



## Høgskolen i Telemark

# Flåtten *Ixodes ricinus* som sykdomsvektor i Sør-Norge.

Etablering og utvikling av PCR-baserte påvisningsmetoder  
og påvisning av *Babesia*, *Borrelia* og *Anaplasma*

Anne-Lene Lundsett



Hovedfagsoppgave til Cand. scient. grad i natur-, helse- og  
miljøvern.

Våren 2004



# **Flåtten *Ixodes ricinus* som sykdomsvektor i Sør-Norge.**

Etablering og utvikling av PCR-baserte påvisningsmetoder  
og påvisning av *Babesia*, *Borrelia* og *Anaplasma*

**Anne-Lene Lundsett**

**u 95 26 85**

**28 mai 2004**

## Forord

Dette hovedfagsprosjektet er tilknyttet Høgskolen i Telemark avd. Bø, Institutt for Natur-, helse- og miljøvern, i samarbeid med a.s. Telelab i Skien. Alt praktisk arbeid er utført ved FoU-avd. ved a.s. Telelab.

Det er mange som har bidratt på veien mot det endelige målet:

Jeg vil rette en stor takk til eksternveileder Forsknings sjef/ Professor II Andrew Jenkins ved a.s. Telelab og Høgskolen i Telemark for dyktig og fantastisk veiledning med en stor dose tålmodighet.

Til Forskningsingeniør Anne Gry Allum, Cand. scient Linda Strand og Cand. scient Randi Kersten Aakre ved FoU-avd; tusen takk for god opplæring, oppfølging på lab`n og nok en dose tålmodighet. Til alle ansatte på a.s. Telelab takk for koselig mottakelse og opphold hos dere.

Design og konstruksjon av primere, prober og positivkontroll til *Babesia* Real Time PCR ble gjort av Andrew Jenkins. Innsamling av flåttene som er benyttet i oppgaven er utført av FoU-avd. på a.s. Telelab av Bjørn Erik Kristiansen, Anne-Gry Allum, Linda Strand, Randi Kersten Aakre og Andrew Jenkins.

Takk til veileder Professor Jan Heggenes ved Høgskolen i Telemark for konstruktiv tilbakemelding på mitt prosjekt.

Takk til Prof. Dr. Frans Jongejan, Utrecht, Nederland for positiv *Babesia*- kontroll

Til Sivilingeniør Marit Svendsen og Sivilingeniør Martin Svendsen ved Yrkes-og miljømedisinskavdeling ved Sykehuset Telemark takk for god hjelp med tall og andre nyttige innspill.

Takk til Une Mjaugeto for god råd og vink ved redigering av oppgaven.

Takk til familie og venner som har holdt ut med meg i denne perioden.

Skien, 28 mai 2004.

Anne-Lene Lundsett

## INNHOLD

<b>FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INNLEDNING.....</b>	<b>9</b>
<b>2 TEORI.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Flått (<i>Ixodes ricinus</i>).....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Utbredelse i Norge .....	13
2.1.2 Utseende .....	13
2.1.3 Livssyklus.....	14
2.1.4 Overføring av smitte.....	15
<b>2.2 <i>Babesia spp</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 <i>Ehrlichia og Anaplasma</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 <i>Borrelia</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIALE OG METODER.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Feltinnsamling av flått .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Ekstrahering/lysning av DNA fra flått.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Mastermixer.....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Mastermix til konvensjonell PCR .....	25
3.3.2 Mastermix til Real Time PCR med probe.....	26
3.3.3 SYBR®Green-mastermix til Real Time PCR.....	27
<b>3.4 PCR-program .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 Analyse av Real Time PCR resultater .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Gelelektroforese.....</b>	<b>29</b>
3.6.1 Polyakrylamidgel 8% .....	29
3.6.2 Metaforgel 3%.....	29
3.6.3 Agarosegel.....	29
3.6.4 Kombinasjonsgel 0.5% agarose 1% metaforgel.....	29
3.6.5 Farging og fotografering .....	30
<b>3.7 Isolering og eluering av DNA-fragmenter fra elektroforesegeler.....</b>	<b>30</b>
3.7.1 Isolering av DNA-fragment fra polyakrylamidgel.....	30
3.7.2 Fryseeluering.....	30
3.7.3 Passiv eluering.....	30

---

3.8	Konstruksjon av positivkontroll - amplikon fra gel.....	30
3.9	Statistiske analyser .....	31
3.10	Oversikt over benyttede primere, prober og positivekontroller .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>33</b>
4.1	Etablering og optimalisering av PCR for påvisning av <i>Babesia</i> .....	33
4.1.1	Konvensjonell PCR .....	33
4.1.2	Real Time PCR.....	34
4.1.2.1	Konstruksjon av primere, probe, positivkontroll og internkontroll til Real Time PCR.....	34
4.1.2.2	Optimalisering av Real Time PCR.....	37
4.2	Konstruksjon av internkontroll til bruk i <i>Ehrlichia/ Anaplasma</i> PCR .....	39
4.2.1	Strategi for konstruksjon av <i>Ehrlichia</i> -internkontroll.....	39
4.2.2	Konstruksjon av <i>Ehrlichia</i> internkontroll .....	41
4.3	Analyseresultater av innsamlede flått .....	42
4.4	Analytisk følsomhet for <i>Borrelia</i> -positivkontroll .....	45
4.5	Analyse-erfaringer ved bruk av <i>Ehrlichia</i> -internkontroll.....	45
4.6	Analyse-erfaringer ved bruk av Real Time PCR .....	46
<b>5</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>47</b>
5.1	PCR-metoder for påvisning av <i>Babesia</i> .....	47
5.2	Sammenligning av konvensjonell PCR og Real Time PCR.....	47
5.3	Internkontroll til <i>Ehrlichia</i> -PCR .....	48
5.4	Analyseresultater av innsamlede flått .....	48
<b>6</b>	<b>REFERANSER .....</b>	<b>52</b>
	<b>APPENDIKS.....</b>	<b>55</b>

## Forkortelser og ordforklaringer

<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Babesiose	Sykdom forårsaket av <i>Babesia spp.</i>
bp	Basepar
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> er en betegnelse på 11 genomarter, hvor 3 stykker er human patogene; <i>Borrelia afzelii</i> , <i>Borrelia garinii</i> og <i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu strict</i> , en genomart innen <i>B. burgdorferi s.l.</i>
DNA	Deoksyribonukleinsyre; arvestoff.
dNTP	Deoxynucleotide triposfat
dUTP	Deoxyuridin triposfat
Endonuklease	Et enzym som kutter internt i nukleinsyre.
Eluere	Trekke ut eller ekstrahere absorbert substans i løsning.
<i>E. phagocytophila</i>	<i>Ehrlichia phagocytophila</i> . Tidligere navn på en undergruppe i <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .
Febril hemoglobinuri	Sykdomsbeskrivelse på sykdom med feber og hemoglobin i urin forårsaket av <i>Babesia</i> hos kyr.
HA	Human anaplasnose
HGE	Human granulocytær ehrlichiose
HME	Human monocytær ehrlichiose.
Hypostom	Organ hos flåtten som stikkes inn i verten ved blodsuging.
Inhibitorisk	Hemmende
IK	Internkontroll
Intraerytrocyttær	I røde blodlegemer.
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
Ligase	Et enzym som "limer" sammen DNA-fragmenter.
Ligere	"Lime" sammen DNA-fragmenter vha. enzymet ligase
Lyme borreliose	Fellesbetegnelse for sykdom som skyldes de tre genomartene <i>B. burgdorferi s.s.</i> , <i>B. afzelii</i> og <i>B. garinii</i> .
Lyme disease	Betegnelse for sykdom som skyldes <i>B. burgdorferi s.s.</i> Brukes også som fellesbetegnelse for sykdom som skyldes de tre genomartene <i>B. burgdorferi s.s.</i> , <i>B. afzelii</i> og <i>B. garinii</i> .

Miltekstirpert	[Individ] som har fått fjernet milten.
MSIS	Meldingssystemet for infeksjonssykdommer til Folkehelse Instituttet.
Prevalens	Utbredelse av eks. sykdom målt på det totale antall, på et bestemt tidspunkt.
Patogen	Agens som forårsaker sykdom.
PCR	Polymerase chain reaction.
Primer dimer	Et amplikasjons artefakt som oppstår når en primer blir utvidet av polymerasen ved å bruke den andre primeren eller seg selv som templat. Dette resulterer i et kort ukorrekt produkt.
Protozo	Et encellet dyr.
rDNA	DNA som koder for ribosomalt –DNA.
Real Time PCR	PCR-reaksjon hvor amplifisert DNA påvises ved fluoresens-deteksjon direkte i reaksjonsrøret, mens reaksjonen foregår.
Regresjon	Tilbakefører blodplasma til verten under blodsugingen.
rpm	Omdreining pr. minutt.
Restriksjonsenzym	Endonukleaser som kutter dobbeltrådet DNA ved spesifikk DNA-sekvens.
Restriksjonsete	Er den spesielle sekvensen av DNA, oftes 4-8 bp lang, som restriksjonsenzymet gjenkjenner.
Sepsis	Blodforgiftning
Spirokete	En bakterietype
Transovariell	Overføring av smittestoffer fra hunnen via eggleder til egg.
Transstadiell	Overføring av smittestoff mellom ulike stadier til eks. larve til nymfe.
Vert	En organisme som en annen organisme lever i/ på eks. flått på rådyr.
Vektor	En organisme som overfører en mikroorganisme eks flått.
Vortexing	Blanding av bl.a. en løsning ved hjelp av en virvelstrøm.

## Summary

The intention with this project was to examine the tick *Ixodes ricinus* as a vector for *Ehrlichia/ Anaplasma*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* in Southern-Norway, and to establish DNA-amplification to detect *Babesia* and to improve the method to detect *Ehrlichia/ Anaplasma*.

To control the variation in the sensitivity of *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR with 16s rDNA primers Ehr 521/747, was an “internal control” designed. The “internal control” is a DNA-fragment, which can amplify with the primers Ehr 521/747. This gives a larger DNA-fragment than natural rDNA.

A Real Time PCR method was established to detect *Babesia*, when a published conversely PCR-method did not give satisfactory results. This is the first detection of *Babesia* by genetic methods in Norway and the first Real Time PCR method for *Babesia* detection.

Real Time PCR worked for detection of *Babesia divergens*, but not for detection of *Babesia microti*.

In August 2000, 275 ticks from the counties Telemark, Vest-Agder, Rogaland and Hordaland were collected to examine the prevalence and the distribution of ticks as carrier of infection. Furthermore 100 ticks from August 1999 and 97 ticks from August 2001 from Langøya, Telemark were included in this project. DNA from all the collected ticks was extracted and analyzed for pathogen with PCR. 33 ticks were excluded from this project because they were inhibitory for PCR-amplification.

*Babesia* was detected in one tick (0.23%), *Ehrlichia/ Anaplasma* in 78 ticks (17.8%) and *Borrelia burgdorferi s.l.* in 13 ticks (3.2%). Only 3 ticks (0.46%) contained two pathogens. There was a significant increasing trend from August 1999 to August 2001 in occurrence of *Ehrlichia/ Anaplasma* at Langøya. There were no significant differences between the different counties or between the different instars for prevalence of *Ehrlichia/ Anaplasma*. The prevalence of *Borrelia burgdorferi s.l.* and *Babesia* were too low to analyze statistical. This is the first use of Real Time PCR for detection of *Babesia* and the first study of the prevalence of *Ehrlichia* where an “internal control” was used. This methodological advances improved the ease of interpretative results and saved time. The analyses of collected ticks showed a low frequency of infection without clear geographic variation.



## Sammendrag

Hensikten med denne undersøkelsen var å undersøke flåtten *Ixodes ricinus* som smittebærer av *Ehrlichia/ Anaplasma*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* og *Babesia* i Sør-Norge, og å etablere DNA-basert metode for påvisning av *Babesia* og forbedre metode for påvisning av *Ehrlichia/ Anaplasma*.

For å kontrollere variasjon i følsomheten av *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR med 16s rDNA primere Ehr 521/747, ble en internkontroll konstruert. Internkontrollen er et DNA-fragment som kan amplifiseres med primerne Ehr 521/747. Dette gir et større amplifiseringsprodukt enn naturlig rDNA.

En Real Time PCR-metode ble etablert til påvisning av *Babesia*, da en publisert konvensjonell PCR-metode ikke gav tilfredsstillende resultater. Real Time PCR fungerte for påvisning av *Babesia divergens* gruppen, men ikke for *Babesia microti* gruppen.

I august 2000 ble 275 flått fra fylkene Telemark, Vest-Agder, Rogaland og Hordaland samlet inn for å undersøke frekvens og fordeling av smittebærende flått. I tillegg ble 100 flått fra august 1999 og 97 flått fra august 2001 fra Langøya, Telemark inkludert i undersøkelsen. DNA fra alle de totalt 472 flåttene ble ekstrahert og analysert for sykdomspatogener vha. polymerase chain reaction (PCR). 33 flått ble ekskludert fra undersøkelsen fordi de var hemmende for PCR-reaksjonen.

*Babesia* ble påvist i én flått (0.23%), *Ehrlichia/ Anaplasma* i 78 flått (17.8%), og *B. burgdorferi s.l.* i 13 flått (3.2%). Kun 3 flått (0.86%) var bærere av to smittestoff samtidig. Det var en signifikant stigende trend fra august 1999 til august 2001 når det gjaldt forekomsten av *Ehrlichia/ Anaplasma* på Langøya, Telemark. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike fylkene eller mellom de ulike stadiene når det gjaldt forekomst av *Ehrlichia/ Anaplasma*. Forekomstene av *B. burgdorferi s.l.* og *Babesia* var for få til å kunne gjennomføre tilsvarende sammenligninger.

Resultatet av denne undersøkelsen viste at utviklete metoder fungerer og er potensielt nyttige. Analyse av innsamlet flått viste svært lav smittefrekvens uten klar geografisk fordeling.

## 1 Innledning

Flått har i tusenvis av år vært kjent som en parasitt på mennesker og dyr, og beskrivelser av dette er å finne helt tilbake til antikken [28]. De er blitt vel kjent som bærer og overfører av agens som kan føre til infeksjoner av ulik karakter hos dyr og mennesker. De første oppdagelsene av flått som sykdomsvektor i nyere tid ble gjort på begynnelsen av 1900-tallet da Smith og Kilbourne [28] påviste at flåtten *Boophilus annalatus* overførte protozoen *Babesia bigemina*, som forårsaker Texas cattle fever.

I global sammenheng er det i dag registrert ca 870 ulike arter flått [28]. Disse deles inn i to hovedgrupper; *Ixodidae* -hard flått, og *Argasidae* -myk flått. Det er registrert mer en 650 arter av *Ixodidae* og mer en 150 arter av *Argasidae* [46,51]. Det er også registrert en tredje gruppe, *Nuttalliellidae* som består av kun en art som finnes i det Sørlige-Afrika [15,28,51].

De to hovedgruppene er representert med ulike arter over hele verden [28,51]. Alle flåttene har det fellestrekk at de suger blod, og at de fungerer som vektor for ulike patogener. Ulik anatomi og livssyklus skiller ellers de ulike gruppene klart fra hverandre, blant annet ved at *Ixodidae* hunnene legger egg og dør, mens *Argasidae* hunnene legger egg flere ganger [15,16,28,46]. Et annet skille er det karakteristiske ryggskjoldet hos *Ixodidae*, som er helt fraværende hos *Argasidae* [16,28].

*Ixodidae* er den mest omtalte gruppen i medisinsk sammenheng [16,28]. Flått kan overføre et vidt spekter av ulike patogener ved blodsuging av ulike organismer [28,46]. De mest kjente flåttoverførte mikroorganismene i Europa er ulike arter av *Babesia*, *Borrelia burgdorferi s.l.* og *Ehrlichia/ Anaplasma* [16]. *Borrelia* er en spirokete, *Ehrlichia/ Anaplasma* er gram negative-bakterier i *Rickettsia*-gruppen, og *Babesia* er en protozo [5,28,49]. I Norge er det registrert 11 flåttarter [42]. To av disse er kjent for å overføre sykdommer som angriper mennesker, skogflåtten *Ixodes ricinus* og fugleflåtten *Ixodes (Ceraticxodes) uriae* [42]. I mer en 95 % av tilfellene hvor flått blir funnet på mennesker i Norge tilhører den arten *I. ricinus* [42]. Naturlig utbredelse og frekvens av sykdomsbærende flått er imidlertid lite kjent.

En undersøkelse av flåtten *I. ricinus* i Nedre-Telemark i 1999 viste at 15 % av nymfene og 16% av de voksne individene av 341 innsamlet flått var bærere av *Borrelia burgdorferi s.l.* [21]. Samme undersøkelse viste at 13% av nymfene og 8% av de voksne individene var bærere av *Ehrlichia/ Anaplasma* [21]. Undersøkelser gjort i Sverige viste at 5-20% av

nymfene var infisert med *Borrelia burgdorferi s.l.*, mens 15-40% av de voksne individene var infisert av *Borrelia burgdorferi s.l.* [42]. En sveitsisk undersøkelse viste at 0.5% av nymfene var positive for *A. phagocytophilum*, og 1.6% av de voksne [31].

*Borrelia burgdorferi s.l.* forårsaker ulike infeksjoner, og disse kan deles inn i 3 hovedgrupper [20,42,49]. Dermatoborreliose kan føre til ulike typer hudutslett, bl.a. Erythema migrans (EM). Muskel- og skjelettborreliose kan gi artritt og infeksjoner i hjerte. Den alvorligste infeksjon er neuroborreliose, som kan ramme sentralnervesystemet [49]. I Norge har det vært påvist ulike typer borreliose hos mennesker. Tall fra MSIS viste at det i 2001 var registret 124 tilfeller av Lyme borreliose, som er en samlebetegnelse for infeksjoner forårsaket av ulike *Borrelia*-arter [49]. Rapporteringen til MSIS inkluderer ikke Erythema migrans, som er en lokal hudinfeksjon [49]. Det totale antallet *Borrelia*-smittede ligger derfor trolig betydelig høyere enn de innrapporterte tilfellene til MSIS. Seroprevalens og insidensstudier fra de fleste europeiske land viser en lavere forekomst av Lyme borreliose i Vest-Europa enn i Sentral- og Øst-Europa [42]. Forekomst av borreliose hos husdyr er lite undersøkt [14].

