

Mastergradsoppgave

Lars H. Kløcker

Borrelia burgdorferi sensu lato  
- forekomst i Ixodes ricinus  
flått fra vegetasjon i Norge



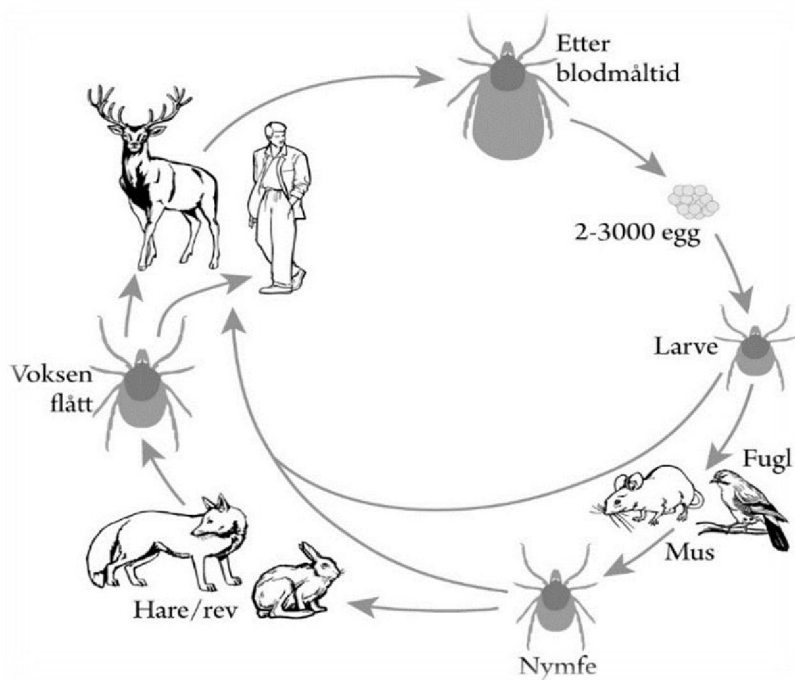
**Høgskolen i Telemark**

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Lars H. Kløcker

*Borrelia burgdorferi sensu lato*

- forekomst i *Ixodes ricinus* flått fra vegetasjon i Norge



Høgskolen i Telemark 2015

Fakultet for allmennvitenskapelige fag (AF)

Institutt for natur-, helse- og miljøvern

Adresse: Gullbringvegen 36, 3800 Bø

<http://www.hit.no>

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng.

© Rettigheter etter lov om åndsverk: Lars H. Kløcker

Trykket ved Høgskolens kopisenter i Bø

## Målet med oppgaven:

- Gi en oversikt over borreliabakterien og *Ixodes ricinus*.
- Foreta laboratorieundersøkelser for forekomst av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått samlet fra Jomfruland, Fjelløyvær, Tjore, Straum og Hinnebu.
- Innarbeide egne laboratorieresultater i en fagartikkel om forekomsten av *Borrelia* i flått i Norge.

# Forord

Oppgaven har utspring i mastergradprogrammet ENLINO (Lithuanian-Norwegian Network of Programs in Environmental Sciences), et samarbeidsprosjekt mellom HIT-Bø, NTNU, Vytautas Magnus University i Kaunas og Vilnius University. Studieprogrammet favnet om ulike masterkurs innenfor natur- og miljørelaterte emner. Forelesninger, laboratorie- og feltarbeid ble avholdt på alle fire studiestedene.

Med bakgrunn i det omtalte samarbeidet, fikk jeg anledning til å skrive en masteroppgave om flått, innenfor et forskningsfelt som blir viet stadig større oppmerksomhet grunnet økende fokus på flåttbårne sykdommer. Professor Olav Rosef, HIT- avd. Bø, har vært veileder for oppgaven.

Gjennom samarbeidet mellom Vytautas Magnus University og HIT, fikk jeg et Erasmus-stipend som gjorde det mulig å gjennomføre laboratoriearbeidet i Kaunas.

Jeg vil rette en stor takk til professor Algimantas Paulauskas, dr. Jana Radzijeuskaja, og laboratoriestaben ved Vytautas Magnus University i Kaunas, for god hjelp og tilrettelegging i forbindelse med mitt studieopphold høstsemesteret 2009. I tillegg vil jeg takke professorene Olav Rosef og Andrew Jenkins for inspirerende og god veiledning.

Bø, juni 2015

*Lars H. Kløcker*

# Innholdsfortegnelse

Mål med oppgaven .....	3
Forord .....	4
Innholdsfortegnelse .....	5
Sammendrag.....	6
Summary .....	7
Innledning.....	8
Matriale og metode.....	22
Resultater .....	34
Diskusjon.....	36
Referanser.....	39

## Vedlegg:

The prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in questing *Ixodes ricinus* ticks in Norway (Rosef et al. 2014).

## Sammendrag

Av 18 beskrevne *Borrelia burgdorferi* sensu lato er tre knyttet til sykdom hos menneske. De tre gir ulike manifestasjoner, med *Borrelia afzelii* som er assosiert med hudlesjoner (dermatoborreliose), *Borrelia garinii* med infeksjoner i nervesystemet (nevroborreliose) og *Borrelia burgdorferi* sensu stricto med betennelser i leddene (artritt).

I Norge er *Ixodes ricinus*-flåttens vektoren som overfører sykdommen ved at flåttens suger blod og samtidig avleverer bakteriene til verten. Mennesket er bare en tilfeldig vert da gnagere og vilt er de viktigste vertene for flåttens syklus. Den har tre blodsugende stadier, larve, nymfe og voksne flått, hvor de to sistnevnte er de viktigste ved human smitte.

Det er analysert 328 nymfer og voksne flått, samlet inn fra Fjelløyvær, Straum, Hinnebu, Tjore og Jomfruland. Det ble brukt bioteknologiske metoder for påvisningen av bakteriene i flåttene. Til sammen ble det funnet 13 (4%) *B. burgdorferi* s.l. Forekomsten varierte fra ikke påvist (Straum) til 7,6% (Hinnebu). Det ble funnet mindre *Borrelia* i flåttene fra områder med høy vilttetthet, Straum og Fjelløyvær (0% og 1,9%), mot områder med lavere vilttetthet Hinnebu og Tjore (7,6 % og 5,2%). Det er mer lyng og furuskog på de to førstnevnte lokalitetene, mens bar- og blandingskog er mer dominerende på de sistnevnte.

Det var høyest forekomst av *B. burgdorferi* s.l. i voksne flått i forhold til nymfer med 5,6% mot 1,5%. I fordelingen av genotyper var *B. afzelii* den dominerende med 54% (n=7) fulgt av *B. garinii* med 31% (n=4) og *B. burgdorferi* s.s. med 8% (n=1). En *B. burgdorferi* s.l. kunne ikke genotypes med de spesifikke primerne det ble brukt i undersøkelsen.

De foreliggende data ble brukt i et større arbeid hvor 2360 *I. ricinus* fra 24 lokaliteter ble undersøkt. Denne artikkelen er vedlagt.

## Summary

Of the 18 described *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) species, three are linked to disease in humans. These three provide different manifestations, with *Borrelia afzelii* being associated with skin lesions (dermatoborreliosis), *Borrelia garinii* with infections of the nervous system (neuroborreliosis) and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto with inflammation of the joints (arthritis).

In Norway the tick vector *Ixodes ricinus* transmits diseases by virtue of the fact that the tick sucks blood and at the same time delivers bacteria to the host. Humans are chance opportunistic hosts, while rodents and wildlife are the main hosts. *I. ricinus* has three blood-sucking stages, larva, nymph and adult, of which the latter two are the most important in human infections.

Three-hundred and twenty-eight nymphal and adult ticks collected from Fjelløyvær, Straum, Hinnebu, Tjore and Jomfrulund were analysed. Biotechnological methods (PCR) were used for detection of *Borrelia* in the ticks. Overall, 13 (4%) *B. burgdorferi* s.l. was detected in 13 ticks (4%). The prevalence ranged from not detected (Straum) to 7.6% at Hinnebu. There was lower prevalence in the ticks from areas with high game density - Straum and Fjelløyvær (0% and 1.9%), compared to areas with lower game density, Hinnebu and Tjore with 7.6% and 5.2% respectively. The two former localities consisted of heather and pine forests while the latter of mixed forests. The prevalence of *B. burgdorferi* s.l. was higher in adult ticks compared to the nymphs (5.6% vs 1.5%). *B. afzelii* was the dominant genospecies with 54% (n = 7) followed by *B. garinii* with 31% (n=4) and *B. burgdorferi* s.s. with 8% (n=1). One *B. burgdorferi* s.l. was not possible to genotype with the specific primers used in the survey. The present data was included in a larger work in which 2360 *I. ricinus* from 24 localities were examined. This article is attached.



