorferi sl.*-bacterie. Een infectie met deze bacterie kan de ziekte van Lyme veroorzaken. Geschat wordt dat er jaarlijks ruim één miljoen mensen door teken worden gebeten. ⁽³⁾ Omgerekend worden jaarlijks dus ongeveer 200.000 mensen gebeten door een besmette teek. Hiervan krijgen naar schatting tussen de 20.000 en 30.000 mensen de ziekte van Lyme. ⁽⁴⁾ De meeste mensen die deze infectieziekte oplopen, krijgen een kenmerkende rode ring bij de plek van de tekenbeet, de zogenaamde erythema migrans. Een kleinere groep mensen krijgt, al dan niet na een erythema migrans, ernstigere vormen van de ziekte van Lyme, die zich onder andere kunnen kenmerken door een typische huidafwijking (chronische acrodermatitis), gewrichts- of neurologische klachten. ⁽⁵⁾ In de meeste gevallen is deze infectieziekte goed te herkennen door artsen en kan de diagnose eventueel ondersteund worden door middel van serologisch onderzoek. Het wordt lastiger wanneer de symptomen na een tekenbeet minder kenmerkend zijn en waarbij de ziekte van Lyme op basis van serologische testen niet kan worden vastgesteld of uitgesloten. Een van de mogelijke verklaringen is, dat een andere ziekteverwekker de veroorzaker is van de ziekteverschijnselen. In Nederlandse teken circuleren naast *B. burgdorferi sl.* nog andere pathogenen, zoals *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* en *Neoehrlichia mikurensis*. ⁽²⁾ Hoe vaak mensen in Nederland ziek worden door deze andere tekenover-

draagbare pathogenen is nog onduidelijk en zal verder moeten worden onderzocht.

Recentelijk is beschreven dat een betrekkelijk onbekende bacterie in harde teken, *B. miyamotoi*, mogelijk ziekte kan veroorzaken. ⁽⁶⁾ Mogelijke klinische symptomen zijn griepachtige verschijnselen met piekende koorts, hoofdpijn, moeheid, rillen en zweten. *B. miyamotoi* en *B. burgdorferi sl.* behoren tot dezelfde familie van spirocheten, toch zijn er nogal wat verschillen. *B. miyamotoi* is een relapsing fever spirocheet en lijkt genetisch gezien meer op *B. duttoni* en *B. recurrentis* die door respectievelijk zachte teken en kleeerluizen worden overgedragen op mensen. ⁽⁷⁾ *B. miyamotoi* veroorzaakt geen ziekte van Lyme. Serologische testen voor de detectie van de ziekte van Lyme zijn niet geschikt om een *B. miyamotoi*- infectie aan te tonen. Net als *B. burgdorferi sl.*, komt *B. miyamotoi* op het noordelijk halfrond voor in verschillende soorten harde teken zoals *Ixodes scapularis* (Verenigde Staten), *I. persulcatus* (Rusland) en



Figuur 1 Verschillende tekensoorten dragen genetisch verschillende *B. miyamotoi*-bacteriën met zich mee. De lengte van de horizontale lijnen zijn een maat voor de genetische verschillen.

I. ricinus (Europa). Op één locatie in Nederland, nabij Zandvoort, zijn al teken gevonden die besmet zijn met *B. miyamotoi*. (8) In hoeverre *B. miyamotoi* verspreid is in Nederlandse teken, is nog onbekend. Het doel van deze studie was om te onderzoeken of en in welke regio's in Nederland mensen worden blootgesteld aan de *B. miyamotoi*-bacterie door tekenbeten.

Methode

Verzamelen van teken

De teken zijn verzameld via www.tekenradar.nl. Op deze website van het RIVM en Wageningen University kon in 2012 iedereen een tekenbeet melden en meedoen aan onderzoek naar tekenbeten en de ziekte van Lyme. Mensen met een tekenbeet werd gevraagd om de teek na het verwijderen naar het RIVM op te sturen. Deelnemers aan het onderzoek werd ook gevraagd om in anderhalf jaar tijd elke 3 maanden een korte vragenlijst in te vullen met vragen over hun gezondheid en eventueel ontwikkelde ziekte van Lyme. De teken uit de tekenradarstudie zijn gekozen voor dit onderzoek om 2 redenen. Allereerst zijn de teken verspreid over heel Nederland dan wel verspreid over heel Nederland. Een tweede reden is dat de teken mensen gebeten hebben. Hierdoor kunnen we met deze studie vaststellen of mensen in Nederland daadwerkelijk kunnen worden blootgesteld aan de *B. miyamotoi*-bacterie.