*Ehrlichia/ Anaplasma* angriper de hvite blodlegemene og fører til Human anaplasmose (HA). Human anaplasmose ble første gang beskrevet i 1994 i USA, og i 1997 ble det første tilfellet av Human anaplasmose rapportert fra Europa [5]. De første tilfellene av Human anaplasmose ble rapportert til Folkehelse Instituttet i 2000 [23,49], men utover dette finnes det ikke noe statistikk på hvor mange som er rammet av denne bakterien i Norge [49]. Et studium utført av Bakken [5] viser at av 56 pasienter fra Syd-Norge som hadde Lyme borreliose, hadde 10.2% antistoffer for *A. phagocytophilum* i tillegg [5]. Innen veterinærmedisin har imidlertid infeksjonen sjodogg hos storfe, småfe og ville hjortedyr som skyldes *A. phagocytophilum*, vært kjent helt tilbake til 1700-tallet [39,40].

Livssyklusen til *Babesia* består av ulike stadier av ukjønnnet og kjønnnet formering. *Babesia* invaderer de røde blodlegemene til mennesker, der de gjennomgår en formering og de røde blodlegemene ødelegges [22,42]. Det er pr.d.d ikke påvist human babesiose i Norge [49]. Men i Europa er det rapportert om ca 30 tilfeller de siste 40 årene, bl.a. i nabolandet Sverige, som skyldes *Babesia divergens* [49]. I USA er det beskrevet ca 400 tilfeller av babesiose som skyldes *Babesia microti* [49]. Babesiose hos storfe er vanlig, og sammenhengen med *I. ricinus* er vel dokumentert [14].

Disse patogener er vanskelig å påvise ved dyrkning og mikroskopi blir ofte for uspesifikt. Polymerase chain reaction (PCR) er en metode for masseproduksjon av spesifikke DNA-fragmenter. Slike DNA-fragmenter kan brukes til identifisering av ulike organismer [27]. En gjennomgang av tilgjengelig litteratur på området viser at PCR er den mest brukte påvisningsmetoden for patogener *Babesia*, *Borrelia burgdorferi s.l.* og *Ehrlichia/ Anaplasma* i flått.

Et problem med PCR-reaksjoner er at deres følsomhet kan variere fra oppsett til oppsett. Følsomhetsvariasjon kan føre til variasjon i estimert hyppighet av infeksjon, fordi en svak positiv flått kan være positiv under forhold hvor følsomheten er høy, men negativ når følsomheten er lav. Dette gjør det vanskelig å vite om observerte geografiske- og tidsmessige variasjoner i flåttens innhold av smittestoffer er riktig, og derfor om de skyldes biologiske variasjoner eller bare et artefakt av følsomhetsvariasjoner. Av denne grunn var en viktig målsetting i denne oppgaven å konstruere en internkontroll for *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR slik at effekten av eventuelle variasjoner i følsomhet kunne reduseres.

Et videre generelt problem med PCR er at den kan gi falske positive resultater på grunn av forurensning av lokaler med reaksjonens produkter. Det er derfor ønskelig å utføre PCR i mest mulig lukkede systemer, hvor spredning av PCR-produkter ikke kan forekomme. Real Time PCR er et eksempel på et lukket system. I en Real Time PCR foregår det en PCR-reaksjon hvor amplifisert DNA påvises ved fluoresens deteksjon direkte i reaksjonsrøret, mens reaksjonen foregår. I dette studiet ble det utviklet og etablert en analyse for *Babesia divergens*-gruppen på Real Time PCR.

Risiko for å bli syk etter et flåttbitt avhenger av om flåttene er bærere av patogener mikroorganismer, og hvor lenge flåttene suger blod. Hittil i Norge er det kun gjort PCR-baserte undersøkelser på *Ehrlichia/ Anaplasma* og *Borrelia burgdorferi s.l.* i flått på to steder i Nedre-Telemark i 1999. Denne undersøkelsen viste at det var ganske lik prevalens av smittestoff i flått som var bærere av *Borrelia burgdorferi s.l.*, mens det var ulikheter i prevalensen av *Ehrlichia/ Anaplasma* [21]. Det er usikkert hvor representativt dette er for Norge forøvrig. En annen hovedmålsetting for denne undersøkelsen var derfor å utvide feltinnsamlingen av flått til å geografisk dekke 4 fylker (Hordaland, Rogaland, Vest-Agder og Telemark) og tidsmessig til å dekke 3 år i Nedre Telemark, vil det være mulig å gi et mer

dekkende bilde. Dette ville kunne si noe mer om geografisk-fordeling i rom og tid, og dermed risiko for å bli smittet ved flåttbitt ulike steder i Norge.

## 2 Teori

### 2.1 Flått (*Ixodes ricinus*)

Arten *Ixodes ricinus* tilhører suborder *Ixodida*, superfamilie *Ixodidoidea*, familie *Ixodidae* [5,46,51].

#### 2.1.1 Utbredelse i Norge

I Norge er det påvist 11 flåttarter. Av disse er skogflått *Ixodes ricinus* og fugleflått *Ixodes (Ceraticodes) uriae* kjent for å angripe mennesker [42]. I de tilfeller hvor flått er funnet på mennesker og dyr i Norge tilhører 95% arten *I. ricinus* [42]. Utbredelsen av *I. ricinus* i Norge strekker seg langs et belte ved kysten fra Østfold i sør og til midt på Helgelandskysten i Nordland [42]. Bredden på beltet varierer med klima, topografi, vegetasjon og forekomst av vertsdyr. Det blir ofte funnet eksemplarer av *I. ricinus* utenfor utbredelsesområdene, både inn i landet og langt nordover. Dette skyldes transport med fugler som er på trekk [42].

#### 2.1.2 Utseende

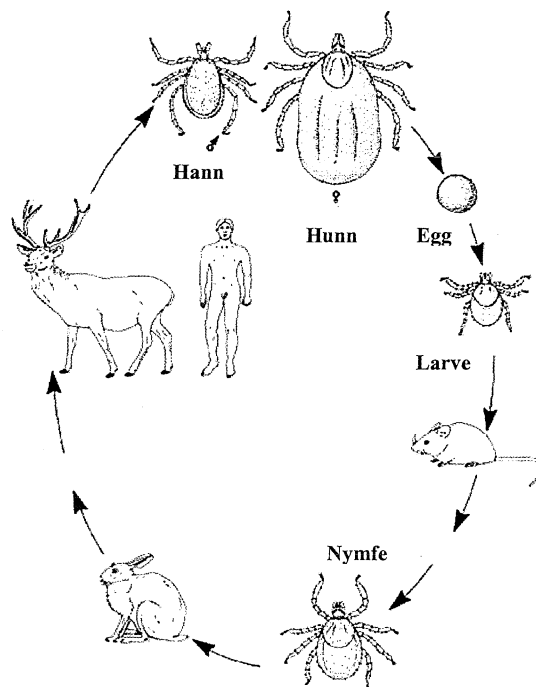
Flåttens utseende er sammenlignbar med middens. Hele kroppen er kompakt. Voksne flått og nymfer har 4 par bein (gåbein), det er ikke noe skille mellom hode, bryst og mage, og den har ingen antennesensoriske organer (Figur 1). Bakdelen har alle de 4 beinparene, genital åpning/kjønnsorganer og analåpning [14,28,51]. Alle organer henger sammen ved kapillæreffekten av en sirkulerende væske bestående av plasma og celler (hemocytter). Sentralnervesystemet er en enkel nerveklump samlet i den fremre delen [28,51]. *Ixodidene* kjennetegnes ved sine harde og ikke-elastiske ryggplate, hvor av navnet ”hard tick” [16,28]. Ryggplaten dekker nesten hele ryggen på hannen, mens den på hunnen, nymfene og larvene dekker bare framsiden på ryggen [14,51].



Figur 1 Viser en voksen *I. ricinus* hunn før blodsuging

### 2.1.3 Livssyklus

Livssyklusen til *I. ricinus* består av fire ulike stadier; egg, larve, nymfe og fullvoksen hann eller hunn (Figur 2) [16,28,37,51]. Larven og nymfen må ha et blodmåltid for å kunne utvikle seg videre til neste stadium. Hunnen må ha blod for å kunne produsere egg. Hannen suger lite eller ikke noe blod, og tiden på verten brukes til å pare seg med hunner (Figur 2) [20,28]. Hvor lenge de suger blod, varierer avhengig av stadium. I tillegg avhenger det av type vert og plassering på verten [28]. Larvene suger blod i 3-5 døgn, nymfene i 5-7 døgn og hunnene i 7-13 døgn [16,20]. Hunnen dør etter at hun har lagt egg [16,28]. *I. ricinus* betegnes som en trevertsflått, hvor de ulike stadiene oppholder seg på ulike vertsdyr (Figur 2) [16,28]. Flåtten er lite kresen når det gjelder valg av vert. De umodne stadiene velger ofte smågnagere og fugl, mens hunnen må ha et måltid fra mellomstore og store pattedyr for å kunne formere seg [16,28]. Flåtten søker etter verter ved å sitte i vegetasjon og vente på at en vert skal passere forbi [16,28]. De ulike stadier befinner seg ulikt plassert i vegetasjon; larvene i et sjikt opptil 20 cm fra bakken, nymfer opptil 50 cm og voksne individer opptil 1 m [14,16]. Den benytter de fremre bena som er utstyrt med et spesielt sanseorgan til å registrere om en vert er i nærheten. Når verten passerer, kryper de over og finner en plass hvor blodsugingen kan foregå [14,16].



Figur 2 Livssyklusen til trevertsflåtten *I. ricinus* [50].

Flåtten trenger over 80% relativ fuktighet for å kunne overleve og utvikle seg [16]. Derfor finner vi som oftest flåtten i områder med mye tre- og buskvegetasjon [16,42]. Den optimale biotopen til en flått består av grasmarker, buskvegetasjon og løvskog som danner områder med høy luftfuktighet [16,52].

I Nord-Europa trenger *I. ricinus* i gjennomsnitt 3 år på å gjennomføre livssyklusen, men det kan variere mellom 2 og 6 år [16,20,39]. *I. ricinus* er i hovedsak aktiv i perioden fra april til oktober, men kan ved mild temperatur være aktiv også utover denne perioden. Størst aktivitet er i perioden mai-juni, men ofte også med en annen topp på høsten [42]. I Nord-Europa ser det ut til å være to populasjoner av *I. ricinus*, en som er aktiv om våren og tidlig sommer, og en som er aktiv på ettersommer og høst. Dette er trolig tilpasninger for å unngå perioder med lav luftfuktighet midt på sommeren [14,16]. Utviklingen av de ulike stadiene kan bli avbrutt av inaktive perioder, diapauser, hvor det er lite metabolsk aktivitet. Lengden på diapausen er tilpasset variasjoner i daglengden, slik at *I. ricinus* bryter diapausen når den kan utvikle seg videre ved optimale forhold. Den er inaktiv ved temperatur under 4-5°C, selv om diapausen er over [14,16].

#### 2.1.4 Overføring av smitte

Mikroorganismer kan bli overført mellom ulike dyreslag og til mennesker ved at flåtten suger blod fra ulike verter i løpet av livssyklusen [28]. Overføringen skjer ved at flåtten kutter hull i huden på verten ved hjelp av kutteorganet og presser hypostomen ned og inn i såret. Flåtten skiller så ut en sementlignende substans som fester hypostomen fast i såret. Deretter starter flåtten å skille ut spytt som inneholder et bedøvende stoff, et antikoagulerende stoff og en substans som hemmer betennelsesreaksjoner. Til slutt starter selve blodsugingen og i denne prosessen kan opptak av patogene mikroorganismer skje, slik at flåtten blir infisert [14,16,28,33]. Ulike patogener blir tatt opp i tarmen på flåtten, der de invaderer tarmvevet. Fra tarmvevet kan de invadere annet vev, deriblant spyttkjertlene [33]. Etter stadiumskifte suger den infiserte flåtten blod på nytt, og de patogene mikroorganismene kan overføres fra flåtten til verten enten via spyttet eller regresjon [14,16,33].



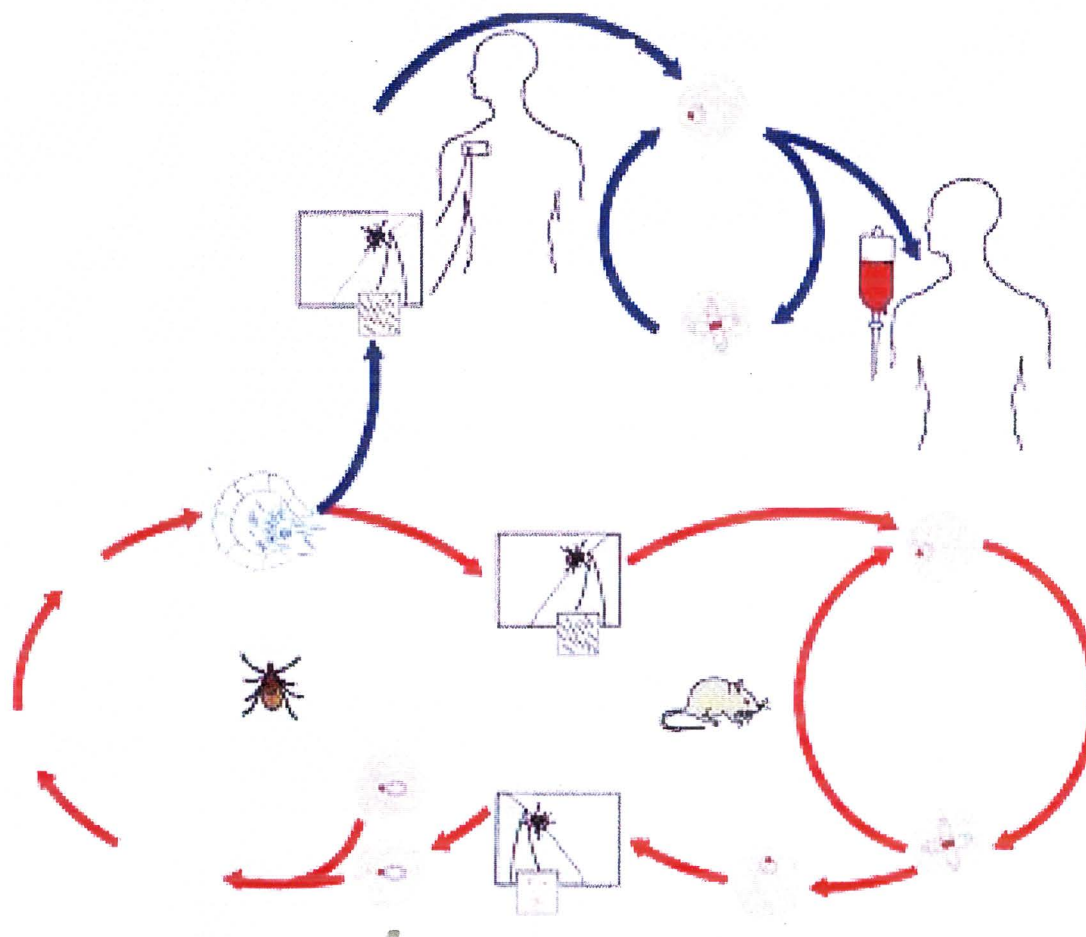
## 2.2 *Babesia* spp

Protozoen *Babesia* er en av verdens mest utbrede blodparasitter [19]. *Babesia* er vel kjent i veterinærmedisin for sykdommen febril hemoglobinuri ”redwater fever” hos kyr, eller på norsk kjent som ”blodpiss” [20,42]. *Babesia* er etter hvert også blitt kjent i human medisin som en malarialignende parasitt, som kan føre til sykdom.

*Babesia* ble første gang beskrevet av Babes i 1888 i jakten på årsaken til febril hemoglobinuri hos kyr i Romania. Babes trodde det var en bakterie og gav den navnet ”*Haematococcus bovis*” [29]. Smith og Kilborne [28] fastslo under sin forskning på ”hemolytic disease” på kyr i Texas, at årsaken var en protozo. De fastslo også at sykdommen trolig ble overført av leddyr [29]. Det er senere påvist at *Babesia* overføres av *Ixodes*-flåtter [22].

*Babesia* tilhører rekken *Apicomplexa*, klassen *Aconoidasida*, orden *Piroplasmida* og familien *Babesiidae* [22]. To av familiene i orden *Piroplasmida* er *Babesiidae* og *Theileriidae* [22]. Hovedskillet mellom disse er vanligvis definert som fravær av ”preerythrocytic cycle” i *Babesia*, dvs at *Babesia* ikke angriper lymfocytene før de angriper erytrocyttene, og fravær av transovariell overføring hos *Theileria* [22]. Det er i dag beskrevet ca 100 arter av *Babesia*, som har blitt klassifisert ved morfologi og vert. Det er antydnet at en del av disse artene er like [22]. Det har vist seg at ulike parasitter kan være morfologisk like i samme vert, og at den samme parasitten kan være morfologisk ulike i ulike verter. Framtidig klassifisering ved hjelp av molekylærbiologiske metoder vil derfor trolig føre til en mer sannferdig klassifisering av *Babesia* -arter [22]. I morfologisk klassifisering blir *Babesia* delt inn i to hovedgrupper etter størrelse. Små *Babesia* med en størrelse på 1,0 til 2,5µm og store *Babesia* med en størrelse på 2,5 til 5,0 µm. Ved sekvenssammenligning av nukleær- små- enhet -ribosomal DNA av de ulike artene av *Babesia*, vises samme inndeling [22]. Den viser også at små *Babesia* er mer like *Theileria* spp enn store *Babesia*. Av de to kjente humanpatogene *Babesia* defineres *Babesia divergens* som stor *Babesia*, til tross for dens morfologiske likhet med små *Babesia*-arter. *Babesia microti* defineres som en liten *Babesia* [19,22,29]. *B. divergens* forekommer i Europa og fører til babesiose, en malarialignende sykdom, hos kyr og mennesker [22]. *B. divergens* overføres av flåtten *I. ricinus*. *B. microti* forekommer hovedsakelig i USA, og reservoaret for parasitten er gnagere, særlig mus. Parasitten overføres av flåtten *Ixodes scapularis* [49]. Det er også påvist *B. microti* i gnagere i Europa, men denne overføres av *Ixodes trianguliceps* som ikke angriper mennesker [22].