## Innledning

Det har vært en markant økning i meldte tilfeller av Lyme borreliose (LB) i Europa og USA de siste 20 åra, og sykdommen er den vanligste vektor-overførte sykdom i den tempererte sone i den nordlige hemisfære. Økningen av LB kan tilskrives endringer innenfor klima, kulturlandskap, hjortedyrbestand og menneskers atferd i naturen (Barbour og Fish 1993). Trenden med et økende antall registrerte tilfeller av Lyme borreliose gjelder også for Norge. En mulig ekspansjon og økende tetthet av skogflått, *Ixodes ricinus*, større oppmerksomhet i befolkningen, flere som tester seg samt bedre tester, kan sees i sammenheng med denne økningen. Med bakgrunn i dette, kan det stilles spørsmål om hvor vidt økningen er reell. Data fra de siste 20 årene viser at antall meldte tilfeller av smittede i Norge varierer fra lavest 122 tilfeller i 1996, til høyest 346 tilfeller i 2008 (Tabell 1).

**Tabell 1.** Antall tilfeller med borreliasmitte, diagnostisert per år siste 20 år, fordelt på fylke (MSIS 2015).

Fylke	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<b>Østfold</b>	3	2	10	10	3	3	2	1	3	11	13	18	14	13	15	17	19	9	8	14
<b>Akershus</b>	9	5	4	6	5	2	1	6	1	11	8	13	11	26	16	7	14	18	18	15
<b>Oslo</b>	1	-	3	2	3	2	6	2	1	12	8	11	7	45	34	19	11	5	10	20
<b>Hedmark</b>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	3	1	2	2	1	1	-	-	1	2
<b>Oppland</b>	2	-	-	-	-	-	-	-	1	2	4	-	3	3	3	3	-	1	4	3
<b>Buskerud</b>	2	1	5	4	1	4	3	3	6	3	8	6	11	6	7	4	4	11	11	5
<b>Vestfold</b>	10	6	9	6	10	13	9	5	6	29	24	14	19	10	30	25	22	13	19	28
<b>Telemark</b>	11	9	12	25	20	21	14	16	23	25	32	70	28	30	21	25	16	18	24	25
<b>Aust-Agder</b>	15	23	24	16	18	9	16	5	25	34	27	17	32	27	15	12	12	25	21	21
<b>Vest-Agder</b>	56	50	53	40	60	38	38	22	37	49	61	47	62	59	24	25	22	32	52	27
<b>Rogaland</b>	-	8	2	12	13	16	19	13	18	33	29	39	44	25	24	40	33	29	38	46
<b>Hordaland</b>	-	7	-	10	3	6	5	2	5	6	23	21	11	14	24	37	32	40	54	68
<b>Sogn og Fjordane</b>	5	5	4	8	7	5	5	5	5	10	15	25	28	19	24	14	13	11	17	19
<b>Møre og Romsdal</b>	15	5	8	21	7	11	20	16	9	20	15	21	36	42	26	47	27	26	29	21
<b>Sør-Trøndelag</b>	-	-	3	6	4	5	2	6	3	3	4	7	9	12	7	5	18	13	4	3
<b>Nord-Trøndelag</b>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2	3	3	5	4	-	4	2	3	4	4
<b>Nordland</b>	1	1	1	3	1	-	-	-	3	1	3	1	4	7	2	3	2	1	1	1
<b>Troms</b>	-	-	1	-	2	-	-	-	1	2	-	1	2	1	-	-	1	1	-	-
<b>Finnmark</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<b>Ukjent fylke</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Totalt</b>	<b>130</b>	<b>122</b>	<b>139</b>	<b>170</b>	<b>157</b>	<b>135</b>	<b>140</b>	<b>103</b>	<b>149</b>	<b>255</b>	<b>280</b>	<b>315</b>	<b>328</b>	<b>346</b>	<b>273</b>	<b>288</b>	<b>248</b>	<b>256</b>	<b>315</b>	<b>322</b>

Tabell 1 viser at det var innmeldt 322 tilfeller av smitte i 2015 (MSIS 2015). Fra 1995 er det kun diagnostisert LB som er meldepliktig, og ikke EM (erythema migrans). Tabellen kan derfor representere «toppen av et isfjell». De fleste pasienter med mistanke om borreliasmitte (EM), blir behandlet av primærlegen med antibiotika. De som utvikler alvorlige symptomer (systemisk sykdom og senmanifestasjoner) blir registrert, og er representert i tabellen.

Beskrivelse av borreliasmitte hos menneske ble allerede gjort tidlig på 1900-tallet. Den svenske hudlegen Arvid Afzelius beskrev i 1910 det sirkulære utslettet erythema migrans (EM). Svensken Carl Lennhoff, som arbeidet ved Carolinska Istituttet, observerte i 1948 spiroket-liknende bakterier i ulike typer hudlesjoner, også fra EM. Dette førte til at penicillin fra tidlig på 1950-tallet ble brukt til behandling av EM i Europa (Hollstrøm 1951).

I 1976 ble mange barn i området Lyme i Connecticut i USA diagnostisert med reumatoid artritt. Dette ble rapportert av Steere et al. i 1977, og resulterte i videre epidemiologiske undersøkelser der sykdommen fikk navnet Lyme disease. Det ble klarlagt at sykdommen førte til hudlesjoner, leddbetennelser, affeksjoner av hjerte og nervesystem både hos barn og voksne.

Årsaken til sykdommen ble først klarlagt i 1982 da bakterien ble isolert fra tarmene i flåtten av Willy Burgdorfer og kolleger. Bakterien ble identifisert som en ny art blant spiroketene, og fikk navnet *Borrelia burgdorferi* etter oppdageren (Johnson et al. 1984).

Lyme borreliose er en kompleks sykdom som opptrer på ulike måter, særlig ved utslett, infeksjoner i store ledd og ved nevrologiske manifestasjoner. Sykdommen er forårsaket av en gruppe spiroketer, *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Det er til nå beskrevet 18 genotyper *B. burgdorferi* s.l. (Stanek og Reiter 2011), der flere er knyttet til infeksjoner hos mennesker. Det er beskrevet forskjellige kliniske manifestasjoner ved smitte fra tre av de patogene artene. *Borrelia afzelii* er assosiert med dermatoborreliose (hudlesjoner), *Borrelia garinii* med

nevro-borreliose (infeksjon i nervesystemet), og *Borrelia burgdorferi* sensu stricto med artritt (infeksjon i leddene) (Ruzic-Sablic et al. 2008). Lyme borreliose regnes som den vanligste vektorbårne sykdommen i Europa. I USA er bare *B.burgdorferi* s.s. observert i forbindelse med sykdom hos mennesker. Det er årsaken til at symptomene var i ledd (rheumatoid artritt) når infeksjonen ble utredet i Lyme. I USA er *Ixodes scapularis* flåtten som overfører sykdommen. Den primære vektoren for *B.burgdorferi* s.l. i Europa er skogflått, *I. ricinus*. Utbredelsen av borrelia-bakteriene er derfor avhengig av forekomsten av *I. ricinus* (Ostfeld et al. 2006). Det dominerende genospecies i *I. ricinus* flått i Norge, er *B. afzelii*, fulgt av *B. garinii* og *B. burgdorferi* s.s., men sammensetningen av *B. burgdorferi* s.l. genospecies kan variere mellom typer av habitat (Paulauskas et al. 2008).

### ***Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Borreliabakterien tilhører *phylum spirochaetes*, som er delt i tre hovedfamilier; *Leptospiraceae*, *Brachyspiraceae* og *Spirochaetaceae*. *B.burgdorferi* s.l-komplekset (Figur 1) består som nevnt over av 18 *Borrelia* species (Stanek og Reiter 2011).

