

Kristine Jensen

Flåttmidler og flåttbårne patogener

En undersøkelse av flåttmiddelvirkning og flåttens eventuelle responsendring som følge av patogeninfisering.



Høgskolen i Sørøst-Norge
Fakultet for allmennvitenskapelige fag
Institutt for natur-, helse- og miljøvern
Halvard Eikas Plass
3800 Bø i Telemark

<http://www.usn.no>

© 2016 Kristine Jensen

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng.

Sammendrag

De siste årene har det vært økt fokus på flåttbårne sykdommer, og det er i folks interesse å vite hvordan man best kan beskytte seg mot overføring av patogener. I denne oppgaven ble det i September 2012 testet for 13 ulike flåttmidler. Et utvalg av flåttene ble senere analysert ved hjelp av real- time PCR-analyse for patogenene *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Neoehrlichia mikurensis* og *Anaplasma phagocytophilum*.

Uttestingen av flåttmidlene foregikk på øya Jomfruland i Telemark, Norge, og ble utført ved hjelp av flagging. Det ble brukt tre ulike doser; 0x- dose var et ubehandlet kontrollhåndkle, 1x- dose var et normalbehandlet håndkle med 13 påføringer av middelet og 10x- dose var 10 ganger så sterk som normaldosen. De innsamlede flåttene ble plukket av håndkledet og loggført.

Det ble samlet inn totalt 3131 flått, hvorav 495 av dem ble testet videre. Det var tre flåttmidler som ga forventede resultater etter feltarbeidet, Mygga Natural Spray, Etono Myggspray og Autan Protection Plus. De 495 flåttene ble valgt fra disse tre midlene, hvorav 165 flått på hvert middel. DNA ble ekstrahert fra flåttene ved hjelp av amoniakkmetoden.

Borrelia burgdorferi sensu lato hadde en prevalens på 12,63% og *Neoehrlichia mikurensis* 4,64%. *Anaplasma phagocytophilum* ble pooleet sammen fem flått per pool før analyse, og ga et prevalensresultat på 17,65%, basert på pool. Dette ble siden estimert til å være 3,2% på individnivå ved hjelp av en prevalenskalkulator. Alle prevalensverdiene som ble funnet, samstemte med tilgjengelig litteratur.

Jevnt over så man at flåttmidler fungerer, og at en høyere dose holder flere flått unna. 10x- dosen holder flest flått unna. Mygga Natural Spray, Etono Myggspray og Autan Protection Plus ga gode resultater i forhold til forventningene.

Imidlertid sees en høyere andel infiserte flått på 0x- og 1x- dosene, men grunnet skjevheter i antall flått som ble testet for hver dose blir det derfor ikke sikkert å si noe om en eventuell atferdsendring som følge av infisering.

Abstract

In recent years, there has been an increased focus on tick- borne diseases, and it is in people's interest to know how to protect themselves from tick pathogens.

In this thesis, 13 different tick- and insect repellents were tested in September 2012. A selection of the collected ticks was analyzed by real-time PCR assay for the pathogens *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*.

The repellents were tested at the island of Jomfruland in Telemark county, Norway, and the method of flagging was conducted to test the repellents. It was used three different doses; 0x- dose was an untreated control towel, 1x- dose was a normal treated towel with 13 applications of repellent and 10x- dose was 10 times as strong as normal dose. The ticks were picked off the towels and logged. A total of 3131 ticks were collected, of which 495 of them were further tested. Three repellents gave the expected results after the fieldwork, Mygga Natural Spray, Etono Myggspray and Autan Protection Plus. The 495 ticks were chosen from these three repellents, of which 165 ticks on each repellent. DNA from the ticks was extracted by using the ammonia method.

Borrelia burgdorferi sensu lato had a prevalence of 12,63% and *Neoehrlichia mikurensis* had 4,64%. *Anaplasma phagocytophilum* were pooled together (five ticks per pool) before analysis, and gave a prevalence result of 17,65%, based on the pools. This was re- estimated to 3,2% on individual level by using a prevalence calculator. All the prevalence results concurred with the available literature.

The final results show that, on average, tick repellents do work, and a higher dose will keep more ticks away. Mygga Natural Spray, Etono Myggspray and Autan Protection Plus gave good results.

However, a higher percentage of infected ticks were seen on 0x- and 1x- doses, but due to disparities in the number of ticks tested for each dose, it is therefore not likely to say anything about any behavioral change as a result of infection.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	4
Abstract	5
Innholdsfortegnelse	6
Forord	9
1 Innledning.....	11
1.1 Generelt om flått.....	11
1.2 Flåttbårne patogener.....	12
1.2.1 <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	12
1.2.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	13
1.2.3 <i>Neoehrlichia mikurensis</i>	13
1.3 Flåttmidler	14
1.4 Real- time PCR analyse; generell innføring.....	15
2 Metoder.....	19
2.1 Feltarbeid/ uttesting av flåttmidler	19
2.1.1 Valg av flåttmidler	19
2.1.2 Feltinnsamling av flått.....	20
2.1.3 Tidspunkt og værforhold for flagging.....	21
2.1.4 Valg av vegetasjonsområde	21
2.2 Laboratoriearbeid	25
2.2.1 Utvelgelse av flått for undersøkelse av patogener	25
2.2.2 Ekstraksjon av DNA fra flått ved bruk av ammoniakkmetoden.....	26
2.3 Real- time PCR- program, primersekvenser og reaksjonsblandinger for de ulike patogenene.....	27
2.3.1 <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> ; Real- time PCR	27
2.3.2 <i>Neoehrlichia mikurensis</i> ; Real- time PCR.....	30
2.3.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ; Real- time PCR	32
2.4 Syntetisk pooling	36
2.5 Dosenivå og patogeninfisering.....	37
2.6 Statistisk analyse	37
2.6.1 Valg av analysemetode	37
3 Resultater.....	41

3.1 Resultater; Feltinnsamling av flått	41
3.2 Resultater; Utvelgelse av flått for videre analyse av patogener	42
3.3 Resultater; Ekstraksjon av DNA fra flått ved hjelp av amoniakkmetoden	43
3.4 Resultater; Pooling og fortynning av pool.....	43
3.5 Resultater; Real- time PCR for påvisning av <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	43
3.6 Resultater; Real- time PCR for påvisning av <i>Neoehrlichia mikurensis</i>	45
3.7 Resultater; Real- time PCR for påvisning av <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	47
3.7.1 Resultater; Individuell prevalensestimering fra pool	48
3.8 Resultater; Dosenivå og patogeninfisering.....	49
3.8.1 Resultater; Prosent positive på ulike doser for enten <i>Borrelia spp.</i> og/ eller <i>Neoehrlichia mikurensis</i>	49
3.8.2 Resultater; Prosent positive på ulike doser for <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	50
3.9 Resultater; Syntetisk pooling	51
3.9.1 Positive resultater fra syntetisk pooling.....	51
3.10 Resultater; Statistiske analyser	52
3.10.1 Resultater; Flåttmiddel og dosenivå; kjikvadratsanalyse	52
3.10.2 Resultater; Dosenivå og patogeninfisering	53
4 Diskusjon	55
4.1 Flagging.....	55
4.2 Flåttmidler, resultater og virkestoffer	56
4.2.1 Resultater fra uttestingen.....	57
4.2.2 Virkestoffer.....	58
4.2.3 Feilkilder under feltøkt og uttesting av flåttmidler.....	60
4.3 Hvilken flåttmidler synes å virke og hvilken synes ikke å virke?.....	61
4.4 Påvisning av patogeninfisering.....	63
4.4.1 Prevalens av ulike patogener	63
4.4.2 Syntetisk pooling	64
4.4.3 Dobbeltinfisering.....	64
4.4.4 Patogeninfisering og dosebruk.....	65
5 Konklusjon	68
Referanser/litteraturliste	70
Oversikt over tabeller og figurer	73
Tabeller.....	73
Figurer	75
Vedlegg	76

Vedlegg 1: Flåttmidler med ingrediensliste	76
Vedlegg 2: 1-veis ANOVA av forskjell i dosenivå, flåttmiddel J2, Mygga Natural Spray	79
Vedlegg 3: 1-veis ANOVA av dosenivå, alle flåttmidler	83
Vedlegg 4: Kjikkvadratsanalyse av dosenivå og patogeninfisering.	86

Forord

Min vei til en ferdig masteroppgave har vært både lang og strevsom. Jeg begynte med et optimistisk sinn, og med tanke på at jeg ønsket en oppgave som inkluderte både feltarbeid og laboratoriearbeid, falt valget på flått etter en hyggelig konsultasjon med veileder Jenkins. Selve praksisbiten begynte allerede høsten 2012 på Jomfruland, men livet byr på mange vendinger i blant, og som et resultat ble oppgaveinnleveringen utsatt. Først nå, nesten 4 år senere, er oppgaven ferdig.

Mange har bidratt til oppgaven på ulike måter, blant annet Stine Gulliksen og Maria Søvde Lie som begge stilte opp som assistenter på Jomfruland. De utførte utsøkt flagging, og må i tillegg gis en stor takk for eksellent selskap på en ellers så ensom innsamlingstokt, hvor Jomfrulands kyr tidvis var de eneste levende vesenene jeg hadde rundt meg, med unntak av flått og andre av Jomfrulands beboere. Medstudent Cecilie Raasok fortjener også en takk for deling av real- time PCR- oppsett og program som hun optimaliserte i sin masteroppgave «*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Ixodes ricinus* i Norge», 2015. I tillegg finnes utallige venner, kollegaer og medstudenter som har vært der underveis og heiet på meg for å oppgaven ferdig, denne støtten og interessen har betydd veldig mye.

Flere har bidratt til artikler og andre nyttige informasjonskilder, blant dem Ingeborg Klepp ved Geanor, Åshild Andreassen ved Folkehelseinstituttet og Vivian Kjelland ved Sørlandet Sykehus.

En stor takk rettes også til familien min, som har støttet meg ukritisk og latt meg gjøre ting i mitt tempo, selv om jeg lot oppgaven trekke ut i en lengre periode enn hva som kanskje var forståelig.

Jeg vil også gjerne takke min kjæreste Runar, som kom inn i livet mitt da oppgaven begynte å nærme seg en slutt. Ikke en god slutt, men en oppgivelse. Han ga meg motivasjon, inspirasjon og trøst til å komme i mål, selv om det virket umulig og uoversiktlig. Sakte, men sikkert formet oppgaven seg ferdig med hjelp av hans vennlige dytt. Tusen takk!

Sist, men ikke minst, en stor takk rettes til min gode veileder Andrew, som har holdt ut med mine noe langtekkelige beslaglegninger på tiden hans. Aldri et

bryskt ord, og alltid en løsning på alt jeg hadde av spørsmål og problemer. En mann med tusen ideer som har stått trofast ved min side i hele denne perioden, og som har gitt meg både trøst og stadig påfyll av motivasjon når den begynte å ebbe ut. Tusen takk for alt du har lært meg.

Skien, Våren 2016

Kristine Jensen

1 Innledning

Flått; et ord som får flere til å utvise skepsis så fort det blir nevnt, da det i dagens samfunn stadig ropes varsku i media om den «farlige» flåtten. Den er kjent smittebærer av flere ulike patogener som kan gi sykdommer hos både mennesker og dyr, men i hvilken grad er den farlig, og hvordan kan man best beskytte seg mot den?

I denne oppgaven ble det på øya Jomfruland i Telemark tatt for seg uttesting av et utvalg flåttmidler som var å få på markedet i 2012 ved hjelp av metoden flagging. I tillegg ble et utvalg (495 flått) av de innsamlede flåttene undersøkt for prevalens av tre ulike patogener som er kjent for å utvikle sykdomstilstander hos mennesker; *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* og *Neoehrlichia mikurensis*. Det ble også undersøkt om det var noen sammenheng mellom patogeninfeksjon og en eventuell respons mot flåttmiddel.

1.1 Generelt om flått

På verdensbasis finnes det omtrent 900 flåttarter, hvorpå 13 av disse er registrert i Norge (Nilssen, 2010, Flåttsenteret, 2015). I denne oppgaven er det ikke artsbestemt hvilken flått som er samlet inn, men det er grunn til å tro at majoriteten av flåttene tilhører arten skogflått (*Ixodes ricinus*). Dette antas fordi den er svært vanlig i utbredelse i Norge (Kjelland, Korlund & Slettan, 2014), og støttes også av at det er dominans av skogflått på Jomfruland (Hasle, 2011), hvor flåttene ble samlet inn.

Flått er en fellesbetegnelse som brukes om en gruppe små parasittiske edderkoppdyr nær beslektet med midd. De livnærer seg ved å bite seg fast i huden og suge blod fra verter som mennesker, små og store pattedyr, krypdyr og fugler. Den trives best i områder med høy gressvegetasjon, gjerne i fuktige løvskoger, men kan også stedvis finnes i lyngområder og barskog. Den trives heller dårlig i sol- og vindutsatte områder, da den er sårbar for uttørking (Kjelland et al., 2014).

I Norge er flåtten vanligst på Sørlandet. Den finnes på begge sider av Oslofjorden, og det er spesielt i kystområdene fra sør og nordover til Helgeland at vi finner

flåtten. På Vestlandet og i Trøndelag følger den kyststripen og går innover i landet langs fjordene. Den er ujevnt fordelt i terrenget; noen steder kan det være store mengder flått mens det i andre nærliggende områder ikke er noen. De største forekomstene er helst i områder med gode bestander av hjortedyr og andre verter på foretrukne vegetasjonsområder, men fugler er også ansvarlige for å transportere flått til områder de normalt ikke oppholder seg. Her kan det oppstå bestander i begrensede perioder, som deretter forsvinner etter en stund om det ikke er gode livsvilkår der (Kjelland, Stuen, Skarpaas og Slettan, 2010, Flåttsenteret, 2015).

1.2 Flåttbårne patogener

Det ble i denne oppgaven tatt for seg tre patogener; *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* og *Neoehrlichia mikurensis*.

1.2.1 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Dog flåtten ikke er farlig i seg selv (Ulveseth, 2015), er det likevel smittespredningen av de ulike patogenene som er problematisk. En av patogenene, *Borrelia burgdorferi sensu lato* (flere steder i oppgaven referert til som *Borrelia spp.*) er en samlebetegnelse for 18 arter av *Borrelia spp.*, hvorpå seks av disse er påvist å kunne overføre infeksjoner til mennesker (Jenkins, Hvidsten, Matussek, Lindgren, Stuen & Kristiansen, 2012). I denne oppgaven ble det kun testet for *Borrelia spp.*, ikke for en spesifikk art.

Borrelia spp. er en bakterie. Den viktigste sykdommen *Borrelia spp.* overfører, er *Lyme Borreliose*. Den kan manifestere seg på ulike måter i kroppen, men det vanligste er at den når nervesystemet eller gir leddbetennelser (Kjelland et al., 2014, fhi.no, 2013).

Prevalensen av *Borrelia spp.* i Norden er ulik fra sted til sted. Enkelte steder er prevalensen så høy som 25% blant skogflåtten (Kjelland et al., 2014), mens det i andre undersøkelser hevdes å være helt opp mot 40-60% for voksne flått og 20-30% for nymfer (Ljøstad og Mygland, 2008). 13,6%- prevalens ble funnet hos nymfer av Hasle, Bjune, Midthjell, Røed og Leinaas (2010), mens det ble funnet

en prevalens på 16,2% hos nymfer av Jenkins, Kristiansen, Allum, Aakre, Strand, Kleveland, van de Pol og Schouls (2001), begge funnene gjort i sørlige Norge.

Imidlertid er det anslått i en svensk studie (Stingstudien) at kun rundt 1% av mennesker som blir bitt av flått infisert med *Borrelia spp.*, blir syke (Kjelland et al., 2014, fhi.no, 2013).

1.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum er en annen flåttbåren bakterie som det ble testet for i denne oppgaven. Den kan bl.a. føre til sykdommen *Human Anaplasmosis*, som nedsetter immunforsvaret ved å ødelegge de hvite blodcellene hos verten. Lette symptomer er feber, hodepine og slapphet, men i verste fall også nyresvikt, lungebetennelse og død (Nilssen, 2010, Kjelland et al., 2014, Stuen og Bergström, 2008).

Det er gjort forholdsvis lite undersøkelser hva prevalens av *A. phagocytophilum* i Norge gjelder, men en upublisert studie fra Telemark og Rogaland viser en prevalens på 5% og 6% på de respektive fylkene (Stuen og Bergström, 2008). En annen studie viste en prevalens mellom 2,83% og 3,16% (Tveten, 2014), mens en europeisk studie viste en prevalens på 3,9% (Richter og Matuschka, 2011).

1.2.3 *Neoehrlichia mikurensis*

En forholdsvis nyoppdaget her i Norge, *N. mikurensis* kan gi symptomer som minner om en lett sommerinfluensa med høy feber og ledd- og muskelsmerter (Kjelland et al., 2014). Andre symptomer er i tillegg ødemer, erysipelas og akutt diarè, og det ser i tillegg ut til å hovedsakelig ramme personer med nedsatt immunforsvar (Jenkins og Kristiansen, 2013, Richter og Matuschka, 2011).

Prevalens av *N. mikurensis* ble av Jenkins og Kristiansen i 2013 funnet til å være på 7% på Langøya i Bamble og 6% i Siljan kommune, med noen variasjoner innad i sesongen fra 2-3% i juni-juli til 12,5% i mai. Dette samsvarer med undersøkelser gjort i sentrale Europa, hvor man fant en prevalens på 6,2% av de innsamlede flåttene (Richter og Matuschka, 2011).

1.3 Flåttmidler

For å unngå å bli infisert med patogener, er unngåelse av bitt et sentralt element. Det finnes ulike metoder for å unngå å få flått på seg, og en av dem er bruk av ulike insekts- og flåttmidler.

DEET, IR3535 og icardin er vanlige virkestoffer i insekts- og flåttmidler i Norge. Disse reduserer angivelig faren for å bli bitt av flått om de brukes på klær eller bar hud. For husdyr og kjæledyr er det tillatt med andre midler, som for eksempel permetrin. Disse har både en avstøtende og en dødelig effekt på flått og andre insekter, men er ikke tillatt å bruke på mennesker (Kjelland et al., 2014, Lupi, Hatz og Schlagenhauf, 2013). DEET er blant det mest brukte virkestoffet siden 50-årene, og ble patentert i 1947 og tillatt for allmennheten i 1957 (Lupi, et al., 2013).

Dog flått- og myggmidler indirekte hjelper til med å hindre overføring av patogener, kan deler av midlenes innhold føre til forgiftning. Eteriske oljer (for eksempel sitronelle-, kamfer-, eukalyptus- eller peppermynteolje), pyretriner og pyretroider er alle giftige, men mengden er normalt så liten at det sjeldent gir alvorlig forgiftning (Flåttsenteret, 2015). Eteriske oljer og naturlige produkter er også i mange tilfeller et mer miljøvennlig middel, dog flere undersøkelser viser at de ikke holder like lenge som kjemiske (Nerio, Olivero- Verbel & Stashenko, 2009).

DEET (dietyltoluamid) er regnet som trygt i mindre mengder, men kan utløse toksiske reaksjoner som allergiske reaksjoner, dermatitt, nevrologiske og kardiovaskulære bieffekter. Encefalopati hos barn har også blitt beskrevet, dog etter uvettig bruk (Lupi et al., 2013).

En del av intensjonen bak oppgaven var å teste ulike flåttmidler for å se effekten av dem. Ut i fra formålet med midlene vil man anta at effekten av å bruke middel vil være færre antall festede flått, og dermed redusere, eventuelt totalt forhindre flåttbitt.

En problemstilling som ikke tas opp i denne oppgaven er spørsmålet om hvordan overdreven bruk av flåttmidler kan føre til andre helseplager enn eventuell

sykdom påført av flåttpatogener, som følge av reaksjoner på virkemidler og andre innholdsstoffer i flåttmidlene. Flere undersøkelser viser at høyere konsentrasjoner av for eksempel DEET kan være uheldig (Lupi et al., 2013).

Samtidig kan man spørre seg om hva som skjer med flått som er infisert med ulike patogener. Kan disse flåttene bli påvirket av patogenene, slik at de ikke reagerer normalt, det vil si blir frastøtt av flåttmidler? Har det da noen hensikt å bruke midler om det skulle vise seg at flåttene som likevel skulle finne på å feste seg, inneholder patogener?

Belova, Burenkova og Karganova publiserte i 2012 en artikkel som tok for seg en lignende problematikk. Artikkelen tok for seg infeksjon av viruset TBEV (Tick-Borne Encephalitt Virus), og så blant annet på hvordan flått (*Ixodes ricinus*) som var infisert med TBEV reagerte mot flåttmiddel, i dette tilfellet DEET. Data som de samlet inn viste først og fremst at flått som var infisert med TBEV var mer aktive og viste en høyere toleranse mot DEET enn ikke-infiserte flått. Det ble også sett at flått som ble fjernet fra mennesker kontra vegetasjon på samme lokalitet, hadde en høyere prevalens av TBEV. Dette var det to teorier om. Den ene gikk ut på at infiserte flått var mer aktive og aggressive enn uinfiserte flått, og derfor oftere ble funnet på mennesker enn ellers, og den andre teorien gikk ut på at noen søkende flått allerede hadde TBEV, dog i en så lav konsentrasjon at det var vanskelig å oppdage den, men at konsentrasjonen økte ettersom flått fikk i seg mer næring (blod) og dermed satte fart på virusreplikasjonen til TBEV-infeksjonen, slik at den nådde konsentrasjonsverdier som var mulig å oppdage.

Flåttene i denne oppgaven ble kun testet for bakteriepatogener, ikke viruspatogener som TBEV. Men det er likevel interessant å se i hvilke grad infiserte versus uinfiserte flått reagerer på flåttmidler.

1.4 Real- time PCR analyse; generell innføring

Påvisning av de ulike patogenene i denne oppgaven ble gjort ved hjelp av analyser fra en real- time PCR- maskin.

Beskrivelsene i dette avsnittet er gjengitt fritt etter Pierce 2012, Sæbø 2014 og Thieman og Palladino 2009. Real-time PCR- maskin brukt i denne oppgaven er fra Applied Biosystems, se Figur 1-1.