Analyse van teken

Voor dit onderzoek zijn 1040 mensen met een tekenbeet geselecteerd. Zij stuurden hun teek in tussen 1 april 2012 en 1 juli 2012 en vulden 1 of meer vragenlijsten in. Na ontvangst werden de teken bewaard bij -20 graden Celsius. De tekensoort en het levensstadium werden met behulp van een microscoop en internationaal erkende determinatiesleutels vastgesteld. (8) Een grove maat van aanhechtingsduur als indicatie of de teek gevoed heeft, werd afgeleid aan de hand van de zwelling van de teek. (4) Deze werd gescoord in 4 categorieën 0 t/m 3, waarbij 0 een niet zichtbaar vergrote teek is en de getallen 1 t/m 3 een toenemende mate van vergroting van de teek aangeeft. Om het DNA te isoleren werden teken met een korte aanhechtingsduur, score 0 of 1, opgekookt in ammoniumhydroxide. (9) DNA van teken met relatief veel bloed,

score 2 en 3, werd verkregen met behulp van de Qiagen blood & tissue DNA-extractiekit volgens het Qiagen supplementary protocol Purification of total DNA from ticks using the DNeasy® Blood & Tissue Kit for detection of Borrelia DNA. (10)

Moleculaire diagnostiek van *Borrelia burgdorferi* sl. en *Borrelia miyamotoi*

Om *B. miyamotoi* in tekenlysaten aan te kunnen tonen, was een *B. miyamotoi*-specifieke realtime PCR ontwikkeld op basis van het flagelinegen. (1) Om de positieve resultaten uit deze realtime PCR te bevestigen, werd een aanvullende PCR gebruikt op een fragment van het glpQ-gen. Deze PCR-producten werden gesequenced waarna de DNA-sequenties werden vergeleken met bekende *B. miyamotoi* en *B. burgdorferi* sl.-sequenties uit Genbank. De aanwezigheid van *B. burgdorferi* sl. DNA werd aangetoond met een duplex qPCR waarbij fragmenten van het Outer Surface Protein A (OspA)- en het Flagelin B (FlaB)-gen werden gebruikt als target. (10)

Resultaten

Analyse van teken

Alle 1040 teken van de Tekenradar werden geïdentificeerd als *I. ricinus*. De teken konden verder onderverdeeld worden in 29 larven, 792 nimfen en 219 volwassen teken. (Tabel 1) Bij 56% van de teken was enige mate van zwelling door voeding te zien (score 1 t/m 3), terwijl bij de rest op het oog niet te zien was of de teek gevoed had (score 0).

Moleculaire detectie van *Borrelia burgdorferi* sl. en *Borrelia miyamotoi*

Tekenlysaten werden getest op de aanwezigheid van *B. miyamotoi*-DNA. Hiervan gaf 3,6% (n=37) van de teken een positief signaal in de qPCR. Twee van de 29 larven (6,8%), 3,6% van de nimfen en 5% van de volwassen teken gaf een positief resultaat in de qPCR. (Tabel 1) De aanwezigheid van *B. miyamotoi*-DNA kon in 32 van de 37 qPCR-positieve teken bevestigd worden met de conventionele PCR op het fragment van het glpQ-gen. De volgorde van nucleo-

Tabel 1 De mate van zwelling en de besmettingsgraad met de 2 *Borrelia*'s in de verschillende levensstadia van *Ixodes ricinus*-teken. De mate van zwelling door voeden werd visueel gescoord (0-3) zoals beschreven in de tekst. Voor de analyses zijn de teken die zichtbaar vergroot zijn door voeding samengevoegd als 1 groep (score 1 t/m 3).