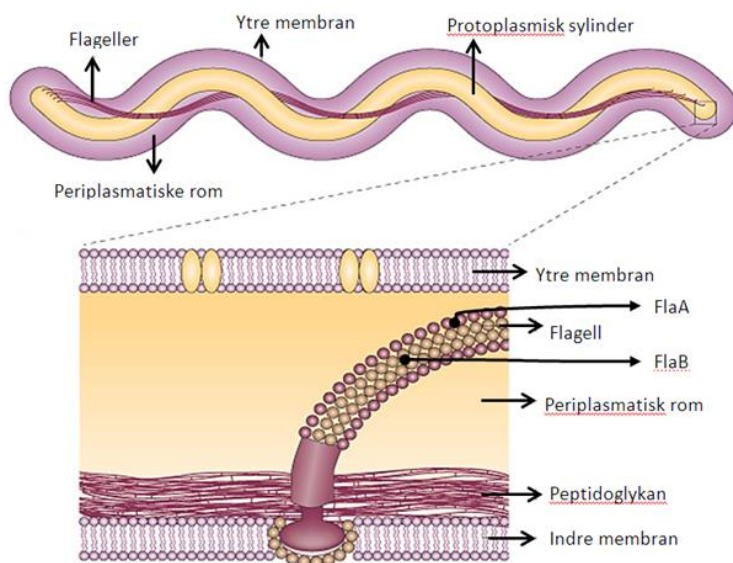


9 <i>B. valaisiana</i>	18 <i>B. kurtenbachii</i>
8 <i>B. lusitaniae</i>	17 <i>B. bavariensis</i>
7 <i>B. tanukii</i>	16 <i>B. americana</i>
6 <i>B. turdi</i>	15 <i>B. carolinensis</i>
5 <i>B. andersonii</i>	14 <i>B. yangtze</i>
4 <i>B. japonica</i>	13 <i>B. californiensis</i>
3 <i>B. afzelii</i>	12 <i>B. spielmanii</i>
2 <i>B. garinii</i>	11 <i>B. sinica</i>
1 <i>B.burgdorferi</i> s.s.	10 <i>B. bissettii</i>

**Figur 1.** *B. burgdorferi* s.l.-komplekset, med 18 påviste arter.

En undertype av *B. garinii* OspA 4 er nylig klassifisert som eget genospecies, *B. bavariensis*. Denne er også inkludert i den humanpatogene gruppen. *B. spielmanii*, har imidlertid også blitt isolert fra erythema migrans hudlesjoner (Strle og Stanek 2009). Det er også rapporter om isolasjon eller påvisning av *B. bisettii* og *B. valaisiana* hos Lyme borreliose-pasienter (Fingerle et al. 2008, Rudenko et al. 2008). Det er ikke klarlagt om *B. lusitaniae* gir Lyme borreliose symptomer selv om den er påvist i hudlesjoner (Collares-Pereira et al. 2004). Betydningen av disse som humanpatogen er uklar.

*B. burgdorferi* s.l. er langstrakte, spiralformede bakterier, med en lengde og bredde på henholdsvis 10 – 30  $\mu\text{m}$  og 0,3  $\mu\text{m}$  (Figur 2). Bakteriene har korketrekkerlignende utseende, er motile med 7 – 11 flageller, og tilhører familien *Spirochaetaceae* (Burgdorfer et al.1982). Flagellene er festet til polene i det periplasmatiske rom mellom ytre og indre cellemembran, og er sammensatt av to klasser av proteiner, FlaA og kjerneproteinet FlaB (Ge et al.1998). Bakteriene (spiroketene) svømmer ved å rotere flagellene på hver pol i ulik retning. De skifter retning ved å forandre til motsatt rotasjon av flagellene. Kjemisk stimuli kan også få flagellene til å rotere i samme retning slik at bevegelsen "fremover" stopper opp, og bakteriefiendtlig miljø unngås (Charon et al. 1992 og Shi et al. 1998).

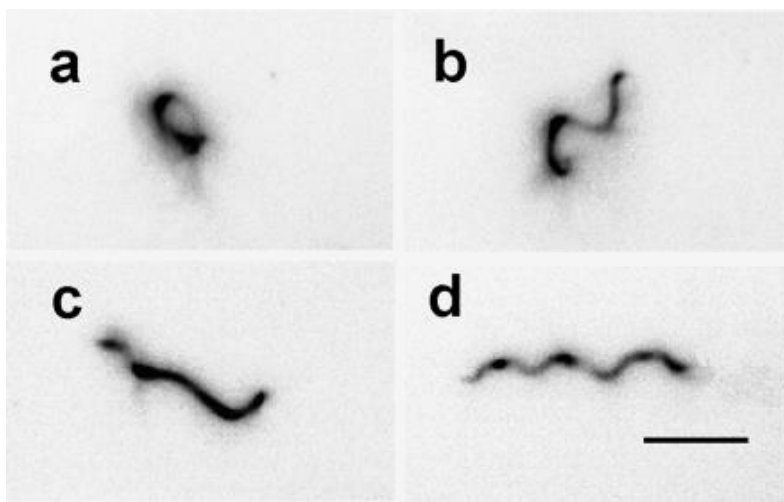


**Figur 2.** Lengdesnitt av *B. burgdorferi*. Utsnittet viser feste-punkt for flagellen på den indre membranen av bakteriecellen, med markering av FlaA og FlaB proteiner. Figuren er modifisert fra Rosa et al. (2005).

Borreliaspikroter kan være svært invasive, og invaderer ulike organer hos infiserte dyr, f. eks hjerte, blære, ledd (Barthold, 1995), og hud, blod, og hjernevev hos mennesker (Garcia-Monco et al. 1990, Stanek et al. 1990, Nocton et al. 1994). Spiroketene tilhører de eldste prokaryote bakteriegruppene. Artene består av fleksible og spiralformede celler (Madigan et al. 2009). *B. burgdorferi* s.s., stamme B31, har blitt fullt sekvensert. Genomet er lite, bare på 1,52 Mbp, hvorav 910.725 basepar på det lineære kromosomet, mens 611 kbp er fordelt på 12 lineære og 9 sirkulære plasmider (Casjens et al. 2000). Genomet inneholder ca 850 gener (Fraser et al. 1997). Bakterien er å betrakte som en parasitt, og den har mistet mange gener som er nødvendige for frittlevende eksistens. Den genetiske organiseringen er svært kompleks, og er fortsatt ikke fullt ut forstått (Bergstrøm et al. 2002). Antallet plasmider er høyt, sammenlignet med andre kjente bakterier, og det antas at plasmidene gir bakterien en form for responssystem som gjør at den raskt kan tilpasse seg miljøendringer. I tillegg til å ha denne genetiske strukturen (som ikke er helt forstått), har bakterien også en evne til å unngå vertens immunforsvar. Dette er viktig i sykdomsforløpet og i diagnostisk arbeid.

*B. burgdorferi* har mange gener som koder for kjemotaktiske egenskaper, eksempelvis to *cheA* gener (*cheA<sub>1</sub>* og *cheA<sub>2</sub>*), tre *cheY* gener (*cheY<sub>1</sub>*, *cheY<sub>2</sub>*, og *cheY<sub>3</sub>*) (Foynes et al. 2000, Charon og Goldstein 2002), samt *cheX* (Motaleb et al. 2005). I tillegg er det identifisert flere gener som er avgjørende for spiroketens motilitet, inkludert *cheA<sub>2</sub>*, *cheY<sub>3</sub>* og *cheX* (Sze et al. 2012). Funn fra tidligere forskning tyder på at motilitet er en viktig virulens-faktor som er knyttet til spiroketens invasivitet og syklus (Charon og Goldstein 2002). Bakterien kan bevege seg i tykflytende stoffer samt bindevev (Kimsey og Spielman 1990, Goldstein et al. 1994), noe ikke-motile, flagellfrie mutanter av bakterien ikke kan (Motaleb et al. 2000, Sal et al. 2008, Li et al. 2010). Både kjemotaksi og motilitet antas å ha stor betydning for patogenesen til Lyme borreliose. Syed et al. (2012) viste gjennom sine undersøkelser at ikke-motile

mutanter var ute av stand til å infisere mus gjennom injeksjon eller flåttbitt. *cheX*-genet spiller en avgjørende rolle for bakteriens motilitet, men er også viktig for kjemotaktiske prosesser i cellen (Motaleb et al. 2005). *cheX*-mutanter framtrer med forvrengte former (Figur 3), og viser manglende kjemotaksi i tillegg til hemmet motilitet. Disse mutantene har heller ikke det karakteristiske framoverrettede eller reverserende bevegelsesmønster som man finner i "villtype-spiroketene" (Motaleb et al. 2005).