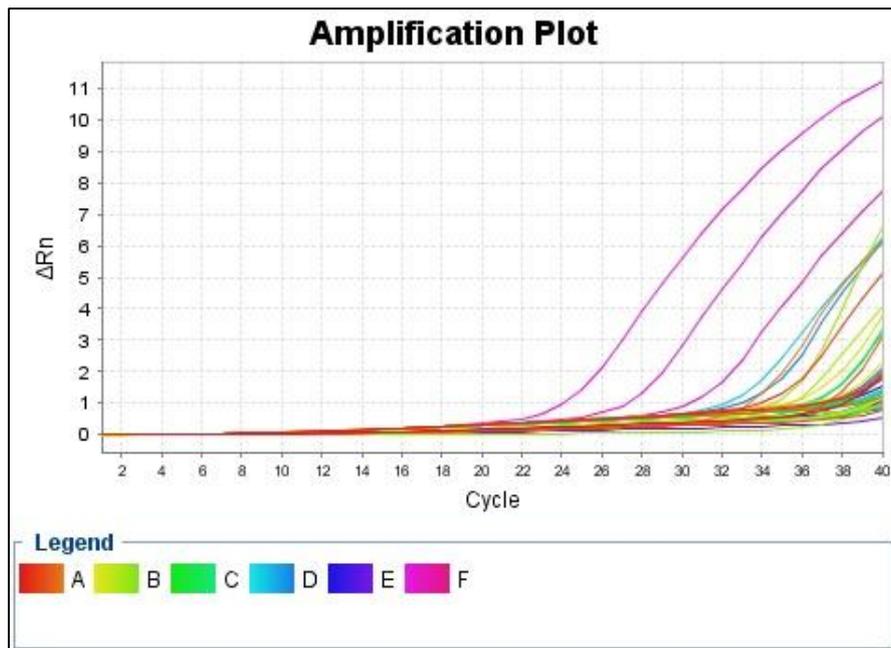
Som i en vanlig PCR-reaksjon amplifiserer en real-time PCR en ønsket DNA- sekvens, men kan også brukes til å mengdebestemme (kvantitering) en bestemt DNA- eller RNA- sekvens, og man kan følge reaksjonen og se resultatene mens de skjer.



Figur 1-1 Real-time PCR- maskin fra Applied Biosystems

En av metodene som brukes er ved hjelp av SYBR®Green, et kjemisk stoff som binder seg til alt dobbeltrådet DNA. Det er et fluorescerende fargestoff som emitterer lys i proporsjonalt forhold til mengde dobbeltrådet produkt som dannes, noe som gjør at lyssignalet blir sterkere for hver runde syklus i PCR-reaksjonen og mer dobbeltrådet produkt blir produsert. Lyssignalet kan leses av i maskinen. Nedenfor vises et amplifiseringsplott, hvor hver av grafene viser produsert PCR-produkt. I dette eksempelet er det *Borrelia spp.* som vises.

I denne oppgaven ble DNA-templat plassert i plater med 48 brønner, hver brønn med DNA fra individuell flått eller fra pool. Grafer med riktig smeltepunktstemperatur (T_m ; se lenger ned i dette avsnittet) ble avlest som positivt resultat. Grafene viste også hvilke brønner som ga positivt resultat, det vil si hvilken flått/pool som er infisert med det aktuelle patogenet det ble testet for.

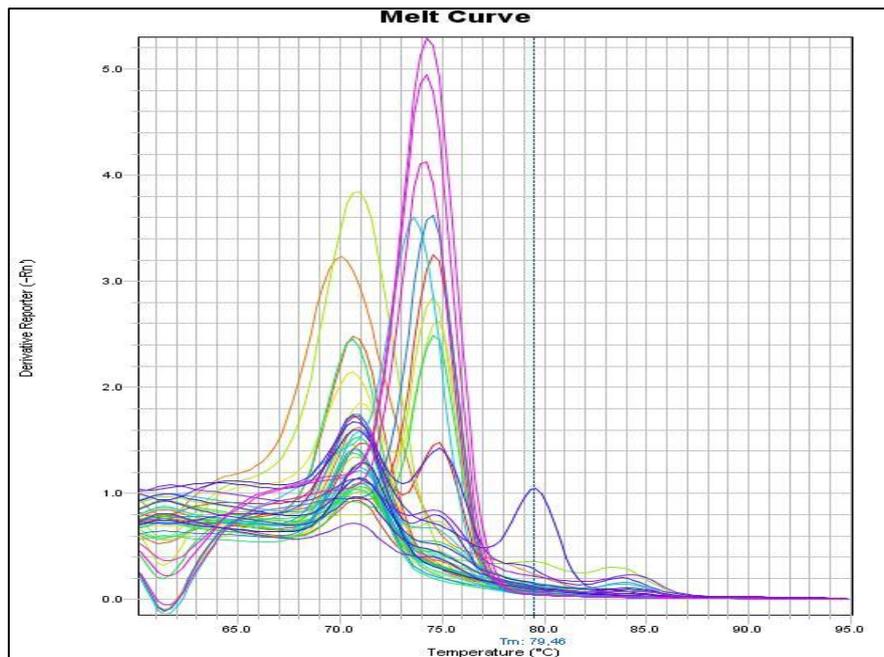


Figur 1-2 Amplifiseringsplott fra en real- time PCR- analyse med SYBR®Green av *Borrelia spp.*

Ulempen er at SYBR®Green-fargestoffet bindes til alt dobbelttrådet DNA, og man kan derfor ikke nødvendigvis se hva slags produkt man har amplifisert. For å se om man har tilstedeværelse av riktig produkt, kan man gjennomføre en smeltepunktsanalyse.

Ettersom en real- time PCR registrerer både DNA- syntesen og smeltepunktet (T_m) til de ulike PCR-produktene, vil man gjennom en smeltepunktsanalyse kunne se om man har riktig PCR- produkt. T_m til ulike sekvenser er avhengig av komposisjon på basene og lengde på sekvensen, og alt PCR- produkt for et spesifikt primerpar bør derfor ha samme smeltepunkt. De tre patogenene har nærliggende smeltepunkt. T_m for *A. phagocytophilum* ligger på ca $74,5^{\circ}\text{C}$, mens *Borrelia spp.* ligger på ca $74,2^{\circ}\text{C}$. *N. mikurensis* ligger noe lavere med rundt $73,65^{\circ}\text{C}$.

Nedenfor vises et eksempel på en smeltepunktsanalyse, hvor smeltepunktet til hver enkelt produkt fra hver brønn vises ved sin T_m . Kun resultater med samme smeltepunkt som kontrollene blir regnet som positive for det man tester for, i dette tilfellet *Borrelia spp.*



Figur 1-3 Eksempel på smeltepunktsanalyse med SYBR®Green, testet for *Borrelia spp.*

Et annet alternativ til SYBR®Green er å bruke prober, noe som også er blitt gjort i denne oppgaven. Ved å bruke en såkalt probe som er spesifikt for et bestemt område på en DNA/RNA-sekvens, økes PCR-reaksjonens spesifisitet, samtidig som produktet påvises etter som det blir dannet. I denne oppgaven ble det brukt en Taqman- probe, en oligonukleotid med en flurofor i hver ende av nukleotidet. Den ene fluroforen kalles en reporter og den andre kalles en quencher (hemmer). Når disse to befinner seg i nær avstand til hverandre, det vil si på hver sin side av proben, vil quencheren hindre reporterfluororen. Den er hemmet både når den eksisterer fritt i løsningen og når den er bundet til enkeltrådet DNA/RNA. I annealing- delen av PCR-reaksjonen vil imidlertid proben bli spaltet av taq-polymerasen, og de to fluroforene skiller lag. Det vil ikke lenger bli noen hemming av reportertermolekylet, og den vil derfor emittere lys ved en bestemt bølgelengde, noe som lese av på real- time PCR-maskinen. Det kan ikke gjennomføres en smeltepunktsanalyse når det har blitt brukt probe.

Når alt er gjennomført, skal det bli interessant å se hva som kommer ut av oppgaven. Er flagging en god metode, fungerer laboratoriearbeidet, har flåttmidler noe for seg og har infisering noe å si for flåttens atferd?

2 Metoder

2.1 Feltarbeid/ uttesting av flåttmidler

2.1.1 Valg av flåttmidler

Sportsbutikker, apoteker, jakt- og fiskebutikker samt dyrebutikker i sentrale Grenland (Skien, Porsgrunn) ble saumfart i perioden August/September 2012, og de tilgjengelige flåttmidlene ble innkjøpt.

Det ble også testet for virkningen av vanlig gul løk, hvitløk og ospeblanding. Gul løk og hvitløk ble innkjøpt i en vanlig matbutikk Grenland. Ospeblader til ble plukket fra et ospetre i et lite skogholt i Gjerpensdalen, på nedsiden av Håvundvegen 227 i Skien.

Se vedlegg 1 for ingrediensinnhold i de forskjellige flåttmidlene, og preparering av ospeblader.

Midlene ble gitt forkortelser. De ble gitt bokstaven J for Jomfruland, og deretter et tall som anga hvilke rekkefølge de ble testet i. J1 er ikke med i oppgaven ettersom denne ble brukt av Jenkins under demonstrasjonstesting.

2.1.1.1 Utprøvde flåttmidler

- J2: Mygga Natural Spray
- J3: Anti-Flått (hundemiddel)
- J4: Ospeblanding
- J5: Myggolf Spray
- J6: Etono Myggspray
- J7: Autan (gul flaske)
- J8: Cactuz 20% DEET
- J9: Autan Protection Plus (hvit flaske)
- J10: Mygga Myggmelk, Roll- On
- J11: Vanlig gul løk
- J12: Hvitløk
- J13: Tikker, Dogman (halsbånd som lager lyd)

Det ble også kjøpt inn to andre produkter mot flått som kunne brukes av dyr, men disse ble ikke utprøvd. Det ene, Beaphar Biodråper, fungerte på den måten at det

spredte seg i dyrets fettlag, som ikke var mulig å teste ut på et håndkle, og det andre produktet (Cani- Flåttbånd til hund) var heller ikke var særlig egnet til utprøving med håndkle.

2.1.2 Feltinnsamling av flått

Fangstmetoden for å samle inn flått til denne oppgaven kalles flagging (Lundsett, 2004, Kjelland et al., 2014). Et hvitt frottéhåndkle av størrelse 70 cm x 150 cm ble festet til en trestang ved hjelp av stifter/spiker, og ble dradd sakte over den utvalgte vegetasjonssonen en bestemt tid, for så å telle antall flått som hadde festet seg i løpet av flaggingsperioden.

I dette tilfellet ble hvert håndkle dratt over sin utvalgte vegetasjonssone i en time, denne timen ble delt opp i 2 x 30 minutters intervaller eller 3 x 20 minutters intervaller.

I tillegg ble hvert flåttmiddel testet ut i ulike doser, merket 0x, 1x og 10x. Dose 0x var et ubehandlet kontrollhåndkle. Dose 1x var normalbehandlet håndkle med 13 spray eller påføringer med roll- on på håndkledet. Antallet ble avgjort ut ifra ulike anbefalinger på de forskjellige midlene, samt hvordan utfører selv ville valgt å påføre middelet. Dose 10x var behandlet med 10 ganger normaldose, det vil si 130 spray eller påføringer med roll- on. Flåttmidlene ble siden evaluert ved å sammenligne antall flått som festet seg til behandlet og ubehandlet håndkle.

Etter flaggingsperioden ble flåttene plukket av med en pinsett og lagt i et eppendorfrør med 70 % sprit. Antall flått ble opptalt og loggført mellom hvert intervall og plassert i kategorier nymfe, voksen hann eller voksen hunn.

Etter endt feltinnsamling ble flåttene oppbevart på sprit inntil videre behandling i et kjølerom på høghskolen.

Det var ikke nok håndklær til å ta et nytt håndkle for hver intervall. Det ubehandlede kontrollhåndkledet ble derfor brukt om igjen mellom intervallene, da det var lett å få av hver flått ettersom de var godt synlige mot den hvite bakgrunnen. Kontrollhåndkledene ble videre fordelt til 1x- doser og 10x- doser, dette for å unngå overlapp i den kjemiske behandlingen av håndkledene. Etter

bruk ble håndkledene lagt i vann tilsatt klorin, tørket og tatt med til kokvask i nærmere 3 timer (90°C) i vaskemaskin. Det ble brukt et nøytralt vaskemiddel, Blenda Sensitive Hvitt.

2.1.3 Tidspunkt og værforhold for flagging

Det ble flagget fra tidlig formiddag til sen ettermiddag, så lenge forholdene på underlaget ikke var fuktige fra dogg eller regn, og så lenge lysforholdene tillot innsamlingen. Temperaturen var jevn alle feltdagene, og lå for det meste rundt 12-13°C. Den laveste temperaturen som ble registrert var 11°C og den høyeste var 14°C. Temperaturmålingene ble hentet fra nettstedet yr.no fra målested «Jomfruland, Kragerø (Telemark)». Pauser i innsamlingen ble holdt så korte og få som mulig for å passe på at det ikke ble for store endringer i vær- og lysforhold for hvert enkelt middel og dose. På denne måten ble det forsøkt å minimere faktorer som kunne gi utslag på resultatet fra uttestingen. Innsamlingsperioden for flåttene i denne oppgaven var September 2012. Det ble kun flagget på oppholdsdager, regndager var ikke aktuelle da håndkledet ble våt og flåtten ikke er like aktiv som ved tørre forhold.

2.1.4 Valg av vegetasjonsområde

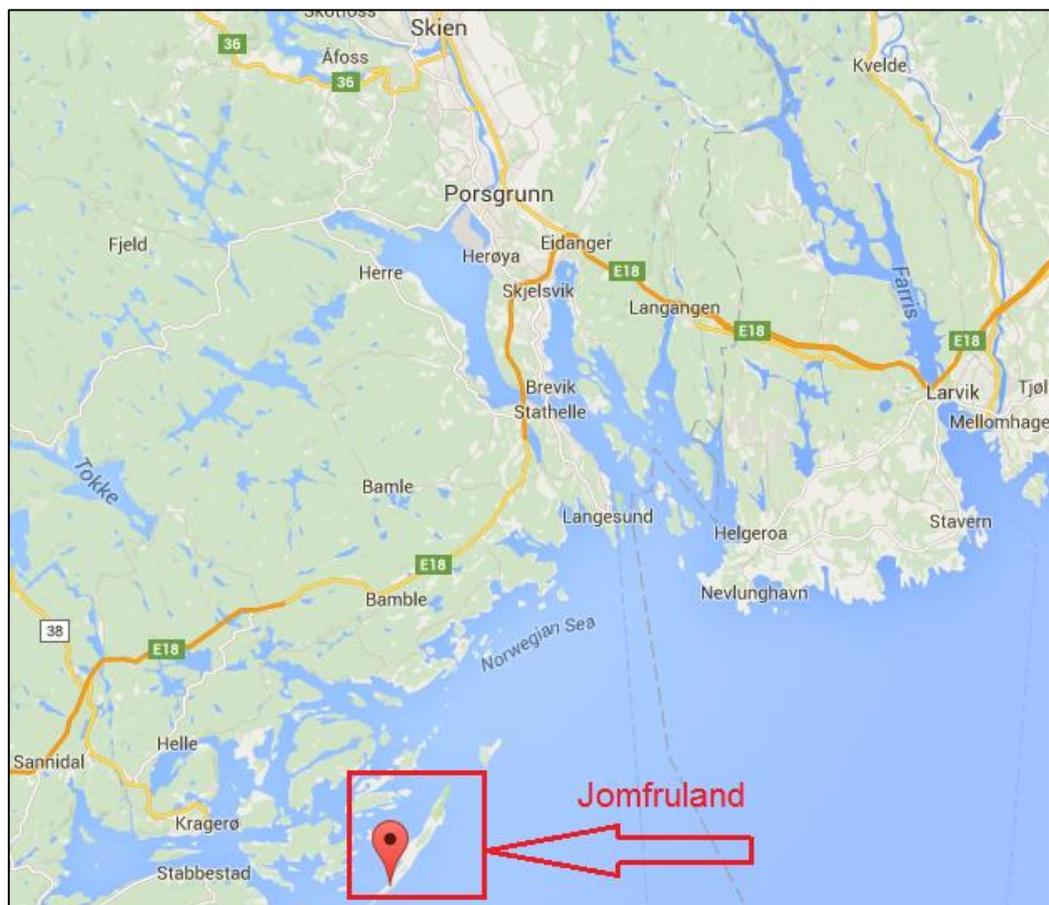
Jomfruland er ei øy på utsiden av Kragerøkysten i Telemark fylke som er kjent for å ha mye flått (Hasle, 2011).

Ettersom Jomfruland har et stort utvalg av turstier med kantvegetasjon som er passende habitat for flått, ble det flagget langs disse stiene. Det var ønskelig at vegetasjonen var så lik som mulig for hvert enkelt flåttmiddel for å minimere ulikheter i forsøket. Inne i hasselskogene på Jomfruland er det tilstrekkelig med både lys og skygge for flåtten, og det er også fine forhold med tanke på fuktighet; ikke for mye, ikke for lite. Det ble gjort en liten testflagging for nysgjerrighetens skyld i den korte gressvegetasjonen ute ved rullesteinstranden på Jomfruland, og her ble det ikke funnet noen flått. Vegetasjonen langs stranden var mye mer værutsatt for både sol og nedbør enn inne i skogen, noe flåtten ikke liker.

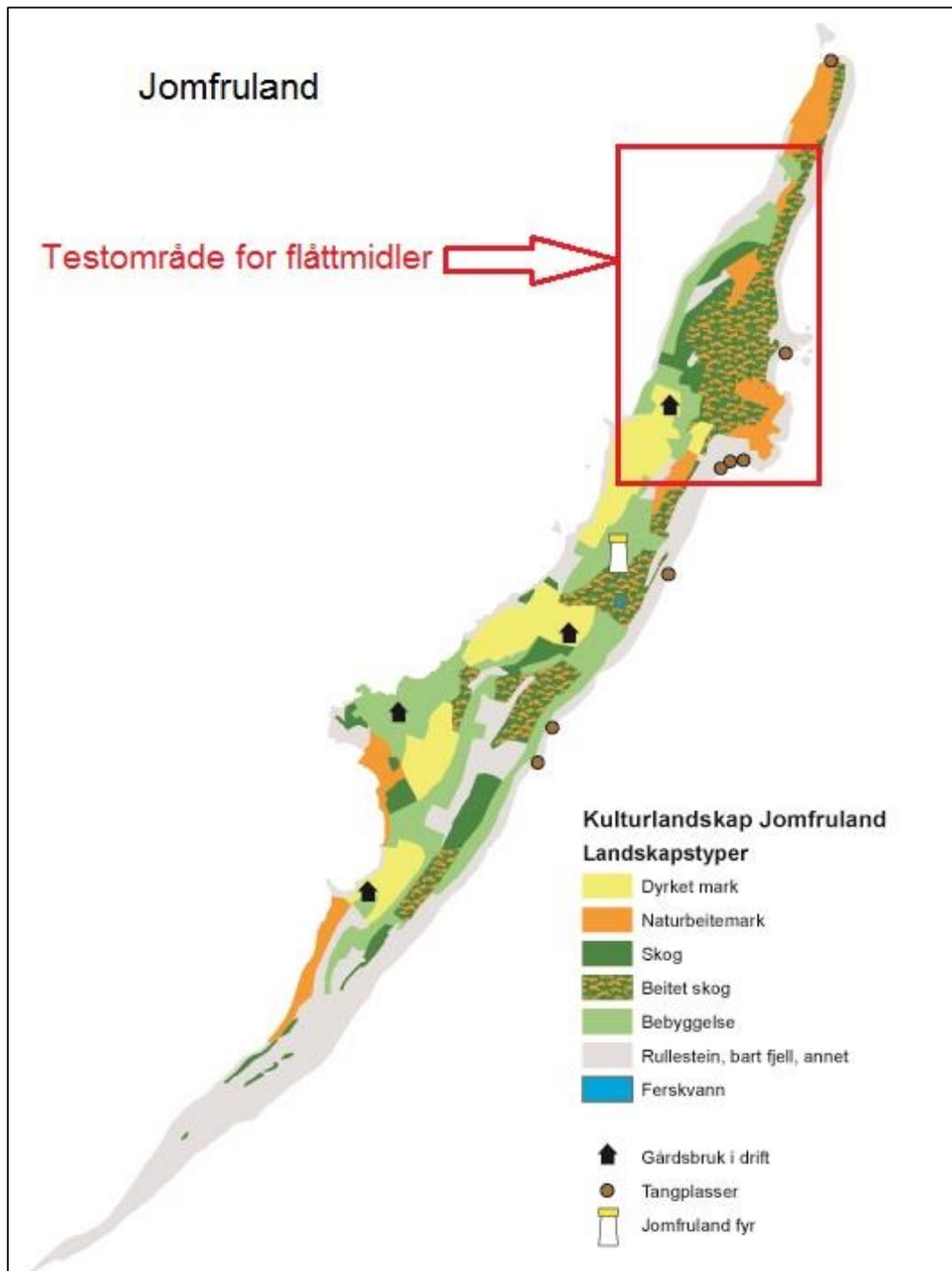
Hvert flåttmiddel fikk tildelt sin sti inne i hasselskogen. Flåttmiddelet for hver sti ble tilfeldig trukket, ved å simpelthen velge det første og beste produktet som lå i posen.

Det ble konsekvent flagget med 0x- dose på den ene siden av stien og 1x- dose på den andre siden av stien, innenfor en rekkevidde på opptil 1 meter fra stien. 10x-dosen ble imidlertid testet på begge sider av stien, men denne var innen en rekkevidde f.o.m 1 meter t.o.m 5 meter fra stien, slik at ingen av dosene overlappet hverandre.