Livssyklusen til *Babesia* består av ulike stadier av ukjønnnet og kjønnnet formering. *Babesia* infiserer de røde blodcellene til verten. Der gjennomgår de en ukjønnnet formering og de røde blodlegemene ødelegges (Figur 3) [22,42].



**Figur 3** Flåtten tar et blodmåltid og overfører *Babesia* (sporozoitter) til verten. Sporozoittene invaderer vertens erythrocytter og sporozoittene omdannes til trophozoitter. Trophozoittene formere seg ukjønnnet og danner merozoitter. I blodet vil noen av merozoittene bli omdannet til hunngameter og noen til hanngameter. Gametene overføres til en ny flått, ved at flåtten anvender den infiserte verten til et blodmåltid. Gametene samler seg og gjennomgår en sporogonisk syklus, som resulterer i nye sporozoitter i flåtten. Flåtten tar et nytt blodmåltid og overfører sporozoittene til en ny vert. Økning av antall parasitter i blodet er årsaken til sykdom [48].

Den første sikre dokumentasjon av human babesiose ble gjort i 1957 i Jugoslavia [29,37]. En miltekstirpert storfebonde ble rammet av febril hemoglobinuri, og i blodutstryk ble det funnet intraerythrocyttære organismer. Det ble konstatert at denne infeksjon skyldtes *B. divergens* [29,37]. Det første dokumenterte tilfellet av human babesiose i USA ble rapportert i 1968 [34]. Det har blitt rapportert ca 400 tilfeller human babesiose i USA som skyldes *B. microti*

[49]. I Europa har det blitt rapportert ca 30 tilfeller av human babesiose, hvor 23 skyldes *B. divergens* [22,42]. Det første dokumenterte tilfellet i Sverige ble offentliggjort i 1992 [44]. I Norge er det forløpig ikke påvist tilfeller av human babesiose [49].

Det ble på 1990-tallet oppdaget en ny intraerytrocyttær protozo i USA [43]. Denne ble isolert fra en mann med symptomer på malaria, og ble sammenlignet med *B. microti*. Den er morfologisk lik *B. microti*, men biologisk og genetisk ulik. Den har fått betegnelsen WA1 og regnes som human patogen [43].

*Babesia* viser mange likhetstrekk med malariaparasitter fordi de begge angriper de røde blodlegemene [49]. Infeksjon med *B. microti* gir ofte subklinisk infeksjon og influensaliknende symptomer [49]. Infeksjon med *B. divergens* gir malarialiknende symptomer med feber, myalgi og hemolytisk anemi. De alvorligste sykdomsforløp sees vanligvis hos miltekstirperte [20,49].

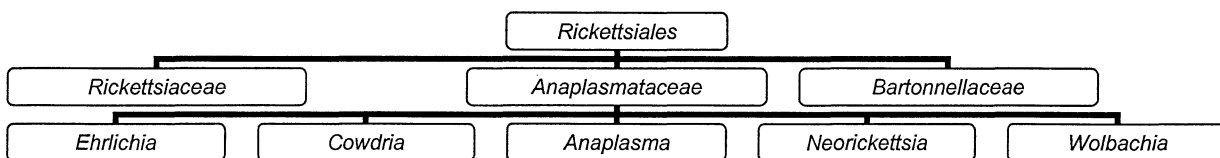
### 2.3 Ehrlichia og Anaplasma

*Ehrlichia*, *Anaplasma* og *Cowdria* er gram-negative intracellulære bakterier som tilhører *Rickettsia*-gruppen, og som er velkjent innen veterinærmedisin [5,7]. *Ehrlichia/ Anaplasma* infiserer ville pattedyr, husdyr og mennesker [5]. De ulike *Ehrlichia/ Anaplasma*-artene har til felles at de fleste artene angriper de hvite blodlegemene [5]. Ulike infeksjoner som skyldes *Ehrlichia/ Anaplasma* har vært beskrevet siden tidlig 1900-tallet i verdenssammenheng [11]. I Norge finner vi beskrivelser helt tilbake til 1780 av infeksjonen sjodogg som skyldes *Anaplasma phagocytophilum*. Sjodogg angriper drøvtyggere og gjenkjennes ved feberreaksjoner [39,40]. *Ehrlichia ruminantium* er kjent som infeksjonen "heartwater", som angriper kyr, geit og sau. "Heartwater" utgjør et problem på husdyr i det Sørlige-Afrika [2]. De ulike *Ehrlichia*- og *Anaplasma*-artene blir overført av ulike flått-arter. I Norge er det flåtten *I. ricinus* som er kjent vektor for overføring av *Ehrlichia* og *Anaplasma* [39,40].

Identifisering av *Ehrlichia*-, *Anaplasma*- og *Cowdria*-arter har vært vanskelig fordi konvensjonelle metoder for dyrkning har vært lite egnet. Morfologiske likheter og serologiske kryssreaksjoner har dessuten gjort identifikasjon usikker [52]. Grundig molekylær karakterisering i de senere årene av de ulike artene har ført til omfattende endringer i klassifiseringssystemet. Genomiske analyser på 16S rRNA- og *groESL* sekvens har slått fast at de tidligere *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* og agens for "human granulocytær

ehrlichiose” (HGE) er nært beslektet til genus *Anaplasma*. Dette har ført til at disse har blitt samlet under arten *Anaplasma phagocytophilum comb.nov* siden 2001 [10]. Agens som forårsaker ”human granulocytær ehrlichiose” kalles nå *Anaplasma phagocytophilum*, og ”human granulocytær ehrlichiose” kalles nå Human Anaplasrose (HA) [5,10,52]. Agens for ”human monocytær ehrlichiose” (HME), *Ehrlichia chaffeensis* klassifiseres imidlertid fremdeles som *Ehrlichia* [5,10,52].

*Ehrlichia* og *Anaplasma* er  $\alpha$ -Proteobacterier. De tilhører etter ny klassifisering orden *Rickettsiales*, familien *Anaplasmataceae* (Figur 4), som inkluderer ulike arter fordelt på genus *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Neorickettsia* og *Wolbachia* [5,10].



Figur 4 Ny klassifisering av *Ehrlichia* og *Anaplasma* etter reklassifisering [5,10]

”Human monocytær ehrlichiose” (HME) ble oppdaget i USA i 1991, og skyldes *Ehrlichia chaffeensis*, som infiserer monocytene [42]. Den ble definert som *Ehrlichia* pga sin tilsynelatende likhet med *E. equi*, nå *Anaplasma phagocytophilum*, men ble beholdt i genus *Ehrlichia* på grunn av molekylær slektskap til typearten *Ehrlichia canis* [10,42]. Den overføres av flåtten *Amblyoma americanum*, som ikke finnes i Europa. Det er rapportert om enkelte tilfeller av ”human monocytær ehrlichiose” (HME) i Europa som skyldes mononukleære ehrlichiaer med serologisk kryssreaksjon for *E. chaffeensis*. Det er ukjent om disse ehrlichiaene er andre arter eller om *E. chaffeensis* kan overføres av en annen vektor enn *A. americanum* [42].

Human anaplasrose (HA) (tidligere ”human granulocytær ehrlichiose”) ble beskrevet første gang i 1994 i USA av den norske legen Johan Bakken [5,42]. Første tilfellet av Human anaplasrose i Europa ble påvist i 1997 i Slovenia [20]. I 1999 ble det første tilfellet beskrevet i Sverige, og de første tilfellene i Norge ble publisert i 2001 [23]. Et studium utført av Bakken [5,23,42] viste at av 56 pasienter fra Syd-Norge som hadde Lyme borreliose, hadde 10.2% antistoffer for *A. phagocytophilum* [5,23,42]. Human anaplasrose skyldes en patogen nært beslektet med eller identisk med tidligere *E. equi* og *E. phagocytophila*. Disse artene er nå

forent i arten *A. phagocytophilum* [10]. Det er *Ixodes*- flåtter som er vektor for disse patogener, og som overfører disse til ulike vertsdyr.

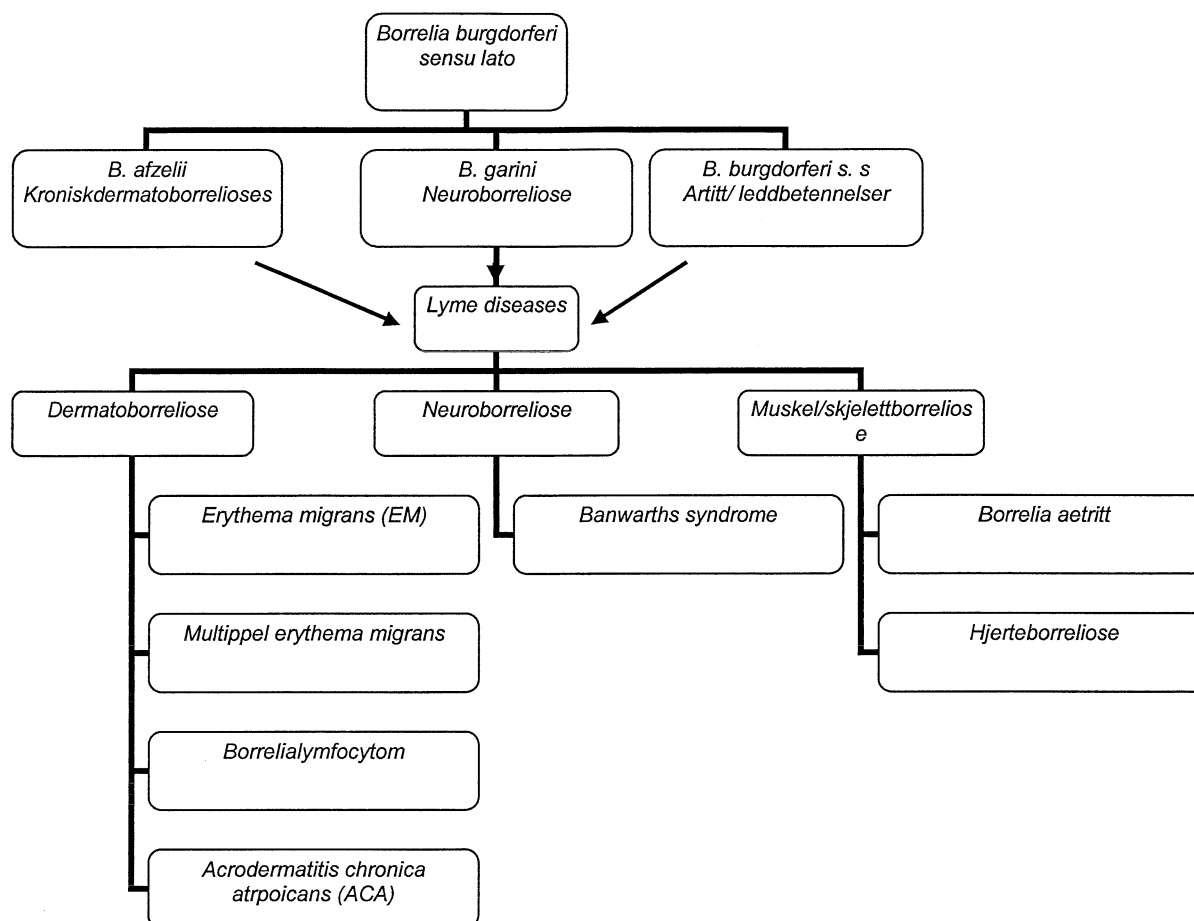
Human anaplasnose forårsaker akutt febril tilstand med hodepine og muskelsmerter. Hyppig forekommer også nedsatt matlyst, kvalme, leddsmerter og tørrhoste. I alvorlige tilfeller kan Human anaplasnose gi et sepsis- liknende sykdomsbilde med dødelig utgang hos ca 2 % [5]. De samme symptomene forekommer ved infeksjon som skyldes ”human monocytær ehrlichiose”, men kan være noe mildere [15]. Forskning viser at ”human monocytær ehrlichiose” og Human anaplasnose kan svekke immunsystemet til den infiserte, som derved kan bli mer mottakelig for andre infeksjoner [6,15].

## 2.4 *Borrelia*

*Borrelia*-infeksjoner er blant de mest rapporterte vektoroverførte sykdommer i Europa og USA [13,35,49], *Borrelia* er kjent både i humanmedisin og innen veterinærmedisin [52]. *Ixodes*- flåttene er hovedvektor for *Borrelia burgdorferi sensu lato* i Europa og USA [8].

*Borrelia* er en spirokete, og det finnes flere ulike arter av den. *Borrelia burgdorferi sensu lato* er fellesbetegnelse for flere nært beslektede *Borrelia*-arter. Det finnes 11 ulike genomarter (genospecies) av *B. burgdorferi s.l.*, hvor av 3 stykker er humanpatogene [42]. De tre genomartene *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* og *Borrelia garinii* er alle årsak til human sykdom i Europa, mens i USA er det bare *B. burgdorferi s.s.* som gir human sykdom [35,42]. *B. afzelii* og *B. garinii* er de mest vanlige i Europa, mens *B. burgdorferi s.s.* er mer sjelden [42].

*B. burgdorferi s.l.* tilhører orden *Spirochaetales* og familien *Spirochaetaceae* [42]. De er gram negative mikroaerofile bevegelige spiroketer [28]. Genuset har fått navnet etter den franske mikrobiologen A. Borrel [13]. I figur 5 vises en oversikt over hvilke *Borrelia*-arter som er human patogene og sykdommene de kan føre til [42].



**Figur 5** Oversikt over hvilke sykdommer som samles i felles betegnelsen Lyme borreliose, og hvilken human patogen *Borrelia*-art som forårsaker den enkelt sykdom [42].

I 1910 ble hudsymptomer, som nå er kjente karakteristikk for *Borrelia*-infeksjon etter flåttbitt, beskrevet for første gang [49]. I 1922 ble nevrologiske manifestasjoner beskrevet [49]. Lyme disease ble først beskrevet i 1975 i USA i byen Old Lyme i Connecticut, der av navnet [13,28]. Spiroketen ble oppdaget av Willy Burgdorfer i 1982, da han fant disse i tarmene til flått han hadde fått tilsendt fra Shelter Island, New York, et område med endemisk Lyme disease [15]. I 1984 ble spiroketen gitt navnet *Borrelia burgdorferi* som en honnør til Willy Burgdorfer [13,15,28].

Borreliose diagnostiseres regelmessig ved norske sykehus, og er rapportert fra de fleste fylker, bortsett fra de to nordligste [52]. Tall fra MSIS viste at det i 2001 ble registrert 124 tilfeller av Lyme borreliose [49]. Rapportering til MSIS inkluderer ikke den lokale hudinfeksjon *Erythema migrans* (EM). Antallet *Borrelia*-smittede er trolig derfor betydelig høyere.

*Borrelia*-infeksjonen forårsaker ofte rødlig hudutslett, Erythema migrans, rundt flåttbittet, og kan utvikle seg videre til infeksjoner i hud, ledd og nervesystemet [49]. Infeksjonenes forløp deles ofte inn i tidlig lokaliserte infeksjoner, disseminerte infeksjoner og kroniske infeksjoner [49]. *Borrelia burgdorferi s.l.* overføres til blodet ved flåttbitt, og føres med blodstrømmen rundt i kroppen. Spiroketen invaderer der ulike organsystem ved å binde seg til ulike cellevev når den ankommer kroppen [41]. Noen mennesker reagerer med symptomer på infeksjon med en gang, mens andre reagerer først på et senere tidspunkt. Andre får ingen synlige symptomer i det hele tatt [52]. *B. afzelii* er kjent som årsaken til sykdom i huden, bl.a. Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), *B. garinii* gir ofte neuroborreliose som kan rammer sentralnervesystemet og *B. burgdorferi s.s.* gir som ofte leddbetennelser [42].

### 3 Materiale og metoder

Benyttede reagenser og instrumenter i dette studiet som ikke er beskrevet direkte i teksten henvises det til Appendix.

#### 3.1 Feltinnsamling av flått

Metoden som er benyttet for å samle inn flått kalles flagging [21,38]. Et frottéhåndkle stiftes til et kosteskaff. Frottéhåndkleet dras over vegetasjon i de utvalgte områdene. Flåtten oppfatter håndkleet som et potensielt vertsdyr og fester seg til det. Flåtten plukkes av frottéhåndkleet ved hjelp av en pinsett, og overføres til et prøveglass med 70% etanol.

Det har ved hver innsamling vært målsettingen å sanke inn 100 flått, med fordelingen 25 hanner, 25 hunner og 50 nymfer.

Langøya, Telemark huset tidligere en mindre gård med beitende husdyr, som gav øya et kulturlandskap. Etter at beitedyrene forsvant har mye av det åpne kulturlandskapet forsvunnet, og øya har fått mer vegetasjon. I tillegg er øya blitt en yndet sted for rådyr som kommer svømmende fra fastlandet. Øya har derfor optimale forhold for flått med tilgang på ulik vegetasjon og vertsdyr.

På Langøya, Telemark har a.s. Telelab et fast felt på 10 m x 10 m på en gresseng ved nordøstre enden av øya. Dette feltet flagges heldekkende ved hver innsamling. Oppnås det ikke å samle inn tilstrekkelig antall flått (se over), flagges det i tillegg på vilkårlige steder inntil innsamlingen er komplett. Materialet som ble benyttet fra denne lokaliteten ble hentet fra innsamlingene i august 1999 (25 hanner, 25 hunner og 50 nymfer) [21], august 2000 (25 hanner, 25 hunner og 50 nymfer) og august 2001 (25 hanner, 24 hunner og 48 nymfer).

Valg av lokalitetene i Hordaland, Rogaland og Aust-Agder ble basert på kunnskap om flåtten habitat og informasjon fra lokalbefolkning. Det ble flagget og lett etter flått på ”typiske flåttsteder”, som f.eks. beitemark for sau og storfe.

I Hordaland ble det samlet inn på Stord og Borgundøy totalt 47 flått, fordelt på 22 hanner og 25 hunner i august 2000. Det ble også samlet inn over 50 nymfer, men disse ble dessverre ved et uhell ødelagt på laboratoriet og er ikke inkludert i oppgaven. I Rogaland ble det samlet inn totalt 29 flått, fordelt på 4 hanner, 1 hunn og 24 nymfer i august 2000 i Vidafjord, Moi, Helleland og Rennesø. I Vest-Agder på Reme ble det samlet inn totalt 101 flått, fordelt på 26 hanner, 26 hunner og 49 nymfer i august 2000.