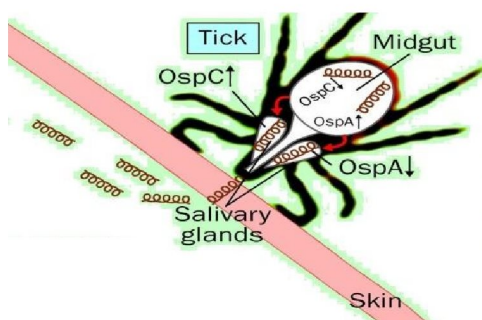
**Figur 3.** Bildene viser forskjellen i kroppsform på *CheX* mutanttype *B. burgdorferi*-celler (a, b, c), og en ikke-mutanttype *B. burgdorferi*-celle (d) (Motaleb et al. 2005).

*B. burgdorferi* s.l. er gram-negative bakterier og har både en ytre og indre membran. Den indre cytoplasmiske membranen er nær forbundet til en peptidoglykan-cellevegg, og danner en protoplasmisk sylinder som grenser mot det periplasmatiske rom (Figur 2). Den ytre membranen består av 45-62 prosent protein, 23-50 prosent fett (lipid) og 3-4 prosent karbohydrat (Barbour and Hayes, 1986). En spesiell egenskap med den ytre membranen, er mangelen på lipopolysakkarider (Takayama et al. 1987). Membranen er istedenfor dekket med lipoproteiner (Luft et al. 1989), der de ytre overflateproteinene OSP (Outer Surface Proteins) er mest forsket på. Relatert til størrelsen, koder genomet i *B. burgdorferi* s.l. for omkring 10 ganger flere lipoproteiner i forhold til andre kjente bakteriegenomer (Steere et al.

2005), og man mangler fremdeles inngående forståelse av struktur og funksjon til borreliaspiroketens ytre membranproteiner. Borreliabakterien tilpasser seg flere strategier for å overleve i immunkompetente verter, fra infeksjonstidspunkt til spredning i forskjellige vevstyper, og OspA representerer antakeligvis sykdomsfremkallende faktorer.

OspA er vesentlig for borrelia-bakteriens koloniseringen av flåttens tarm/mage (midgut), og proteinet binder bakteriecellen til flåttens tarmceller (Sing og Girschick, 2004). Flåttens fordøyelse av blodet skjer intracellulært ved endocytose, og man antar at den OspA-styrte bindingen, ved starten av blodfordøyingen, hindrer at bakteriene også blir fordøyd (Pal og Fickrig, 2005). Antistoff til OspA fra flåttvertens blod, kan imidlertid hindre at bakteriene bindes til tarmcellene og dermed hemme kolonisering i flåttarmen (Anguita et al. 2003). Nedregulering av OspA tar derfor til under blodmåltidet, og kan utfra dette også ha en funksjon i borreliabakteriens adskillelse fra flåttarmen og dens videre vandring til spyttkjertelen (Sing og Girschick, 2004) (Figur 4). Etter overføring til pattedyrverten, er OspA nedregulert, og proteinets rolle i verten er uklar.

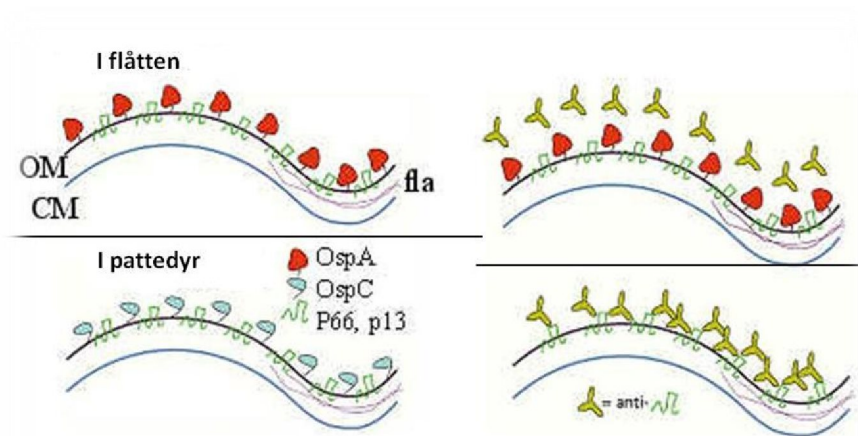
OspC er nedregulert under bakteriens opphold i flåttens tarm, før flåttan suger blod (Fingerle et al. 1995). Om blodet inneholder antistoff mot OspC, vil de kunne hindre bakterien i å migrere fra tarmen til spyttkjertelen (Gilmore et al. 2000). Etter vandring til flåttens spyttkjertel, oppreguleres OspC (Figur 4), og bakterien føres inn i pattedyrverten. Etter det, følger en rekke kompliserte mekanismer, der ulike overflate-proteiner er involvert i bakteriens strategi mot vertens immunsystem (Sing og Girschick, 2004).



**Figur 4.** Regulering av genuttrykk hos *B. burgdorferi*. I flåttens tarm blir bakteriens overflate-protein OspA oppregulert, og OspC nedregulert. Under blod-måltidet vandrer bakterien til spyttkjertelen, og OspA nedreguleres, mens OspC oppreguleres. Modifisert etter Sing og Girschick (2004).



OSP og de integrerte yttermembranproteinene (poriner) P13 og P66 (Figur 5), kan spille en viktig rolle i utviklingen av fremtidige vaksiner mot borreliose (Bunikis et al. 1999). Når OspA er oppregulert hos bakterien i flåttens tarm, "beskyttes" de integrerte proteinene P13 og P66 mot antistoff. I pattedyrverten er OspA nedregulert, og kan ikke beskytte P13 og P66 mot spesifikke antistoff (Figur 5).



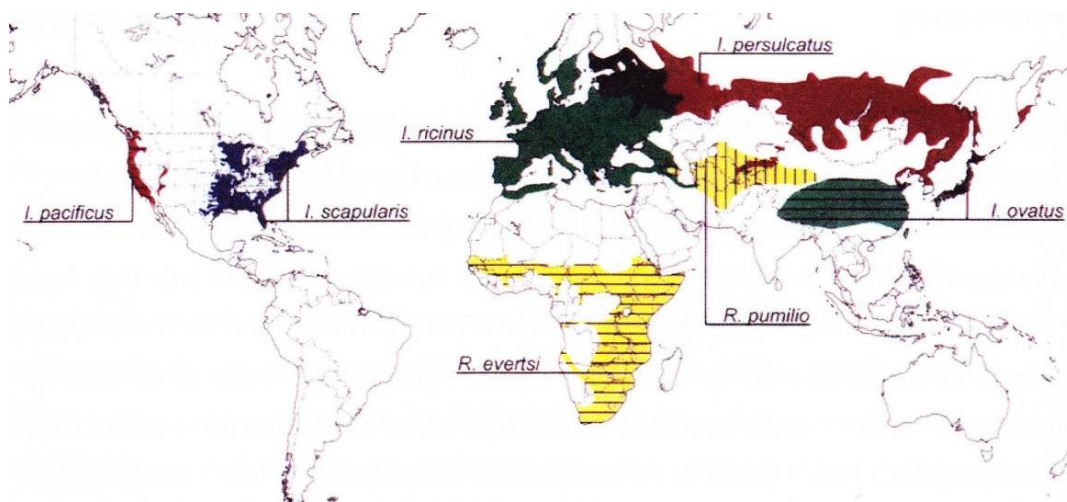
**Figur 5.** OspA og OspC bundet til den ytre membranen (OM) hos *B. burgdorferi* i flått (øverst) og pattedyrvert (nederst). De integrerte overflateproteinene P13 og P66 er mest utsatt for spesifikke antistoff i pattedyrverten, med nedregulert OspA og OspC. Modifisert etter Bunikis (2001).

Den eneste vaksinen som er utviklet mot borreliose hos mennesker, ble lisensiert og gjort tilgjengelig i USA i 1998 (History Of Vaccines, 2014). Den var virksom på borreliabakterier i flåttens tarm, og hindret bakteriens migrering til spyttkjertelen (History Of Vaccines, 2014). Vaksinen (Lymerix) ble imidlertid trukket tilbake i 2002 etter spekulasjoner og påstander om alvorlige sideeffekter. Kliniske studier på en multivalent OspA-vaksine mot lyme borreliose, er nylig avsluttet i USA (Wressing et al. 2014), men det foreligger ikke noen uttalelser om at en eventuell vaksine kommer for salg.