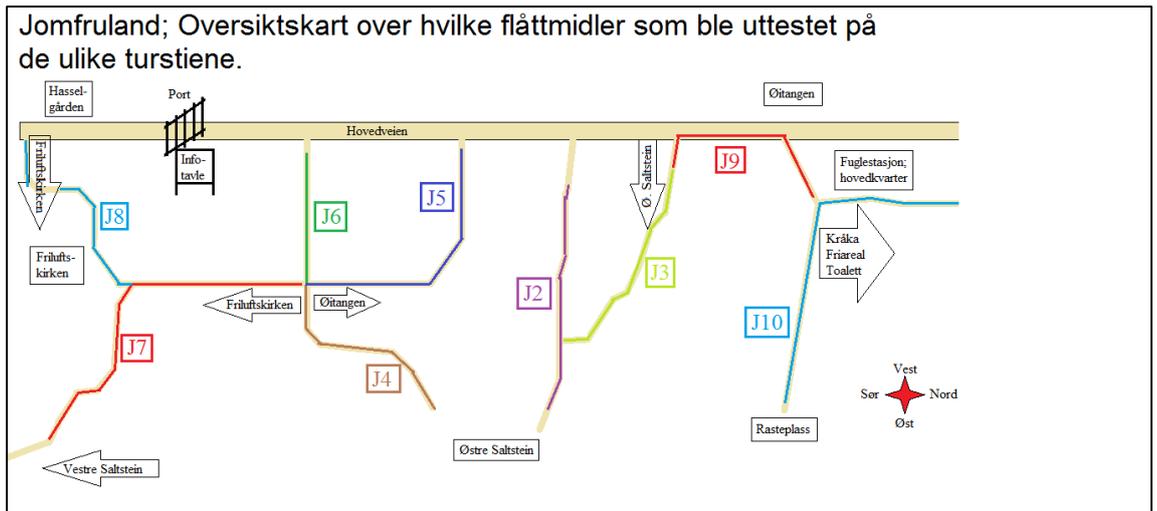
Nedenfor vises kart av Jomfruland, både et oversiktskart (Figur 2-1) og et utsnittskart for å illustrere hvilken del av øya testene ble utført på (Figur 2-2).



Figur 2-1: Oversiktskart over Kragerø/Grenland med markering av Jomfrulands lokasjon (Kilde: Google maps).



Figur 2-2: Oversiktskart over Jomfruland med avmerket testområde for flåttmidler (Kilde: «Jomfruland- Kulturen former landskapet»)



Figur 2-3: Kart over hvilke midler (angitt med koder) som ble testet ut på de ulike stiene på Jomfruland (Jensen, Kristine, 2013).

2.2 Laboratoriearbeid

2.2.1 Utvelgelse av flått for undersøkelse av patogener

Utvelgelse av hvilke flått som skulle testes for patogener ble valgt på følgende måte; der innsamlet talldata tydet på at flåttmidlene virket ut ifra hypotesen om at behandlet håndkle ville ha flere flått enn ubehandlet håndkle.

Dette resultatet så man best etter at antall flått var telt opp for hver enkelt dose på hvert enkelt middel og plassert i et søylediagram (Figur 3-1). Det ble valgt flått fra tre midler (se Tabell 2-1 for oversikt over antall flått fra hvert middel), Mygga Natural Spray (J2), Etono Myggspray (J6) og Autan Protection Plus (hvit flaske) (J9). Det var ønskelig å teste på så mange flått som mulig, men av praktiske årsaker ble det valgt et antall på 500 flått. Dette ble omgjort til 495 flått fordi det tillot et jevnt antall flått fra hvert middel, 165 (165 flått x 3 midler = 495).

Det ble vurdert som ønskelig at det skulle tas 55 flått fra hver dose da det var 3 doser (0x, 1x og 10x), men dette var i praktisk ikke mulig da det i noen av dosene ikke var nok flått til å nå antallet på 55 flått. Det ble da valgt ut så mange som var tilgjengelig, og deretter fylt opp med ekstra flått hos de andre dosene og forsøkt å jevne ut så godt det lot seg gjøre. Tabell 2-1 viser en oversikt over antall flått som ble testet fra hvert middel.

Det ble utelukkende testet på nymfer, da det var ytterst få voksne individer som ble sanket inn.

Tabell 2-1: Oversikt over antall flått som ble testet for smittestoffer.

Utvalgte flåttmidler for patogenanalyse:				
Middel:	Antall flått:			
	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt antall flått:
Mygga Natural spray (J2)	98	55	12	165
Etono Myggspray (J6)	70	75	20	165
Autan Protection Plus (J9)	96	65	4	165
Totalt:	264	195	36	495

2.2.2 Ekstraksjon av DNA fra flått ved bruk av ammoniakkmetoden

Amoniakkmetoden består i å koke flåttene i ammoniakkhydroksid 2,5%, slik at flåttens DNA kokes ut og kan analyseres. Metoden er hentet fra Lise Brekkes masteravhandling fra 2008, med noen modifikasjoner.

2.2.2.1 Fremgangsmåte

1. Flåttene ble tatt ut fra eppendorfrørene de ble samlet inn i med en plastøse og lagt på et tørkepapir. Her ble de skilt fra hverandre og lå til tork i 3 til 4 minutter inntil spriten har fordampet.
2. Hver flått ble så overført til hvert sitt nye 500 µl eppendorfrør med plastøse og merket. Den samme plastøsen kan benyttes for hver flått som har kommet fra det samme eppendorfrøret hvor de har ligget sammen på sprit siden innsamlingen. Plastøsen ble ellers byttet mellom hver gang et nytt eppendorfrør fra innsamlingen ble åpnet.
3. 100 µl 2,5% ammoniumhydroksid (NH₄OH i TE-buffer (TE-buffer= 10 MM TRIS, 1 MM EDTA, pH 8,0) (se avsnitt 2.2.2.2) ble deretter tilsatt i hvert rør. Ny pipettespiss ble brukt mellom tilsetning i hvert rør for å unngå evt smitte eller forurensning mellom hver enkelt flått. Tilsetting av NH₄OH ble gjennomført i avtrekksskap.
4. Eppendorfrørene ble lukket og låst med en «cap- lock» for å forhindre at lokket går opp under koking.
5. Rørene ble inkubert i varmeblokk ved 95°C i 20 min. Kokes det ved 100°C, vil mye av væsken fordampe, noe som ikke er ønskelig). Rørene ble sentrifugert ved maks hastighet (ca 13000 rpm) i 1 minutt. Instrument fra produsent Grant Instrument (T190).
6. Rørene ble åpnet og inkubert i varmeblokk ved 95°C i 10 minutter ekstra.
7. Rørene kjølte ned på is og ble sentrifugert i noen få sekunder for å samle all væske som eventuelt hadde kondensert opp på rørvæggen. DNA var nå ferdig ekstrahert og ble oppbevart på kjølerom inntil videre bruk.

Ekstraksjonen gikk som planlagt, med unntak av følgende hendelser;

- Fra rørene merket J2-155, J2-159, J2-160 og J2-163 lå flåtten langs siden inne i røret og ikke nederst i væsken. Dette gjaldt også for rør J9-89 og J9-90.
- Rør merket J2-146 fikk et løst lokk under koking.

2.2.2.2 Ammoniakkhydroxid-bruksløsning (2,5 % Ammoniakk i 1x TE- buffer)

Det ble laget amoniakkhydroxid- bruksløsning for å koke flåttene for DNA-ekstrahering. Se Tabell 2-2 for konsentrasjonstabell.

Tabell 2-2: Konsentrasjonstabell for bruksløsning av amoniakkhydroxid-bruksløsning (2,5% amoniakk i TE- buffer)

Reagenser:	Konsentrasjon i bruksløsningen:
10% NH ₄ OH	0,25x
10x TE-buffer	0,1x
Destillert H ₂ O	-

2.3 Real- time PCR- program, primersekvenser og reaksjonsblandinger for de ulike patogenene

2.3.1 *Borrelia burgdorferi sensu lato*; Real- time PCR

Oppsett og program er med modifikasjoner hentet fra Jenkins et. al., 2012. Modifikasjonene er gjort med hjelp fra professor Jenkins.

Real- time PCR ble gjennomført både ved bruk av Taqman®Probe og med SYBR®Green på en StepOne Software real-time PCR maskin fra Applied Biosystems.

Taqman Mastermix, Taqman®Probe og SYBR®Green Mastermix er alle levert av Applied Biosystems. Prøvene ble kjørt i plater med 48 brønner fra Applied Biosystems.

Stockløsningen av primere og Taqman®Probe ble levert i 100 pmol/μl = 100 μM.

Primerene ble tynnet ut med 1:10 (1 del stockløsning, 9 deler TE-buffer 1x), for å få en bruksløsning med konsentrasjon 10 µM.

Før selve analysene ble gjort, ble det gjennomført testkjøringer med både Taqman®Probe og SYBR®Green, hvorpå det ut ifra resultatene ble bestemt at de første analysene skulle kjøres med SYBR®Green, og positive resultater derfra ble testet på nytt med Taqman®Probe. I tillegg ble også resultater fra SYBR®Green-kjøringen som var usikre kjørt på nytt med Taqman®Probe. Kun prøver med positive funn på både SYBR®Green og Taqman®Probe ble regnet som positive resultater.

Positive kontroller var fire rør fra en 10x- fortynningsserie (konsentrasjoner fra 3×10^5 til 3×10^2 per mikroliter) av plasmid pFLA fra 2010, og er syntetisk fremstilt fra *e.coli*-bakterier. Disse ble levert av Genscript Corporation (Jenkins et al., 2012). Rørene var merket Borr 4, Borr 5, Borr 6 og Borr 7. Negativ kontroll var vann.

2.3.1.1 Primersekvenser

Tabell 2-3: Primersekvenser, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Primer:	Navn:	Sekvens:
Forward	FlaBf	TCAAGAAATAATGSTATTAATGCTGCTAA*
Reverse	FlaBr	CCAGCAGCATCATCAGAAGCT

* S; kan være C+G

2.3.1.2 Reaksjonsblanding for real- time PCR med SYBR®Green

Tabell 2-4: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Reagenser:	Konsentrasjon i bruksløsningen:	Antall µl pr. prøve:	Konsentrasjon i PCR- reaksjonen:
2x Mastermix (SYBR®Green)	2x	12,5	1x
Primer F, FlaBf	10 µM	1,5	0,6 µM
Primer R, FlaBr	10 µM	1,5	0,6 µM
H ₂ O		9,0	
Totalt med PCR- mix:		24,5	
DNA- templat:		0,5	
Totalt PCR-volum:		25,0	

2.3.1.3 Reaksjonsblanding for real- time PCR med Taqman®Probe

Tabell 2-5: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med Taqman®Probe, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Reagenser:	Konsentrasjon i bruksløsningen:	Antall µl pr. prøve:	Konsentrasjon i PCR- reaksjonen:
2x Mastermix (Taqman Mastermix)	2x	12,5	1x
Primer F, FlaBf	10 µM	1,5	0,6 µM
Primer R, FlaBr	10 µM	1,5	0,6 µM
Taqman®Probe	10 µM	0,4	0,16 µM
H ₂ O	-	8,6	
Totalt med PCR- mix:		24,5	
DNA- templat:		0,5	
Totalt PCR-volum:		25,0	

2.3.1.4 Real- time PCR- program for SYBR®Green- reagenser

Tabell 2-6: Real- time PCR-program for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, SYBR®Green

Stadium:	Steg:	Temperatur:	Tid:	
Holding stage	1	50°C	2 min	
	2	95°C	10 min	
Cycling stage	1	95°C	15 sek	Antall sykluser 45
	2	60°C	1 min	
Meltcurve stage	1	95°C	15 sek	Øker med 0,3°C per trinn fra 60°C til 95°C.
	2	60°C	1 min	
	3	95°C	15 sek	

2.3.1.5 Real- time PCR- program for Taqman®Probe- reagenser

Tabell 2-7: Real- time PCR-program for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, Taqman®probe

Stadium:	Steg:	Temperatur:	Tid:	
Holding stage	1	50°C	2 min	
	2	95°C	10 min	
Cycling stage	1	95°C	15 sek	Antall sykluser 45
	2	60°C	1 min	

2.3.2 *Neoehrlichia mikurensis*; Real- time PCR

Oppsett og program er gjengitt med tillatelse fra Cecilie Raasok, masterstudent ved Høgskolen i Telemark. Hun har optimalisert real- time PCR for *Neoehrlichia mikurensis* i masteroppgaven «*Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Ixodes ricinus* i Norge» (2015).

SYBR®Green Mastermix er levert av Applied Biosystems, Warrington, UK, mens primere er levert av Applied Biosystems, Foster City, CA.

Stockløsningen av primere er levert i 100 pmol/μl = 100 μM.

Tynnet ut primere med 1:10 (1 del stockløsning, 9 deler TE-buffer 1x) for å få bruksløsning 10,0 μM.

Positive kontroller for PCR-kjøringen var en fortyningsserie med DNA ekstrahert vha amoniakkmetoden, og ble gitt meg av veileder Jenkins. Prøvene kommer fra Langøya, en øy i Kragerøfjorden ikke langt unna Jomfruland, og var merket «Flått Mai 2000 I». Det ble brukt tre positive kontroller, merket L2-92, L2-93 og L2-94. Negativ kontroll var vann.

2.3.2.1 Primersekvenser

Tabell 2-8: Primersekvenser, *Neoehrlichia mikurensis*

Primer:	Navn:	Sekvens:
Forward	Neo2f	GCA AAT GGA GAT AAA AAC ATA GGT AGT AAA
Reverse	Neo2r	CAT ACC GTC AGT TTT TTC AAC TTC TAA

2.3.2.2 Reaksjonsblanding for real- time PCR med SYBR®Green

Tabell 2-9: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Neoehrlichia mikurensis*

Reagenser:	Konsentrasjon i bruksløsningen:	Antall μl pr. prøve:	Konsentrasjon i PCR- reaksjonen:
2x Mastermix (SYBR®Green)	2,0x	12,5	1,02x
Primer Forward Neo2f	10,0 μM	2,0	0,82 μM
Primer Revers Neo2r	10,0 μM	2,0	0,82 μM
H ₂ O	-	3,0	-
TE-Buffer 1 x	1,0x	4,5	0,18x
Totalt med PCR- mix:		24,0	
DNA- templat:		0,5	
Totalt PCR-volum:		24,5	

2.3.2.3 Real- time PCR- program for SYBR®Green reagenser

Tabell 2-10: Real- time PCR-program for *Neoehrlichia mikurensis*, SYBR®Green

Stadium:	Steg:	Temperatur:	Tid:	
Holding stage	1	50°C	2 min	
	2	95°C	10 min	
Cycling stage	1	95°C	15 sek	Antall sykluser: 40
	2	60°C	1 min	
Meltcurve stage	1	95°C	15 sek	Øker med 0,3°C per trinn fra 60°C til 95°C.

2.3.3 *Anaplasma phagocytophilum*; Real- time PCR

Reaksjonsblandningsoppsett og PCR- program for *Anaplasma phagocytophilum* er gjort med hjelp fra professor Jenkins.

Real- time PCR ble testgjennomført både med Taqman®Probe og SYBR®Green. Under testrundene viste det seg at SYBR®Green ga de beste resultatene, så det ble ved hovedtestingen kun brukt SYBR®Green. Real- time PCR for *A. phagocytophilum* er hentet fra Henningson et al., 2015.

Både Taqman®Probe og primerstockløsninger ble levert i 100 pmol/µl fra Applied Biosystems, Foster City, USA. Disse ble fortynnet ned til 3000 nM ved uttynning i TE-buffer i henhold til Henningson AJ et al., 2015.

Som positive kontroller til testingen ble det brukt en fortynningsserie av et syntetisk *Anaplasma*-plasmid fra Genscript (200 ng/µl). Det var uttynnet i humant DNA (10 ng/µl). I prøvene mine besto dette av syv positive kontroller (AP4, AP5, AP6, AP7, AP8, AP9 og AP10). Den første kontrollen hadde en DNA-konsentrasjon på 0,002 ng/µl, deretter fortynnet med 10 for hver av de seks. Det ble også brukt en negativ kontroll, APK, som hadde destillert vann i stedet for DNA-templat. Fortynningsserien ble donert av Unilabs Telelab, Skien.

2.3.3.1 Primersekvenser

Tabell 2-11: Primersekvenser, *Anaplasma phagocytophilum*

Primer:	Navn:	Sekvens:
Forward	NNf	TTT TGG GCG CTG AAT ACG AT
Reverse	NNr	TCT CGA GGG AAT GAT CTA ATA ACG T

2.3.3.2 Probesevens

Tabell 2-12: Probesevens, *Anaplasma phagocytophilum*

Probe:	Navn:	Sekvens:
5' hydrolyse-probe	ApM	TGC CTG AAC AAG TTA TG

2.3.3.3 Reaksjonsblanding for real- time PCR med SYBR®Green

Tabell 2-13: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Anaplasma phagocytophilum*

Reagenser:	Konsentrasjon i bruksløsningen:	Antall µl pr. prøve:	Konsentrasjon i PCR- reaksjonen:
2x Syber®Green Mastermix	2x	12,5	1x
Primer Forward NNf	3000 nM	2,5	300 nM
Primer Revers NNr	3000 nM	2,5	300 nM
H ₂ O	-	2,5	-
Totalt med PCR- mix:		20,0	
DNA- templat:		5,0	
Totalt PCR-volum:		25,0	

2.3.3.4 Real- time PCR-program for SYBR®Green reagenser

Antall syklus på cycling stage er 45, og på melting curve stage vil det mellom steg 2 og 3 øke fra 60°C til 95°C med 0,3°C per trinn. Nedenfor vises programmet for real- time PCR for *A. phagocytophilum* i Tabell 2-14.

Tabell 2-14: Real- time PCR-program for *Anaplasma phagocytophilum*, SYBR®Green

Stadium	Steg	Temperatur	Tid	
Holding stage	1	50°C	2 min	
	2	95°C	10 min	
Cycling stage	1	95°C	15 sek	Antall sykluser 45
	2	60°C	1 min	
Melting curve-stage	1	95°C	15 sek	Øker med 0,3°C per trinn fra 60°C til 95°C.
	2	60°C	1 min	
	3	95°C	15 sek	

2.3.3.5 Pooling og fortynning av pool

A. phagocytophilum ble poolet sammen før de ble testet. Dette fordi man forventer en lav prevalens av *A. phagocytophilum*, rundt 2-3%, pers.med Jenkins.

Hver pool besto av templat fra 5 flått. 5 µl DNA-templat ble tatt fra hvert rør og blandet sammen, se oversikt over hvor mange pool fra hvilken dose/middel under Tabell 2-15.

Hvert pool ble deretter fortynnet 1:10. 5 µl DNA-templat fra et pool ble tilsatt 45 µl TE-buffer 1x. Fortynningen ble gjort for å påse at det ble et sikkert positivt resultat, da fortynning minsker risiko for hemming. Hilde G. Thorvig (masterstudent ved HiT) og A. Jenkins fant ut av dette da de testet ut fortynning ved Thorvigs masterarbeid. Resultatene er upubliserte.

Pooling gikk som planlagt, med unntak av rør J2-47 som var tørket bort. Her ble det tilsatt 5 µl destillert vann, og forhåpentligvis sørget dette for at DNA som eventuelt lå igjen i bunnen av røret ble sugd opp av pipetten. Fortynning; ingen

problemer. Det ble totalt testet for *A. phagocytophilum* på 495 flått fordelt på 101 fortynnede pool.

Tabell 2-15: Oversiktstabell, pooling *A. phagocytophilum*

Pooling <i>A. phagocytophilum</i> :		
Middel:	Dose:	Antall pool:
Mygga Natural Spray (J2)	0x	20
	1x	11
	10x	3
Etono Myggspray (J6)	0x	6
	1x	23
	10x	4
Autan Protection Plus (J9)	0x	20
	1x	13
	10x	1

2.3.3.6 Individuell prevalensestimering fra pool

Selv om det kun blir målt prevalens på pool for *Anaplasma phagocytophilum*, kan det være interessant å vite den individuelle prevalensen hos sampelet. Ved å bruke en prevalenskalkulator oppgitt i artikkelen “*Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway*” av Andreassen et al., 2012, kan man estimere en individsprevalens av *Anaplasma phagocytophilum*.

Hos epitools.ausvet.com.au finner man kalkulatoren, og det ble brukt to varianter; *Pooled prevalence for fixed pool size and tests with uncertain sensitivity and specificity* og *Pooled prevalence for fixed pool size and tests with known sensitivity and specificity*. Nedenfor vises angitte data satt inn i kalkulatoren, Tabell 2-16 og Tabell 2-17. *Pool size* (5), *Number of pools tested* (101), *Number of pools positive* (18) og *Sample size* (495) er de eneste tallverdiene som ble endret i testen, resten ble satt av testen selv.

Tabell 2-16 *A. phagocytophilum*; Inputdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med ukjent sensitivitet og spesifitet.

Inputs	
Method	Uncertain Se/SP & asymptotic confidence limits
Pool size	5
Number of pools tested	101
Number of pools positive	18
Sensitivity	0.9
Specificity	0.95
Se sample size	495
Sp sample size	495
Lower CL	0.025
Upper CL	0.975

Tabell 2-17 *A. phagocytophilum*; Inputdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med kjent sensitivitet og spesifitet.

Inputs	
Method	Known Se/SP & exact confidence limits
Pool size	5
Number of pools tested	101
Number of pools positive	18
Sensitivity	0.9
Specificity	0.95
Lower CL	0.025
Upper CL	0.975

2.4 Syntetisk pooling

Ettersom kun *A. phagocytophilum* ble poollet før PCR-analysen, kunne det ikke direkte sammenlignes med resultatene fra *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, da disse ble analysert enkeltvis og ikke fem og fem samlet slik som *A. phagocytophilum*. Det var kun 7 av 495 flått som var infisert med *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, og syntetisk pooling ble en måte å kunne sammenligne *A. phagocytophilum* med de to andre patogenene på.