### 3.2 Ekstrahering/lysering av DNA fra flått

Flåtten tømmes ut på en steril petriskål og overflødig etanol fjernes. Hver enkelt flått deles i to på langs med et sterilt skalpellblad. Skalpellbladet flamberes etter deling av hver flått.

Flåttbitene overføres til et 2 ml rør og knuses med en Pellet Pestle (en liten plastmorter) i 60  $\mu$ l lyseringsbuffer. Prøvene lyseres 1 time ved 65°C og 10 min ved 100°C. Løsningen sentrifugeres i 1 min ved 10500 rpm for å samle materialet [21].

QIAamp® DNA Mini Kit fra trinn 3 i Tissue Protocol ble benyttet til å rense flått for hemmende stoffer etter lysering. Dette skjer ved at DNA bindes til en membran, vaskes og elueres. Dette gav ca 150  $\mu$ l med DNA løst i produsentens anbefalte elueringsbuffer.

Eluatet ble renset videre med Fenol: Kloroform: Isoamyl Alkohol 25:24:1. 150 $\mu$ l eluat ble tilsatt 150 $\mu$ l med Fenol; Kloroform: Isoamyl Alkohol. Løsningen ble blandet ved vortexing, sentrifugert ved 10500 rpm i 5 minutter for å skille fasene, og det øverste vandige laget ble deretter avpipettert. Den avpipetterte løsningen ble tilsatt etanol, 2 x volum av det avpipetterte, blandet og inkubert i 15 min ved 4°C, slik at DNA kunne felles ut. Etter inkubering ble løsningen sentrifugert i 5 minutter ved 10500 rpm for å samle det felte DNA`et. Etter sentrifugering ble etanolen helt forsiktig av prøven, og prøven ble satt til lufttørking i 30 min. Tilstrekkelig lufttørking av prøven gjenkjennes ved at det ikke er synlig etanol eller etanollukt. DNA`et ble løst opp i 200 $\mu$ l 1x TE og oppbevart ved -20°C, inntil de ble benyttet som DNA-templat til PCR.

### 3.3 Mastermixer

*Ehrlichia/ Anaplasma, Borrelia burgdorferi s.l.* og *Babesia* ble påvist ved hjelp av PCR.

Sammensetningen av de ulike mastermixene er gitt i tabellene 1 til 8.

#### 3.3.1 Mastermix til konvensjonell PCR

Mastermix til konvensjonell PCR lages ved å blande PCR-buffer, MgCl<sub>2</sub>, forwardprimer, reversprimer, sterilt destillert vann og polymerase. Deretter ble 45 µl reaksjonsmix tilsatt 5 µl DNA-templat (Tabell 1-4).

**Tabell 1** PCR-mastermix uten dUTP for konvensjonell *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR. Benyttet til konstruksjon av *Ehrlichia* internkontroll.

<i>Ehrlichia/Anaplasma</i> PCR mastermix uten dUTP		
Komponenter	Konsentrasjon	pr. PCR- reaksjon
10 x PCR Gold-buffer		5µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4µl
dNTP	25 mM	0.4µl
Ehr 521	100 pmol/µl	0.5µl
Ehr 747	100 pmol/µl	0.5µl
Sterilt dest. vann		36.6µl
AmpliTaq Gold™	2.5 U/50µl	0.5µl
DNA-templat		5µl

**Tabell 2** PCR-mastermix med dUTP for konvensjonell *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR. Benyttet til analyse av flått.

<i>Ehrlichia/Anaplasma</i> PCR mastermix med dUTP		
Komponenter	Konsentrasjon	pr. PCR- reaksjon
10 x PCR Gold-buffer		5µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3µl
dUTP	25 mM	0.4µl
Ehr 521	100 pmol/µl	0.5µl
Ehr 747	100 pmol/µl	0.5µl
Sterilt dest. vann		35.6µl
AmpliTaq Gold™	2.5 U/50µl	0.5µl
DNA-templat		5µl

**Tabell 3** PCR-mastermix for konvensjonell *Babesia* PCR. Benyttet til analyse av flått.

<i>Babesia</i> PCR mastersmix		
Komponenter	Konsentrasjon	pr. PCR- reaksjon
10 x PCR Gold-buffer		5µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3µl
dNTP	25 mM	0.4µl
Piro A	100 pmol/µl	0.5µl
Piro B	100 pmol/µl	0.5µl
Sterilt dest. vann		35,6µl
AmpliTaq Gold™	1.5 U/50µl	0.3µl
DNA-templat		5µl

**Tabell 4** PCR-multiplex-mastermix for konvensjonell *Borrelia* PCR. Benyttet til analyse av flått.

<b><i>Borrelia</i> PCR multiplex-mastermix</b>		
<b>Komponenter</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>pr. PCR- reaksjon</b>
10 x PCR Gold-buffer		5µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4µl
dNTP	25 mM	0.4µl
GI-L	500 ng/µl	0.75µl
GI-R	500 ng/µl	0.75µl
GII-L	500 ng/µl	0.75µl
GII-R	500 ng/µl	0.75µl
GIII-L	500 ng/µl	0.75µl
GIII-R	500 ng/µl	0.75µl
Sterilt dest. vann		31.1µl
Amplitaq Gold	1.5 U/50/µl	0.3µl
DNA-templat		5µl

### 3.3.2 Mastermix til Real Time PCR med probe

Mastersmix til Real Time PCR (Tabell 5-6) ble laget ved å blande Taqman Universal PCR Master Mix (2x), forwardprimer og reversprimer, probe og sterilt destillert vann.

**Tabell 5** PCR-mastermix med probe for Real Time *B. divergens* gr. PCR. Benyttet til analyse av flått.

<b><i>B. divergens</i> gr. Real Time PCR mastermix</b>		
<b>Komponenter</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>pr. PCR- reaksjon</b>
Taqman Universal PCR Master Mix (2x)		25µl
BdiT	5µM	2,0µl
BdiF	3 pmol/µl	5µl
BdiR	9 pmol/µl	5µl
Sterilt dest. vann		8µl
DNA templat		5µl

**Tabell 6** PCR-mastermix med probe for Real Time *B. microti* gr. PCR.

<b><i>B. microti</i> gr. Real Time PCR mastermix</b>		
<b>Komponenter</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>pr. PCR- reaksjon</b>
Taqman Universal PCR Master Mix (2x)		25µl
BmiT	5µM	2,5µl
BmiF	9 pmol/µl	5µl
BmiR	9 pmol/µl	5µl
Sterilt dest. vann		7,5µl
DNA templat		5µl

### 3.3.3 SYBR®Green-mastermix til Real Time PCR

SYBR®Green-mastersmix ble laget ved å blande SYBR®Green PCR-Mastermix, forwardprimer, reversprimer og sterilt destillert vann (Tabell 7-8).

**Tabell 7** PCR-mastermix for *B. divergens* gr. SYBR®Green-PCR. Benyttet ved innkjøring av metode for detektering av *B. divergens* gr.

<b><i>B. divergens</i> gr. SYBR®Green PCR mastermix</b>		
<b>Komponenter</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>pr. PCR- reaksjon</b>
Sybr®Green reaksjons PCR Master Mix		25µl
BdiF	9 pmol/µl	5µl
BdiR	9 pmol/µl	5µl
Sterilt dest. vann		10µl
DNA-templat		5µl

**Tabell 8** PCR-mastermix for *B. microti* gr. SYBR®Green-PCR. Benyttet ved innkjøring av metode for detektering av *B. microti* gr.

<b><i>B. microti</i> PCR SYBR®Green mastermix</b>		
<b>Komponenter</b>	<b>Konsentrasjon</b>	<b>pr. PCR- reaksjon</b>
Sybr®Green reaksjons PCR Master Mix		25µl
BmiF	9 pmol/µl	5µl
BmiR	9 pmol/µl	5µl
Sterilt dest. vann		10µl
DNA-templat		5µl

## 3.4 PCR-program

PCR-program til konvensjonell PCR og Real Time PCR benyttet til detektering av *Ehrlichia*/*Anaplasma*, *Borrelia burgdorferi s.l* og *Babesia* (Tabell 9-12).

**Tabell 9** Konvensjonelt PCR-program for *Ehrlichia*/*Anaplasma* analyse.

<b><i>Ehrlichia</i>/<i>Anaplasma</i> PCR-program</b>		
<b>Programtype</b>	<b>Tid og temperatur</b>	<b>Repetisjoner</b>
Aktiveringsprogram	10 min 93°C	1
Syklusprogram		
Denaturering	45s 94°C	40
Annealing	45s 60°C	
Extension	45s 72°C	
Holdprogram	5 min 72°C	1
Instrument	Perkin Elmer PE 9600	

Tabell 10 Konvensjonelt PCR-program for *Babesia* analyse.

<i>Babesia</i> PCR-program		
Programtype	Tid og temperatur	Repetisjoner
Aktiveringsprogram	10 min 93°C	1
Syklusprogram		
Denaturering	45s 94°C	40
Annealing	45s 55°C	
Extension	45s 72°C	
Holdprogram	5 min 72°C	1
Instrument	Perkin Elmer PE 9600	

Tabell 11 Konvensjonelt PCR-program for *Borrelia* analyse.

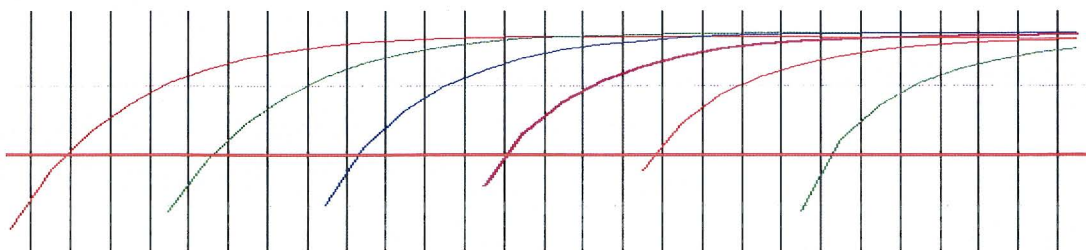
<i>Borrelia</i> PCR-program		
Programtype	Tid og temperatur	Repetisjoner
Aktiveringsprogram	10 min 93°C	1
Syklusprogram		
Denaturering	60s 92°C	40
Annealing	60s 65°C	
Extension	60s 72°C	
Instrument	Perkin Elmer PE 9600	

Tabell 12 Real Time PCR program for *Babesia* analyse.

<i>Babesia</i> Real time PCR-program		
Programtype	Tid og temperatur	Repetisjoner
Stage 1	2 min 50°C	1
Stage 2	10 min 95°C	1
Stage 3	15s 95°C	40
	60s 60°C	
Instrument	ABI Prism 7000	

### 3.5 Analyse av Real Time PCR resultater

Ved analyse av resultater for Real Time PCR settes en terskelverdi (Figur 6). Terskelverdien settes som en linje der hvor så mange som mulig av kurvene er lineære. Ct-verdien er PCR-syklusen hvor amplifiseringskurven krysser en bestemt terskelverdi. Kvantifisering av resultatene gjøres i henhold til en standardkurven, basert på Ct-verdier av en fortyningsserie av kontroll-DNA med kjent konsentrasjon.



Figur 6 Viser amplifiseringsplot av fortyningsserie av kontroll-DNA.

### 3.6 Gelelektroforese

Gelelektroforese benyttes til analyse og isolering av DNA fragmenter.

#### 3.6.1 Polyakrylamidgel 8%

En 8% polyakrylamidgel separerer DNA-fragmenter i størrelsen 60-400bp [32].

Polyakrylamidgel ble brukt ved separasjon av DNA-fragmenter som skulle isoleres fra gel. Polyakrylamidgel 8% ble laget ved å blande destillert H<sub>2</sub>O, glyserol, Acrylamid/Bis Stock-løsning og 10 x PAGE-buffer i en konisk vakuumflaske. Deretter ble løsningen avgasset under vakuum, og tilsatt katalysatorene 1% Ammonium persulfate og TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). Gelen ble deretter støpt og satt til polymerisering i 2 timer. Gelelektroforese ble kjørt i 3-5 timer ved 400 V i 1 x PAGE-buffer.

#### 3.6.2 Metaforgel 3%

Metaforgel ble benyttet istedenfor agarosegel til separasjon av DNA-fragmenter hvor det var behov for spesielt høy resolusjon.

Metaforgel 3% ble laget ved å blande metafor og 1x TBE-buffer i en glasskolbe. Løsningen ble kokt i mikrobølgeovn. Gelen ble deretter støpt ved 4°C og satt til stivning i 2 timer ved 4°C. Gelelektroforese ble kjørt i 2 timer ved 100 V.

#### 3.6.3 Agarosegel

3% agarosegel ble benyttet til separasjon av amplifisert *Ehrlichia* med internkontroll. 2% agarosegel ble benyttet til kontroll av amplifisert materiale uten spesielle krav.

Agarosegel ble laget ved å blande agarose og 1x TBE-buffer i en glasskolbe. Løsningen ble så kokt i mikrobølgeovn. Gelen ble deretter støpt og satt til stivning i 1 time ved romtemperatur. Gelelektroforese ble kjørt i 1 time ved 130 V.

#### 3.6.4 Kombinasjonsgel 0.5% agarose 1% metaforgel

Denne gelen ble benyttet til å kontrollere amplifisert *Borrelia*. Hensikten med blandingsgelen var å få bedre separasjon av DNA-fragmentene i området 50-200 bp.

1% agaroseløsning og 2% metaforløsning i 1x TBE ble smeltet i separate beholdere i vannbad, og blandet sammen i forholdet 1:1. Dette gir 0.5 % agarose + 1% metaforgel. Gelen ble satt til stivning i 1 time ved romtemperatur. Gelelektroforese ble kjørt i 1.5 timer ved 100V.

### 3.6.5 Farging og fotografering

For å synliggjøre DNA fragmenter ble agarose og metaforegeler farget med SYBR®Gold i 1 x TBE-buffer i 40 minutter. Polyakrylamidgeler ble farget med SYBR®Gold i 1 x PAGE-buffer i 40 minutter. Gelene ble deretter avfotografert på en 302 nm transilluminator med 40 sekunder eksponeringstid med gult filter.

## 3.7 Isolering og eluering av DNA-fragmenter fra elektroforesegeler

### 3.7.1 Isolering av DNA-fragment fra polyakrylamidgel

Isolering fra polyakrylamidgel ble gjort for oppnå et produkt som var renere, og hadde mindre hemmende stoffer i seg. Gelelektroforese ble kjørt som beskrevet overfor, gelen ble farget og UV-bestrålt på en 302 nm transilluminator for å synliggjøre DNA-fragmentene. Ved hjelp av størrelsesstandarder  $\phi$ -X 174 DNA/ HaeIII Markers kunne størrelsene på båndene som var synlig på gelen fastsettes. Ønskede bånd ble kuttet ut av gelen vha. skalpell.

### 3.7.2 Fryseeluering

Etter isolering fra gelen ble fragmentene lagt i et 1.5 ml rør og fryst ned i  $-70^{\circ}\text{C}$  i 18 timer. Det frosne innholdet ble så most med en Pellet Pestel og frosset ned på nytt i  $-70^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter. Det frosne materialet ble most på nytt med en Pellet Pestel og tilsatt 1 xTE. Løsningen ble så vortexet og spunnet ned, dette ble gjentatt 3 ganger.

### 3.7.3 Passiv eluering

Etter isoleringen fra gelen ble fragmentene lagt i et 1.5 ml rør og tilsatt 1 xTE i likt volum som fragmentene. Løsningen ble satt til passiv eluering i romtemperatur over natt.

## 3.8 Konstruksjon av positivkontroll - amplikon fra gel

Eksisterende positivkontroll ble oppformert ved PCR. PCR-produktet ble rensert med QIAquick PCR purification Kit for å fjerne primer dimer. Primer dimer utkonkurrerer det autentiske PCR-produkt og fører til underestimering av følsomheten. For være sikker på at all primer dimer ble fjernet, ble PCR-produktet applisert på en 2% agarosegel og gelelektroforese ble kjørt i 1 time 130 V. Gelen ble farget og de spesifikke båndene ble isolert fra gelen. De isolerte fragmentene ble rensert med MinElute Gel extraction Kit. Konsentrasjon ble beregnet vha agarosegelelektroforese og størrelsesstandard;  $\Phi$ X 174 DNA/Hae III Markers, og løsningen ble seriefortynnet i 1 xTE.

### 3.9 Statistiske analyser

Statistisk bearbeiding av analysedata ble gjennomført ved hjelp av SPSS, versjon 12.0. Det ble benyttet kji-kvadrattest.

### 3.10 Oversikt over benyttede primere, prober og positivekontroller

Oversikt over benyttede primere, prober og positivekontroller med sekvens, målorganisme og referanser (Tabell 13-16).