## *Ixodes ricinus*

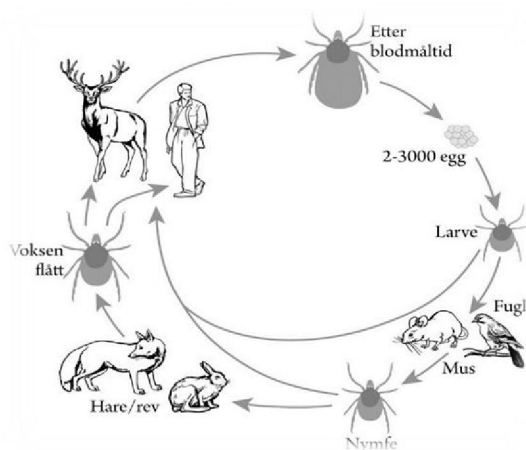
Klassifisering av flåtten skriver seg tilbake til 1746, fra Carl von Linné. Flåtten tilhører arthropodene (sammen med edderkopper og skorpioner) i klassen *Arachnidae* og subklasse *Acari*. Det er to hovedfamilier av flått, de bløte innen familien *Argasidae*, og de harde innen *Ixodidae*. Flåttarter innenfor familien *Argasidae* (bløte) er vanligvis å finne i varmere strøk, mens arter innenfor familien *Ixodidae* (harde) er vidt distribuert (Brown et al. 2005) og kan også finnes i subarktisk klima (Figur 6).



Figur 6. Oversikt over geografisk distribusjon av de vanligste flåttartene på de ulike kontinentene. *Ixodes ricinus* (grønn), *Ixodes persulcatus* (rød), *Ixodes scapularis* (blå), *Ixodes pacificus* (rød – amerikanske kontinent), *Ixodes ovatus* (grønn horisontalt merket), *Rhipicephalus evertsi* (gul horisontalt merket) og *Rhipicephalus pumilio* (gul vertikalt merket) (Brown et al. 2005).

Hunnflåtten suger blod fra alle større viltlevende pattedyr, som for eksempel elg, hjort, rådyr og hare, samt husdyr som sau, storfe, hund og katt, og ellers alle som ferdes i flåttens habitat. De ikke-voksne stadiene av flåtten (larver og nymfer), kan parasittere enkelte reptiler og omtrent alle varmblodige dyr (Labuda og Nuttall 2008), hvorav mennesket bare er en tilfeldig vert (Figur 7). Flått i nymfe- og voksenstadium er de som i hovedsak parasitterer mennesket. Larver kan imidlertid bite og suge blod av mennesker, men regnes ikke som smitteførende, da det er uvanlig med transovarial borreliasmitte (Radzijevska et al. 2013).

De minste *I. ricinus*, larvene, er vanskelige å se. De er små (< 1 mm), og skiller seg fra nymfene i form av mindre størrelse og 3 par bein, mot 4 i nymfe- og voksenstadiet. Det voksne stadiet består av både hanner og hunner. Hannens funksjon er å pare seg med hunnen. Hanner og hunner skiller lett ved at hannen er mørk blåsvart, mens hunnen har et rødfarget skjold. Nymfene er og mørke, men mye mindre i størrelse enn voksne individer, og kan ikke skiller på kjønn ved fargenyanser. Nymfer og voksne hunner er spredere av flere sykdommer, mens larvene bare overfører sykdommer som kan smitte gjennom egg og larvestadiet (transovarialt). Transovarial overføring av smitte er bl.a. kjent for *Babesia* spp. blodparasitter, og tick-borne encephalitis (TBE).



**Figur 7.** Livssyklusen til flåttene. Mennesket er bare en tilfeldig vert. Gnagere og fugler er viktige for larve- og nymfestadiene. Alle flåttens stadier suger blod (Ill. Rosef ).

Larvene kan motta smittestoffer ved første blodmåltid, enten direkte ved at vertsdyret er smittet eller ved co-feeding. Ved co-feeding sitter to eller flere flåttindivider samlet og suger blod i samme angrepspunkt på verten, og bakterier fra en infisert flått kan spres direkte til en ikke-infisert flått (Parola og Rault 2001). Larvene lever stort sett helt nede på bakken, derfor er mus (og fugl) viktig som den første verten. Flåttene fester seg først og fremst på partier hvor huden er tynn. Den bedøver bittstedet, slik at verten ikke merker noe. Mennesker oppdager som regel bittet først når flåttene skiller ut spytt som inneholder ulike kjemiske komponenter,

og vi reagerer med kløe. Flåttangrepet gir etter hvert irritasjon i huden, likt et myggstikk eller kleggbit.

Flått i vegetasjonen er særlig følsom for tørke, og i noen grad for kulde. Den regulerer vannbalansen hvis den relative fuktigheten er over 80% (Bowman et al. 2008). Sterk barfrost og tørkesommer vil påvirke antallet. Gode flåttbiotoper er derfor skyggefulle og fuktige områder, hvor det er tett med busker og kratt. Bringebær- og orekratt er eksempler på gode biotoper.

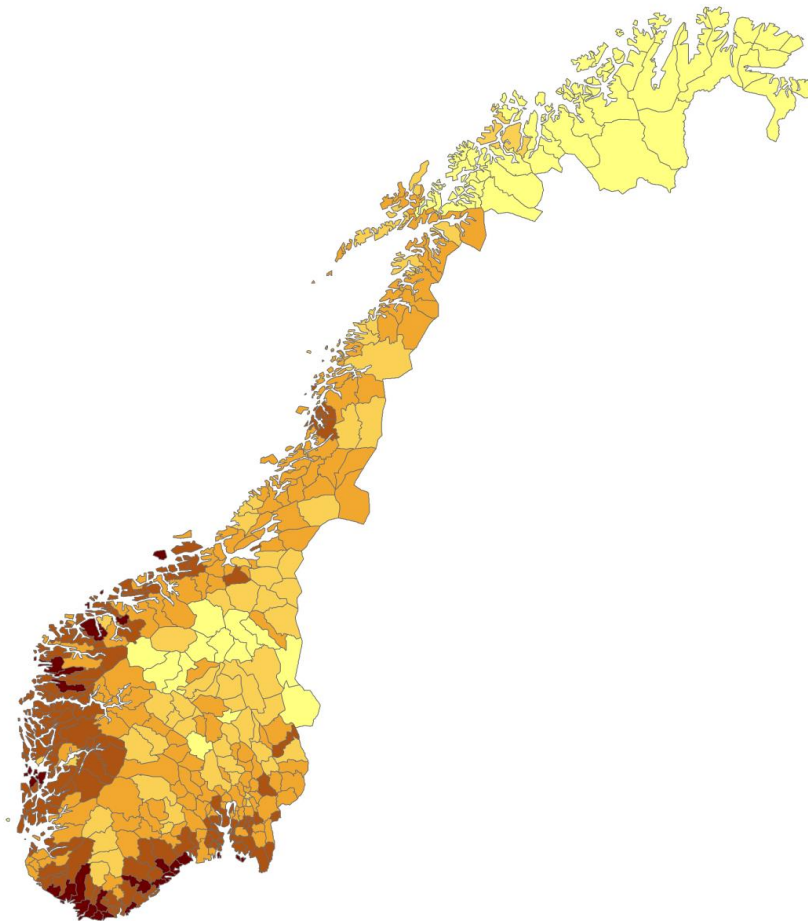
Vårt landskap med tiltagende gjengroing er gunstig for flåtten. Her får den skygge og fuktighet. Tettere bunnvegetasjon isolerer også om det kommer frost. Særlig om bakken er dekket av snø, vil disse biotopene gi god isolasjon i kuldeperioder (Ottesen 2010). Flåtten er aktiv ved temperaturer over 5°C. I områder der temperaturen sjelden beveger seg under denne temperaturen, kan man finne aktive flått store deler av året, som for eksempel langs sørlandskysten. Fugler, inklusive trekkfugler, regnes som viktige spredere av flåtten over landegrensene og til nye områder, og vi importerer millioner av flått hvert år med trekkfugler (Hasle et al. 2011). Smågnagere er viktig i sirkulasjonen av flåttbårne infeksjoner. Særlig er de viktige når det gjelder smitte til larver (Figur 8).