Borrelia spp. og *N. mikurensis* ble derfor syntetisk poollet, det vil si resultatene for hver enkelt flått ble ført inn i en Excel-fil og skrevet ned om det var positivt eller negativt resultat. En kolonne inneholdt resultatene for *Borrelia spp.* og den neste

inneholdt resultatene for *N. mikurensis*. På denne måten så man resultatene direkte ved siden av hverandre og kunne lett se om det var noen dobbeltinfiseringer. Det var fem og fem flått som ble poollet sammen hos *A. phagocytophilum*, og derfor ble resultatene fra de samme fem flåttene slått sammen i den syntetiske pooling av *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*. Det vil si at dersom minst en av de fem flåttene slo ut positivt, så ble hele poolen merket som positiv. På denne måten får man en måte å sammenligne alle tre patogenene på. Metoden ble anvist av professor Jenkins ettersom det var ønskelig med en metode for sammenligning av alle tre patogener. Det ble også gjort en oppsummering av hvilke pool som slo ut positivt for flere enn et patogen, se Tabell 3-10.

2.5 Dosenivå og patogeninfisering

Det ble sett på, etter at real- time PCR-analyser var kjørt på alle flåttene, prevalensen til patogenene til hver enkelt flått for hver dose på de tre midlene Mygga Natural Spray (J2), Etono Myggspray (J6) og Autan Protection Plus (J9) for å se om det kunne være en sammenheng mellom toleranse for en utvalgt dose og patogeninfisering. Det ble også gjort statistisk analyse av resultatet, se vedlegg 4.

2.6 Statistisk analyse

De statistiske analysene som ble brukt på resultatene, ble gjort ved hjelp av både regneprogrammer (Excel) og eksempler fra faglitteratur; lærebøkene i statistikkfaget Naturvitenskapelige metoder 4301 (Løvås, 2010 og Wheeler og Cook, 2003) ved Høgskolen i Telemark, og tavleeksempler fra faget Naturvitenskapelige metoder 4301. I tillegg ble det gitt assistanse fra veileder professor Jenkins ved Høgskolen i Telemark.

2.6.1 Valg av analysemetode

På grunnlag av enkelte ulikheter under innsamlingsdelen (ulikheter i tidsintervall) og under laboratorieanalysene (pooling versus ikke pooling), ble det gjort noen ulike statistiske analyser.

2.6.1.1 1-veis ANOVA av dosenivå, flåttmiddel Mygga Natural Spray (J2)

Det ble i denne ANOVA-analysen undersøkt om det var forskjell på dosestyrken når det gjelder frastøtingseffekten på flått.

1-veis ANOVA ble kun brukt på data innsamlet fra middel J2, Mygga Natural Spray. Dette var fordi J2 var den eneste av midlene med data som kvalifiserte til en 1-veis, da den hadde nok rader og kolonner til å fullføre ANOVA. Middel J6 (Etono Myggspray) hadde en blanding av tidsintervaller (dose 0x og 1x ble tatt i 3x 20 min, mens dose 10x ble tatt i 2x30 min), og var derfor ikke mulig å gjennomføre en ANOVA på. Middel J9 (Autan Protection Plus) hadde kun to rader, noe som er for lite for en ANOVA (Løvås, 2010).

Utrekning ble gjort ved hjelp av undervisningseksempel fra faget Naturvitenskapelige metoder 4301 ved HiT, og fullstendig utregning vises under vedlegg 2.

2.6.1.2 1-veis ANOVA av dosenivå, alle flåttmidler

Det ble også i denne analysen undersøkt om det var forskjell på dosestyrken når det gjelder frastøtingseffekten på flått.

Denne er gjort på nøyaktig samme måte som beskrevet i vedlegg 2, mens her ble det testet for alle uttestede midler, med unntak av løk, hvitløk og tikkende halsbånd. Disse fikk ingen fullverdig uttesting av ulike praktiske årsaker. Alle midlene er slått sammen for hver dose, og ANOVA ser på om det er en forskjell i gjennomsnittene mellom de ulike dosene, 0x (kontroll), 1x og 10x.

Også i dette tilfellet var en praktisk forventning om at en høyere andel flått ville feste seg til de ubehandlede kontrollhåndkledene enn de behandlede, noe en også så ut i fra rene telledata.

H_1 -hypotesen vil derfor være at det er forskjell i gjennomsnittene mellom dosene, det vil si sammenheng mellom antall flått som festet seg til håndkledet og dosestyrke, noe som i dette tilfellet bygger sterkt opp under den praktiske forventningen.

Nullhypotesen H_0 vil her være at det ikke er noen forskjell i gjennomsnitt antall flått mellom dosene, noe som i praksis vil si at det ikke er noen forskjell i avstøtingseffekten på de ulike dosene.

Se fullstendig utregning i vedlegg 3 (som for øvrig som nevnt følger standarden satt i vedlegg 2).

2.6.1.3 Kjikvadratsanalyse av dosenivå og patogeninfeksjon

Frekvensen av patogeninfiserte/ikke infiserte flått i forhold til dosebruk skulle undersøkes, det vil si at det skulle undersøkes om det var noen større hyppighet av flått med en patogeninfeksjon på et behandlet håndkle kontra et ubehandlet håndkle.

Det ble kjørt kjikvadratsanalyser på dette med flere ulike kombinasjoner. Tabell 2-18 viser en oversikt over antall/prosentandel positive for de ulike kombinasjonene (tabellen er laget på grunnlag av data som kommer frem i resultat-delen av oppgaven). Forkortelsene for flåttmidlene Mygga Natural Spray (J2), Etono Myggspray (J6) og Autan Protection Spray (J9) er tatt i bruk.

Utregningene vises i vedlegg 4, og tok for seg følgende kombinasjoner;

- I. Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (J2, J6 og J9).
- II. Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og alle tre midlene (J2, J6 og J9).
- III. Alle resultater slått sammen for *N. mikurensis* og alle tre midlene (J2, J6 og J9).
- IV. Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *Borrelia spp.*
- V. Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *N. mikurensis*.
- VI. Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *Borrelia spp.*
- VII. Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *N. mikurensis*.
- VIII. Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *Borrelia spp.*
- IX. Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *N. mikurensis*.
- X. Alle resultater slått sammen for *Anaplasma phagocytophilum* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (J2, J6 og J9).

- XI. Resultater fra J2 (Mygga Natural Spray) og *Anaplasma phagocytophilum*.
- XII. Resultater fra J6 (Etono Myggspray) og *Anaplasma phagocytophilum*.
- XIII. Resultater fra J9 (Autan Protection Plus) og *Anaplasma phagocytophilum*.

Tabell 2-18 Oversiktstabell over positive flått/pool for de ulike kjikvadratskombinasjonene

Oversikt; positive flått for ulike analysekombinasjoner på patogeninfisering:					
Nr: Antall positive flått:					
	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt positive:	Totalt antall testede flått/pool:
I	33 (3,33)	58 (5,85)	6 (0,6)	97 (9,79)	990
II	25 (5,05)	44 (8,89)	5 (1,01)	74 (14,95)	495
III	8 (1,61)	14 (10,87)	1 (1,67)	23 (4,65)	495
IV	10 (6,06)	15 (9,09)	0 (0)	25 (5,05)	165
V	4 (2,42)	2 (1,21)	1 (0,61)	7 (4,24)	165
VI	8 (4,84)	21 (12,72)	4 (2,42)	33 (20)	165
VII	2 (1,21)	9 (5,45)	0 (0)	11 (6,67)	165
VIII	7 (4,24)	8 (4,84)	1 (0,61)	16 (9,70)	165
IX	2 (1,21)	3 (1,8)	0 (0)	5 (3,03)	165
X	5 (4,95)	11 (10,89)	2 (1,98)	18 (17,82)	101
XI	3 (8,82)	3 (8,82)	1 (2,94)	7 (20,59)	34
XII	1 (3,03)	4 (12,12)	0 (0)	5 (15,15)	33
XIII	1 (2,94)	4 (11,76)	1 (2,94)	6 (17,65)	34

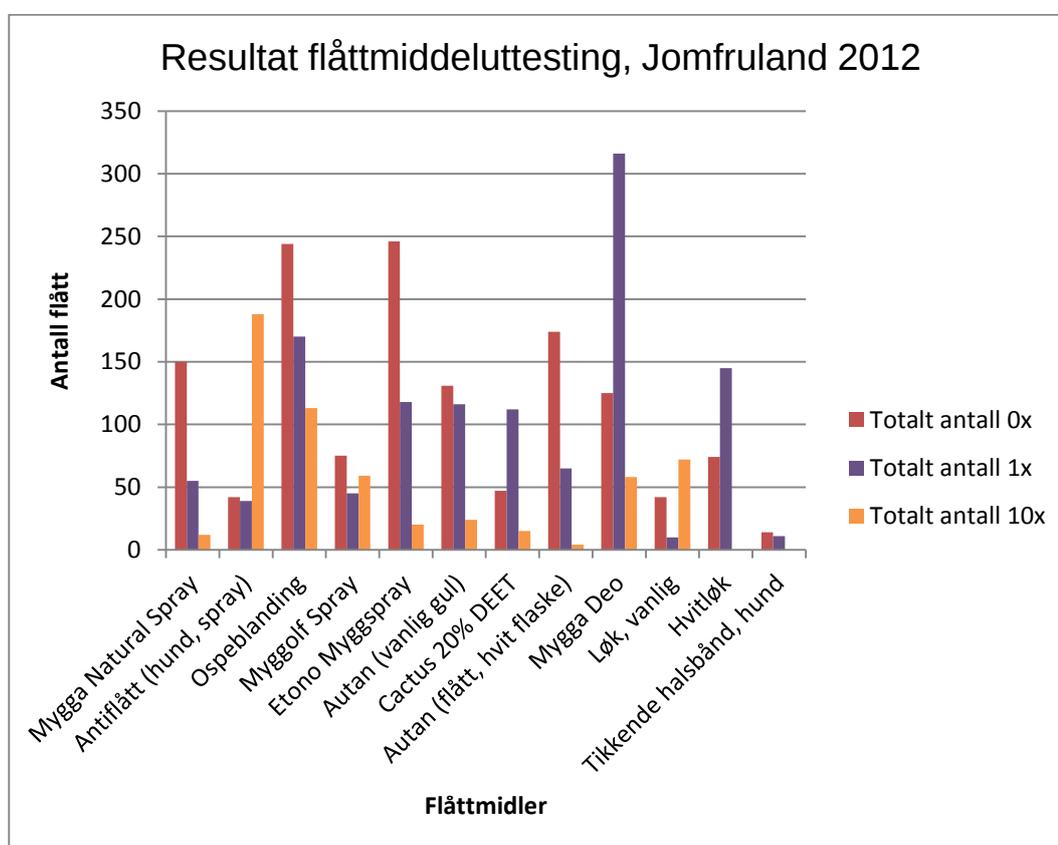
Antall enkeltflått i vanlig skrift, **pool i uthevet skrift.**
 Antall positive uten parentes, prosentandel positive i parentes.

3 Resultater

3.1 Resultater; Feltinnsamling av flått

Fra 12 testede midler mot flått ble det i September 2012 samlet inn totalt 3131 flått.

Figur 3-1 viser resultatene fra flåttinnsamlingen fremstilt i et søylediagram for hver enkelt dose og middel på Jomfruland, September 2012, og resultatet vises også som talldata (Tabell 3-1).



Figur 3-1: Resultater av uttesting av flåttmidler, Jomfruland, September 2012.

Ut ifra søylediagrammet ser spesielt Mygga Natural Spray, Etono Myggspray og Autan Protection Plus (hvit flaske) ut til å fungere på ønsket vis.

Ospeblanding og Myggolf Spray har også høyere antall flått på kontrollhåndkledet (0x) enn behandlet håndkle (10x).

Tabell 3-1: Resultater Jomfruland September 2012; antall flått på de ulike midlene/dosene

Antall flått på de ulike midlene/dosene:				
Middel:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt antall på alle doser:
Mygga Natural Spray	150	55	12	217
Antiflått (hund, spray)	42	39	188	269
Ospeblanding	244	170	113	527
Myggolf Spray	75	45	59	179
Etono Myggspray	246	118	20	384
Autan (vanlig gul)	131	116	24	271
Cactus 20% DEET	47	112	15	174
Autan Protection Plus (flått, hvit flaske)	174	65	4	243
Mygga Deo	125	316	58	499
Løk, vanlig	42	10	72	124
Hvitløk	74	145	*	219
Tikkende halsbånd, hund	14	11*	*	25
Totalt antall flått:	1364	1202	565	3131

*10x ble ikke gjennomført på hvitløk på grunn av for lite tid til rådighet. For tikkende halsbånd til hund ble det testet kun med et tikkende halsbånd på 1x, og 10x ble ikke gjennomført.

3.2 Resultater; Utvelgelse av flått for videre analyse av patogener

De tre utvalgte midlene som ut ifra Figur 3-1 så ut til å gi ønsket effekt, var Mygga Natural Spray med PMD (p-mentan-3,8-diol) som aktiv ingrediens, Autan Protection Plus (hvit flaske) med Icardin som aktiv ingrediens og Etono Myggspray med IR3535 som aktiv ingrediens. Ingen av de tre inneholdt DEET som er vanlig å bruke i flått- og insektsmidler (Kjelland et al., 2014, Helsenorge.no, 2013). Antall flått fra de ulike dosene vises i Tabell 2-1 under «Metoder».

3.3 Resultater; Ekstraksjon av DNA fra flått ved hjelp av amoniakkmetoden

Av de nevnte flåttene på Metode-delen, J2-146, J2-155, J2-159, J2-160, J2-163, J9-89 og J9-90, slo ingen av disse positive ut for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ei heller på *Neoehrlichia mikurensis*. For *Anaplasma phagocytophilum*, hvor DNA fra fem flått ble poolet sammen, slo det positivt ut for to av fire pool som inneholdt de nevnte flåttene. Her ble flått J2-146 (pool J2-P30x) og flått J2-159, J2-160 og J2-163 (pool J2- P33x) positive ved SYBR®Green testing, mens J2-155 (pool J2-P32x) og J9-89 og J9-90 (pool J9-P18) slo ut negativt.

3.4 Resultater; Pooling og fortytning av pool

Rør J2-47 var tørket bort ved pooling, og den tilhørte pool J2- P10x. Denne slo ut negativ for testing av *Anaplasma phagocytophilum* med SYBR®Green.

3.5 Resultater; Real- time PCR for påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Av 495 flått var 64 flått positive for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, en andel på 12,93 %.

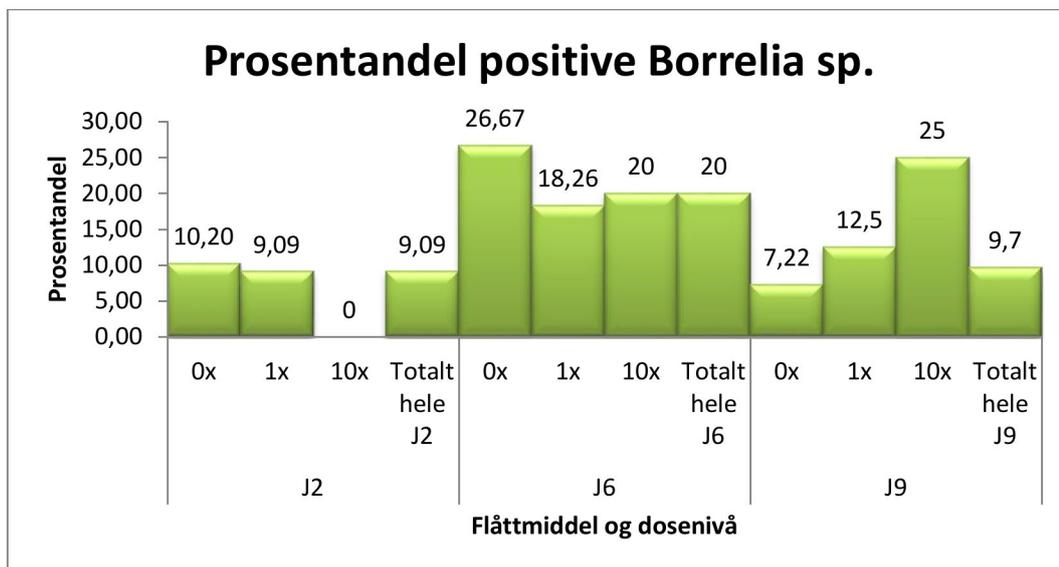
Det ble i første omgang kjørt real- time PCR med SYBR®Green på alle 495 flåttene, deretter ble positive resultater fra disse kjøringene testet på nytt med Taqman®Probe. Det ble også testet med Taqman®Probe på SYBR®Green-resultater som virket usikre/ hadde en Tm-topp på 85. Det ble kjørt kontroll med Taqman®Probe på totalt 205 flått. Av flått med positivt utslag fra SYBR®Green-kjøringen som hadde en Tm-topp på 85, var det 65 som ble testet med Taqman®Probe. Det var kun 1 av disse 65 med en Tm- topp på 85 som slo ut positivt på Taqman®Probe- kontrollen.

Kun positive for både SYBR®Green og Taqman®Probe ble regnet som positive, og av 205 positive fra SYBR®Green-kjøringen, ble kun 64 stk bekreftet positive med Taqman®Probe; altså av 495 testede flått var 64 positive for bakterien *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Resultatene vises oppsummert for real- time PCR påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato* for alle tre midlene, både som tabell (Tabell 3-2) og som søylediagram (Figur 3-2).

Tabell 3-2: Resultater for påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Resultater for påvisning av <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> , real- time PCR				
Middel:	Dose:	Antall flått testet:	Antall positive:	Prosentandel positive:
Mygga Natural Spray (J2)	0x	98	10	10,20 %
	1x	55	5	9,09 %
	10x	12	0	0 %
	Totalt J2	165	15	9,09 %
Etono Myggspray (J6)	0x	30	8	26,67 %
	1x	115	21	18,26 %
	10x	20	4	20 %
	Totalt J6	165	33	20 %
Autan Protection Plus (J9)	0x	97	7	7,22 %
	1x	64	8	12,50 %
	10x	4	1	25 %
	Totalt J9	165	16	9,70 %
Totalt:		495	64	12,93 %



Figur 3-2: Prosentandel positive for *Borrelia burgdorferi sensu lato*

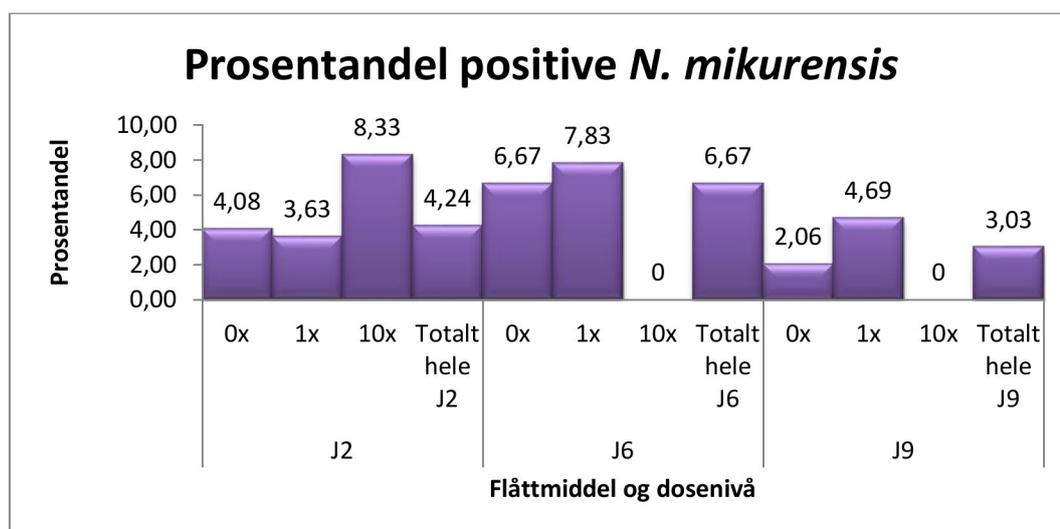
3.6 Resultater; Real- time PCR for påvisning av *Neoehrlichia mikurensis*

Av 495 testede flått var 23 positive for *Neoehrlichia mikurensis*, en andel på 4,64%.

Resultatene vises oppsummert for real- time PCR påvisning av *N. mikurensis* for alle tre midlene, både som tabell (Tabell 3-3) og som søylediagram (Figur 3-3).

Tabell 3-3: Resultater for påvisning av *Neoehrlichia mikurensis*

Resultater for påvisning av <i>Neoehrlichia mikurensis</i> , Real- time PCR				
Middel:	Dose:	Antall flått testet:	Antall positive:	Prosentandel positive:
Mygga Natural Spray (J2)	0x	98	4	4,08 %
	1x	55	2	3,63 %
	10x	12	1	8,33 %
	Total J2	165	7	4,24 %
Etono Myggspray (J6)	0x	30	2	6,67 %
	1x	115	9	7,83 %
	10x	20	0	0 %
	Total J6	165	11	6,67 %
Autan Protection Plus (J9)	0x	97	2	2,06 %
	1x	64	3	4,69 %
	10x	4	0	0 %
	Total J9	165	5	3,03 %
Totalt:		495	23	4,64 %



Figur 3-3: Prosentandel positive for *Neoehrlichia mikurensis*

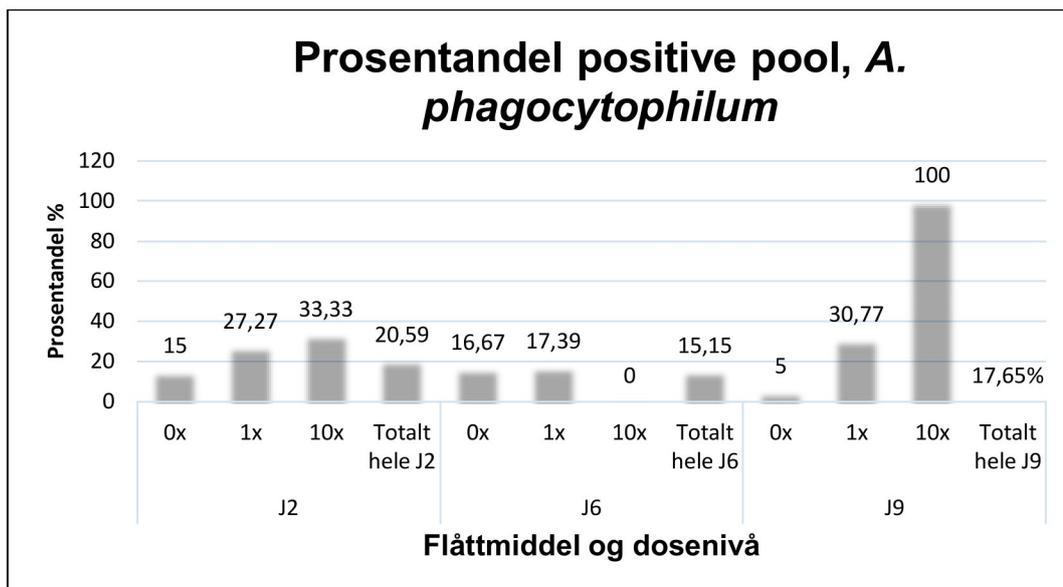
3.7 Resultater; Real- time PCR for påvisning av *Anaplasma phagocytophilum*

Av totalt 101 testede pool var 18 pool positive for *A. phagocytophilum*, en andel som utgjør 17,65%.