Teken Stadium	Teken Mate van zwelling	Teken Aantallen	<i>B. burgdorferi</i> sl. (positief)	<i>B. miyamotoi</i> (positief)
Larf	0	10	0	1
	1-3	19	0	1
Nimf	0	310	51	8
	1-3	482	71	16
Adult	0	136	50	5
	1-3	83	18	6
Totalen		1040	190	37

tiden van deze PCR-producten (667 baseparen) werd bepaald en vergeleken met DNA-sequenties in Genbank. De verkregen glpQ-sequenties uit onze *I. ricinus*-tekenen waren identiek en hadden de hoogste homologie (98-99%) met *B. miyamotoi*-isolaten geïsoleerd uit *I. persulcatus* teken (FJ940729, AY368276) en een isolaat uit *I. scapularis* (AY922996; Figuur 1). In totaal zijn er 3 genetische varianten gevonden van *B. miyamotoi* op basis van het glpQ-gen. Iedere variant correleert met een tekensoort (Figuur 1). Het eerstvolgende micro-organisme met slechts 91% homologie was *B. lonestari*, een relapsing fever spirocheet afkomstig uit *Amblyomma americanum* teken (AY368275). In 3,9% procent van de 584 teken met een duidelijke zwelling door voeding (score 1 t/m 3) werd *B. miyamotoi* DNA aangetoond (Tabel 1).

Alle teken werden ook getest op de aanwezigheid van *B. burgdorferi* sl. Omgerekend waren 190 (18%) van de geteste teken *B. burgdorferi* sl. positief. Geen van de geteste larven waren positief in de qPCR, terwijl 15% van de nimfen en 31% van de adulte teken positief was in deze test. 15% van de 584 teken met zichtbare aanwijzing gevoed te hebben (score 1 t/m 3), was besmet met *B. burgdorferi* sl.. Van de 190 positieve *B. burgdorferi* sl.-teken (Tabel 1) waren er 9 ook positief voor *B. miyamotoi*. In Figuur 2 is te zien dat zowel de *B. burgdorferi* sl. als de *B. miyamotoi* verspreid is over heel Nederland en in bijna elke provincie voorkomt.

Discussie en conclusie

Deze studie laat zien dat Nederlandse teken de relapsing fever spirocheet *B. miyamotoi* bij zich kunnen dragen en dat mensen door een tekenbeet aan *B. miyamotoi* kunnen worden blootgesteld. 18% van de geteste teken zijn positief voor *B. burgdorferi* sl. en 3,6% waren positief voor *B. miyamotoi*. Met meer dan 1 miljoen teken-

beten per jaar in Nederland, kan worden geschat dat er dus jaarlijks ongeveer 36.000 mensen gebeten worden door een teek met de *B. miyamotoi*-bacterie. Zeer recent is de eerste patiënt in Nederland gevonden waarin de *B. miyamotoi*-bacterie moleculair is aangetoond. (1). Het genotype, gebaseerd op de GlpQ-sequentie, van *B. miyamotoi* uit de tekenradarteken is identiek aan de *B. miyamotoi* van deze immuungecompromiteerde patiënt. Deze patiënt heeft geen buitenland anamnese en wel een verleden met tekenbeten. Dit suggereert dat de patiënt de *B. miyamotoi*-infectie in Nederland heeft opgelopen. Het betrof hier een immuun-gecompromiteerde patiënt met progressieve neurologische klachten. Of de *B. miyamotoi*-bacterie ook een ziekteverwekker kan zijn voor mensen met een normaal functionerend immuun-systeem is nog onduidelijk.

In Figuur 2 is te zien dat zowel de teken positief getest op *B. burgdorferi* sl. (190/1040) als op *B. miyamotoi* (37/1040) verspreid zijn over heel Nederland. De *B. miyamotoi*-positieve teken zijn niet geclusterd maar verdeeld over bijna elke provincie. De tekenbeet-meldingen geven aan dat men op meerdere plekken in Nederland kan worden blootgesteld aan teken en mogelijk ook aan *B. miyamotoi*.

Één op de 4 *B. miyamotoi*-positieve teken is ook besmet met *B. burgdorferi* sl.. Dat impliceert dat men blootgesteld kan worden aan beide spirocheten tegelijkertijd. Verder is het opvallend dat 2 van de 29 onderzochte larven positief waren in de test voor *B. miyamotoi*. Of deze besmette larven de bacterie kunnen overdragen naar mensen is onderwerp van verdere studies.