**Figur 8.** Bildene viser flåttangrep hos fugl og smågnager (Fotos: Rosef).

## *Ixodes ricinus* – Utbredelse i Norge

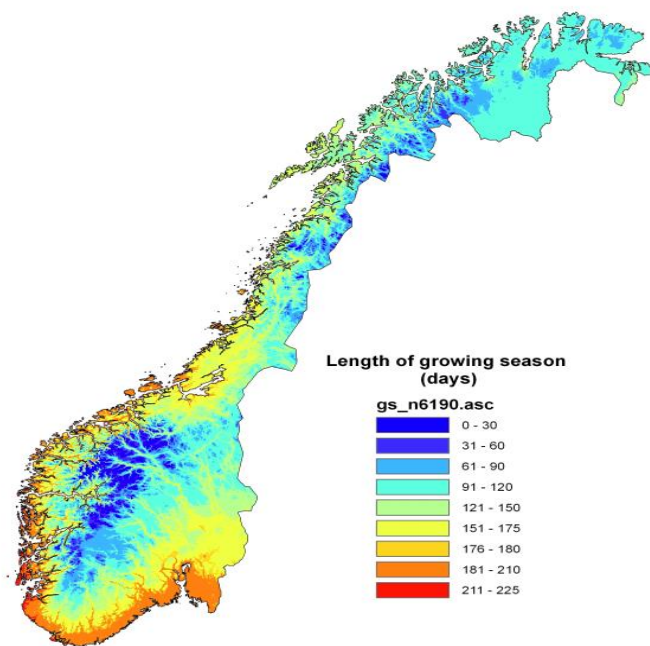
*I. ricinus* regnes som den viktigste vektoren blant flåttartene i Europa, etterfulgt av *Dermacentor reticulatus*. *I. ricinus* (skogflått) forekommer vanligst på Sørlandet. Den finnes imidlertid normalt langs kyststripen på Vestlandet, Trøndelag og Nordland. Flåtten kan opptre sporadisk i indre deler av Østlandet, og det er rapportert om funn i bl.a. Hallingdal, Mjøs-traktene og Nes i Akershus. Kartet under viser en kalkulert utbredelse av *I. ricinus* i Norge, basert på en «multi-kilde analyse» som ble slutført i 2010 (Figur 9). Funnene viser en utbredelse av skogflåtten i større høyder og lengre nord, enn hva tidligere kartlegginger har vist (Jore et al. 2011)



**Figur 9.** Utbredelse av *I. ricinus* i Norge, 2010. Lysegul farge indikerer meget liten eller ingen forekomst av flått. Dess mørkere farge, dess større forekomst av flått. Kartmaterialet er basert på flere kilder enn direkte deteksjon av flått. Figuren er hentet fra Jore et al. (2011)

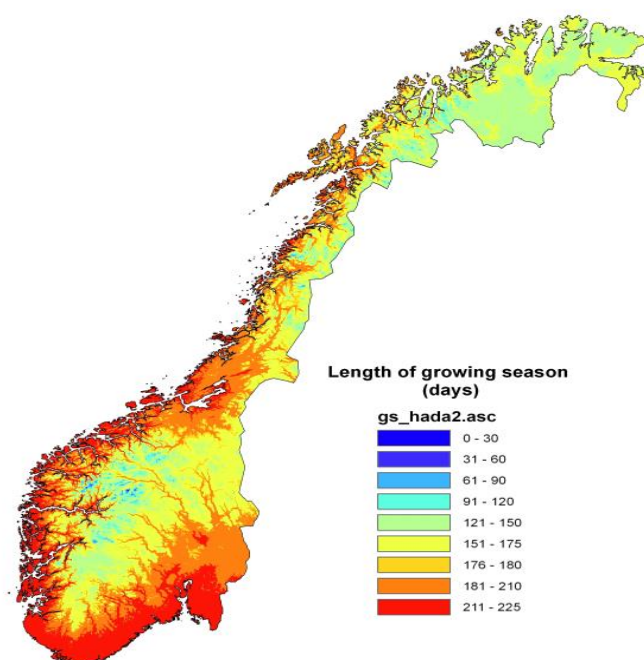
Spredning av flått med fugler, kan føre til at det oppstår bestander på steder flåtten normalt ikke finnes, særlig i innlandet. Slike bestander kan forsvinne etter noen år, og trenger derfor ikke være tegn på varig etablering. Man antar at økningen i den geografiske utbredelsen av flått i Norge, skyldes gjengroing av landskapet og endrete klimaforhold, samt større bestander av hjortevilt. Preben Ottesen, Folkehelseinstituttet, skriver i rapporten "Helsekonsekvenser av klimaendringer i Norge" (2010) at det har vært en økning av flått de seinere åra. Han refererer til Tambs-Lyche (1943) som forteller at jegere på denne tiden ikke fant flått på skutt vestlands-hjort. Dette har endret seg markant, og i våre dager er hjorten på Vestlandet angrepet av flått. Gjengroing av landskapet fører til at vegetasjonen skaper gode livsvilkår for skogflåtten mht. skygge-, fuktighets- og kuldeforhold. Tettere vegetasjon skaper mer skygge og høyere fuktighet langs bakken, og det produseres mer isolerende strø som bedrer flåtten overlevelsesmuligheter gjennom strenge kulde-perioder. Selv om man regner med at skogflåtten (*I. ricinus*) krever minst 5°C for å fungere aktivt, viser undersøkelser fra Tyskland at flåtten fryser i hjel først ved ca. -22°C (Dautel et al. 1997).

Klimaendringer påvirker vekstsesongens lengde (antall dager med gjennomsnittlig døgntemperatur over 5°C). Et oversiktskart over midlere vekstsesong i perioden 1961 – 1990 fra Meteorologisk Institutt i Oslo (Figur 10), viser at områder med 176 – 180 vekstdøgn sammenfaller med dagens utbredelse av skogflått i Norge (Ottesen 2010). Fra perioden 1961 – 90 til perioden 1979 – 2008, antyder målinger at antall dager med middel døgntemperatur over 5°C har økt med 1-2 uker over mesteparten av Norge (Hanssen-Bauer et al. 2009). I rapporten "Klima i Norge 2100", vises det også til trendanalyser (Karlsen et al. 2006, 2007, 2009), som indikerer en økning i vekstsesongen på opptil 3 uker for hele Sør-Norge og kysten av Nord-Norge i perioden 1982 – 2006. For Østlandet og Møre viste trenden en vekstsesong-økning på over 3 uker innenfor samme periode.



**Figur 10.** Kart over temperaturbestemt vekstsesong i perioden 1961 – 90. Flåttens utbredelse i dag sammenfaller med 176-180 eller flere vekstdøgn, markert med oransje til rødt. Kart produsert av Meteorologisk Institutt, Oslo. Ottesen (2010).

Hvis vi ser på framskrivningene av vekstsesonglengden for perioden 2071 – 2100, viser den i følge modellen Hadley A2 2071 – 2100 at tilnærmet alle lavlandsområder i Norge vil være dekket av en vekstsesonglengde på 176 – 180 dager (Figur 11). Hvis tilgangen på flåttens vertsdyr opprettholdes på dagens nivå, antar man at den lengre vekstsesongen vil føre til større utbredelse av flått, og en økning i antall flåttbårne sykdommer (Ottesen 2010).



**Figur 11.** Framskrivningene av vekstsesongens lengde i perioden 2071-2100, i følge modellen Hadley A2 2071-2100, viser at vekstsesongens lengde på 176 – 180 dager vil dekke stort sett alle lavlandsområdene i Norge med unntak av det aller nordligste. Kart produsert av Meteorologisk institutt, Oslo (Ottesen 2010).



# Materiale og metode

## Innsamling av flått.

Sommeren 2008 ble det samlet inn totalt 328 flått, *I. ricinus*, fra fem forskjellige lokaliteter i Norge, henholdsvis Fjelløyvær, Straum, Hinnebu, Tjore og Jomfruland (Figur 12). Forfatteren stod for innsamlingen på Jomfruland. Lokalitetene ble valgt med bakgrunn i at det var gjort undersøkelser på forekomsten av borreliainfisert flått fra disse fem områdene både i 2006 og 2007. Flåttene ble samlet ved hjelp av standard flagging metode (Hillyard 1996), og deretter puttet på mikrotuber fylt med 70 % etanol for lagring. Det ble samlet inn totalt 328 flått på de fem lokalitetene, fordelt på nymfer og voksenstadium av hanner og hunner (Tabell 4). Det ble ikke samlet inn larver.