Nedenfor vises resultatene oppsummert for real- time PCR- påvisning av *A. phagocytophilum* for alle tre midlene, både som tabell (Tabell 3-4) og som søylediagram (Figur 3-4).

Tabell 3-4: Resultater for påvisning av *Anaplasma phagocytophilum*

Resultater for påvisning av <i>Anaplasma phagocytophilum</i>, Real- time PCR				
Middel:	Dose:	Antall pool testet:	Antall pool positive:	Prosentandel positive:
Mygga Natural Spray (J2)	0x	20	3	15,00 %
	1x	11	3	27,27 %
	10x	3	1	33,33 %
	Total J2	34	7	20,59 %
Etono Myggspray (J6)	0x	6	1	16,67 %
	1x	23	4	17,39 %
	10x	4	0	0 %
	Total J6	33	5	15,15 %
Autan Protection Plus (J9)	0x	20	1	5,00 %
	1x	13	4	30,77 %
	10x	1	1	100,00 %
	Total J9	34	6	17,65 %
Totalt:		101	18	17,82 %



Figur 3-4: Positive resultater for påvisning av *Anaplasma phagocytophilum*

3.7.1 Resultater; Individuell prevalenestimering fra pool

Resultatene fra kalkulatorutregningen for både usikker og sikker testssensitivitet- og spesifisitet ble en estimert prevalens av *Anaplasma phagocytophilum* hos utvalget på 495 individer på 3,2%. (Se Tabell 3-5 og Tabell 3-6).

Tabell 3-5: *A. phagocytophilum*; Resultatdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med ukjent sensitivitet og spesifitet.

Results	
Summary	
	Prevalence
Number +ve	18.000000
Est. Prevalence	0.032174
2.5 % CL	0.011658
97.5 % CL	0.052689
Std. Error	0.010467

Tabell 3-6: *A. phagocytophilum*; Resultatdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med kjent sensitivitet og spesifitet.

Results	
Summary	
	Prevalence
Number +ve	18.000000
Est. Prevalence	0.032174
2.5 % CL	0.014330
97.5 % CL	0.057237
Std. Error	0.010212

3.8 Resultater; Dosenivå og patogeninfisering

3.8.1 Resultater; Prosent positive på ulike doser for enten *Borrelia spp.* og/ eller *Neoehrlichia mikurensis*

Tabell 3-7 viser en oversikt over hvor mange av de testede flåttene på de forskjellige dosene som var positive for *Borrelia spp.* eller *N. mikurensis*.

Oversikten viser de samme tallene som er gitt i resultater for hver enkelt av de to patogenene, men er her satt sammen for sammenligningens skyld. Det er ikke tatt noen hensyn til et eventuelt overlapp, dry vil si om en flått er infisert med begge patogener eller kun det ene patogenet.

Tabell 3-7 viser at det for 0x- dosen var en prevalens av positive på 7,33%, på 1x- dosen var det en prevalens på 12,39% og på 10x- dosen 8,33%.

Tabell 3-7: Prosent positive for *Borrelia* spp. og/eller *Neoehrlichia mikurensis*

Middel:	Patogen:	Dose 0x:		Dose 1x:		Dose 10x:	
		Antall testet:	Antall positive:	Antall testet:	Antall positive:	Antall testet:	Antall positive:
Mygga Natural Spray (J2)	<i>Borrelia</i> spp..	98	10	55	15	12	0
	<i>N. mikurensis</i>	98	4	55	2	12	1
Etono Mygg-spray (J6)	<i>Borrelia</i> spp..	30	8	115	21	20	4
	<i>N. mikurensis</i>	30	2	115	9	20	0
Autan Protection Plus (J9)	<i>Borrelia</i> spp..	97	7	64	8	4	1
	<i>N. mikurensis</i>	97	2	64	3	4	0
Antall:		450	33	468	58	72	6
Prosent positive for et patogen:		7,33 %		12,39 %		8,33 %	

3.8.2 Resultater; Prosent positive på ulike doser for *Anaplasma phagocytophilum*

Nedenfor vises en oversikt i Tabell 3-8 over hvor mange av de testede poolene på de forskjellige dosene som var positive for *A. phagocytophilum*. Grunnet at det kun var *A. phagocytophilum* som ble poolet, er de ikke satt i sammenheng med resultatene vist i Tabell 3-7. Dette kan i stedet sees under resultater for syntetisk pooling.

10,87% av poolene var positive for 0x- dosen, 23,40% var positive for 1x- dosen og 25% var positive for 10x- dosen.

Tabell 3-8: Prosent positive pool for *Anaplasma phagocytophilum*.

Middel:	Patogen:	Dose 0x:		Dose 1x:		Dose 10x:	
		Antall pool testet:	Antall positive:	Antall pool testet:	Antall positive:	Antall pool testet:	Antall positive:
Mygga Natural Spray (J2)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	20	3	11	3	3	1
Etono Myggspray (J6)		6	1	23	4	4	0
Autan Protection Plus (J9)		20	1	13	4	1	1
Antall pool:		46	5	47	11	8	2
Prosent positive:		10,87 %		23,40 %		25 %	

3.9 Resultater; Syntetisk pooling

3.9.1 Positive resultater fra syntetisk pooling

Syntetisk pooling for *Borrelia spp* ga et resultat på 44 positive pool av 101 testede (43,56%), syntetisk pooling for *N. mikurensis* ga 20 positive pool av 101 testede (19,80%), og reell pooling av *A. phagocytophilum* som ga 18 positive pool av 101 testede (17,82%), se Tabell 3-9.

Ser man på Tabell 3-10, ser man at 13 pool var positive både for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, og 7 pool var positive for både *Borrelia spp.* og *A. phagocytophilum*. 6 pool var positive for både *N. mikurensis* og *A. phagocytophilum*, og 5 var positive for alle tre patogenene.

Av flått som faktisk var bekreftet positive for både *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* (ettersom syntetisk pooling er en «kunstig» estimering), var det kun 7 flått av 495 som var infisert med begge. *A. phagocytophilum* ble ikke tatt med i den beregningen, da den ikke ble testet for individuell flått. Flått nr J2-52, J6-7, J6-13, J6-68, J6-129, J6-139 og J9-159 var de dobbeltinfiserte flåttene.

Tabell 3-9: Resultater; Syntetisk pooling av *Borrelia spp.*, *N. mikurensis* og *A. phagocytophilum*.

			<i>Borrelia spp.</i>		<i>N. mikurensis</i>		<i>A. phagocytophilum</i>	
Middel:	Dose:	Antall pool:	Antall positive pool:	Prosentandel positive pool:	Antall positive pool:	Prosentandel positive pool:	Antall positive pool:	Prosentandel positive pool:
Mygga Natural Spray (J2)	0x	20	8	40%	4	20%	3	15%
	1x	11	3	27,27%	2	18,18%	3	27,27%
	10x	3	0	0%	1	33,33%	1	33,33%
Etono Myggspray (J6)	0x	6	5	83,33%	2	33,33%	1	16,67%
	1x	23	13	56,52%	7	30,43%	4	17,39%
	10x	4	3	75%	0	0%	0	0%
Autan Protection Plus (J9)	0x	20	6	30%	1	5%	1	5%
	1x	13	5	38,46%	3	23,08%	4	30,77%
	10x	1	1	100%	0	0%	1	100%
Total:		101	44	43,56%	20	19,80 %	18	17,82 %

Tabell 3-10: Syntetisk pooling; overlappende positive pool, resultater

Syntetisk pooling; overlappende positive pool, resultater:		
Kombinasjoner	Antall pool:	Prosentandel:
Antall pool testet totalt på J2, J6 og J9:	101	
Positive for både <i>Borrelia spp.</i> og <i>N. mikurensis</i> :	13	12,87 %
Positive for både <i>Borrelia spp.</i> og <i>A. phagocytophilum</i>	7	6,93 %
Positive for <i>N. mikurensis</i> og <i>A. phagocytophilum</i>	6	5,94 %
Positive for alle tre patogener:	5	4,95 %

3.10 Resultater; Statistiske analyser

3.10.1 Resultater; Flåttmiddel og dosenivå; kjiqvadratsanalyse

3.10.1.1 Resultater; 1-veis ANOVA av dosenivå, flåttmiddel J2, Mygga Natural Spray

Den utregnede F-verdien (663,89) er ved $df_{\text{between}}=2$ og $df_{\text{within}}=6$ større enn P-verdien i tabell (se vedlegg 2 for fullstendig utregning) ved både $\alpha=0,05$ (P-

verdi = 5,14) og $\alpha=0,01$ (P-verdi= 10,9), og det er derfor en signifikant forskjell mellom de ulike dosene.

3.10.1.2 Resultater; 1-veis ANOVA av dosenivå, alle flåttmidler

Den utregnede F-verdien (13,03) er ved $df_{\text{between}}=2$ og $df_{\text{within}}=24$ større enn P-verdi i tabell (se vedlegg 3 for fullstendig utregning) ved både $\alpha=0,05$ (P-verdi = 3,4) og $\alpha=0,01$ (P-verdi = 5,61), og det er en signifikant forskjell mellom de ulike dosene.

3.10.2 Resultater; Dosenivå og patogeninfisering

Av de 13 ulike kombinasjonskvikvadratsanalysene av de tre flåttmidlene J2 (Mygga Natural Spray), J6 (Etono Myggspray) og J9 (Autan Protection Plus) og patogenene *Borrelia spp.*, *Neoehrlichia mikurensis* og *Anaplasma phagocytophilum*, var det 4 av analysene som ga et sterk statistisk signifikant resultat. Det var nr I, nr II, nr IV og nr XIII.

Nr I og nr II var begge analyser gjort på resultater fra alle tre midlene. Nr I, «Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (J2, J6 og J9).» hadde et signifikansnivå på 0,025, og nr II «Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og alle tre midlene (J2, J6 og J9)» hadde et signifikansnivå på 0,01.

Nr IV «Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *Borrelia spp.*» hadde et signifikansnivå på 0,01, og nr XIII «Resultater fra J9 (Autan Protection Plus) og *Anaplasma phagocytophilum*» hadde et signifikansnivå på 0,025.

Samtlige av de resterende analysene hadde et signifikansresultat på 0,9, noe som ikke er sterkt nok til å underbygge noen påstander. Oversikt over alle resultatene er gitt i Tabell 3-11. Utregningene vises i vedlegg 4.

Tabell 3-11: Resultater, dosenivå og patogeninfisering, kjikvadratsanalyse.

Oppsummerte resultater; dosenivå og patogeninfisering.			
Nr:	Analyse:	Største signifikansnivå (α):	Signifikant resultat?
I.	Alle resultater slått sammen for <i>Borrelia</i> spp og <i>N. mikurensis</i> og de tre midlene det ble kjørt real-time PCR på (J2, J6 g J9).	0,025	Ja
II.	Alle resultater slått sammen for <i>Borrelia</i> spp og alle tre midlene (J2, J6 og J9).	0,01	Ja
III.	Alle resultater slått sammen for <i>N. mikurensis</i> og alle tre midlene (J2, J6 og J9).	0,9	Nei
IV:	Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og <i>Borrelia</i> spp.	0,01	Ja
V:	Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og <i>N. mikurensis</i> .	0,9	Nei
VI:	Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og <i>Borrelia</i> spp.	0,9	Nei
VII:	Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og <i>N. mikurensis</i> .	0,9	Nei
VIII:	Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og <i>Borrelia</i> spp.	0,9	Nei
IX:	Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og <i>N. mikurensis</i> .	0,9	Nei
X:	Alle resultater slått sammen for <i>Anaplasma phagocytophilum</i> og de tre midlene det ble kjørt real-time PCR på (J2, J6 og J9).	0,9	Nei
XI:	Resultater fra J2 (Mygga Natural Spray) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	0,9	Nei
XII:	Resultater fra J6 (Etono Myggspray) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	0,9	Nei
XIII:	Resultater fra J9 (Autan Protection Plus) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	0,025	Ja
	Flåttmiddelforkortelser: J2: Mygga Natural Spray J6: Etono Myggspray J9: Autan Protection Plus		

4 Diskusjon

4.1 Flagging

Den første delen av oppgaven tok for seg uttesting av flåttmidler ved hjelp av flagging i vegetasjonen på Jomfruland. Forventningen var at flere flått skulle feste seg på kontrollhåndkledene som ikke var påført flåttmiddel enn håndklær som var påført flåttmiddel, og enda færre flått skulle feste seg på håndklær som var påført ekstra mye middel.

Etter endt felt, ble antall flått ført opp i både søylediagram (Figur 3-1) og tabell (Tabell 3-1) for en oppsummerende oversikt over resultatene.

Flagging som en metode å teste ut flåttmidler på, har både fordeler og ulemper.

Noen av fordelene var at man kan teste ut ulike midler og telle antall festede flått uten å utsette levende vesener for flått og midler. Det er en potensiell fare for smitte ved bitt, og bruk av et håndkle gjør det hele mer kontrollerbart. Høy eksponering for flåttmidler slik det hadde blitt i denne oppgaven om det hadde blitt testet på folk i stedet for håndklær ville også potensielt ha vært uheldig med tanke på mulig overeksponering av ulike kjemiske komponenter (Semmler, Abdel- Ghaffar, Al- Rasheid & Mehlhorn, 2010).

Det var en svært økonomisk rimelig måte å teste ut midler på; det krevde i utgangspunktet enkelt utstyr som en stang (kosteskraft, passende gren etc), hvitt frottéhåndkle, pinsett og beholdere med sprit til oppbevaring av den innsamlede flåtten (om man ønsket å undersøke flåtten senere, vel og merke).

Det var lett å gjennomføre; det stilte særs lite krav til fysisk form hos den som utførte flaggingen. Lett gåing og lett vibrerende sleping av håndkledet over vegetasjonen var alt som skulle gjennomføres, samt også avplukkingen. Det hvite frottéhåndkledet gjorde det lett for flåtten å feste seg, og det var lett å se flåtten og å plukke den av.

Man kan også, med mer tid til rådighet, utføre forsøkene over lenger perioder, da ved å gjenta forsøket med samme middel på samme lokalitet for å få mer data.

Sider ved denne metoden som er mer negative og uforutsigbare, er at den i all hovedsak utføres i felt. I felt er det ofte tilfeldigheter og uregelmessigheter som kan påvirke resultatene. Vær og vind kan ingen styre. Man kan riktignok velge å ikke utføre flagging i dårlig vær, men ved begrenset tid på en lokalitet blir man tvunget til å gjennomføre flagging selv når forholdene ikke er optimale, værmessig sett.

Antall flått langs en sti kan være rent tilfeldig. Flåttene kan være «klumpete» spredt langs lokaliteten, jevnt spredd, eller nesten ikke tilstedeværende i det hele tatt. Derfor må man gå ut i fra at det over en lenger strekning vil jevne seg ut i forhold til de andre lokalitetene man tester på.

Metoden er, selv om den er lett å gjennomføre, svært tidkrevende. I dette forsøket gikk det med 3 timer i ren flaggtid per middel, dette kom i tillegg til all den tiden det tok å komme seg til lokaliteten, plukke av flått, telle og loggføre den. Jo flere personer som er med på gjennomføringen, vil tidsbruken minke og også eventuelle endringer i temperatur og vær fra start til slutt av test av middelet. Det som derimot er ulempen med at flere personer er med på undersøkelsen, er at det kan bli (store eller små) forskjeller i utførelsen av selve flaggingen (gangehastighet, viftfrekvens etc), og under selve plukkingen av flått (noen er mer nøyaktige enn andre ved telling etc). Dette antas av undertegnede å utgjøre minimale forskjeller, men er likevel en faktor som kan tas hensyn til. Det bør i slike tilfeller være slik at hver person har separate oppgaver, slik at hver enkelt del av oppgaven blir gjennomført med størst mulig likhet. Dette er, så langt det lar seg gjøre i felt, et skritt i retning på å få til god forsøksdesign hvor uniformitet er tingen.

Kort oppsummert er flagging en lett gjennomførbar og god måte å gjøre en feltundersøkelse på flåttmidlers virkning.

4.2 Flåttmidler, resultater og virkestoffer

I denne delen av diskusjonen sees det på resultater av hvilke flåttmidler som lot til å fungere og hvilke som ikke fungerte og hva virkestoffet (aktive ingrediens) deres var, hvilke av kjemiske eller essensielle virkemidler som fungerte best og

hvordan dette matcher andre undersøkelser på temaet. Det blir også diskutert eventuelle feilkilder og mulige årsaker til de ulike resultatene.

4.2.1 Resultater fra uttestingen

Midler som rent tallmessig ga forventede verdier, det vil si høyere antall flått på kontrollhåndkledet enn behandlet håndkle, var Mygga Natural Spray (0x: 150, 1x: 55, 10x: 12), Etono Myggspray (0x: 246, 1x: 118, 10x: 20), Autan (vanlig gul) (0x: 131, 1x: 116, 10x: 24) og Autan Plus (hvit flaske) (0x:174, 1x: 65, 10x: 4). Ospeblanding hadde også resultater som var i henhold til forventningene (0x: 244, 1x: 170, 10x: 113).

Enkelte av midlene ga imidlertid et mer uventet resultat, hvor det ble telt flere flått på håndkledet som ble behandlet enn kontrollhåndkledet, eksempelvis Cactuz 20% DEET (0x: 47, 1x: 112, 10x: 15). Her kom det over dobbelt så mange flått på det behandlede håndkledet enn kontrollhåndkledet. Det samme gjaldt for Mygga Deo (0x: 125, 1x: 316, 10x: 58). På begge disse flåttmidlene er det imidlertid mindre flått på håndkledene som er behandlet med 10x- dose, noe som var innenfor det forventede. Også på hvitløk ble det talt flere på det behandlede håndkledet enn kontroll håndkledet (0x: 74 mot 1x: 145). Her ble det ikke testet en 10x- dose.

Spray til hund (Anti-Flått) ga et resultat som var i helt motsatt ende av skalaen, her var det tilnærmet ingen forskjell mellom 0x- og 1x- dose (42 mot 39), mens det var 188 flått på håndkledet som var behandlet med 10x- dose.

Imidlertid var det av midlene det ble testet en 10x- dose på (10 midler) kun to som hadde flere festede flått på 10x- håndkledet enn kontrollhåndkledet. Det var nylig nevnte Anti-Flått for hund (0x: 42 og 10x: 188) og vanlig løk (0x: 42, 10x: 72). Bortsett fra disse to hadde alle færre flått på det overdoserte håndkledet enn kontrollhåndkledet. Dette var forventet, og kan tyde på at en sterkere dose hindrer flere flått fra å feste seg.

Myggolf Spray hadde riktignok flere flått på kontrollhåndkledet enn både 1x og 10x, men her var antallet på de ulike dosene ikke veldig sprikende, så det var ikke lett å se en klar skilnad (0x: 75, 1x: 45, 10x: 59).

4.2.2 Virkestoffer

De aktive ingrediensene i flåttmidlene (se vedlegg 1 for ingrediensoversikt) som ga forventede resultater var icaridin 20% (191 mg/ml) for begge Autan-produktene. For Mygga Natural Spray var det ikke oppgitt hva som var den aktive ingrediensen, men resten av ingrediensene besto av vekstoljer fra blant annet av lavendel, geranium og roser. Den inneholdt også alkoholer, i likhet med Autan-produktene. Icaridin er i flere undersøkelser slått ut som et effektivt middel mot flått (Lupi et. al, 2013, Semmler et. al. 2010). Etono Myggspray inneholdt IR3535, et syntetisk middel som er et godt dokumentert med effektiv virkning mot insekter og også flått (Lupi et al., 2013).

I ospebladene finnes glykosidet tremuloidin, som kan spaltes til glukose og salgenin, som igjen kan omdannes videre til salisysyre (Urtekilden, 2013). Selv om ospebladene tilsynelatende gir færre flått ved behandling, og enda færre ved ekstra sterk dose, var det likevel totalt sett svært mange flått i forhold til resultatene både hos begge Autan-produktene og Mygga Natural Spray, noe som trekker ned helhetsinntrykket av ospeblader som et godt, alternativt middel mot flått. Det ble for øvrig ikke funnet noe litteratur på at innholdet i ospeblader har noen preventiv effekt mot flått.

Av de tre midlene som inneholdt aktiv ingrediens DEET (Myggolf Spray, Cactuz 20% DEET og Mygga Myggmelk, Roll- On), var resultatene ikke i henhold til hvordan de i utgangspunktet skal virke. Myggolf Spray hadde som nevnt ovenfor forholdsvis likt antall flått, det vil si ingen klar skilnad mellom dosene, og Cactuz 20% DEET hadde et uventet resultat med over dobbelt så mange flått på 1x-håndkledet enn kontrollhåndkledet. I tillegg gikk det drastisk ned igjen på 10x-håndkledet (0x: 47 ,1x: 112, 10x: 15). Mygga Myggmelk Roll-On (referert til i tabell og diagram som Mygga Deo) hadde også en høyere andel flått på 1x-håndkledet enn kontrollhåndkledet, og gikk i likhet med Cactuz 20% DEET mye ned igjen i antall flått på 10x- håndkledet. Det skal likevel nevnes at antall flått på 10x-dosen for samtlige flåttmidler med DEET var lavere på enn antall flått på kontrollhåndkledet. Dette stemmer med Semmler et al., fra 2010 som konkluderer med at DEET trenger en høy konsentrasjon for å fungere optimalt, dog over lenger tid. I denne oppgaven ble det bare testet for en time totalt, til nød 2 timer

om man tar med tiden som gikk med til telling og registrering mellom flaggingsintervallene. Imidlertid viste en annen undersøkelse at produkter med DEET-innhold høyere enn 25% ikke hadde noen nevneverdig bedre effekt enn lavere konsentrasjoner, og igjen, dette blir nevnt som mer trygt i henhold til helse (Lupi et. al, 2013), men i denne oppgaven ser altså en høy dose av DEET ut til å fungere, dog det var feilkilder tilstede for de involverte midlene.