**Tabell 13** Oversikt over primere med sekvenser og målorganismer til konvensjonell PCR og Real Time PCR

Primere til PCR	Sekvens	Målorganisme	Referanse
Ehr 521	5`-TGT AGG CGG TTC GGT AAG TTA AAG-3`	<i>A. phagocytophilum</i>	Levin et al. (24)
Ehr 747	5`-GCA CTC ATC GTT TAC AGG GTG-3`	<i>A. phagocytophilum</i>	Levin et al. (24)
GL-R	TTA CAG TAA TTG TTA AAG TTG AAG TGC C	<i>B. burgdorferi s.s</i>	Demaerschalk et al. (9)
GI-L	AAC AAA GAC GGC AAG TAC GAT CTA ATT	<i>B. burgdorferi s.s</i>	Demaerschalk et al. (9)
GII-R	GTA ACT TTC AAT GTT GTT TTG CCG	<i>B. garinii</i>	Demaerschalk et al. (9)
GII-L	TGA TTA AAA CAA CGG TTC TGG AAC	<i>B. garinii</i>	Demaerschalk et al. (9)
GIII-R	TTC CAA TGA TAC TTT ATC ATT AGC TAC TT	<i>B. afzelii</i>	Demaerschalk et al. (9)
GIII-L	TAA AGA CAA AAC ATC AAC AGA TGA AATG	<i>B. afzelii</i>	Demaerschalk et al. (9)
Piro-A	5`-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G-3`	<i>B. divergens gr.</i>	Armstrong et al. (4)
Piro-B	5`-TTA AAA TAC GAA TGC CCC CAA C-3`	<i>B. divergens gr.</i>	Armstrong et al. (4)
BdiF	CAG CTT GAC GGT AGG GTA TTG G	<i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet
BdiR	TCG AAC CCT AAT TCC CCG TTA	<i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet
BmiF	GGG ACT TTG CGT TCA TAA AAC G	<i>B. microti gr.</i>	Dette studiet
BmiR	AGG ACA TCT AAG GGC ATC ACA GA	<i>B. microti gr.</i>	Dette studiet

**Tabell 14** Oversikt over benyttede positivkontroller med sekvenser og målorganismer til Real Time PCR.

Pos. kontr. til Real Time PCR	Sekvens	Målorganisme	Referanse
Bmik	5`-GGA CTT TGC GTT CAT AAA ACG CAA GGA AGT GTA AGG CAA TAA CAGGTCTGTGATGC CCT TAG ATG T CC T-3`	<i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet
Bdik	5`AGG GAC TTT GCG TTC ATA AAA CGG GAC AAT AAC GGA ATG TGA AGG AAC TCT GTG ATG CCC TTA GAT GTC CT-3`	<i>B. microti gr.</i>	Dette studiet
Bmic-ic	5`AGG GAC TTT GCG TTC ATA AAA CGG GAC AAT AAC GGA ATG TGA AGG AAC TCT GTG ATG CCC TTA GAT GTC CT-3`	<i>B. microti gr.</i>	Dette studiet
Bdi-ic-real	5`- CAG CTT GAC GGT AGG GTA TTG GCC TAC GGC AAC GAC GGA GGG TAA CGG GGA ATT AGG GTT CGA-3	<i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet



Tabell 15 Oversikt over benyttede positivkontroller til konvensjonell PCR

Pos. kontr. til Real Time PCR	Opphav	Målorganisme	Referanse
<i>Babesia</i>	Positivt <i>B. divergens</i> PCR-materialet fra Nederland	<i>B. divergens</i>	Prof. Dr. F. Jongjan
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	Amplikon fra gel	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	Dette studiet
<i>B. garinii</i>	Amplikon fra gel	<i>B. garinii</i>	Dette studiet
<i>B. afzelii.</i>	Amplikon fra gel	<i>B. afzelii</i>	Dette studiet
<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i>	Total DNA fra blod fra en sau podet med <i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	a.s. Telelab/ Snorre Stuen

Tabell 16 Oversikt over prober med sekvenser og målorganismer til Real Time PCR.

Prober til Real Time PCR	Sekvens	Målorganisme	Referanse
BdiT	CGA GGC AGC AAC GG	<i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet
BmiT	AAG TGT AAG GCA ATA AC	<i>B. microti gr.</i>	Dette studiet
BdiKT	C TA CGG CAA CGA CG	<i>B. microti gr.</i> <i>B. divergens gr.</i>	Dette studiet

## 4 Resultater

### 4.1 Etablering og optimalisering av PCR for påvisning av *Babesia*.

#### 4.1.1 Konvensjonell PCR

For konvensjonell PCR-analyse for *Babesia spp* ble primerne PiroA (forward)/ PiroB (revers) benyttet [4]. *B. divergens* DNA ble benyttet som positivkontroll.

Amplifisering av positivkontroll med PiroA/ PiroB gav det forventede 408 bp-bånd på en 2% agarosegel. I den negative kontrollen (human genomisk DNA 10 ng/ $\mu$ l) ble det observert amplifiseringsprodukter av ulike størrelser.

Fem tilfeldig utvalgte flått ble amplifisert med primerne PiroA/ PiroB. Amplifiseringen gav mange uspesifikke bånd. Tilsvarende resultater ble observert for positivkontroll.

På bakgrunn av disse resultatene ble justeringer i PCR-forholdene gjennomført for å oppnå bedre spesifisitet. For å oppnå optimal følsomhet og spesifisitet i en PCR-reaksjon er det vanlig å justere annealingstemperaturen, MgCl<sub>2</sub>- konsentrasjon og primerkonsentrasjon. Ved å øke annealingstemperaturen kan primernes selektivitet økes. Ved økning eller senkning av MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon endres DNA- polymerasens evne til å binde seg til primerne for å utvide disse. Ved for lav MgCl<sub>2</sub>- konsentrasjon vil DNA-polymerasen ha for lav aktivitet, og den vil ha problemer med å binde seg til primerne. Ved for høy MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon vil aktiviteten være svært høy, og DNA-polymerasen vil binde seg til alle "settene" hvor primerne har festet seg. Ved optimal MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon vil det ta litt tid før DNA-polymerasen binder seg til primerne, og det skjer bare en utvidelse av primere som kan binde seg varig.

Ved primertitrering optimaliseres primerkonsentrasjonene. Optimal primerkonsentrasjon avhenger av primernes stabilitet. Er primerne stabile etter "feste" til sekvensen som skal kopieres, kan primerkonsentrasjon være lav. Er primernes "feste" til sekvensen ustabil behøves høyere primerkonsentrasjon.

Økning i annealingstemperaturen fra 55°C til 57°C gav dårligere følsomhet uten vesentlig forbedring av spesifisiteten. 55°C ble derfor benyttet i de videre forsøkene.

Da endring i annealingstemperaturen fra 55°C til 57°C ikke gav bedre selektivitet, ble det gjennomført en MgCl<sub>2</sub>-titrering. MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjonene på 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2.5 mM, 2 mM, 1.75 mM, 1.5 mM og 1.25 mM ble undersøkt. 3 mM MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon gav det tydeligste og sterkeste 408 bp-båndet. Ved 1.25 mM til 2 mM ble ingen 408 bp-bånd observert. For konsentrasjoner over 3 mM ble det mer bakgrunnstøy av lav molekylær vekt DNA som utkonkurrerte det 408 bp-båndet.

Etter MgCl<sub>2</sub>-titrering ble det gjennomført en trinnvis økende primertitrering (Tabell 17) [3]. De beste amplifiseringsresultatene ble oppnådd med 300 nM av både PiroA (forward) og PiroB (revers).

**Tabell 17** Viser de ulike primerkonsentrasjonen for forward og revers primerne som ble benyttet i primertitreringen.

Revers Primer / konsentrasjon	Forward primer / konsentrasjon		
	50 nM	300 nM	900 nM
50 nM	50/50	300/50	900/50
300 nM	50/300	300/300	900/300
900 nM	50/900	300/900	900/900

Etter justering i primerkonsentrasjon og MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon, ble syv tilfeldige flått valgt ut og amplifisert. Analysen viste fortsatt mange uspesifikke bånd i prøvene. Det var også tendenser til uspesifikke bånd i positivkontrollen.

I løpet av en del PCR-oppsett ble det observert ustabil følsomhet fra PCR-oppsett til PCR-oppsett, noe som gjorde analyse av resultatene vanskelig.

#### 4.1.2 Real Time PCR

Da optimalisering av den konvensjonelle metoden ikke lyktes, ble det vurdert som hensiktsmessig å etablere en ny PCR analyse i Real Time format.

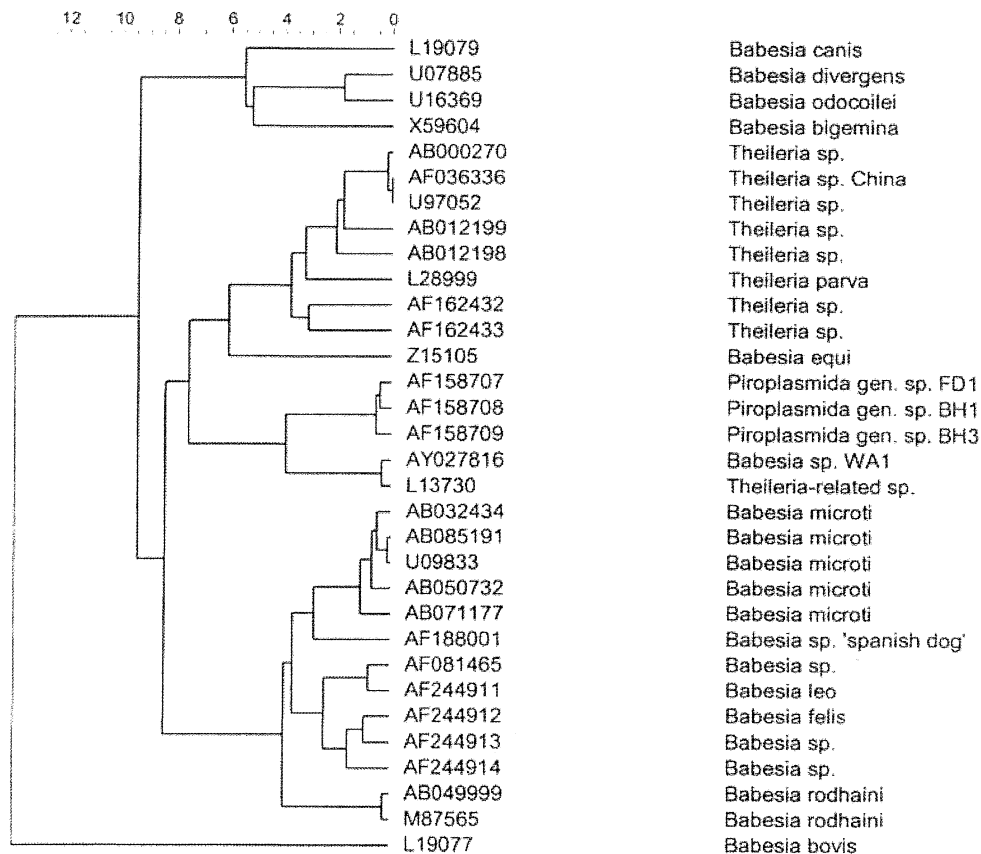
##### 4.1.2.1 Konstruksjon av primere, probe, positivkontroll og internkontroll til Real Time PCR

Som utgangspunkt for å konstruere *Babesia* primere til Real Time PCR, ble sekvensen til primeren PiroA benyttet som søkesekvens i programmet BLAST [www.ch.embnet.org]. Dette søket gav mange treff, blant disse var *Babesia microti* 18s rRNA gensekvens AB071177. *B. microti* AB071177 ble benyttet som søkesekvens til å foreta et nytt BLAST-søk. BLAST-søket gav treff på 18s rRNA sekvenser fra flere *Babesia*-arter, samt endel *Theileria* og

*Piroplasma*-arter. Det ble ikke gjort treff på *B. divergens* eller *B. bigemina*. For å finne sekvenser til de manglende *Babesia*-artene, ble disse søkt på artsnavn i PubMed [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>]. Et utvalg av sekvenser ble lastet ned vha. kommandoen FETCH [ [www.ch.embnet.org/](http://www.ch.embnet.org/)]. De ulike sekvensene ble importert til programvaren KODON [Versjon 1.0, Applied Matris, Sint-Martens-Latein, Belgia] hvor det ble gjennomført multippel sekvenssammenstilling og fylogenetisk analyse etter likhetsalgoritmen [UPGMA] (Figur 7). Resultatet av analysen viste at de ulike sekvensene kunne deles inn i fire store grupper; ”bovisgruppen” (B), ”divergens gruppen” (D), ”theileriagruppen” (T) og ”microtigruppen”. Microti -gruppen kunne videre deles i 3 undergrupper ”microti ”(M), ”felis/leo” (F) og ”rodhainii”(R). Videre viste det seg at ”microtigruppen” hadde større likhet med ”theileriagruppen”, enn med ”divergensgruppen”, og at *B. bovis* var meget ulik alle de andre sekvensene (Tabell 18, Figur 7).

**Tabell 18** Sekvenser brukt i seleksjon av *Babesia* primere

Løpenummer	Organisme	Gruppe
U07885	<i>Babesia divergens</i>	Divergens (D)
U16369	<i>B. odocoilei</i>	D
X59604	<i>B. bigemina</i>	D
L19079	<i>B. canis</i>	D
AB012198	<i>Theileria sp.</i>	Theileria (T)
U97052	<i>Theileria sp.</i>	T
AF036336	<i>Theileria sp.</i>	T
AB000270	<i>Theileria sp.</i>	T
AB012199	<i>Theileria sp.</i>	T
L28999	<i>Theileria parva</i>	T
AF1642432	<i>Theileria sp.</i>	T
AF1642433	<i>Theileria sp.</i>	T
Z15105	<i>B. equi</i>	T
AY027816	<i>Babesia sp.</i> WA1	T
L13730	<i>Theileria</i> -beslektet sp.	T
AF158709	<i>Piroplasmida</i> genospecies BH3	T
AF158707	<i>Piroplasmida</i> genospecies FD1	T
AF158708	<i>Piroplasmida</i> genospecies BH1	T
AF081465	<i>Babesia sp.</i>	Felis/Leo (F)
AF244911	<i>B. leo</i>	F
AF244914	<i>Babesia sp.</i>	F
AF244913	<i>Babesia sp.</i>	F
AF244912	<i>B. felis</i>	F
AB032434	<i>B. microti</i>	Microti (M)
U09833	<i>B. microti</i>	M
AB085191	<i>B. microti</i>	M
AB050732	<i>B. microti</i>	M
AB071177	<i>B. microti</i>	M
AF188001	<i>Babesia</i> "spanish dog"	M



**Figur 7** Cladogram basert på sammenligning av 18s rRNA sekvenser fra *Babesia* og beslektede arter.

Det ble på bakgrunn av resultatene fra sekvenssammenstilling og fylogenetisk analyse konkludert med at det sannsynligvis ikke ville være mulig å designe en PCR som påviste alle *Babeisa*-artene uten at *Theileria* og *Piroplasma* også ble omfattet. Det ble derfor besluttet å konstruere to separate primersett som skulle være spesifikke for ”divergens-gruppen” og ”microti-gruppen”.

Videre design ble gjort i programvaren Primer Express [Versjon 2.0, Applied Biosystems, Foster City, USA]. *B. microti* sekvensen AB 032434 ble importert til Primer Express, som søkte gjennom en DNA-sekvens for undersekvenser som egnet seg som PCR-primere og deteksjonsprober. Søket ble gjennomført med innstillinger for TaqMan MGB (minor groove binder) primere og prober. Primersekvensene som ble funnet ble sortert etter posisjonen av den 5`-prime enden av den venstre (forward) primer. Primerne var samlet i 14 områder. De tilsvarende områdene i *Babesia-Theileria* sekvenssammenstilling ble undersøkt. Halvparten av områdene viste enten sekvensvariasjon innen ”microtigruppen” (for variable), eller var like med sekvenser utenom ”microtigruppen” (for konserverte). Ut fra disse resultatene ble det

konstatert at de mest lovende primersettene var fra område til høyre for bp 1154, 1360 og 1540 i AB032434 sekvensen. Det ble deretter gjennomført et nytt søk i BLAST med de ulike primer/probekandidatene for å kontrollere for uforutsette kryssreaksjoner. Dette søket eliminerte 1154 og 1540 områdene, og primere i 1360-region ble valgt. Disse primerne het BmiF (forward) og BmiR (revers); proben het BmiT. PCR-reaksjonens spesifisitet stammer kun fra forward primeren BmiF og proben BmiT; BmiR er ikke spesifikk. Sekvensene hadde full homologi til alle medlemmene i "microtigruppen", med to unntak. BmiT har en enkel mismatch med *Babesia* "spanish dog". En av *B. rodhainii* sekvensene mangler en "G" i forhold til BmiR. Denne basen er tilstede i samtlige andre *Babesia/Theileria* sekvenser, så den manglende G er høyst sannsynlig en sekvenseringsfeil.

Tilsvarende arbeid ble gjort for å designe primere til "divergensgruppen". *B. divergens* 18s rRNA sekvensen U07885 ble analysert for lovende primere og prober i Primer Express. Det ble etter analyse i Primer Express identifisert 11 områder, av disse var 7 for variable og 1 for konserverte. Etter søk i BLAST ble området til høyre for bp 266 valgt. Dette gav primerne BdiF (forward) og BdiR (revers) og proben BdiT. PCR-reaksjonens spesifisitet stammer kun fra forward primeren BdiF og proben BdiT, mens BdiR er ikke spesifikk.

Til konstruksjon av positivkontroller til *B. microti* ble *B. microti* (AB032434) 18s rRNA sekvensen fra 1362 til 1430 (dvs fra begynnelsen av BmiF til enden av BmiR) syntetisert. Tilsvarende ble gjort for å lage positivkontroll til *B. divergens*. *B. divergens* (U07885) 18s rRNA sekvensen fra 266 til 327 ble syntetisert.

Til konstruksjon av internkontroll ble internkontroll-sekvensen derivert fra positivkontroll-sekvensene ved å stokke om probe-bindings-sekvensene. Dette for å gi en sekvens som lot seg amplifisere av de samme primerne som positivkontroll. Den skulle ikke reagere med den opprinnelige påvisningsproben, men skulle kunne detekteres med egen spesifikk probe.

#### 4.1.2.2 Optimalisering av Real Time PCR

De syntetiske positivkontrollene til *B. divergens* og *B. microti* hadde fra leverandøren en konsentrasjon på 100 pmol/μl. Denne konsentrasjon var meget høy, tatt i betraktning at man kun trenger ett molekyl for å kunne amplifisere. Dette gav en risiko for forurensning av området for PCR-oppsett på laboratoriet. Løsningen ble derfor fortynnet ned til  $6 \times 10^9$

molekyler/10 $\mu$ l på et post-PCR-område, før den ble brakt inn til et pre-PCR-område. Løsningen med 6x10<sup>9</sup>/10 $\mu$ l molekyler ble deretter seriefortynnet med Human DNA (10 ng/ $\mu$ l). Ved PCR-kjøringer ble 3x10<sup>6</sup> molekyler/5 $\mu$ l til 3x10<sup>-1</sup> molekyler/5 $\mu$ l benyttet som positivkontroll. For *B. divergens* ble den forventede amplifiseringskurven observert.

Det ble ved uttesting av positivkontroll ikke observert noen amplifiseringkurven for *B. microti*. Dette tydet på feil ved enten probe, primer eller positivkontroll. *B. microti* ble så testet med SYBR®Green-teknologi, men ingen amplifisering ble observert. Den konstruerte internkontrollen til *B. microti* ble testet, men ingen amplifisering ble observert. Disse uttestingene tydet på at det var feil ved primerne for *B. microti*. For å utelukke sekvensfeil som årsak til manglende amplifisering ble de leverte primerne og positivekontroll kontrollert, og det ble konstatert at disse var korrekte. Videre optimalisering ble på grunn av dette kun utført for *B. divergens*.