**Figur 12.** Geografisk lokalisering av innsamlingsstedene av flått.  
1) Fjelløyvær, 2) Straum, 3) Tjore, 4) Hinnebu og 5) Jomfruland

## Fangst av *Ixodes ricinus*

Fangsten av flått fra vegetasjonen foregår ved «flagging» (Hillyard 1996). En bruker et hvitt håndkle på ca. 1x1,5 meter (Figur 13). Dette dras over vegetasjonen. Flåttene oppfatter dette som en potensiell vert og slipper seg ned/fester seg til håndkledet. De er lett synlige og plukkes av med en pinsett og legges i eppendorf-rør med 70% etanol for bakteriologiske undersøkelser på laboratoriet (Figur 14).



**Figur 13.** Flagging etter flått (t.v). Flått festet til håndkledet (t.h) (Fotos: Rosef).



**Figur 14.** Hunnflått (skilles fra hannflått ved den røde bakparten) som skal til laboratorieundersøkelse (Foto: Rosef).



## Beskrivelser av lokalitetene

To av lokalitetene det ble samlet flått fra, Fjelløyvær og Straum, ligger på Hitra, nordvestlandet i Møre og Romsdal fylke. De resterende lokalitetene ligger sørøst i landet, Hinnebu og Tjore i Aust-Agder og Jomfruland i Telemark fylke. Alle stedene bortsett fra Hinnebu, ligger i kystnære strøk. Hinnebu ligger ca. 2,5 mil innenfor kystlinjen. Vegetasjonen på Fjelløyvær og Straum er dominert av grass- og lyngvekster, og markene blir beitet av storfe (Tabell 3). Fjelløyvær, Hinnebu og Tjore har beiteområder med storfe og eller sau. I tillegg har stedene bestander med hjortedyr. Deler av Jomfruland er beiteområder for storfe. Det er ellers ikke ville bestander av større pattedyr på øya, men forekomst av smågnagere. Jomfruland har en høy tetthet av trekkfugler vår og høst. Det er en ornitologisk stasjon på øya, hvor det også i flere år er samlet inn flått fra trekkfugl. EU89,UTM-sone 32 koordinater er vist i tabell 2.

**Tabell 2.** Prøvetakingssteder EU89,UTM-sone 32 koordinater.

Lokalitet	Koordinater
1) Fjelløyvær	N: 7059209 E: 504490
2) Straum	N: 7048605 E: 487671
3) Tjore	N: 6463382 E: 473032
4) Hinnebu	N: 6493848 E: 469418
5) Jomfruland	N: 6527153 E: 535236

**Tabell 3.** Habitater på prøvetakingsområder.

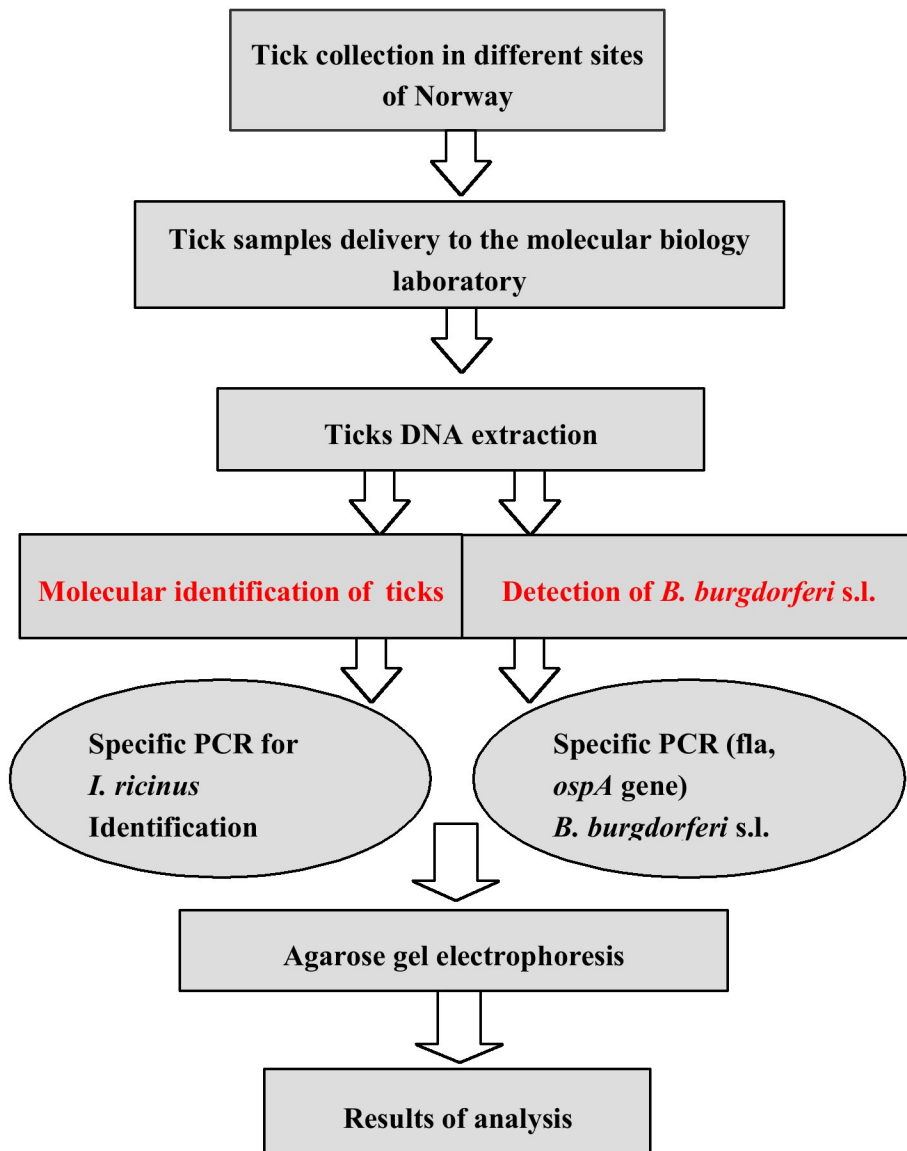
1) Fjelløyvær	2) Straum	3) Tjore	4) Hinnebu	5) Jomfruland
Grass og lyng. Beitemark. Innslag av furu- skog. Beite- og hjortedyr.	Grass og lyng. Beitemark. Innslag av furu- skog. Beite- og hjortedyr.	Bar- og blandingskog. Beitemark. Beite- og hjortedyr.	Bar- og blandingskog. Beitemark. Beite- og hjortedyr.	Bar- og blandingskog. Beitemark. Beitedyr

**Tabell 4.** Antall flått samlet i juli 2008, fordelt på nymfe og voksent stadium av hann og hunn.

	Hunn	Hann	Nymfe	Totalt
<b>Fjelløyvær</b>	9	8	43	60
<b>Straum</b>	5	7	40	52
<b>Hinnebu</b>	31	41	7	79
<b>Tjore</b>	24	14	20	58
<b>Jomfruland</b>	29	30	20	79
<b>Totalt</b>	98	100	130	328

## Laboratorieundersøkelsene

Alle laboratorieanalysene ble utført ved laboratoriet ved Vytautas Magnus University i Kaunas, Litauen. Det ble satt opp en prosedyre for undersøkelsene, og gangen for gjennomføringen er skissert under:



## Isolering av DNA fra flått

Ekstraksjon av DNA ble utført ved lysering i 2,5% ammoniumhydroksyd-løsning (NH<sub>4</sub>OH) (Stanczak et al. 1999).