Flåttmidlene som inneholdt virkemidler som først og fremst var essensielle oljer og naturprodukter, så ikke ut til å fungere. Anti- Flått var så godt som jevn i antall flått på kontrollhåndkledet kontra normalbehandlet håndkle, mens det samtidig var et nesten femdobbel antall flått på håndkledet som var behandlet med 10x-dose. Middelet påstår at tilsetningsstoffet kattermynte skal erstatte DEETs effekt, noe det ikke later til å gjøre i denne undersøkelsen, heller tvert om.

Løk og hvitløk så heller ikke ut til å ha noe for seg. Hos hvitløk var det nesten dobbelt så mange flått på det behandlede håndkledet enn kontrollhåndkledet, og på vanlig løk var det svært ujevnt (0x: 42, 1x: 10, 10x: 72). Det skal imidlertid sies at både hvitløk og vanlig løk ble testet på et senere tidspunkt på døgnet enn for de fleste andre midlene, mellom kl 17 og kl 20 på kvelden, og det var mer fukt i vegetasjonen som følge av kveldsdugg. Om dette hadde noe nevneverdig å si for resultatene, blir rene spekulasjoner her.

Mygga Natural Spray inneholdt hverken DEET eller icaridin, men PMD som er utledet av essensielle oljer fra eukalyptustrær (Carroll og Loye, 2016). Dette middelet så ut til å fungere svært bra, og er unntaket fra de andre midlene med syntetiske virkestoffer fremfor naturlige oljer. Det er gjort undersøkelser som sammenligner flåttmidler fra både kjemiske og biologiske stoffer. En undersøkelse fra 2010 (Semmler et al.) viste at midler med ekstrakter fra essensielle oljer for det meste var ineffektive, mens undersøkelsen gjort av Nerio et al. i 2008 er positive til bruk av naturlige midler, og mener effekten, som tilsynelatende minker fortere hos naturlige midler enn ved syntetiske midler, kan fås til å vare lenger med ulike tilsetningsstoffer. Artikkelen deres fremhever også bekymringen for miljø og helse ved bruk av syntetiske stoffer til bekjempelse mot flått og insekter.

For å kommentere kort det tikkende halsbåndet som skulle ha en hørbar lyd som ville skremme bort flåtten, så vil det ut i fra resultatene virke som om dette ikke har noe for seg i det hele tatt. Det var riktignok 14 på kontrollhåndkledet og 11 på håndkledet som hadde det tikkende halsbåndet hengende ved seg, men totalt sett var det få flått, og i praksis ingen forskjell mellom «behandlet» og «ubehandlet» håndkle. Halsbåndet ble tatt med mest for nysgjerrighetens skyld, og den slo ikke ut som noe det var verdt å kikke nærmere på.

4.2.3 Feilkilder under feltøkt og uttesting av flåttmidler

Før det diskuteres videre på resultatene til disse flåttmidlene, vil det bli gitt noen kommentarer på mulige feilkilder under selve feltøkten.

Feilkilder her kan være flere ulike faktorer. Undersøkelser som dette bør gjøres på så like premisser som mulig, det vil si at forholdene for hvert enkelt flåttmiddel burde være uniforme. Men ettersom dette var en feltundersøkelse, var det ikke mulig å gi alle midler helt like utgangspunkt, selv om det ble gjort mye for å unngå de verste ulikhetene. Samtidig skal man også huske på at det er i naturen folk oppholder seg når de benytter flåttmidlene, og her vil tilfeldigheter alltid spille inn, i henhold til både lokalitet, vær, klima og selvfølgelig også utbredelsesgraden av flåtten.

Vegetasjonen ble holdt så lik som mulig, med samme type stier og i samme skog. Flere av stiene lå i nærheten av hverandre, dog aldri så det ble overlapp. Det ble heller ikke overlapp på hver sti mellom håndklær med ulik dose. Likevel var det ikke 100% like vegetasjon for hver sti, noe som kan være med på å gi en ujevnhet til resultatene.

Selv om vær og temperatur for det meste var svært lik fra dag til dag, var det noen få unntak. Lokaliteten hvor middelet Myggolf Spray (virkestoff DEET) ble testet, var preget av mye regn tidligere på dagen. Det gikk to timer fra det sluttet å regne til det ble begynt å flagge, men det var fremdeles vått i vegetasjonen slik at håndkledet ble tungt av fukt. Det var i tillegg litt mindre gressvegetasjon her enn andre steder. Det kan potensielt ha hatt store påvirkninger på utfallet av testen, da flått ikke trives i regnvåte omgivelser, og kan være årsaken til det nokså jevne resultatet på de ulike dosene på Myggolf Spray. Det ble ikke testet med Myggolf

Spray på en annen lokalitet ved en annen anledning når det var tørt pga tidsmangel.

På lokaliteten hvor det ble testet for Cactuz 20% DEET var det litt annerledes vegetasjon enn flere av de andre lokalitetene. Den var tilnærmet lik, men med noen flere spredte områder hvor det var lite gress langs stien. Det var noe mindre buskvegetasjon langs 0x- siden av stien enn 1x-siden, dette kan være en mulig forklaring på hvorfor det kom mer flått på 1x-dosen enn 0x-dosen, hvor man ville anta at skulle være omvendt. Men samtidig var dette et område hvor det beitet kyr mens flaggingen ble gjennomført. Et område med vertsdyr vil jo ha en høy sannsynlighet for mye tilstedeværelse av flått, enten det satt på gressvegetasjonen, eller i den noe høyere buskvegetasjonen. Kan det da ha vært en mulighet for at en høyere andel av flåtten har satt seg på vertsdyrene enn på de andre lokalitetene?

4.3 Hvilken flåttmidler synes å virke og hvilken synes ikke å virke?

Sett totalt under ett, når resultatene fra samtlige midler blir lagt sammen på de ulike dosene (regnet både med og uten hvitløk som ikke hadde noen 10x-dose og tikkende halsbånd for hund), ser man at flåttmidler virker i henhold til forventningene om lavere antall festede flått i takt med sterkere dose (Alle midler lagt sammen; 0x: 1364, 1x: 1202, 10x: 565). Samlet sett ser man også at en ekstra sterk dose, 10x, fungerer best.

Det ble også gjort ulike statistiske analyser som så på om det var en signifikant forskjell mellom dosene. Samtlige av disse bygger opp under påstanden om at flåttmidler virker.

En 1-veis ANOVA som kun tok for seg resultater på dosetyrke på middel J2, Mygga Natural Spray (se vedlegg 2), slo ut som statistisk signifikant for forskjeller mellom doser med $\alpha=0,01$, og en annen 1-veis ANOVA som tok for seg alle flåttmidlene, med unntak av løk, hvitløk og tikkende halsbånd (se vedlegg 3), kom også ut som statistisk signifikant på forskjell mellom doser ($\alpha=0,01$).

Ospeblanding slo godt ut hva gjelder antall minkende flått ettersom dosen ble sterkere, men som nevnt tidligere i diskusjonen var det så mange flått der i forhold

til andre midler som tilsynelatende fungerte like bra, men som samtidig hadde et mindre antall flått totalt. Dette kan selvfølgelig skyldes tilfeldigheter ute i felten, det vil si at ospeblandingen ble testet ut i et område hvor det var mye flått, og den kan være verdt å teste ut videre.

Det var tre midler som skilte seg ut på en bra måte, og som med høy sannsynlighet kan brukes med fordel om man ikke å få flått på kroppen. Etono Myggspray hadde en jevn minking i antall flått fra kontrollhåndkledet til sterkere dose. Det var et enda jevnere resultat mellom Mygga Natural Spray og Autan Protection Plus Pumpspray (hvit flaske), og disse to hadde i tillegg et lavere total antall flått enn Etono. Som nevnt med ospeblandingen; dette kan være en ren tilfeldighet fra naturens side med tanke på spredningen av flått, men det var disse resultatene det ble handlet videre ut i fra.

Når det gjelder hvilken dose som synes å være den beste, er det ut i fra denne oppgaven den sterkeste dosen, 10x. Men det må det tas med i vurderingen at dette er håndklær som er slept bortetter vegetasjonen. Antallet flått er de som har heklet seg på i løpet av den ene timen det ble flagget (lagt sammen etter intervallene). Hvordan folk oppholder seg i naturen på, vil variere fra person til person. En jeger vil muligens bevege seg mer i terreng med høyere vegetasjon og utråkkede løyper enn en «søndagsturgåer», som kanskje i større grad følger opptråkkede stier med lavere kantvegetasjon og i det hele tatt mindre kontakt med kantvegetasjon. Jo mindre kontakt med vegetasjonen, jo mindre sjanse for at en flått fester seg. Rent effektmessig vil det utfra disse resultatene være mindre sjanse for flått ved høyere doser enn ved vanlige doser. Men, det bør tas med i vurderingen at det kan være helseskadelig med høye doser (Semmler et al., 2010, Nerio et al., 2009), men ser man bort i fra eventuelle bivirkninger av for mye flåttmiddel, vil en sterkere dose ha en større frastøtingseffekt.

Ut i fra rene talldata later det til at man fra de utprøvde flåttmidlene kan velge fritt mellom de tre nevnte flåttmidlene Etono Myggspray, Mygga Natural Spray og Autan Protection Plus Pumpspray (hvit flaske).

Men oppgaven tok også for seg hvilke patogener som kunne finnes i flått fra hver enkelt middel, og også om en eventuell infisering gjør at flåtten reagerer på en

uheldig måte på visse midler. Vil da «anbefalingene» fra uttestingsdelen av oppgaven holde?

4.4 Påvisning av patogeninfisering

Først og fremst må det nevnes en potensiell feilkilde her. Ideelt sett skulle det tas 65 flått for hver dose, men dette var ikke mulig i alle tilfellene, da det på noen av dosene ikke var samlet inn nok flått til å fylle opp helt. Det blir derfor et noe urettferdig utgangspunkt som kunne gå ut over resultatet, men det ble utlignet så godt det lot seg gjøre. Dette er en ulempe med feltundersøkelse. Oversikten over antall flått som ble testet, sees i Tabell 2-1. Jo høyere antall man får undersøkt, desto mer korrekt data kommer inn, og i tabellen ser man at det spesielt for 10x-dosen ble samlet inn få flått (Mygga Natural Spray; 12 stk, Etono Myggspray; 20 stk, Autan Protection Plus; 4 stk.).

4.4.1 Prevalens av ulike patogener

Av 495 testede flått var 64 av dem infiserte med *Borrelia burgdorferi sensu lato*, en prevalens på 12,93%.

Som nevnt i innledningen, er prevalensen av *Borrelia spp.* varierende, avhengig av hvor i landet man er. Det ble nevnt alt i fra prevalens i fra 13,6% (Hasle et. al., 2010) helt opp til 20-30 % (Ljøstad og Mygland, 2008) for nymfer, og resultatet i denne oppgaven ser ikke ut til å avvike fra denne spredningen.

Ser man imidlertid på prevalensen for hver av de tre flåttmidlene som ble testet for patogener (J2; Mygga Natural Spray, J6; Etono Myggspray og J9; Autan Protection Plus), ser man at den hadde henholdsvis 9,09% for J2 og 9,70% for J9, mens den var opp i hele 20% hos flått testet fra J6.

Neoehrlichia mikurensis hadde en prevalens på 4,64% (23 av 495 flått). Dette var også innenfor resultatene av andres funn, som varierte fra 2-3% til 12,5 % (Jenkins og Kristiansen, 2013). Ser man på prevalensen hos hver av de tre flåttmidlene, finner man at Mygga Natural Spray har 4,24% og Autan Protection Plus har 3,03, mens Etono Myggspray har, som hos *Borrelia spp.*, den høyeste prevalensen med 6,67%.

Anaplasma phagocytophilum ble poolet, og det er derfor ikke like lett å sammenligne med resultater fra andre artikler, eller resultatene fra *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* i denne oppgaven. Resultatet i denne oppgaven ble 18 positive pool av 101 testede (totalt 495 flått), hvilket tilsvarer 17,65%. Imidlertid ble det brukt en prevalenskalkulator fra Epitools (se 2.3.3.6) som viste en estimert prevalens på 3,2%, både med kjent og ukjent spesifisitet og sensitivitet. Dette var også helt i tråd med hva som ble funnet i andre artikler fra 2,83% (Tveten, 2014) til 6% (Stuen og Bergström, 2008).

4.4.2 Syntetisk pooling

Å bruke prevalenskalkulatoren til å estimere individuell prevalens kan nok være en bedre metode enn å bruke syntetisk pooling på individuelle resultater. Resultatet for syntetisk pooling i denne oppgaven av *Borrelia spp.* var på 43,56% og *N. mikurensis* på 19,80%. Det kan derfor ved første øyekast se ut som om det er en høy frekvens av patogenene, mens det i virkeligheten ikke er fullt så høyt. I tillegg ble det også laget en oversikt over (Tabell 3-10) hvilke av de syntetiske poolene og *A. phagocytophilum*- poolene som var infisert med både *A. phagocytophilum* og/eller *N. mikurensis* og *Borrelia spp.* Dette kan gi et skjevt bilde av hvor mye dobbel-/ multiinfeksjon det er. Eksempelvis viste den syntetiske pooling at det var 12,87% av poolene som var infisert av både *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, mens det faktisk bare var 7 av 495 flått som var positive for begge, noe som bare tilsvarer 1,4%. For øvrig var 5 av de 7 dobbeltinfiserte flått som ble samlet inn med bruk av Etono Myggspray (J6). Syntetisk pooling ble i denne oppgaven i første omgang brukt som en måte å kunne sammenligne resultater fra alle tre patogenene, men viste seg å være en metode som ikke tilfredstilte forventningene.

4.4.3 Dobbeltinfisering

Dobbelt- eller multiinfeksjon av patogener er for øvrig ikke ukjent, og har blitt påvist og målt flere steder. (Zhao et.al, 2013). Dobbeltinfisering med *A. phagocytophilum* og *Babesia microti* (et flåttpatogen som ikke har blitt testet i denne oppgaven), ble funnet med en prevalens fra 0,9% til 2% (Adelson et al., 2004, Holman et al., 2004). Richter og Matuschka (2011) fant en

dobbeltinfiseringsprevalens på 1,8% av *Borrelia afzelii* og *Neoehrlichia mikurensis*. Dette samsvarer med resultatene fra denne oppgaven, 1,4 % dobbeltinfeksjon med *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*. Imidlertid kan man lure på om real- time PCR- analysen har avdekket alle flått som var dobbeltinfiserte i denne oppgaven, da det ikke er utenkelig at flåtten kan være infisert med ulike patogener, dog i så liten mengde at det ikke blir oppdaget/ når høye nok verdier på CT-skalaen på real- time PCR-analysen (Belova et al., 2012).

Hvorvidt i hvilken grad en dobbel- eller multiinfeksjon påvirker flåtten, går det imidlertid ikke videre inn på i denne oppgaven. Da det bare var 7 av 495 flått (1,4%) som var infisert med både *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, ga det ikke spesielt mye data å eventuelt arbeide videre på. Imidlertid var ingen av de 7 fra en 10x- dose. 5 av dem var fra 1x- dose og 2 av dem var fra 0x- dose.

4.4.4 Patogeninfisering og dosebruk

Det er ut i fra denne oppgaven, på en generell basis, tydelig at flåttmidler har noe for seg. Det må riktignok være av den riktige typen, da det i denne oppgaven ble sett at flere av midlene ikke ga det ønskede frastøtingsresultatet.

Neste punkt på listen vil da være at det er interessant å se om det er en større hyppighet av infiserte flått på noen av dosene enn andre, og forøvrig også om det gjelder for noen konkrete midler, eller kun bare for dosestyrken.

Det kunne også ha vært interessant å gjort analyser prevalensnivået på de forskjellige dosene på de andre dosene som ga uventede resultater. For eksempel ble det på Myggolf Spray funnet omtrent like mange flått på kontrollhåndkledet (75 flått) som det overdoserte 10x-håndkledet (59 flått) og for løk ble det funnet nesten dobbelt så mange på det overdoserte håndkledet (72 flått) som kontrollhåndkledet (42 flått). Her er allerede mulige feilkilder diskutert, og det kan kun gjøres spekulasjoner på de resterende flåttmidlene, ettersom det ikke ble gjort noen videre analyser på de. Kan det hende at flått fra midler med uventede resultater hadde en høyere eller lavere prevalens av de ulike patogenene enn hos flått fra midler som viste forventede resultater? Dette er et potensielt tema å jobbe videre med.

I Tabell 3-7 og Tabell 3-8 er det laget en oversikt over antall positive for hver dose. Det er en faktisk forskjell i andelen positive i stigende grad med økt dosestyrke, men samtidig er ikke denne forskjellen veldig stor. I Tabell 3-7 er det sammenlagt for alle tre midlene og *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*, 7,33% for 0x-dosen, 12,39% for 1x-dosen og 8,33% for 10x-dosen, en differanse fra høyeste til laveste prosentandel på kun 5,06%. Tilsynelatende kan det derfor se ut til at det ikke er noen nevneverdig signifikant forskjell mellom infiserte/ikke- infiserte flått i henhold til hvor sterk dose de er «immune» mot. For *A. phagocytophilum* (Tabell 3-8) var differansen mellom høyest og lavest prosentandel større, 14,3%, hvor høyeste var positive prosentandel var 10x- dosen med 20% og laveste var 0x-dosen med 10,87%.

Det ble gjort kjikvadratsanalyser med ulike kombinasjoner for infisering og dosenivå (Tabell 2-18). Ser man først og fremst på rene tall fra de ulike kombinasjonene som ble satt sammen for *Borrelia spp.* (kombinasjon nr IV, VI og VIII), var det utpreget flere positive på dose 0x og 1x. Dette gjaldt for alle de tre flåttmidlene. Det samme ser man på *N. mikurensis* (nr V, VII og IX), og også på *A. phagocytophilum* (nr. XI, XII og XIII). Samtidig så man jo at dose 10x hadde en større effekt på frastøting enn 0x- og 1x- dosen. Årsaken til at det ble funnet flere positive på 0x- og 1x- dosen kan rett og slett være at det ble samlet inn flere flått på disse dosene. Som nevnt ble det forsøkt å jevne ut slik at det ble testet for et så likt antall som mulig på alle dosene, men dette ble praktisk ugjennomførbart (se Tabell 2-1 for oversikt over antall som ble testet fra hver dose). Derfor er det en mulig feilkilde her med at det er, rent statistisk sett, en større sjans for å finne flått med infisering jo flere du tester på. Men, om dette ikke er en tilfeldighet, er det rent tallmessig høyere andel flått med infisering på dose 0x og 1x.

Dette så man også på kombinasjon I hvor man slo sammen alt av data for alle tre midler og *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*; der var det henholdsvis 3,33% positive på 0x-dosen og 5,85% på 1x-dosen. 10x-dosen hadde kun 0,6% positive. Igjen kan en vurdere om ikke det skjevfordelte antallet som ble testet på de forskjellige dosene kan ha noe med utfallet å gjøre, men om ikke, er det også her en indikasjon på at det som en helhet er høyest infisering på dose 0x og 1x.

Den høyeste prosentandelen av positive flått fant man på kombinasjon nr VI, som var fra Etono Myggspray og *Borrelia spp.*, med 12,72% positive på 1x-dosen. Med tanke på at Etono Myggspray også hadde 5 av 7 dobbeltinfiserte flått, er det lett å tenke i retning av at Etono skiller seg ut på en dårligere måte, men det er ingenting som gir hold for dette. Ser man også på kjikvadratsanalysene som er blitt gjort, var det ingen av de statistiske analysene som omfattet Etono Myggspray som slo ut som signifikant sterk i henhold til forskjell mellom positive og negative flåttene på de ulike dosene, med unntak av nr I, som omfattet alle de tre midlene og *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*.

Samlet på kjikvadratsanalysene som sammenlignet positive/negative flått og dosenivå som ble gjort med ulike kombinasjoner, ser man at kun 4 av 13 prøver slår ut som statistisk signifikante på at det er en sammenheng mellom positiv/negativ infisering og dosestyrke. Det er blant disse fire heller ingen av flåttmidlene som skiller seg ut, så man kan ikke med sikkerhet si at det er et middel som er bedre enn et annet. Det som derimot bør legges merke til, er at 3 av disse 4 prøvene er for *Borrelia spp.* Igjen kan dette ha sammenheng med at det var generelt en høyere andel av *Borrelia spp.* i prøvene (64 av 495 testede flått var positive, 12,93%), og at dette er årsaken til også kombinasjon nr I (alle de tre midlene og *Borrelia spp.* og *N. mikurensis*) også slo ut som statistisk signifikant for forskjell mellom dosenivå og positiv/negativ infisering.

Samlet sett var det indikasjoner på at det var en høyere andel positive flått på 0x- og 1x-dosen, og kjikvadratanalysen som samlet tok for seg forskjell mellom dosestyrke og infiserte/ikke- infiserte flått for alle tre midler og *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* forsterket inntrykket ved at det var en signifikant forskjell mellom dosenivå og infiserte/ikke- infiserte flått. Imidlertid kan denne forskjellen skyldes at *Borrelia spp.* hadde høyere andel flått totalt sett i oppgaven, og at det ble en skjevfordeling på antall flått av testingen på de ulike dosene.

Er det derimot ikke den skjeve fordelingen som er årsaken, er det et interessant funn å gå undersøke videre hvorfor flere er infiserte ved lavere/ingen flåttmiddeldose enn overdose.