Standardkonsentrasjon for primere ved PCR-kjøring med Real Time er 900 nM for både forward-primer og revers-primer. Ved bruk av denne konsentrasjon gir leverandøren en garanti på at PCR-reaksjonen vil fungere, men dette behøver ikke være den optimale primerkonsentrasjon. En optimal PCR-reaksjon kan fungere med primer-konsentrasjoner mellom 50 nM og 900 nM [3]. Kombinasjoner av hhv 50, 300 og 900 nM (Tabell 17) ble forsøkt i primertitreringen. Kombinasjon 300 nM BdiF (forward primer) og 900 nM BdiR (revers primer) gav like gode signaler som standardoppsett fra leverandøren.

Leverandøren garanterer at PCR-reaksjon vil fungere med en probe-konsentrasjon på 250 nM. Dette behøver ikke være den optimale konsentrasjon, og de anbefaler probetitrering. Probekonsentrasjon på 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM og 250 nM ble forsøkt. Det ble observert at en probekonsentrasjon på 200 nM gav like gode signaler som standardoppsett fra leverandøren..

Internkontrollen ble fortynnet som beskrevet for positivkontroll. Konsentrasjonene 3x10<sup>6</sup> molekyler/5 $\mu$ l til 3x10<sup>0</sup> molekyler/5 $\mu$ l ble benyttet i uttesting av internkontrollen. Det ble observert at *B. divergens* internkontroll ble amplifisert.

Ved samkjøring av internkontroll (IK) og positivkontroll (PK) var det nødvendig å kontrollere denne kombinasjon for eventuelle kryssreaksjoner (Tabell 19). Resultatene av uttestingene

viste at internkontrollen (IK) og positivkontroll (PK) ikke kryssreagerte med hverandre (Tabell 19, forsøk nr 1 og 2). Resultatet i forsøk nr 3 viste at internkontrollen (IK) og positivkontrollen (PK) virket sterkt hemmende på hverandres probe, og dermed ikke egnet seg til tiltenkt bruk.

**Tabell 19** Kombinasjoner av probe, primer og DNA-templat som ble kontrollert for eventuelle kryssreaksjoner i optimaliserings arbeidet til *B. divergens* Real Time PCR.

Forsøk	Probe	Primer	DNA-templat	Resultat
1	BdiT	BdiF/BdiR	Syntetisk IK	Ingen amplifisering
2	BdiKT	BdiF/BdiR	Syntetisk PK	Ingen amplifisering
3	BdiT+BdiKT	BdiF/BdiR	Syntetisk IK og PK*	Ingen amplifisering

\*) PK ble satt opp i seriefortynning  $3 \times 10^5$  molekyler/5 $\mu$ l til  $3 \times 10^0$  molekyler/5 $\mu$ l. IK-konsentrasjon var  $3 \times 10^2$  molekyler/5 $\mu$ l pr.reaksjon.

I videre analyser av flått ble primerne BdiF (300 nM)/ BdiR (900 nM) brukt sammen med probe BdiT (200 nM). Positivkontroll BdiK (fortynnet i 10 ng/ $\mu$ l Human DNA) ble brukt som parallellkontroll og kvantifiseringsstandard. På grunn av negative resultater beskrevet over, ble ingen forsøk gjort for å påvise *B. microti* eller å bruke internkontroll.

## 4.2 Konstruksjon av internkontroll til bruk i *Ehrlichia/ Anaplasma* PCR

I dette studiet skulle primerne Ehr 521/47 benyttes til påvisning av *Ehrlichia/ Anaplasma*. Dette har vist ustabil følsomhet som forekommer fra oppsett til oppsett. Slik variasjon kan føre til systematiske feil i opptelling av positive flått og antyde falske forskjeller mellom populasjoner. Ved å bruke en internkontroll (IK) stiller man inn en minimum følsomhet og kontrollerer variasjon i følsomheten. I tillegg kan falske negative resultater på grunn av hemmende prøver ekskluderes.

Formålet med denne konstruksjon var å konstruere et DNA-fragment som kunne amplifiseres med Ehr 521/747, men som gav et større amplifiseringsprodukt.

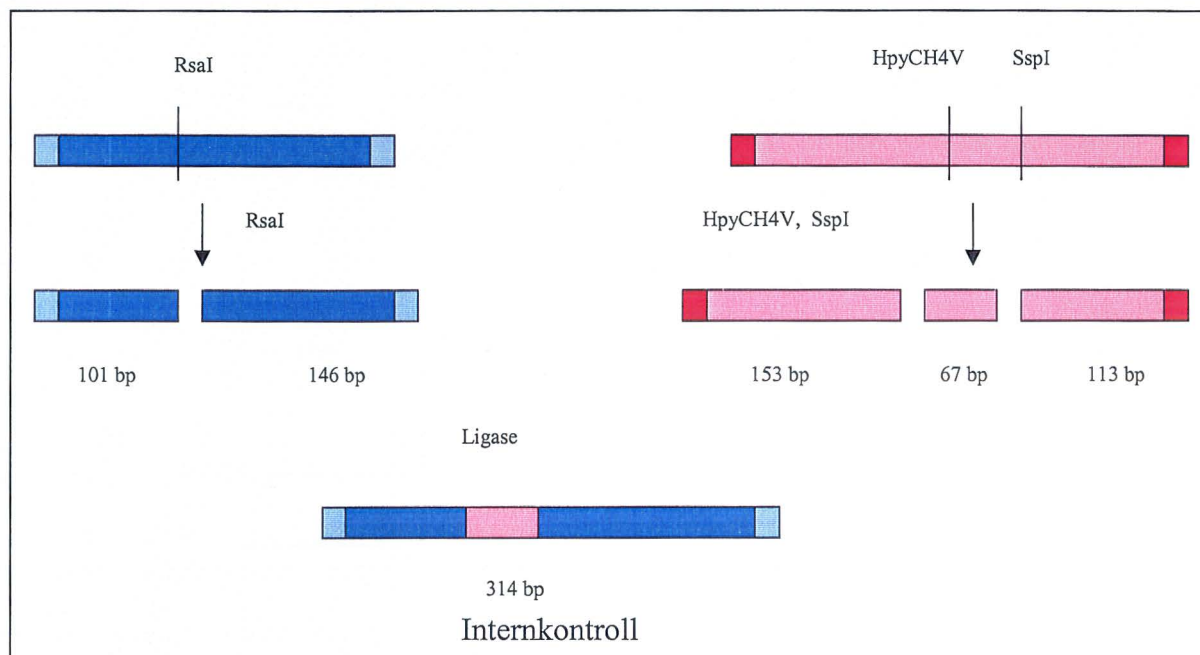
### 4.2.1 Strategi for konstruksjon av *Ehrlichia*-internkontroll

Strategien med denne konstruksjon var å sette inn et 67 bp-fragment inn i det 247 bp Ehr 521/747 amplicon, for å danne et 314 bp-fragment. Amplifisering av *Ehrlichia/ Anaplasma* med Ehr 521/747 gir et produkt på 247 bp (Figur 8). Ved å kutte dette PCR-produktet med restriksjonsenzymet RsaI dannes det 101 bp- og 147 bp-fragmenter (Figur 8). Et 67 bp-fragmentet lages ved å kutte Oli1+/Oli2+ PCR-produkt fra Human papillomavirus HPV-16 med restriksjonsenzymene HpyCH4V og SspI som kutter henholdsvis ved 153 bp og



220 bp (Figur 8). Ved ligering av 101 bp-, 67 bp- og 146 bp-fragmenter dannes det et 314 bp-fragment (Figur 8). Dette resulterer i en sekvens som ikke gjenkjennes verken av RsaI, SspI eller HpyCH4V (Tabell 20). Ved å kutte produktet på nytt med RsaI elimineres uønskede ligeringsprodukter.

Nærmere analyser av DNA-sekvensene viste at ved en orientering av den 67 bp-fragment ville et kuttesete for enzymet BslI bli dannet. Dette gav muligheten for å eliminere en orientering av det 67 bp insertet og produsere internkontroll som var en homogen DNA-sekvens.



**Figur 8** Illustrasjon av konstruksjon av *Ehrlichia* internkontroll. Illustrasjon viser hvor restriksjonsenzymene kutter på Ehr 521/747 amplicon og Oli1+/Oli2+ HPV16 amplicon. Den illustrerer også hvilke DNA-fragmenter som liggeres og danner internkontrollen.

**Tabell 20** En oversikt over gjenkjennelsessekvensene og kuttesetene til restriksjonsenzymene HpyCH4V, SspI og RsaI. Og resultatene av ligering av RsaI- og SspI-fragmenter, og ligering av HpyCH4V- og RsaI-fragmenter.

Restriksjonsenzym	Kuttesete
HpyCH4 V	5`...TG CA...3` 3`...AC GT...5`
SspI	5`...AAT ATT...3` 3`...TTA TAA...5`
RsaI	5`...GT AC...3` 3`...CA TG...5`
Ligering av	Resultat
RsaI/SspI	GTATT CATAA
HpyCH4/ RsaI	TGAC ACTG

#### 4.2.2 Konstruksjon av *Ehrlichia*- internkontroll

PCR-produkt fra HPV-16 ble kuttet med SspI og HpyCH4V og PCR-produkt fra Ehr 521/747 ble kuttet med RsaI. Deretter ble 67 bp-, 101 bp- og 146 bp-fragmenter isolert fra 8% polyakrylamidgel. Eluerte 101 bp-, 146 bp- og 67 bp-fragmenter ble ligert med T4 DNA Ligase, parallelt ble eluert 101 bp- og 146 bp-fragmenter ligert med T4 DNA Ligase. Elektroforetisk analyse viste at fragmenter av økt størrelser var dannet. Etter liggeringen ble liggeringsproduktet amplifisert med Ehr 521/747, og amplifiseringsprodukter av ulike størrelser ble observert etter gelelektroforese. Amplifiseringen bekreftet at det var dannet fragmenter med ulike størrelser under liggering. Amplifiseringen viste et overskudd av 247 bp-fragmenter. På grunn av tilstedeværelse av andre høy molekylære liggering/ amplifiseringsprodukter var det forventede 314 bp-fragmentet ikke synlig. For å få fjernet overskuddet av 247 bp-fragmenter ble ligert 101 bp + 146 bp + 67 bp-fragmenter forsøkt kuttet med restriksjonsenzymet RsaI. Ingen synlig endring i båndmønstrene ble observert etter kutting. For å eliminere flere av de uønskede bånd ble de ligerte prøvene kuttet med ulike kombinasjoner av restriksjonsenzymmer (Tabell 21).

**Tabell 21** Kombinasjonene av restriksjonsenzymmer som ble utprøvd på de ulike prøvene. For kombinasjon med to restriksjonsenzymmer ble det valgt kompromibuffer og kompromi inkuberinstid. For prøver med kun et restriksjonsenzym ble produsentens anbefalinger fulgt.

Prøve nr	Prøvekombinasjon	Enzym	Buffer	Inkubering
A-1	101 bp+146 bp+67 bp	BsII, RsaI	Buffer 4 (komperomi)	37°C i 30 min, 55°C i 30 min
A-2	101 bp+146 bp+67 bp	RsaI	Buffer C (RsaI)	37°C i 60 min
A-3	101 bp+146 bp+67 bp	BsII, RsaI	Buffer 3 (BsII)	55°C i 60 min
B-1	101 bp+146 bp	BsII, RsaI	Buffer 4 (kompromi)	37°C i 30 min, 55°C i 30 min
B-2	101 bp+146 bp	RsaI	Buffer C (RsaI)	37°C i 60 min
B-3	101 bp+146 bp	BsII	Buffer 3 (BsII)	55°C i 60 min
C	Ehr 521/747 PCR -prod.	RsaI	Buffer C (RsaI)	37°C i 60 min

Etter kuttingen ble alle prøvene amplifisert med Ehr 521/747 og analysert på 2% agarosegel. Kombinasjon RsaI+BsII gav en reduksjon i dannelsen av 247 bp-fragment. BsII alene hindret ikke dannelse av religering av 247 bp-fragmenter, noe som heller ikke kan forventes siden BsII ikke har noe kuttsette for 247 bp-fragmenter. RsaI alene eliminerte ikke religering av 247 bp-fragmenter.

Etter amplifisering ble alle PCR-produktene kuttet med RsaI. Dette resulterte i en stor reduksjon i bakgrunnstøy i området 290-350 bp. I ligert / kuttet A1 (RsaI+BsII) kom et separert 314 bp-fragment tydelig til syne. Dette behandlede produktet ble fortynnet og

amplifisert på nytt. Den  $10^2$  fortynningen som gav best forhold mellom 314 bp-fragment og bakgrunnstøy, ble kjørt på 8% polyakrylamidgel og 314 bp-fragment ble isolert.

Fordi elueringen gav en DNA-konsentrasjon under deteksjonsgrensen for UV-absorbasjonsmåling ved 260 nm, ble det eluerte produktet amplifisert med Ehr 521/747. Amplifiseringsproduktet ble isolert fra en 8% polyakrylamidgel og eluert ved fryseeluering. Eluatet hadde etter denne behandlingen et DNA innhold med målbar konsentrasjon.

Eluatet ble seriefortynnet til konsentrasjoner fra  $10^6/10\mu\text{l}$  molekyler til  $10^{-1}/10\mu\text{l}$  molekyler, og evaluert som internkontroll (IK) i kombinasjon med *Anaplasma phagocytophilum* positivkontroll. Det ble funnet at en IK-konsentrasjon på 100 molekyler/ $10\mu\text{l}$  oppsett gav stabile signaler uten å utkonkurrere dannelsen av 247 bp- amplikon.

Etter uttesting av optimal IK-konsentrasjon ble internkontrollen oppbevart ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

Internkontrollen ble tilsatt mastermixen før mixen ble fordelt ut i reaksjonsrørene og DNA-templat tilsatt.

### 4.3 Analyseresultater av innsamlede flått

Som kriterier for godkjennelse og forkastelse av resultater ble internkontrollen (IK) til *Ehrlichia/ Anaplasma* brukt som et mål på prøve kvalitet, både for analyse av *Ehrlichia/ Anaplasma*, *B. Burgdorferi s.l.* og *Babesia*. Prøver som var negative og ikke amplifiserte internkontrollen (IK) ble tolket som hemmende og ekskludert fra undersøkelsen. Prøver som var positive for 247 bp-båndet til *Ehrlichia/ Anaplasma* ble inkludert i undersøkelsen uansett internkontroll-resultat, da sterke 247 bp signaler utkonkurrerer internkontrollen (IK).

I alt ble 472 flått analysert (Tabell 22), og av disse ble 33 prøver ekskludert fordi de ikke amplifiserte *Ehrlichia*-IK. Til sammen er derfor 439 flått inkludert i resultatene (Tabell 23). Prøvene som var negative på internkontrollen var også negative på samtlige andre undersøkelser. Resultatene fra Langøya 1999 [20] er fra en tidligere undersøkelse hvor det ikke er brukt IK. Resultatene fra Langøya 1999 ble inkludert i oppgaven for å kunne si noe om variasjon over tid på Langøya, Telemark.

**Tabell 22** Antall flått som ble analysert i undersøkelsen fordelt på funnsted og stadium

Total analyserte				
Sted/Stadium	Hann	Hunn	Nymfe	Totalt
Langøya 1999	25	25	50	100
Langøya 2000	25	25	50	100
Langøya 2001	25	24	48	97
Hordaland	22	25	0	47
Rogaland	4	1	24	29
Vest-Agder	26	26	47	99
<b>Totalt</b>	<b>127</b>	<b>126</b>	<b>219</b>	<b>472</b>

**Tabell 23** Antall flått som er inkludert i undersøkelsen fordelt på funnsted.

Inkludert i undersøkelsen				
Sted/Stadium	Hann	Hunn	Nymfe	Totalt
Langøya 1999	25	25	50	100
Langøya 2000	24	23	49	96
Langøya 2001	21	23	47	91
Hordaland	14	14	0	28
Rogaland	4	1	24	29
Vest-Agder	25	23	47	95
<b>Totalt</b>	<b>127</b>	<b>126</b>	<b>219</b>	<b>439</b>

Forekomst av smittebærende flått fordelt på stadium (Tabell 24) viste at av 439 analyserte flått, var 2 (0.45%) positive på *B. burgdorferi s.s.*, 7 (1.59%) var positive på *B. afzelii* og 5 (1.14%) var positive på *B. garinii*. *B. divergens* gr. ble påvist i 1 (0.23%) flått. Det ble funnet 78 (17.8%) positive flått for *Ehrlichia/ Anaplasma*. Totalt var 90 (20.5%) av flåttene positive for en av de tre patogenene. Det var ingen signifikant forskjell mellom hanner, hunner eller nymfer.

**Tabell 24** Antall smittebærende flått fordelt på stadium, oppgitt i on-tall og prosent.

Antall smittebærende flått fordelt på stadium						
Stadium/patogen	<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Babesia divergens</i> gr.	<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i>	Antall smittebærende
Hann N:113	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.76%)	1 (0.88%)	29 (25.7%)	30 (26.5%)
Hunn N:109	0 (0%)	4 (3.67%)	2 (1.83%)	0 (0%)	16 (14.7%)	22 (20.2%)
Nymfe N:217	2 (0.92%)	3 (1.38%)	1 (0.46%)	0 (0%)	33 (15.2%)	38 (17.5%)
<b>Totalt N:439</b>	<b>2 (0.45%)</b>	<b>7 (1.59%)</b>	<b>5 (1.14%)</b>	<b>1 (0.23%)</b>	<b>78 (17.8%)</b>	<b>90 (20.5%)</b>

Forekomst av smittebærende flått fordelt på fylker vist (Tabell 25) at av 248 flått var det bare flått fra Vest-Agder som var positiv på *B. burgdorferi s.s.* 1 (1.05%) og *B. garinii* 2 (2.1%). I de andre fylkene ble det ikke påvist flått som var positiv på *Borrelia*. Det ble ikke funnet *B. divergens* gr. i flått fra noen av fylkene i 2000. Det ble derimot påvist totalt 36 (14.5%)

positive flått for *Ehrlichia/ Anaplasma*, og i alle de 4 fylkene (Tabell 25). Det var ingen signifikant forskjell mellom fylkene.