De mate van zwelling van de teken geeft een grove indicatie van de aanhechtingsduur. (4) Het is onduidelijk hoe lang een teek bij een score van 1 t/m 3 heeft gevoed. De groep teken met score 0 waarbij op het oog niet te zien is of deze gevoed heeft, bevat waarschijnlijk nog een aantal gevoede teken. De eerste periode van aanhechting is, met de door ons gebruikte methode niet waar te nemen. Om beter onderscheid te kunnen maken tussen teken die wel of niet bloed gezogen hebben, zou een andere methode gebruikt moeten worden. Hierbij kan gedacht worden aan metingen aan teken met behulp van microscopie of het meten van bloedcomponenten in de teek.

Er is meer onderzoek nodig om te achterhalen of *B. miyamotoi* ook ziekte veroorzaakt in personen met een normaal functionerend afweersysteem. Hiervoor is het noodzakelijk om gevoelige serologische en moleculaire testen voor *B. miyamotoi* te ontwikkelen om de eventuele patiënten te kunnen identificeren. In het vervolg van de Tekenradarstudie zal ook gekeken worden of de deelnemers die gebeten zijn door een met *B. miyamotoi* besmette teek gezondheidsproblemen rapporteren.

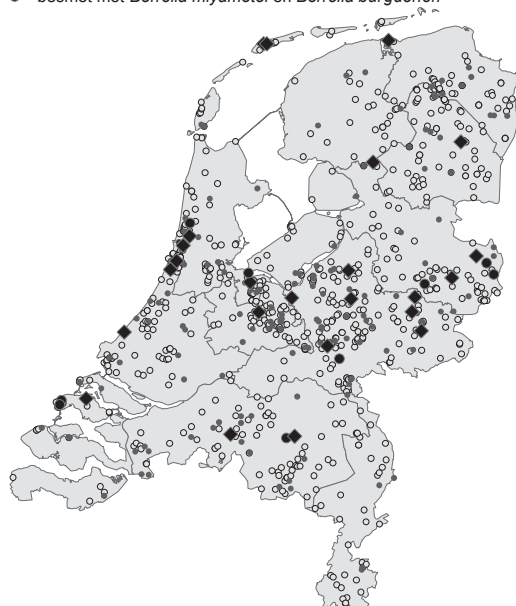
Auteurs

M. Fonville, P. Hengeveld, A. Docters van Leeuwen, S. Jahfari, M.G. Harms, A.J.H. van Vliet, W. van Pelt, H. Sprong, C.C. van den Wijngaard, Centrum Infectieziektebestrijding, RIVM, Bilthoven

Correspondentie
Manoj.Fonville@rivm.nl

Teken verzameld via tekenradar.nl in 2012

- niet besmet met *Borrelia*
- besmet met *Borrelia burgdorferi*
- ◆ besmet met *Borrelia miyamotoi*
- besmet met *Borrelia miyamotoi* en *Borrelia burgdorferi*



Figuur 2 De geografische verspreiding van opgestuurde en onderzochte teken en hun besmettingsstatus

Literatuur

1. Hovius JW, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013;382(9892):658. Epub 2013/08/21.
2. Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen CB, van der Giessen J, Takken W, et al. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:36. Epub 2013/08/03.
3. Hofhuis A, Harms MG, van der Giessen JWB, Sprong H, Notermans DW, van Pelt W. Ziekte van Lyme in Nederland 1994-2009: Aantal huisartsconsulten blijft toenemen. Is voorlichting en curatief beleid genoeg? *Infectieziekten Bulletin*. 2010;21(3):84-7.
4. Hofhuis A, Herremans T, Notermans DW, Sprong H, Fonville M, van der Giessen JW, et al. A prospective study among patients presenting at the general practitioner with a tick bite or erythema migrans in The Netherlands. *PloS one*. 2013;8(5):e64361. Epub 2013/05/23.
5. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012;379(9814):461-73. Epub 2011/09/10.
6. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1816-23. Epub 2011/10/18.
7. Elbir H, Gimenez G, Sokhna C, Bilcha KD, Ali J, Barker SC, et al. Multispacer sequence typing relapsing fever *Borreliae* in Africa. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1652. Epub 2012/06/09.
8. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species. *Bioscience Reports*, UK. 2004.
9. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(7):2215-22. Epub 1999/06/12.
10. Heylen D, Tjisse E, Fonville M, Matthysen E, Sprong H. Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community. *Environmental microbiology*. 2013;15(2):663-73. Epub 2013/01/03.