5 Konklusjon

Flagging som metode for å undersøke flåttmidler, eventuelt bare for å samle inn flått til andre formål er en god og effektiv metode. Den er billig, lett å utføre og kan utføres overalt hvor det er passende lokalitet for flått og tilgjengelighet for personen som skal utføre flaggingen. Eneste er at den er tidkrevende dersom man skal undersøke flåttmidler, hvilket var hensikten i denne oppgaven. Den er da også prisgitt de tilfeldigheter som gis av vær og andre faktorer ute i felten, noe som kan spille inn på resultatet i langt større grad enn ved kontrollerte forhold. Disse faktorenes innvirkning kan reduseres ved å gjenta forsøket, for eksempel ved å gjenta flagging på samme område flere ganger over en lenger periode med samme flåttmiddel. Jo mer data man får samlet inn, jo mer korrekt resultat.

Real- time PCR- analyse var en fin måte å teste prevalensen av de ulike flåttpatogener på. Den var omfattende og det tok flere uker for å gjennomføre alle testene, men i det lange løp er den tidsbesparende og lett å gjennomføre. Den gir god trening i håndtering av ulike laboratorie- utstyr og teknikker, noe som også var noe av tanken bak ved å velge et slikt tema for oppgaven.

Flåttmidler fungerer. I det store og det hele later det til at enkelte flåttmidler faktisk har noe for seg, dog noen av midlene kom ut med uforventede resultater i testen. Det var midlene Mygga Natural Spray, Etono Myggspray og Autan Protection Plus som kom best ut ved første gjennomgang, og flått innsamlet fra disse tre var også de som ble valgt ut til videre analyser. Vanlig Autan kom også bra ut. Midlene var nokså jevne i resultater, men Etono skilte seg litt dårligere ut enn de andre nevnte, uten at det er noen statistiske analyser til å støtte opp om dette.

Virkestoffene til de beste flåttmidlene var icaridin for begge Autan- produktene, og IR3535 for Etono. Mygga Natural Spray var tilsynelatende basert på vekstoljer og naturlige ingredienser, men inneholdt også alkoholer, i likhet med Autan- produktene.

Ingen av de tre midlene som inneholdt DEET ga gode resultater i testen, dog dette er et godt dokumentert utprøvd middel mot flått (Lupi et al., 2014), så det kan tenkes at andre faktorer i felt spilte inn på resultatet. Flåttmidler med vekstoljer og

andre naturlige ingredienser kom dårligere ut i testen, dog Mygga Natural Spray syntes å være unntaket.

Prevalensnivåene av de tre patogenene var høyest hos *Borrelia burgdorferi sensu lato* (12,93%), lavest hos *Anaplasma phagocytophilum* (estimert med prevalenskalkulator til 3,2%) og i midten havnet *Neoehrlichia mikurensis* med 4,64%. Det forholdsvis høye tallet til *Borrelia spp.* bør være grunn nok til å sjekke seg godt etter å ha tilbragt tid ute i terreng hvor flått trives.

Testing av dosenivåer ga også resultater som tilsier at ulike nivå gir ulike mengde flått. Det later til at jo sterkere doser du bruker, jo færre flått fester seg. Jevnt over så man at det var færre flått på håndkledet som var behandlet med 10x-dosen enn kontrollhåndkledet, som forventet. Man kunne derfor anta at det vil lønne seg å bruke en sterkere dose for å unngå flått. Imidlertid var det en større andel av infiserte flått på 0x- og 1x-dosene. En statistisk analyse ga også signifikant resultat for forskjell mellom dosenivå og infisert/ikke- infisert flått. Men, på grunn av skjevheter i antallet flått som ble testet for patogener på hver dose (f. eks hadde ikke 10x-dosene nok innsamlet flått til å fylle opp antallet på 55 flått per dose), sees dette resultatet som usikkert tross alt. Om det likevel skulle stemme at det er en høyere andel infiserte flått på 0x- og 1x-dosene, blir det dermed ikke nødvendigvis bedre av å spraye seg med en høyere dose, da majoriteten av infiserte flått likevel befinner seg på de lavere dosene.

Det var til syvende og sist for mye usikkerhet som følge av ulike faktorer til å trekke noen slutninger om infisering har noe å si for flåttens atferd/toleranse mot ulike dosenivå. Det var som nevnt høyere andel infiserte flått på 0x- og 1x- dosen, og det kan for eksempel bety at infisering gjør dem mer aktive, men heller er det trolig at ettersom man får flere flått på lavere doser, øker sjansene for å finne infiserte flått. Trolig er det heller flåttmidlene som fungerer. Til dette bør det gjøres flere analyser, for eksempel ved å analysere flåttene fra midlene som ga uventet resultat.

Referanser/litteraturliste

Adelson, M.E., Rao, R.V., Tilton, R.C., Cabets, K., Eskow, E., Fein, L., Occi, J.L., Mordechai, E. *Prevalence of Borrelia burgdorferi, Bartonella spp., Babesia microti, and Anaplasma phagocytophila in Ixodes scapularis ticks collected in Northern New Jersey.* J Clin Microbiol. ;42(6): 2799-801; Jun (2004).

Andreassen A., Jore S., Cuber P., Dudman S., Tengs T., Isaksen K., Hygen H.O., Viljugrein H., Anestad G, Ottesen P., Vainio K. *Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway,* Parasit Vectors.; 5:177; Aug. 22 (2012)

Carroll, S.P. og Loye, J. *PMD, a Registered Botanical Mosquito Repellent with Deet-Like Efficacy* Travel Med Infect Dis.;11(6):374-411; Nov- Dec. (2013).

Epitools (prevalenskalkulator). Tilgjengelig fra:
<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>. [Benyttet April 2016].

Flåttsenteret, Sørlandet Sykehus HF (2015) *Flått*. Tilgjengelig fra
<http://flattsenteret.no/flatt/> [Lest Oktober 2015].

Folkehelseinstituttet (2010, endret 2015) *Anaplasmose - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra <http://www.fhi.no/artikler/?id=82651> [Søkeord: *Anaplasmose*, Søkemotor: *fhi.no*].

Folkehelseinstituttet (2013), *Fakta om borreliose*. Tilgjengelig fra:
<http://www.fhi.no/artikler/?id=103125> [Lest: September 2015].

Hasle G., Bjune G. A., Midthjell L., Røed K. H., Leinaas H.P *Transport of Ixodes ricinus infected with Borrelia species to Norway by northward-migrating passerine birds.* Tick Borne Dis.; 2(1):37-43; Mar. (2011).

Helsenorge.no (2013). *Myggmidler*. Tilgjengelig fra
<https://helsenorge.no/Giftinformasjon/Produkter-og-kjemikalier/myggmidler>
[Søkeord: DEET, Søkemotor: *www.google.com*, Lest: Mars 2015].

Henningsson A.J., Hvidsten D., Kristiansen B.E., Matussek A., Stuen S., Jenkins A. *Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks from Norway: evaluation*

of a real-time PCR assay targeting the *Anaplasma citrate synthase (gltA)* gene. BMC Microbiol 15: 153 (2015).

Holman, M.S., Caporale, D.A., Goldberg, J., Lacombe, E., Lubelczyk, C., Rand, P.W., Smith, R.P. *Anaplasma phagocytophilum, Babesia microti, and Borrelia burgdorferi in Ixodes scapularis, southern coastal Maine.* Emerg Infect Dis. 10(4): 744–746; Apr. (2004).

Jenkins, A. og Kristiansen, B. E. *Neoehrlichia- nok en flåttbakterie.* Tidsskrift Norsk legeforening; 133: 1058 – 9 (2013).

Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Allum, A.G. Aakre, R.K., Strand, L., Kleveland, E.J., van de Pol, I., Schouls, L. *Borrelia burgdorferi sensu lato and Ehrlichia spp. in Ixodes ticks from southern Norway.* J Clin Microbiol. 39(10):3666-71; Oct. (2001).

Kjelland, V., Korslund, L., & Slettan, A. (2014). *Fakta om flått.* Oslo: Kagge Forlag.

Krause, P.J., McKay, K., Thompson, C.A., Sikand, V.K., Lentz, R., Lepore, T., Closter, L., Christianson, D., Telford, S.R., Persing, D., Radolf, J.D., Spielman, A. *Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease.* Clin Infect Dis. 1;34(9):1184-91; May (2002).

Ljøstad U. og Mygland. Å. *Lyme- Borreliose hos voksne.* Tidsskrift Norsk Legeforening; 128:1175 – 8; (2008).

Lupi, Eleonora, Hatz, Christoph, Schlagenhaut, Patricia *The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. – A literature review* Travel Med Infect Dis.; 11(6):374-411: Nov-Dec (2013).

Nerio, Luz Stella, Olivero- Verbel, Jesus og Stashenko, Elena *Repellent activity of essential oils: A review.* Biosource technology: Volume 101: Issue 1: 72–378: January (2010).

Pierce, B. A. (2012) *Genetics- A conceptual approach* England: W. H. Freeman and Company.

Raasok, C. (2015) *Candidatus Neoehrlichia mikurensis i Ixodes ricinus I Norge* Masteroppgave ved Høgskolen i Telemark, Norge.

Richter, D. og Matuschka, F.R *Candidatus Neoehrlichia mikurensis, ” Anaplasma phagocytophilum, and Lyme Disease Spirochetes in Questing European Vector Ticks and in Feeding Ticks Removed from People* J. Clin. Microbiol; vol. 50; no. 3; 943-947; March (2012).

Stuen, S. og Bergström, K. *Human anaplasrose- en skjult sykdom i Norge?* Tidsskrift Norsk Legeforening; 128:2579 – 81; (2008).

Sæbø, M. (2012) *4313 Bioteknologi* Fagteori fra faget 4313 Bioteknologi ved fakultet for allmennvitenskapelige fag, Høgskolen i Telemark, Norge.

Thieman, W. J. og Palladino, M. A (2009) *Introduction to biotechnology* (2. utg.) San Fransisco, USA: Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Tveten, A.K. *Prevalence and Diversity among Anaplasma phagocytophilum Strains Originating from Ixodes ricinus Ticks from Northwest Norway*, Journal of Pathogens; vol 2014; article ID 824897; 8 pages (2014).

Ulveseth, S. (2015) *Ni fakta om flått og borrelia*. Tilgjengelig fra: <http://www.lommelegen.no/artikkel/ni-fakta-om-fl%C3%A5tt-og-borrelia>.

Urtekilden (2013) *Osp- Populus tremula* Tilgjengelig fra: http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/popu_tre.htm [Søkemotor: google.com, Søkeord: osp innhold. Lest Mars 2016]

Zhao XG, Li H, Sun Y, Zhang YY, Jiang JF, Liu W, Cao WC. *Dual infection with Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti in a Rattus norvegicus, China*. Tick Borne Dis.; 4(5); 399-402; Sep. (2013).

Oversikt over tabeller og figurer

Tabeller

Tabell 2-1: Oversikt over antall flått som ble testet for smittestoffer.

Tabell 2-2: Konsentrasjonstabell for bruksløsning av amoniakhydroxid-bruksløsning (2,5% amoniakk i TE- buffer)

Tabell 2-3: Primersekvenser, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Tabell 2-4: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Tabell 2-5: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med Taqman®Probe, *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Tabell 2-6: Real- time PCR-program for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, SYBR®Green

Tabell 2-7: Real- time PCR-program for *Borrelia burgdorferi sensu lato*, Taqman®probe

Tabell 2-8: Primersekvenser, *Neoehrlichia mikurensis*

Tabell 2-9: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Neoehrlichia mikurensis*

Tabell 2-10: Real- time PCR-program for *Neoehrlichia mikurensis*, SYBR®Green

Tabell 2-11: Primersekvenser, *Anaplasma phagocytophilum*

Tabell 2-12: Probesekvens, *Anaplasma phagocytophilum*

Tabell 2-13: Reaksjonsblanding for real- time PCR oppsett med SYBR®Green, *Anaplasma phagocytophilum*

Tabell 2-14: Real- time PCR-program for *Anaplasma phagocytophilum*, SYBR®Green

Tabell 2-15: Oversiktstabell, pooling *A. phagocytophilum*

Tabell 2-16 *A. phagocytophilum*; Inputdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med ukjent sensitivitet og spesifitet.

Tabell 2-17 *A. phagocytophilum*; Inputdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med kjent sensitivitet og spesifitet.

Tabell 2-18 Oversiktstabell over positive flått/pool for de ulike kjikvadratskombinasjonene

Tabell 3-1: Resultater Jomfruland September 2012; antall flått på de ulike midlene/dosene

Tabell 3-2: Resultater for påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Tabell 3-3: Resultater for påvisning av *Neoehrlichia mikurensis*

Tabell 3-4: Resultater for påvisning av *Anaplasma phagocytophilum*

Tabell 3-5: *A. phagocytophilum*; Resultatdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med ukjent sensitivitet og spesifitet.

Tabell 3-6: *A. phagocytophilum*; Resultatdata; Poolprevalens for faste poolstørrelser og tester med kjent sensitivitet og spesifitet.

Tabell 3-7: Prosent positive for *Borrelia* spp. og/eller *Neoehrlichia mikurensis*

Tabell 3-8: Prosent positive pool for *Anaplasma phagocytophilum*.

Tabell 3-9: Resultater; Syntetisk pooling av *Borrelia* spp, *N. mikurensis* og *A. phagocytophilum*.

Tabell 3-10: Syntetisk pooling; overlappende positive pool, resultater

Tabell 3-11: Resultater, dosenivå og patogeninfisering, kjikvadratsanalyse.

Figurer

Figur 1-1 Real- time PCR- maskin fra Applied Biosystems

Figur 1-2 Amplifiseringsplott fra en real- time PCR- analyse med SYBR®Green av *Borrelia* spp.

Figur 1-3 Eksempel på smeltepunktsanalyse med SYBR®Green, testet for *Borrelia* spp.

Figur 2-1: Oversiktskart over Kragerø/Grenland med markering av Jomfrulands lokasjon (Kilde: Google maps).

Figur 2-1: Kilde: google maps. Tilgjengelig fra:

<https://www.google.no/maps/place/Jomfruland,+Krager%C3%B8/@59.0275457,9.4278521,10z/data=!4m2!3m1!1s0x4646fdedbcd92bef:0x4305ea6e1b6202b?hl=no>

Figur 2-2: Oversiktskart over Jomfruland med avmerket testområde for flåttmidler (Kilde: «Jomfruland- Kulturen former landskapet»)

Hentet fra brosjyren «*Jomfruland- kulturen former landskapet*». Utgiver: Fylkesmannen i Telemark og Gea Norvegica Geopark.

Figur 2-3: Kart over hvilke midler (angitt med koder) som ble testet ut på de ulike stiene på Jomfruland (Jensen, Kristine, 2013).

Figur 3-1: Resultater av uttesting av flåttmidler, Jomfruland, September 2012.

Figur 3-2: Prosentandel positive for *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Figur 3-3: Prosentandel positive for *Neoehrlichia mikurensis*

Figur 3-4: Positive resultater for påvisning av *Anaplasma phagocytophilum*

Vedlegg

Vedlegg 1: Flåttmidler med ingrediensliste

Mygga Natural Spray (J2)

Ingredienser: P-mentan- 3,8- diol (PMD) 217,9 g/l,
ekstrakt av vekstoljer fra bl.a lavendel, geranium og roser.

Aktiv ingrediens: Ikke oppgitt

Kontaktselskap/produsent: Jaico R.D.P.NV, Nijverheidslaan
1545, BE-3660 Opglabbeck, Belgia



Mygga Myggmelk, Roll- On (J10)

Ingredienser: 19% DEET (N, N-dietyl-m-toluamid),
ekstrakter av forskjellige planteoljer, bl.a. lavendel, geranium
og flere typer roser.

Aktiv ingrediens: DEET

Kontaktselskap/produsent: Jaico R.D.P.NV, Nijverheidslaan
1545, BE-3660 Opglabbeck, Belgia



Autan Protection Plus Pumpspray (J9)

(hvit flaske)

Ingredienser: Aqua, Hydroxyethyl Isobutyl Piperidine
Carboxylate, Alcohol Denat, Glycerin, Dicapryl Ether, Methyl
Glucose Isostearate, Parfum, Carbomer, Aloe Barbadensis

Aktiv ingrediens: Icaridin 20% (198 mg/ml)

Kontaktselskap/produsent: SC Johnson Norge, 2013 Skjetten
Tlf: 800 126 50



Autan Protection Plus Pumpspray, Allround- beskyttelse (J7)

Ingredienser: Ikke oppgitt

Aktiv ingrediens: Icaridin 20% (191 mg/ml)

Kontaktselskap/produsent:

SC Johnson Norge, 2013 Skjetten, Tlf: 800 126 50



Etono Myggspray Odourless (J6)

Ingredienser: Alcohol denat, Dipropylene Glycol

Aktiv ingrediens: IR 3535 (Ethyl Butylacetylaminopropionate 19%)

Kontaktselskap/produsent: ACO HUD NORDIC AB

Box 622, 194 26 SE- Upplands Väsby, NO- Oslo, FI- Espoo

Nettside: www.aconordic.com



Cactuz 20% DEET (J8)

Ingredienser: Diethyl-m-toluamide 20% g/g, alcohol denat

Aktiv ingrediens: DEET

Kontaktselskap/produsent: SØROVER, Østre Strandgate 12,
4610 Kristiansand

Tlf: 38 04 31 35,

Mail: post@sorover.no, Nettside: www.sorover.no



ANTI- Flått (J3)

(Beregnet på hund/katt)

Ingredienser: Vann, Glyserol, Kattemynte, Sitrongress,
Eucalyptussitron, Lavendel

Aktiv ingrediens: Ikke tilsatt DEET, men påstår at kattemynte
erstatte DEETs effekt.

Kontaktselskap/produsent: Oasen Cosmetics AS, Uniongaten 18,
3732 Skien, Norway

Nettside: www.oasecosmetics.no



Myggolf Spray (J5)

Ingredienser: 9,5% N, N Dietyl- m -toluamid, Etanol

Aktiv ingrediens: Ikke oppgitt

Kontaktselskap/produsent: NORAGENT A/S, Waldemar
Thranesgt. 98, 0175 Oslo, Norge

Tlf: 22 71 55 55

E-mail: firmapost@noragent.no



Dogman- Elektronisk Fästingsvakt för hund og katt (J13)

(Elektronisk flåtthalsbånd)

Uten kjemikalier, sender ut ultralydsignaler som flått skal reagere negativt på.

Kontaktselskap/produzent: Dogman AS, Industriveien 14, N-1481 Hagan, Norway

Tel: + 47 67 06

74 00, E-mail: info@dogman.no



Ospeblanding (J4)

Ospeblanding ble laget ved å knuse ospeblader til en «smoothie» i en blender, tilsatt vann til det dekket $\frac{3}{4}$ deler av ospebladlaget.



Blandingen ble deretter filtrert gjennom et kaffefilter, og deretter helt over på en sprayflaske.

Øvrige produkter

Det ble også kjøpt inn to andre produkter mot flått som kunne brukes av dyr, men disse ble ikke utprøvd. Det ene, Beaphar Biodråper, fungerte på den måten at det spredte seg i dyrets fettlag, som ikke var mulig å teste ut på et håndkle, og det andre produktet (Cani- Flåtthalsbånd til hund) var heller ikke var særlig egnet til utprøving med håndkle.

Vedlegg 2: 1-veis ANOVA av forskjell i dosenivå, flåttmiddel J2, Mygga Natural Spray

ANOVA vil teste om det er en dose som har bedre effekt enn en annen dose. Det ble brukt tre doser, merket 0x, 1x og 10 x. Det ble flagget i tre tidsintervaller på 20 minutter hver, totalt en time.

H_0 -hypotesen vil være at det ikke er noen forskjell i gjennomsnitt antall flått på de ulike dosene.

H_1 -hypotesen vil være at det en forskjell i gjennomsnitt på de ulike dosene.

Under er middel, standard avvik (SD) og varians utregnet for de ulike dosene.

Middel, SD og varians av antall flått på de tre ulike flåttmiddeldosene:				
Tidsintervall:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Total
1-20 min	80,00	18,00	12,00	
21-40 min	70,00	8,00	0,00	
41-60 min	80,00	29,00	0,00	
Totalt antall flått:	230,00	55,00	12,00	217,00
Middel:	76,67	18,33	4,00	24,11
SD:	5,77	10,50	6,93	34,04
Varians	33,33	110,33	48,00	

Utregning av F_{\max} :

F_{\max} sjekker om det er jevn varians mellom de ulike samplene. Sampelet med den største variansen blir sammenlignet med sampelet med den laveste variansen (fordi dersom den største og den minste variansen ikke er signifikant forskjellig fra hverandre, så kan heller ikke de andre samplene være forskjellige fra hverandre).

Den største variansen blir delt på den minste variansen, og den kalkulerte verdien blir kalt F_{\max} . F_{\max} blir deretter sammenlignet med en tabellverdi. For å finne tabellverdien, går man ut i fra kolonne (k), hvor k er lik antall samples som blir undersøkt (i dette tilfellet 3 doser; 0x, 1x og 10x) og rader (frihetsgrader n-1), hvor n i dette tilfellet er antall enheter i det minste sampelet (i dette tilfellet er $n=3$, dvs $3-1=2$).

(Varians for de ulike samplene (dosene) er funnet vha Excel.)

Sample:	Varians (SD):
0x	33,33
1x	110,33
10x	48,00

$$F_{\max} = \frac{\text{Størst varians}}{\text{Minst varians}} = \frac{1x \text{ dose}}{0x \text{ dose}} = \frac{110,33}{33,33} = \underline{\underline{3,31}}$$

Ved å sammenligne F_{\max} med tabellverdi (Tabell D.9 i «Using statistics to understand the environment» av Wheather og Cook) ved å se på ($k=3$) og ($n-1=3-1=2$), får vi tabellverdi 87,5.

Vår utregnede F_{\max} (3,31) er mindre enn tabellverdien (87,5), noe som gjør at vi kan fortsette med ANOVA. En annen ting er også at vår største varians 110,33 er større en 2xminste varians ($2 \times 33,33 = 66,66$), noe som også er en trygg indikasjon på at vi kan gå videre med ANOVA.