**Tabell 25** Antall smittebærende flått fordelt på fylker i 2000, oppgitt i on-tall og prosent.

Antall smittebærende flått fordelt på fylker i 2000							
Stadium/patogen		<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Babesia divergens gr.</i>	<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i>	Antall smittebærende
Hordaland	N:28	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (32.1%)	9 (32.1%)
Rogaland	N:29	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (10.3%)	3 (10.3%)
Vest-Agder	N:95	1 (1.05%)	0 (0%)	2 (2.1%)	0 (0%)	8 (8.4%)	10 (10.5%)
Langøya	N:96	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (16.7%)	16 (16.7%)
<b>Totalt</b>	<b>N:248</b>	<b>2 (0.45%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>2 (0.80%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>36 (14.5%)</b>	<b>39 (15.7%)</b>

Forekomst av smittebærende flått fordelt på august 1999, august 2000, august 2001 på Langøya viste betydelige variasjoner (Tabell 26). Av 278 flått var 9 flått positive på *Borrelia* i 1999, fordelt på 1(1%) *B. burgdorferi s.s.*, 7 (7.0%) *B. afzelii* og 1(1%) *B. garinii*. Det ble derimot ikke påvist *Borrelia* i 2000, mens 2 (2.2%) flått var positive for *B. garinii* i 2001. En (1.0%) flått ble funnet positiv for *B. divergens gr.* i 1999, mens det i de andre årene ikke ble påvist *B. divergens gr.* Totalt 58 (20.2%) flått ble funnet positive for *Ehrlichia/ Anaplasma*. Det viste seg å være en signifikant stigende trend i perioden 1999-2001 for antall *Ehrlichia/ Anaplasma* positive flått.

**Tabell 26** Antall smittebærende flått på Langøya, august 1999, august 2000 og august 2001, oppgitt i on-tall og prosent.

Antall smittebærende flått på Langøya							
Stadium/patogen		<i>Borrelia burgdorferi s.s.</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Babesia divergens gr.</i>	<i>Ehrlichia/ Anaplasma</i>	Antall smittebærende
Langøya 1999	N:100	1 (1%)	7 (7.0%)	1 (1%)	1 (1%)	9 (9%)	18 (18%)
Langøya 2000	N:96	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (16.7%)	16 (16.7%)
Langøya 2001	N:91	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.2%)	0 (0%)	33 (36.3%)	34 (37.4%)
<b>Totalt</b>	<b>N:287</b>	<b>1 (0.35%)</b>	<b>7 (2.4%)</b>	<b>2 (0.80%)</b>	<b>1 (0,35%)</b>	<b>58(20.2%)</b>	<b>70 (24.4%)</b>

Forekomst av smittede flått med dobbelinfeksjon var liten (Tabell 27). Totalt 3 (0.86%) flått var bærer av to patogener. To (0.46%) hadde kombinasjon *Borrelia burgdorferi s.l.* og *Ehrlichia/ Anaplasma*, mens 1 (0.23%) var bærere av flere *Borrelia* arter.

**Tabell 27** Antall flått som var positive på flere patogener samtidig, oppgitt i on-tall og prosent.

Antall smittebærende flått fordelt på stadium						
Stadium/patogen		<i>B. burgdorferi</i> + <i>Ehr./Anaplasma</i>	<i>B. burgdorferi</i> + <i>Babesia div.gr</i>	<i>Ehr./Anaplasma</i> + <i>Babesia div.gr</i>	Flere arter av <i>B. burgdorferi</i>	Antall smittebærende
Hordaland	N:28	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Rogaland	N:29	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Vest-Agder	N:95	1 (1.05%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.05%)
Langøya 1999	N:96	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	1 (1%)
Langøya 2000	N:91	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Langøya 2001	N:100	1 (1.09%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	1 (1.09%)
<b>Totalt</b>	<b>N:439</b>	<b>2 (0.46%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>1 (0,23%)</b>	<b>3 (0.86%)</b>

#### 4.4 Analytisk følsomhet for *Borrelia* PCR

*Borrelia* multiplex PCR hadde en cut-off på  $3.83 \times 10^2$  molekylar for *B. burgdorferi s.s.*,  $6 \times 10^1$  molekylar for *B. garinii* og  $1.1 \times 10^3$  molekylar for *B. afzelii*.

PCR-produkt ble brukt som følsomhetskontroll.

#### 4.5 Analyse-erfaringer ved bruk av *Ehrlichia*-internkontroll

Følgende observasjoner ble gjort ved analysing av *Ehrlichia/ Anaplasma* med *Ehrlichia*-internkontroll ; Ved sterke positive *Ehrlichia/ Anaplasma*-prøver ble internkontrollen utkonkurrert, og kun det 247 bp-båndet var synlig. Ved middels til svake positive *Ehrlichia/ Anaplasma* prøver var både 247 bp-båndet og 314 bp IK-båndet synlig. I prøver negative for det 247 bp-båndet, var 314 bp IK-båndet synlig, men signalstyrken var varierende. Prøver hvor verken det 247 bp-båndet eller 314 bp IK-båndet ble amplifisert, ble dette tolket som inhibitoriske. Amplifisering av ren internkontroll gav sterkere signal, enn prøver med DNA-templat og internkontrollen. Det ble også observert at svake signaler i positivkontroll korrelerte med svake signaler for internkontrollen.

#### 4.6 Analyse-erfaringer ved bruk av Real Time PCR

Ved analysering av *Babesia* ble følgende observasjoner gjort: Av de analyserte prøvene viste 48 stykker ved førstegangskjøring å være svake positive, med en Ct: 35-39 og en kvantitet:  $6.65e-001 - 213.82$ . Av disse ble 18 stykker med kvantitet  $> 50$  analysert på nytt i duplikat for å kontrollere reproduserbarheten. Resultatene (Tabell 28) viser at signaler under 500 kopier ikke er reproduserbare, og defineres som negative resultater.

Det ble påvist en positiv *Babesia* prøve med en Ct: 25.56 og kvantitet: 124503.96 ved første kjøring, ved annen kjøring var Ct: 25.28 og kvantitet: 249154.52 ( Tabell 28). Ved fortykning 1:10 var Ct: 29.25 og kvantitet: 13188.87. Ved gjennomgang av de negative prøvene (kun reaksjonsmix) hadde disse Ct: 35-39 og kvantitet: 4.46 –136.03.

**Tabell 28** Viser en oversikt over prøver med kvantitet  $>50$  etter første gangsanalyse for *Babesia*, samt resultatet etter omkjøring av disse prøvene i duplikat. Va = Vest-Agder, Ro = Rogaland og T-0801-N18 = Telemark, Langøya. Ct = PCR-syklus hvor amplifikasjonskurven krysser en terskelverdi

Prøver med kvantitet $\geq 50$	Kjøring nr 1		Kjøring nr 2				Resultat
	Ct	Kvantitet	A		B		
Prøve nr.	Ct	Kvantitet	Ct	Kvantitet	Ct	Kvantitet	
Va 1	39.0	51.86	0	0	36.1	28.66	Negativ
Va 8	38.6	66.19	0	0	37.4	11.72	Negativ
Va 28	38.5	67.70	0	0	37.8	9.27	Negativ
Va 37	38.5	67.89	0	0	37.7	9.81	Negativ
Va 73	38.1	55.72	35.6	41.80	36.6	21.09	Negativ
Va 77	38.2	52.67	0	0	0	0	Negativ
Va 79	38.0	58.63	0	0	0	0	Negativ
Va 88	37.4	84.96	37.1	14.67	37.5	11.30	Negativ
Va 95	38.3	52.15	0	0	0	0	Negativ
Va 100	37.9	60.47	37.1	14.84	35.9	31.52	Negativ
Ro 1	39.9	80.19	37.1	15.17	0	0	Negativ
Ro 4	38.4	213.82	0	0	39.2	8.52	Negativ
Ro 16	39.5	109.53	38.9	9.91	0	0	Negativ
T-0801-N18	39.9	121.86	38.5	5.69	39.0	4.12	Negativ
T-0801-N29	39.6	146.72	0	0	39.3	3.37	Negativ
T-0801-N47	39.2	175.74	0	0	0	0	Negativ
T-LX-645	35.9	42.94	0	0	0	0	Negativ
T-L-308	26.8	20215.63	0	0	39.1	9.03	Negativ
T-L4-139	25.6	124503.96	25.3	249154.52	29.3	13188.87*	Positiv

\* 1:10-fortynning

## 5 Diskusjon

### 5.1 PCR-metoder for påvisning av *Babesia*

Ved etablering av konvensjonell PCR-analyse for *Babesia spp.* ble primerne PiroA og PiroB benyttet [4]. Resultater etter uttesting og optimalisering etter vanlige optimaliseringsprinsipper [27] viste at primerne ikke egnet seg til dette prosjektet. Dette kom til uttrykk ved ustabil følsomhet og dårlig reproduserbarhet. I en undersøkelse utført i Maine, USA ble de samme primerne PiroA og PiroB benyttet for detektering av DNA-templat fra spyttkjertlene til flåttan *Ixodes dammini* for å påvise *Babesia spp.*, og hvor primerne fungerte etter sin hensikt [4]. Det kan tenkes at materialet fra den amerikanske undersøkelsen inneholdt mindre forstyrrende DNA enn i denne undersøkelsen. I tillegg kan den aseksuelle reproduksjon av *Babesia spp.* i spyttkjertlene ha gitt høyere konsentrasjoner av *Babesia*-DNA [19].

Ved etablering av Real Time PCR-analyse ble det konstruert probe, primere, positivkontroller og internkontroll. Det viste seg ved søk i ulik litteratur at de ulike *Babesia* -artene er morfologisk og molekylærbiologisk ulike. Dette gjorde det nødvendig å konstruere separate primere og prober til *Babesia divergens* og *Babesia microti*. Uttesting og optimalisering etter leverandørens anbefalinger av probe og primere gav en fungerende analyse for *B. divergens*. Av ukjente årsaker lyktes det ikke å etablere en fungerende analyse for *B. microti*. Ulike testinger ble gjennomført, og sekvenser for primere, probe og positivkontroll ble kontrollert og funnet korrekt. En mulig årsak kan være mislykket primersyntese. Dette arbeidet er så vidt det vites det første forsøket på spesifikt å påvise små og store *Babesia* ved hjelp av Real Time PCR.

### 5.2 Sammenligning av konvensjonell PCR og Real Time PCR.

Erfaringer fra denne undersøkelsen var at framgangs- og oppsettsmetode av analysematerialet er likt for begge analysene, både når det gjelder arbeidsmengde og tid. Real Time PCR har en mindre arbeids- og tidskrevende analysedel. Ved Real Time PCR er resultatene ferdig til analyse direkte etter endt PCR-kjøring i form av visuelle kurver og tallverdier. I og med at dette skjer automatisk, er det liten mulighet for at feil/uhell oppstår ved menneskelig svikt. Optimal bruk av analyseprogrammet er imidlertid en utfordring, særlig med henhold til



plassering av terskelverdier. Konvensjonell PCR har en mer arbeids- og tidskrevende analysedel, med gelelektroforese, farging og fotografering. I tillegg er denne analysedelen mer utsatt for feil/uhell ved f.eks. dårlig gelkvalitet. Ved effektiv bruk av Real Time PCR kan et høyere antall prøver analyseres i løpet av en dag, anslagsvis mellom 200-300 prøver pr. dag mot ca 80-90 prøver ved konvensjonell metode. Valget mellom bruk av Real Time PCR og konvensjonell PCR er også et spørsmål om økonomi. Real Time PCR er pr.d.d. dyrere både i innkjøp og drift enn en konvensjonell PCR.

### 5.3 Internkontroll til *Ehrlichia*-PCR

I dette studiet ble primerne Ehr 521/747 benyttet til påvisning av *Ehrlichia/ Anaplasma*. Denne analysen har vist ustabil følsomhet fra kjøring til kjøring. Ved å konstruere en internkontroll (IK) var hensikten å stille inn en minimumsfølsomhet og kontrollere variasjoner i følsomheten, og ha en mulighet til å skille ut falske negative resultater pga. hemmende prøver. Strategien for konstruksjon av internkontrollen var at den skulle amplifiseres med primerne Ehr 521/747, og at den skulle kunne skilles fra positive *Ehrlichia/ Anaplasma* resultater. Dette ble gjort ved å erstatte et fragment fra Ehr 521/747 amplicon med et større fragment.

Konstruksjon av internkontroll viste seg å være en tids- og arbeidskrevende prosess, delvis fordi DNA som ble brukt i flere forsøk var inhibitorisk for liggeringsreaksjon. Det lyktes tilslutt å konstruere en internkontroll til bruk i analyse av *Ehrlichia/ Anaplasma*. Erfaringer basert på konstruksjon og bruk av internkontroll, er at den fungerer etter sin hensikt.

Internkontrollen fungerte som et nyttig verktøy for å skille ut hemmende prøver fra negative prøver. 33 prøver ble ekskludert fra undersøkelsen fordi internkontrollen ikke ble amplifisert, dette utgjorde 7 % av prøvematerialet.

### 5.4 Analyseresultater av innsamlede flått

I denne undersøkelsen ble forekomst av *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Ehrlichia/ Anaplasma* og *Babesia* i flått innsamlet i 2000 fra 4 fylker (Telemark, Vest-Agder, Rogaland og Hordaland) undersøkt. Samtidig er årlig variasjon i forekomst sensommer (juli/august) fra 1999 til 2001 i Telemark på Langøya blitt undersøkt spesielt.

I august 2000 var forekomst av *B. burgdorferi s.l.* totalt i de 4 fylkene 1.2%, med en fordeling på 0.45% *B. burgdorferi s.s.*, 0% *B. afzelii* og 0.80% *B. garinii*. Det ble ikke påvist

dobbelinfeksjon av flere *Borrelia* -arter. Lignende studier har blitt gjennomført i Finland [25], Estland [25], Polen [36] og Norge [21]. Rapportert forekomst av *Borrelia burgdorferi s.l.* varierte fra 0% til 12% mellom ulike lokaliteter i Finland [25]. I Estland var 15% av de undersøkte flåttene positive for *B. burgdorferi s.l.* [25]. I begge landene var *B. afzelii* den dominerende arten, med 2.6% i Finland og 12% i Estland [25]. En tilsvarende undersøkelse i Polen viste en variasjon på 2.8% -17% av *B. burgdorferi s.l.* i de undersøkte lokalitetene. I en tidligere norsk undersøkelse var forekomst av *Borrelia*-infisert flått for to undersøkte områder i Telemark henholdsvis 16% og 17 %, med *B. afzelii* som dominerende art [21]. Forekomst av *B. burgdorferi s.l.* i denne undersøkelsen ligger vesentlig lavere enn i tilsvarende undersøkelser andre steder i Nord-Europa. I foreliggende undersøkelsen var det ingen forskjeller i infeksjonsraten mellom stadiene for *B. burgdorferi s.l.* En undersøkelse i Finland viste en infeksjonsrate for *B. burgdorferi s.l.* på 9% for nymfer og 4% for voksne [25]. En tidligere undersøkelse i Telemark viste signifikant forskjell mellom hunner (25%), hanner (7%) og nymfer (15%) for forekomst av *B. burgdorferi s.l.* [21]. Dette studiet viser imidlertid en meget lav forekomst av *B. burgdorferi s.l.* uten påviselig variasjon med henhold til stadium og lokasjon. Sammenligninger av relative prevalenser for geografisk fordeling, stadier og årsvarisjon med andre studier er imidlertid utelukket på grunn av det begrensede tallmaterialet.

Påvisning av *Babeisia* ved en genetisk metode; Real Time PCR er utprøvd for første gang, og det ble påvist *Babesia divergens* i en flått fra Telemark. Dette bekrefter at *B. divergens* er tilstede, og den kan derfor ikke utelukkes som patogen for human sykdom i Norge. En upublisert undersøkelse fra a.s. Telelab bygger oppunder dette; undersøkelsen viser en forekomst på 1.5% *B. divergens* i flått fra Langøya, Telemark i perioden mai 1999 til mai 2003 [Jenkins pers. med]. Det ble ikke foretatt videre artsbestemmelse for å fastslå hvilken av de 4 artene i *B. divergens* gruppen (*B. divergens*, *B. odocoilei*, *B. bigemina* og *B. canis*) som var tilstede. Ellers i Europa er *B. divergens* kjent som human patogen og ca 30 tilfeller er beskrevet i løpet av de siste 40 årene [17, 42,49]. Det er derimot ikke beskrevet human babesiose i Norge [48]. Grunnet tekniske problemer av ukjent årsak ved påvisning av *B. microti* lykkes det ikke å gi noe tall på forekomst av *B. microti* i flått i Sør-Norge. En polsk undersøkelse viste en forekomst på 6.2% *B. microti* i flått [36]. *B. microti* er kjent som human patogen i USA, mens det er ikke påvist humane tilfeller med *B. microti* i Europa [17, 42]. Fremtidig forskning vil trolig gi nærmere svar på *B. microti* sin rolle som human patogen i Europa .

Forekomst av *Ehrlichia/ Anaplasma* i de 4 fylkene var gjennomsnittlig 14.5%, med en variasjon på 8.4% -32.1%. En tidligere norsk undersøkelse viste en forekomst av *Ehrlichia/ Anaplasma* på 10.9% [21], med artsfordring; *Ehrlichia*-like-organismer (ELO) 60.6%, *Anaplasma phagocytophilum* 21.2%, og andre, ikke artsbestemte arter 19.2% [21]. I denne undersøkelsen ble det ikke foretatt noe videre artsbestemmelse. I en finsk-estisk undersøkelse ble det ikke påvist *A. phagocytophilum* i Finland, mens den i Estland ble påvist i 3% av de undersøkte flåttene [25]. En undersøkelse fra Sveits viste en forekomst på 1.3% av *A. phagocytophilum*, med en variasjon på 1.4% -2.1% [31]. En annen sveitisk undersøkelse viste en forekomst på 0.8% *A. phagocytophilum* [30]. Undersøkelser på flåttene *Ixodes scapularis*, også vektor for *B. burgdorferi s.l.*, i USA viste en forekomst av HGE-agens med en variasjon på 1.5%-1.8% hos nymfer, og 7.6%-19% hos voksne flått [24]. I denne undersøkelsen var forekomsten av *Ehrlichia/ Anaplasma* hos nymfer på 15.2%, mens forekomsten for voksne flått var på 20.3%. En sveitsisk undersøkelse viste at 0.5% av nymfene var positive for *A. phagocytophilum*, og 1.6% av voksne flått [31]. Det er imidlertid vanskelig å vurdere hvor vidt disse forskjellene skyldes reelle geografiske- og biologiske forskjeller, fordi metodene bl.a kan ha ulik spesifisitet. Og med unntak av dette studiet er det ikke i noen av de andre studiene brukt internkontroll for å kontrollere metodenes sensitivitet i analyse av *Ehrlichia/ Anaplasma*.