Fremgangsmåte for å finne F- og P-verdiene:

Steg 1: Beregning av $\sum X$, $\sum X^2$, \bar{X} og S^2

	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Total:
$\sum x$	150,00	55,00	12,00	217,00
$\sum x^2$	17700,00	1229,00	144,00	19073,00
\bar{x}	50,00	18,33	4,00	24,11
S^2	33,33	110,33	48,00	1158,72

Steg 2: Utregning av Sum Square Total, SS_T

Følger følgende formel:

$$SS_T = \sum X^2_T - \frac{(\sum X_T)^2}{n_T}$$

hvor

SS_T = Sum Square Total

n_T = Total sample størrelse, dvs totalt antall observasjoner i sampelet.

Det gir følgende SS_T for datasettet;

$$SS_T = 19073 - \frac{(217)^2}{9} = 19073 - 5232,11 = \underline{\underline{13840,89}}$$

Steg 3: Utrekning av Sum Square Within, SS_{within}

For å finne SS_{within} , må først SS_i regnes ut for hvert sample.

$$SS_i = \sum x_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n_i}$$

Dette gir følgende SS_i for hver enkelt sample:

$$SS_{0x} = 17700 - (150^2/3) = \underline{10200,00}$$

$$SS_{1x} = 1229 - (55^2/3) = \underline{220,67}$$

$$SS_{10x} = 144 - (12^2/3) = \underline{96,00}$$

Summerer deretter samtlige tre svar og får SS_{within} :

$$SS_{\text{within}} = 10200,00 + 220,67 + 96,00 = \underline{\underline{10516,67}}$$

Steg 4: Utrekning av Sum Square between, SS_{between}

$$SS_{\text{between}} = \sum \frac{(\sum X_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum X_T)^2}{n_T}$$

Først regne ut for hvert sample ved følgende formel;

$$\frac{(\sum X_i)^2}{\sum n_i}$$

Dette gir for hvert enkelt sample;

$$SS_{0x} = \sum (150)^2 / 3 = \underline{7500,00}$$

$$SS_{1x} = \sum (55)^2 / 3 = \underline{1008,33}$$

$$SS_{10x} = \sum (12)^2 / 3 = \underline{48,00}$$

Summerer disse tre;

$$7500,00 + 1008,33 + 48,00 = \underline{8556,33}$$

SS_{Total} allerede regnet ut; 13840,89

Dette gir oss:

$$SS_{\text{between}} : 8556,33 - 13840,89 = \underline{\underline{-5284,56}}$$

Steg 5: ANOVA- tabell og utregning av F og P:

1-veis ANOVA-tabell					
	df	SS	MS	F	P
Between	2,00	-5284,56	-2642,28	663,89	P= 0,05: 5,14
Within	6,00	10516,67	-3,98		p= 0,01: 10,9
Total	8,00	13840,89			

- df_{between} utregnes ved $(k-1)$, hvor k er antall sample som blir sammenlignet.
- df_{within} utregnes ved $(n-1)-(k-1)$, hvor n er total samplestørrelse.
- df_{total} utregnes ved (n_T-1) , hvor n er total samplestørrelse.
- MS_{between} utregnes ved SS_{between} delt på df_{between} .
- MS_{within} utregnes ved SS_{within} delt på df_{within}
- F utregnes ved MS_{between} delt på MS_{within}

Ved å sammenligne frihetsgrader ($df_{\text{between}}=2$ og $df_{\text{within}}= 6$), finner man P-verdien i tabell D.7 i Wheater og Cook, 2012, i dette tilfellet 5,14 for $\alpha=0,05$ og 10,9 for $\alpha=0,01$.

F-verdien er større enn begge tabellverdiene for P, og det er derfor en signifikant forskjell mellom de dosene.

Vedlegg 3: 1-veis ANOVA av dosenivå, alle flåttmidler

Denne er gjort på nøyaktig samme måte som beskrevet i vedlegg 2, mens her ble det testet for alle uttestede midler, med unntak av løk, hvitløk og tikkende halsbånd. Disse fikk ingen fullverdig uttesting av ulike praktiske årsaker. Alle midlene er slått sammen for hver dose, og ANOVA ser på om det er en forskjell i gjennomsnittene mellom de ulike dosene, 0x (kontroll), 1x og 10x.

Også i dette tilfellet var en praktisk forventning om at en høyere andel flått ville feste seg til de ubehandlede kontrollhåndkledene enn de behandlede, noe en også så ut i fra rene telldata.

H_1 -hypotesen vil derfor være at det er forskjell i gjennomsnittene mellom dosene, det vil si sammenheng mellom antall flått som festet seg til håndkledet og dosestyrke, noe som i dette tilfellet bygger sterkt opp under den praktiske forventningen.

Nullhypotesen H_0 vil her være at det ikke er noen forskjell i gjennomsnitt antall flått mellom dosene, noe som i praksis vil si at det ikke er noen forskjell i avstøtingseffekten på de ulike dosene.

Under er middel, standard avvik (SD) og varians utregnet for de ulike dosene.

Middel, SD og varians av antall flått på de tre ulike flåttmiddeldosene:				
Middel:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt antall på alle doser:
Mygga Natural Spray	150	55	12	
Antiflått (hund, spray)	42	39	188	
Ospeblanding	244	170	113	
Myggolf Spray	75	45	59	
Etono Myggspray	246	118	20	
Autan (vanlig gul)	131	116	24	
Cactus 20% DEET	47	112	15	
Autan (flått, hvit flaske)	174	65	4	
Mygga Deo	125	316	58	
Totalt antall flått:	1234	1036	493	2763
Middel:	137,11	115,11	54,78	102,33
SD:	75,84	86,76	60,53	80,45
Varians:	5752,11	7527,61	3664,19	6471,54

Utregning av F_{\max} :

$$F_{\max} = \frac{\text{Størst varians}}{\text{Minst varians}} = \frac{1x \text{ dose}}{10x \text{ dose}} = \frac{7527,61}{3664,19} = \underline{\underline{2,05}}$$

Ved å sammenligne F_{\max} med tabellverdi (Tabell D.9 i «Using statistics to understand the environment» av Wheather og Cook) ved å se på ($k=3$) og ($n-1=9-1=8$), får vi tabellverdi 6.

Vår utregnede F_{\max} (2,05) er mindre enn tabellverdien (6), noe som gjør at vi kan fortsette med ANOVA.

Fremgangsmåte for å finne F- og P-verdiene:

Steg 1: Beregning av $\sum X$, $\sum X^2$, \bar{X} og S^2

	0x	1x	10x	Total:
$\sum x$	1234	1036	493	2763
$\sum x^2$	215212	179476	56319	451007
\bar{x}	137,11	115,11	54,78	102,33
S^2	5752,11	7227,61	3664,19	6471,54

Steg 2: Utregning av Sum Square Total, SS_T

Følger følgende formel:

$$SS_T = \sum X^2_T - \frac{(\sum X_T)^2}{n_T}$$

$$SS_T = 451007 - \frac{(2763)^2}{27} = 451007 - 282747 = \underline{\underline{168260}}$$

Steg 3: Utregning av Sum Square Within, SS_{within}

For å finne SS_{within} , må først SS_i regnes ut for hvert sample.

$$SS_i = \sum x^2_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n_i}$$

Dette gir følgende SS_i for hver enkelt sample:

$$SS_{0x} = 215212 - (1234^2/9) = \underline{\underline{46016,89}}$$

$$SS_{1x} = 179476 - (1036^2/9) = \underline{\underline{60220,89}}$$

$$SS_{10x} = 56319 - (493^2/9) = \underline{\underline{29313,56}}$$

Summerer deretter samtlige tre svar og får SS_{within} :

$$SS_{\text{within}} = 46016,89 + 60220,89 + 29313,56 = \underline{\underline{135551,34}}$$

Steg 4: Utregning av Sum Square between, SS_{between}

$$SS_{\text{between}} = \sum \frac{(\sum X_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum X_T)^2}{n_T}$$

Først regne ut for hvert sample ved følgende formel;

$$\frac{(\sum X_i)^2}{\sum n_i}$$

Dette gir for hvert enkelt sample;

$$SS_{0x} = \sum (1234)^2 / 9 = \underline{169196,11}$$

$$SS_{1x} = \sum (1036)^2 / 9 = \underline{119255,11}$$

$$SS_{10x} = \sum (493)^2 / 9 = \underline{27005,44}$$

Summerer disse tre;

$$169196,11 + 119255,11 + 27005,44 = \underline{315456,66}$$

SS_{Total} allerede regnet ut; 168260

Dette gir oss:

$$SS_{\text{between}} : 315456,66 - 168260 = \underline{\underline{147196,66}}$$

Steg 5: ANOVA- tabell og utregning av F og P:

1-veis ANOVA-tabell					
	df	SS	MS	F	P
Between	2	147196,66	73598,33	13,03	P= 0,05: 3,4
Within	24	135551,33	5647,97		p= 0,01: 5,61
Total	26	168260			

Ved å sammenligne frihetsgrader (df between=2 og df within=24), finner man P-verdien i tabell D.7 i Wheater og Cook, 2012, i dette tilfellet 3,4 for p=0,05 og 5,61 for p=0,01.

F-verdien er større enn begge tabellverdiene for P, og det er derfor en signifikant forskjell mellom dosene.

Vedlegg 4: Kjikvadratsanalyse av dosenivå og patogeninfisering.

Flått fra tre av flåttmidlene (J2, J6 og J9) ble kjørt real- time PCR-analyser på for å se etter patogeninfisering med *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Neoehrlichia mikurensis* og *Anaplasma phagocytophilum*.

For å se om det er noen sammenheng mellom patogeninfisering og dosenivå/ toleranse mot flåttmiddel, ble det kjørt flere kjikvadratsanalyser. En analyse tok for seg sammenslåtte data for alle midlene og *N. mikurensis* og *Borrelia spp*, men det ble også kjørt analyser for midler og patogener separert (se oversikt over analysekombinasjoner under). *Anaplasma phagocytophilum* ble analysert selvstendig, da flått ble poollet før real-time PCR-analysen.

Analysene er gjort ut i fra kapittel 8.5.1 i læreboken «Statistikk for universiteter og høyskoler» av Løvås, 2010 og «Using statistics to understand the environment» av Wheeler og Cook, 2003.

Nedenfor vises en oversikt over de ulike kombinasjonene analysene ble utført på.

Kombinasjoner; patogeninfisering og dosebruk, kjikvadratsanalyser

- I. Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (J2, J6 g J9).
- II. Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og alle tre midlene (J2, J6 og J9).
- III. Alle resultater slått sammen for *N. mikurensis* og alle tre midlene (J2, J6 og J9).
- IV. Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *Borrelia spp.*
- V. Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *N. mikurensis*.
- VI. Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *Borrelia spp.*
- VII. Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *N. mikurensis*.
- VIII. Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *Borrelia spp.*
- IX. Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *N. mikurensis*.
- X. Alle resultater slått sammen for *Anaplasma phagocytophilum* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (j2, J6 og J9).
- XI. Resultater fra J2 (Mygga Natural Spray) og *Anaplasma phagocytophilum*.
- XII. Resultater fra J6 (Etono Myggspray) og *Anaplasma phagocytophilum*.
- XIII. Resultater fra J9 (Autan Protection Plus) og *Anaplasma phagocytophilum*.

Alle kjikvadratstabeller for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* tar utgangspunkt i Tabell V4.1 som viser en oversikt over positive og negative real-time PCR-resultater for patogeninfisering for hver av de tre midlene.

Tabell V4.1 Resultater fra middel J2, J6 og J9 for infisering av *Borrelia spp.* og *Neoehrlichia mikurensis*.

Oversikt over positive/negative Borr*/Neo* resultater fra middel J2, J6 og J9:							
		Dose 0x:		Dose 1x:		Dose 10x:	
Middel:	Patogen:	Positiv:	Negativ:	Positiv:	Negativ:	Positiv:	Negativ:
J2	Borr*	10	88	15	40	0	12
	Neo**	4	94	2	53	1	11
J6	Borr*	8	22	21	94	4	16
	Neo**	2	28	9	106	0	20
J9	Borr*	7	90	8	56	1	3
	Neo**	2	95	3	61	0	4
Totalt:		33	417	58	410	6	66
Totalt antall tester: 990							
* = <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>							
** = <i>Neoehrlichia mikurensis</i>							

Observerte og forventede verdier

For å kunne utføre en kjikvadratstest på resultatene, ble de satt inn i en rad/kolonnetabell. Her ble de observerte verdiene plassert, samt også deres forventede verdi i parentes. Tabellen er vist nedenfor i «Datastruktur for kjikvadratstest».

Kjennetegnene for radene er $A_1, A_2 \dots A_r$ hvor r er totalt antall rader (i dette tilfellet flåttmidler) og kjennetegnene for kolonnene er $B_1, B_2 \dots B_k$, hvor k er totalt antall kolonner (i dette tilfellet dose).

n er antall enheter som blir testet på (totalt antall flått).

X_{ij} er definert som antall enheter i utvalget med kombinasjonen $A_i B_j$. R_i blir definert som totalt antall enheter med kjennetegn A_i . Tilsvarende defineres K_j som totalt antall enheter med kolonnekjennetegn B_j . Disse blir presentert tabellen nedenfor.

Datastruktur for kjikvadrattest					
	B ₁	B ₂	...	B _k	Totalt:
A ₁	X ₁₁	X ₁₂	...	X _{1k}	R ₁
A ₂	X ₂₁	X ₂₂	...	X _{2k}	R ₂
...
A _r			...	X _{rk}	R _r
Totalt:	K₁	K₂	...	K_k	N

Utregning av forventet verdi (E)

Dersom nullhypotesen er sann, betyr det at det ikke er noen sammenheng mellom kjennetegnene A og B, dvs i dette tilfellet at det ikke er noen sammenheng mellom infisering og dosenivå. Det er i så fall forventet at antall enheter med kombinasjonen A_iB_j er lik antall A_i multiplisert med sannsynligheten for å være av type B_j (ettersom X_{ij} er binomisk fordelt.) det forventede antallet kalles

$$E_{ij}^* = (\text{antall } A_i) \cdot (\text{sannsynlighet } B_j) = R_i \cdot K_j/n$$

*E = Expected

Kjikkvadratsummen Q

Q-summen baserer seg på avvikene mellom observerte og forventede verdier. Det er naturlig å forkaste nullhypotesen dersom det er store avvik mellom de observerte verdiene X_{ij} og de forventede verdiene E_{ij}. Analysen vil derfor basere seg på avviket (X_{ij} – E_{ij}). Siden noen avvik er positive og andre er negative, opphøyes disse avvikene i andre potens. Vi benytter summen av avvikskvadratene dividert med forventningsverdiene for hver av r · k tabellcellene. Når summen for hver enkelt tabellcelle blir summert, finner vi Q.

Frihetsgrader

For å kunne sammenligne Q med tabellverdi, må man regne ut antall frihetsgrader.

Frihetsgrader: (r-1)(k-1)

H₀- og H₁- hypotesen; patogeninfisering og dosenivå

H₀-hypotesen i kjikkvadratstest tar utgangspunkt i at det ikke er noen sammenheng mellom variablene som blir testet, og det derfor ikke vil ha noen betydning om

flåttens som fester seg er infisert eller ei, uavhengig av dose. Med andre ord vil dette være en pekepinn på om en infisering spiller inn på flåttens atferd eller ikke.

H₁- hypotesen sier at det er en sammenheng mellom variablene, for eksempel positivt-/negativt infisert og dosestyrke. Flåttens atferd styres i større grad av om den er infisert eller ei.

Nedenfor følger de respektive utregningene. Observerte verdier (O) står uten parentes i cellene, forventede verdier (E) står med parentes.

I: Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og *N. mikurensis* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR-analyser på (J2, J6 g J9)

Alle tre midler og <i>N.mikurensis/Borrelia spp.</i> slått sammen				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	33 (44,10)	58 (45,85)	6 (7,05)	97
Negativ:	417 (387,73)	410 (403,24)	66 (62,04)	853
Totalt	450	468	72	990

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	2,79	3,22	0,16
Negativ:	2,21	0,11	0,25
Q:	8,74		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (8,74) ved df 2: α **0,025** (7,38).

II: Alle resultater slått sammen for *Borrelia spp.* og alle tre midlene (J2, J6 og J9)

Alle tre midler for <i>Borrelia spp.</i> slått sammen				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	25 (33,64)	44 (34,98)	5 (5,38)	74
	200	190	31	
Negativ:	(191,36)	(161,60)	(30,62)	421
Totalt:	225	234	36	495

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	2,22	2,33	0,027
Negativ:	0,39	4,99	0,005
Q:	9,96		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (9,96) ved df 2: α **0,01** (9,21).

III: Alle resultater slått sammen for *N. mikurensis* og alle tre midlene (J2, J6 og J9)

Alle tre midler for <i>N.mikurensis</i> slått sammen				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	8 (10,45)	14 (10,87)	1 (1,67)	23
	217	220	35	
Negativ:	(214,55)	(223,13)	(34,32)	472
Totalt:	225	234	36	495

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,57	0,9	0,27
Negativ:	0,03	0,04	0,01
Q:	1,82		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (1,82) ved df 2: α **0,9** (0,21).

IV: Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *Borrelia spp.*

Middel J2 (Mygga Natural Spray) og <i>Borrelia spp.</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	10 (14,85)	15 (8,33)	0 (1,82)	25
Negativ:	88 (83,15)	40 (46,67)	12 (10,18)	140
Totalt:	98	55	12	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	1,58	5,34	1,82
Negativ:	0,28	0,95	0,33
Q:	10,3		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (10,3) ved df 2: α **0,01** (9,21).

V: Resultater fra middel J2 (Mygga Natural Spray) og *N. mikurensis*.

Middel J2 (Mygga Natural Spray) og <i>N. mikurensis</i>.				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	4 (4,16)	2 (2,33)	1 (0,51)	7
Negativ:	94 (93,84)	53 (52,67)	11 (11,50)	158
Totalt:	98	55	12	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,0062	0,04672	0,47078
Negativ:	0,00027	0,00207	0,02174
Q:	0,58		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (0,58) ved df 2: α **0,9** (0,21).

VI: Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *Borrelia spp.*

Middel J6 (Etono Myggspray) og <i>Borrelia spp.</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	8 (6)	21 (23)	4 (4)	33
Negativ:	22 (24)	94 (92)	16 (16)	132
Totalt:	30	115	20	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,67	0,17	0
Negativ:	0,17	0,04	0
Q:	1,05		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (1,05) ved df 2: α **0,9** (0,21).

VII: Resultater fra middel J6 (Etono Myggspray) og *N. mikurensis.*

Middel J6 (Etono Myggspray) og <i>N. mikurensis.</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	2 (2)	9 (7,67)	0 (1,33)	11
Negativ:	28 (28)	106 (107,33)	20 (18,67)	154
Totalt:	30	115	20	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0	0,23	1,33
Negativ:	0	0,02	0,09
Q:	1,67		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (1,67) ved df 2: α **0,9** (0,21).

VIII: Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *Borrelia spp.*

Middel J9 (Autan Protection Plus) og <i>Borrelia spp.</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	7 (9,41)	8 (6,21)	1 (0,39)	16
Negativ:	90 (87,59)	56 (57,79)	3 (3,61)	149
Totalt:	97	64	4	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,62	0,52	0,95
Negativ:	0,07	0,06	0,1
Q:	2,32		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (2,32) ved df 2: α **0,9** (0,21).

IX: Resultater fra middel J9 (Autan Protection Plus) og *N. mikurensis*.

Middel J9 (Autan Protection Plus) og <i>N. mikurensis</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	2 (2,94)	3 (1,94)	0 (0,12)	5
Negativ:	95 (88,20)	61 (58,20)	4 (3,64)	160
Totalt:	97	64	4	165

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,3	0,58	0,12
Negativ:	0,52	0,13	0,04
Q:	1,69		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (1,69) ved df 2: α **0,9** (0,21).

X: Alle resultater slått sammen for *Anaplasma phagocytophilum* og de tre midlene det ble kjørt real- time PCR på (J2, J6 og J9).

Alle tre midler for <i>A. phagocytophilum</i> slått sammen				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	5 (8,20)	11 (8,38)	2 (1,43)	18
Negativ:	41 (37,80)	36 (38,62)	6 (6,57)	83
Totalt:	46	47	8	101

Kjikkvadratsummen			
Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	1,25	0,82	0,23
Negativ:	0,27	0,18	0,05
Q:	2,8		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (2,8) ved df 2: α **0,9** (0,21).

XI: Resultater fra J2 (Mygga Natural Spray) og *Anaplasma phagocytophilum*.

Middel J2 (Mygga Natural Spray) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	3 (4,12)	3 (2,26)	1 (0,62)	7
Negativ:	17 (15,88)	8 (8,74)	2 (2,38)	27
Totalt:	20	11	3	34

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,3	0,24	0,23
Negativ:	0,08	0,06	0,06
Q:	0,97		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (0,97) ved df 2: α **0,9** (0,21).

XII: Resultater fra J6 (Etono Myggspray) og *Anaplasma phagocytophilum*.

Middel J6 (Etono Myggspray) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	1 (0,91)	4 (3,48)	0 (0,61)	5
Negativ:	5 (5,09)	19 (19,52)	4 (3,39)	28
Totalt:	6	23	4	33

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	0,009	0,078	0,61
Negativ:	0,002	0,014	0,11
Q:	0,823		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (0,823) ved df 2: α 0,9 (0,21).

XIII: Resultater fra J9 (Autan Protection Plus) og *Anaplasma phagocytophilum*.

Middel J9 (Autan Plus) og <i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:	Totalt:
Positiv:	1 (3,53)	4 (2,29)	1 (0,18)	6
Negativ:	19 (16,47)	9 (10,71)	0 (0,82)	28
Totalt:	20	13	1	34

Kjikkvadratsummen Q:			
Infeksjon:	Dose 0x:	Dose 1x:	Dose 10x:
Positiv:	1,81	1,28	3,74
Negativ:	0,39	0,27	0,82
Q:	8,31		

Frihetsgrader (df): $(r-1)(k-1) = (2-1)(3-1) = 2$

Største signifikansnivå for vår utregnede Q (8,31) ved df 2: α 0,025 (7,38).