På Langøya i perioden august 1999 til august 2001, ble det observert en signifikant økende trend i andel flått som var positive for *Ehrlichia/ Anaplasma*, med 9% i august 1999, 16.7% i august 2000 og 36.3% i august 2001. Upubliserte data fra Langøya i perioden mai 1999 til mai 2003 viste derimot en varierende forekomst av andel flått positive for *Ehrlichia/ Anaplasma* uten noen trend [Jenkins pers. med]. I Norge er det beskrevet to tilfeller av Human anaplasmose hos mennesker [23]. Stuen [39] har også påvist antistoffer til *A. phagocytophilum* hos sau, elg, rådyr og hjort [39]. Undersøkelser gjort av Bakken [5,23] viste at 10.2% av pasienter med borreliose hadde antistoffer mot *A. phagocytophilum* [5,23]. Dette viser at ehrlichiose/ anaplasmose er en sykdom som helsepersonell bør være på vakt for ved influensaliknede symptomer, historie om flåttbitt og/ eller opphold i områder med mye flått.

Det ble påvist 2 (0.46%) flått med dobbelinfeksjon av *Borrelia burgdorferi s.l.* og *Ehrlichia/ Anaplasma*, forventet 0.57% beregnet fra forekomst av *B. burgdorferi s.l.* på 3.2% og

*Ehrlichia/ Anaplasma* på 17.8%. I en finsk-estisk undersøkelse ble det påvist 0% dobbelinfeksjon, mot forventet 0% i Finland og 0.45% i Estland [25]. En tidligere norsk undersøkelse viste 3.7% dobbelinfeksjon mellom *B. burgdorferi s.l.* og *Ehrlichia/ Anaplasma*, mot forventet 1.84% [21]. Ulike studier har vist at dobbelinfeksjon mellom *Ehrlichia/ Anaplasma* og *B. burgdorferi s.l.* varierer fra 1% til 32% i flått samlet inn i Baltikum, Bulgaria, Tyskland, Holland, Italia, Norge og Sveits [5]. Hos pasienter med Lyme borreliose ble det funnet 5.2% dobbelinfeksjon med *A. phagocytophilum* i en undersøkelse foretatt i Wisconsin og Minnesota [26]. Ved diagnostisering av pasienter med Lyme borreliose eller ehrlichiose er det viktig å være observant på dobbelinfeksjon. De første symptomene på begge sykdommene har mange fellestrekk, de kan lett forveksles og den ene kan skjule den andre.

I denne undersøkelsen var det ikke en signifikant forskjell mellom de ulike stadiene som smittebærere for *Ehrlichia/ Anaplasma*. Forekomsten av antall smittede hanner (25,7%) med *Ehrlichia/ Anaplasma* var høyere enn hunner (14,7%) og nymfer (15,2%). Disse resultatene viser det motsatte av en undersøkelse gjort i Telemark, Langøya i 1999 [21] hvor det var positive hunner (13%) og nymfer (13%) som dominerte, mens hanner (3%) hadde en mye lavere forekomst [21].

Dette studiet viser en generell lav forekomst av smittestoffer *B. burgdorferi s.l.* og *Babesia*, mens fordelingen av *Ehrlichia/ Anaplasma* er betydelig høyere. Det ble i 2002 rapportert om 109 tilfeller av Lyme borreliose i Norge [49]. Fordi *Erythema migrans* (EM) ikke er inkludert, er antall *Borrelia*-smittede høyere. Tall fra 1993 til MSIS viste en prosentandel på 59% for *Erythema migrans* av totalt 430 meldte tilfeller av Lyme borreliose [18]. Ut fra data fra denne undersøkelsen kunne man forventet en betydelig høyere insidens av Human anaplasmose. Human anaplasmose er ikke en meldingspliktig sykdom [49], og er antakelig underdiagnostisert. I tillegg er det ikke sikkert at alle *Ehrlichia/ Anaplasma* påviste i denne studien er human patogene, da det ikke ble foretatt noen videre artsbestemmelse. En tidligere norsk undersøkelse [21] viste en artsfordeling på 60.6% *Ehrlichia*-like organismer (ELO), som ikke er kjent som patogen, 21.1% *A. phagocytophilum* og 19.2% andre, ikke bestemte arter. Vist denne prosentfordeling kan overføres til denne undersøkelsen senkes antallet av human patogene *Ehrlichia/ Anaplasma*. Denne undersøkelsen tyder på generell lav risiko for *Borrelia burgdorferi s.l.* og *Babesia* sykdom etter flåttbitt i Sør-Norge. Situasjon for *Ehrlichia/ Anaplasma* er noe mer usikker på grunn av usikkerheter om hvor utbredt Human anaplasmose er i Norge.

## 6 Referanser

1. Allsopp, B.A., Allsopp M.T., Du Plessis J.H. and Visser E.S. 1996. Uncharacterized *Ehrlichia* spp. may contribute to clinical heartwater. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **791**: 17-23.
2. Allsopp, M.T.E.P., Visser E.S., du Plessis J.L., Vogel S.W. and Allsopp B.A. 1997. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Veterinary Parasitology*. **71**: 283-300.
3. Applied Biosystems 2003. User Guide ABI PRISM ® 7000 Sequence Detection System.
4. Armstrong, P.M., Katavolos, P., Caporale, D.A., Smith, R.P., Speilman, A. and Telford III, S.R. 1998. Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes Dammini*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **58**: 739-742.
5. Bakken, J.S. 2003. Human anaplasmosis (human granulocytotropic ehrlichiosis). Doktorgradsavhandling. *Universitetet i Tromsø*.
6. Bjöersdorff, A., Berglund, J., Kristiansen, B.E. and Eliasson, I. 1999. Human granulocytär ehrlichios; Tolv skandinaviska fall hos människa redovisas. *Svensk Veterinärtidning*. **51**: 29-34.
7. Broqui, P. 1999. Ehrlichiosis in Europe. In Raoult, D. And Broqui, P. (eds), Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millenium. *Elsevire, Paris*. 220-232.
8. Burgdorfer, W. 1991. Lyme Borreliosis: Ten years after discovery of the etiologic agent, *Borrelia burgdorferi*. *Infection*. **19**: 257-262.
9. Demarschalk, I., ben Messaud, A., de Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigagionon, G., Bollen, A., and Godfroid, E. 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**: 602-608.
10. Dumler, J.S., Barbet A.F., Bekker C. P.J., Dasch, G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa, Y. and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 2145-2165.
11. Dumler, J.S. and Walker, D.H. 2001. Tick-borne ehrlichioses. *The Lancet Infectious Diseases*. 21-28.
12. Drancourt, M. and Raoult, D. 1994. Taxonomic position of the *Rickettsiae*: Current knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*. **13**: 13-24.
13. Farell, G.M., and Marth, E.H. 1991. *Borrelia burgdorferi*: another cause of foodborne illness? *International Journal of Food Microbiology*. **14**: 247-260.
14. Gjerde, B. 2001. Skogflåtten, *Ixodes ricinus*. *Norsk Veterinærtidsskrift*. **113**: 279-283.
15. Goodard, J. 2000. Infectious diseases and arthropods. Humana Press. Totawa, NJ. 77-105.
16. Gray, J.S. 2003 .The biology of *Ixodes ticks*, with special reference to *Ixodes ricinus*. [www.rczee.org/szee/crtbi/proc/grey.htm](http://www.rczee.org/szee/crtbi/proc/grey.htm). 20.05.03
17. Gray, J., von Stedingk, L.V., Granstrøm, G. 2002. Zoonotic babesiosis. *International Journal of Medical Microbiology*. **291**, suppl. 33: 108-111.
18. Hasseltvedt, V. 1994. Lyme Borreliose 1993. MSIS-rapport. **13**

19. Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S.R., Krause, P.J. and Persing, D.H. 2000. *Babesiosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. **13**: 451-469.
20. Jaenson, T.G.T., Talleklint, L. and Mejlon, H. 1994. Sjukdomsöverförande fästingar i Sverige. *Svensk Veterinärtidning*. **46**: 343-349.
21. Jenkins, A., Kristiansen B.E., Allum, A.G., Aakre R.K., Strand, L., Klevland, E.J., Van de Pol, I. and Schouls, L. 2001. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* Ticks from Southern Norway. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**: 3666-3671.
22. Kjemtrup, A.M. and Conrad, P.A. 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*. **30**: 1323-1337.
23. Kristiansen, B.E., Jenkins, A., Tveten, Y., Karsten, B. and Line, Ø. 2001. Human granulocytær ehrlichiose i Norge. *Tidsskrift for Den norske lægeforening*. **7**: 805-806.
24. Levin, M.L., des Vignes, F. and Fish, D. 1999. Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases*. **5**: 204-208
25. Makinen, J., Vuorinen, I., Oksi, J., Peltomaa, M., Marjamaki, M. and Viljanen, M.K. 2003. Prevalence of granulocytic *Ehrlichia* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected from Southwestern Finland and from Vormsi Island in Estonia. *AMPIS*. **111**: 355-362.
26. Mitchell, P.D., Reed, K.D. and Hofkes, J. 1996. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and Human Granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 724-727.
27. Newton, C.R and Graham, A. 1997. PCR. BIOS Scientific Publishers Limited.
28. Parola, P. and Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans, an emerging infectious threat. *Clinical infectious Diseases*. **5**: 204-208.
29. Pruthi R.K., Marshall, W.F, Wiltsie J.C. and Persing, D. 1995. Human Babesiosis. *Mayo Clinical Proceedings*. **70**: 853-862.
30. Pusterla, N., Hunder, J. B., Lutz, H., and Braun, U. 1998. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 2735-2736.
31. Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Hunder, J.B., Weber, R., Braun, U. and Lutz, H. 1999. Evidence of the Human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 1332-1334.
32. Rolfs, A., Shuller, I., Finckh, U. and Weber-Rolfs, I. 1992. PCR: Clinical diagnostics and research. *Springer-Verlag, London*. 112-131.
33. Sauer, J.R., McSwain J.L., Bowman, A.S. and Essenberg R.C. 1995. Tick salivary gland physiology. *Annual reviews of entomology*. **40**: 245-67.
34. Scholtens, R.G., Braff, E.H., Healy, G. and Gleason, N. 1968. A case of babesiosis in man in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **17**: 810-813
35. Seinost, G., Dykhuizen D.E., Dattwyler R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I., Wormser, G.P., Shriefer, M.E. and Luft, B.J. 1999. Four clones of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* cause invasive infections in humans. *Infection and immunity, American Society of Microbiology*. **67**: 3518-3524.
36. Skotarczak B., Wodecka, B. and Cichocka, A. 2002. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north- western Poland. *Ann agric Environ Med*. **9**: 25-28.

37. Škrabalo, Z. and Deanovic, Z. 1957. Piroplasmosis in man. *Documenta de medicina geographica et tropica*. **9**: 11-16.
38. Sonenshine, D.E. and Mather, T.N (eds). 1994. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. *Oxford University Press, Oxford*. 20-44.
39. Stuen, S. 2003. *Anaplasma phagocytophilum* (formely *Ehrlichia phagocytophila*) infection in sheep and wild ruminants in Norway. Doktorgradsavhandling. Norges Veterinærhøgskole.
40. Stuen, S. 1998. Sjudogg (tick-borne fever) et historisk tilbakeblikk. *Norsk Veterinærtidsskrift*. **110**: 703-706.
41. Szczepanski, A. and Benach, J. 1991. Lyme Borreliosis: Host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Microbiological Reviews*. **55**: 1: 21-34.
42. Terapianbefaling: Behandling og profylakse av flåttbårne sykdommer. 1999. Nytt om legemidler. **22**: 4-45.
43. Thomford, J.W., Conrad, P.A, Telford III, S.R., Mathiesen, D., Bowman, B.H., Spielman, A., Eberhard, M.L., Herwaldt, B.L., Quick, R.E. and Persing, D.H. 1994. Cultivation and phylogenetic characterization of a newly recognized human pathogenic protozoan. *Journal of Clinical Microbiology*. **169**: 1050-1506.
44. Uhnoo, I., Cars, O., Christensson, D. and Nyström-Rosander, C. 1992. First documented case of Human Babesiosis in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **24**: 541-547.
45. Uilenberg, G. Progress and priorities in research on heartwater. 1996. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **791**: 1-16.
46. Vredevoe, L. 2001. Background information on the biology of ticks. [www.entomology.ucdavis.edu/faculty/rbkimsey/tickbio.html](http://www.entomology.ucdavis.edu/faculty/rbkimsey/tickbio.html).
47. Weisburg, W.G., Dobson M.E., Samuel J.E., Dasch, G.A., Mallavia L.P., Baca, O., Mandelco L., Sechrest J.E., Weiss, E. and Woese C.R. 1989. Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *Journal of Bacteriology*. **171**: 4202-4206.
48. [www.dpd.cdc.gov/dpdx/](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/) 20.03.2003
49. [www.fhi.no](http://www.fhi.no) 19.03.03
50. [www.infektionsbiologie.ch/parasitologie](http://www.infektionsbiologie.ch/parasitologie) Mars 2003
51. [www.members.ozemail.com.au/](http://www.members.ozemail.com.au/) 18.09.2003
52. Åkerstedt, J., Blakstad, E. and Artursson, K. 1996. Seroprevalens av *Borrelia burgdorferi sensu lato* og *Ehrlichia sp.* hos hund fra et kystområde i Aust-Agder. *Norsk Veterinærtidsskrift*. **108**: 8-9.

## Appendix

Materiale/løsninger	Spesifikasjon	Leverandør
Agarose	Agarose LE, Analytic Grade MetaPhor®Agarose	Promega, Madison, USA BMA, Rockland; ME, USA
Ligase	LigaFast™ Rapid DNA Ligation System T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA Promega, Madison, USA
Markør	ΦX 174 DNA/Hae III Markers	Promega, Madison, USA
Farge	SYBR®Gold	Promega, Madison, USA
Restriksjonsenzym		
	HpyCH4V SspI BsiI RsaI	New England BioLabs, Beverly, USA Promega, Madison, USA New England BioLabs, Beverly, USA Promega, Madison, USA
Kit	QIAquick PCR purification Kit QIAamp DNA Mini Kit Protocol DNA-dipstick	QIAGEN, www.qiagen.com QIAGEN, www.qiagen.com QIAGEN, www.qiagen.com
Div til PCR	10x PCR Gold Buffer  MgCl <sub>2</sub> dNTP dUTP  AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Promega, Madison, USA Promega, Madison, USA Applied Biosystems UK, Warrington,; Cheshire, UK
Primere	Ehr 521 Ehr 747 Piro A Piro B GI-L GI-R GII-L GII-R GIII-L GIII-R  BdiF BdiR  BmiF BmiR	MWG Biotech, AG MWG Biotech, AG MWG Biotech, AG MWG Biotech, AG  CyberGene AB, Huddinge, Sweden. CyberGene AB, Huddinge, Sweden CyberGene AB, Huddinge, Sweden CyberGene AB, Huddinge, Sweden CyberGene AB, Huddinge, Sweden CyberGene AB, Huddinge, Sweden Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
PCR-mixer	Taqman Universal PCR Master Mix (2x)  SYBR®Green reaksjon PCR Master Mix	Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
Annet	Sterilt vann Glyserol Acrylamid/ Bis Stockløsning 1% Ammonium persulfat TEMED	Fresenius Kabi, Halden, Norge Promega, Madison, USA Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA Promega, Madison, USA Promega, Madison, USA



Materiale/løsninger	Spesifikasjon	Leverandør
Positivekontroller	Bmik	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
	Bdik	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
	Bmic-ic	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
	Bdi-ic-real	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
Prober	BdiT	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
	BmiT	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
	BdIKT	Appleid Biosystems UK, Warrington, Cheshire, UK
Utstyr	Spektrofotometer	Unicam Helios $\alpha$
	Real Time PCR	ABI Prism 7000
	Konvensjonell PCR	Perkin Elmer 9600
	Elektroforeseutstyr	Hofer Sunmarine Unit MAX HE 99
	Elektroforeseutstyr	Hofer SE 600 series
	Transilluminator	2011 Macrovue Transilluminator
	Kamera	Polaroid MP Land Camera

Buffer	Spesifikasjon	Mengde
<i>10 xTE (pH 8.0)</i>		
	Tris Base	60.6g
	EDTA (di-Na-salt) 2H <sub>2</sub> O	18.6g
	dH <sub>2</sub> O	til 5l
	Konsentrert HCl	
<i>10 xTBE-buffer (0.9M Tris, 25 mM EDTA, 0.9 M Borsyre, pH 8.2)</i>		
	Tris (Tris(hydroxymethyl-aminomethan)	1090g
	Boric acid	560g
	EDTA (di-Na Salt)	93g
	dH <sub>2</sub> O	til 10l
<i>10x PAGE-buffer (0.6M Tris, 17mM EDTA, 0.6M Borsyre, pH 8.3)</i>		
	Tris (Tris(hydroxymethyl-aminomethan)	362g
	Boric acid	184g
	EDTA (di-Na Salt)	93g
	dH <sub>2</sub> O	til 10 l
<i>K-buffer</i>		
	10xPCR-buffer	100 $\mu$ l
	TWEEN 20	50 $\mu$ l
	Protinase K (20 $\mu$ / $\mu$ l)	5 $\mu$ l
	Steril dH <sub>2</sub> O	845 $\mu$ l

Gel	Spesifikasjon	Mengde
<i>3% Agarosegel</i>		
	Agarose LE, Analytical Grade	3 g
	TBE-buffer	100 ml
<i>2% Agarosegel</i>		
	Agarose LE, Analytical Grade	2 g
	TBE-buffer	100 ml
<i>Blandingsgel 1% agarosegel + 2% metafor gel</i>		
	Agarose LE, Analytical Grade	1 g
	TBE-buffer	100 ml
	MetaPhor R Agarose	2g
	TBE-buffer	100 ml
<i>8% Polyakrylamidgel</i>		
	Glycerol	15 ml
	Destilert vann	20 ml
	10 x PAGE-buffer	5 ml
	Arylamid/ Bis-stockløsning	10 ml
	Ammonium sulfat	300µl
	TEMED	30µl