1. Flåttten ble overført fra eppendorfrøret med 70% alkohol til et filterpapir for lufttørking.
2. Flåttten ble så overført til et 1,5 ml eppendorfrør og ble tilsatt 2,5% ammoniumhydroksidløsning, 100µl og 75µl for henholdsvis voksne og nymfer.
3. Rørene ble varmet opp i en varmeblokk ved 99°C i 25 minutter. Det ble stukket hull i lokkene for å unngå at lokket spratt opp.
4. Rørene ble deretter sentrifugert i 1 min med 14000 rpm for å samle kondens.
5. Røret ble satt tilbake i varmeblokken med 100°C i 20 minutter med lokket åpent for avdamping av ammonium.
6. Røret ble avkjølt ved at det ble satt på is i 2 minutter for så å bli sentrifugert med 14000 rpm i 1 minutt.
7. Rørene med DNA ekstraktet ble merket og brukt umiddelbart eller lagret ved -20°C for senere analyser.

## Standard PCR

Preparering av DNA-prøver og tillaging av reaksjonsblanding, samt PCR-kjøring, ble utført i separate områder på laboratoriet. Reaksjonsblandingen ble laget i kabinett med UV bestråling. PCR blandingen som ble brukt, var 2X PCR Master Mix fra Fermentas i Litauen. 2X PCR Master Mix består av *Taq* DNA Polymerase (rekombinant), PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, og dNTP.

## Bestemmelse av *Ixodes ricinus*

Hvert eksemplar av flåttene ble analysert for å bekrefte arten *I. ricinus* (Figur 12). Primerne som ble brukt, var IxriF og IxriR (Paulauskas et al. 2008). Primerne gir et segment på 150 basepar fra 5.8s rRNA, som er spesifikke for *I. ricinus* (Tabell 5). Reaksjonsblandingene for analysen er vist i tabell 6. Det ble brukt destillert vann som negativ kontroll. Positiv kontroll er spesifikt *I. ricinus* DNA. PCR ble utført på Mastercycler® gradient fra Eppendorf (Tabell 7).

**Tabell 5.** PCR primere brukt til bestemmelse av *I. ricinus*

Art	Primere	Primersekvenser	Lengde (bp) på PCR produkter
<i>I. ricinus</i>	IxriF IxriR	5'GGA AAT CCC GTC GCA CG3' 5'CAA ACG CGC CAA CGA AC3'	150 bp

**Tabell 6.** PCR reaksjonsblanding, *I. ricinus*

Reaksjonsblanding	1 prøve
2xPCRMix	6,3µl
IxriF	0,5 µl (10 pmol/µl)
IxriR	0,5 µl (10 pmol/µl)
ddH <sub>2</sub> O	3,7µl
Templat DNA	1,5µl
Total reaksjon volum 1 sample	12,5µl

**Tabell 7.** PCR temperatursyklus, *I. ricinus*

Syklus nr.	Temperatur	Tid	Antall repetisjoner
Syklus 1	94° C	3 min	
Syklus 2	94° C	30 sek	} X 30
	51° C	30 sek	
	72° C	30 sek	
Syklus 3	72° C	3 min	
Syklus 4	4° C	Hold	

## Agarose gel

For å dokumentere PCR produkter ble det brukt elektroforese på 1,5% agarosegel. Fremstilling og utførelse av denne er beskrevet under.

1. 2,25g agarose og 150 ml TBE buffer ble blandet i en erlenmeyerkolbe og varmet 2-3 minutter i mikrobølgeovn til det begynte å koke. Kolben ble tatt ut, rotert og kokt videre til løsningen ble glassklar. Så ble den avkjølt til 55 °C.
2. 15µl ethidiumbromid (EtBr) ble tilsatt under avtrekk. Løsningen ble så helt opp i en støpeform med en kam i (brønner til ekstraktet).
3. Etter en time ble kammen fjernet og den stive gelen plassert i et elektroforesekammer hvor den ble dekket med 0,5% TBE-buffer.
4. Gel Loading Buffer (ABgene) tilsettes PCR produktet og 10µl av PCR produktet ble applisert i brønnene.
5. Som størrelsesmarkør ble det brukt Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder fra Fermentas som ble applisert i første og siste brønn, og ØX174RF DNA Hae III (ABgene) ble applisert i brønnene for visualisering.
6. Elektroforesen ble utført ved 135 V i en time.
7. Gelen ble så satt inn i UV-kammer for å synliggjøre DNA. Bilder ble tatt av gelen (GeneSnap) og skrevet ut på vanlig printer.

## Påvisning av *Borrelia burgdorferi sensu lato* i flått

Flåttene ble analysert individuelt for å påvise eventuell smitte med *B.burgdorferi* s.l. Segmenter av *OspA*-genet i *B.burgdorferi* s.l. ble brukt som mål for PCR amplifikasjon (Demaerschalk et al., 1995). SL-F og SL-R primere ble brukt i PCR-reaksjonen som vist i Tabell 8. PCR- produktene ble separert i 1,5% agarose-gel, og visualisert ved UV- lys som beskrevet over. PCR-produkter med vandring likt positivkontrollen (307 bp) ble ansett som positive resultater.

**Tabell 8.** *B. burgdorferi* s.l. PCR med *OspA* gen

Primer	Sekvens
SL-F	5'AAT AGG TCT AAT AAT AGC CTT AAT AGC 3'
SL-R	5'CTAGTGTTTTGCCATCTTCTTTGAAAA 3'

Det ble anvendt 25 µl reaksjonsblanding, fordelt på 12,5 µl 2X Multiplex PCR Mastermix (Fermentas), 1µl av hver primer, 8 µl dobbeltdestillert vann og 2,5 µl DNA-ekstrakt fra flåttene (Tabell 9). PCR-program ble satt opp som vist i Tabell 10.

**Tabell 9.** Reagenser 25 µl bestående av: 22,5 Mix + 2,5 µl DNR

Multiplex Master Mix x 2	12,5 µl
SL-F	1 µl (10 pmol/ µl)
SL-R	1 µl (10 pmol/ µl)
ddH <sub>2</sub> O	8 µl

**Tabell 10.** PCR - program *B.burgdorferi* s.l.

Syklus nr.	Temperatur	Tid	Antall repetisjoner
Syklus 1	95°C	15 min	
Syklus 2	94°C	20 sek	} X 40
	63°C	20 sek	
	72°C	30 sek	
Syklus 3	72°C	2 min	
Syklus 4	4°C	Hold	



## Genotyping ved Multiplex PCR

Flåttprøvene som var positive for *Borrelia burgdorferi* s.l, ble analysert i multiplex PCR for bestemmelse av de tre borrelia-artene *B.afzelii*, *B.garinii* og *B.burgdorferi* s.s. Det ble brukt genotype-spesifikke primere for å avdekke ulike sekvenser i *ospA*-genet hos *B. burgdorferi* s.l., som beskrevet av Jenkins et al. (2001a). Primerne GIII-L / GIII-R (*B. afzelii*), GII-L / GII-R (*B. garinii*), og GI-L / GI-R (*B. burgdorferi* s.s.) ble brukt til PCR amplifikasjon av gensekvensene, med henholdsvis 189, 345 og 544 basepar (Tabell 11). PCR-produktet ble analysert ved elektroforese i 1,5% agarose og visualisert ved UV – lys som beskrevet over. Lengden (bp) etter PCR amplifisering av *OspA* genet i *B. burgdorferi* s.l. er vist i figur 17 under "Resultater". Reagenser og PCR oppsett er listet opp i Tabell 12 og 13.

**Tabell 11.** Primere for artsbestemmelse av *B. burgdorferi* s.l.

Primer	Sekvens	Lengde (bp) av PCR-produkter
GI-L GI-R	5'-AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT-3' 5-TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC-3'	<i>B.burgdorferi</i> s.s., <b>544 bp</b>
GII-L GII-R	5'-TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC-3' 5'-GTAAC TTCAATGTTGTTTTGCCG-3'	<i>B.garinii</i> , <b>345 bp</b>
GIII-L GIII-R	5'-TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG-3' 5'-TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT-3'	<i>B.afzelii</i> , <b>189 bp</b>

**Tabell 12.** Reagenser 30 µl hvorav 3 µl DNR.

Reagenser	1 prøve
<b>Multiplex Master Mix x 2</b> (med HotStart Taq Polymerase)	15 µl
GI-L	2 µl (10 pmol/ µl)
GI-R	2 µl (10 pmol/ µl)
GII-L	2 µl (10 pmol/ µl)
GII-R	2 µl (10 pmol/ µl)
GIII-L	2 µl (10 pmol/ µl)
GIII-R	2 µl (10 pmol/ µl)

**Tabell 13.** PCR-program for bestemmelse av genotype *B.burgdorferi* s.l.

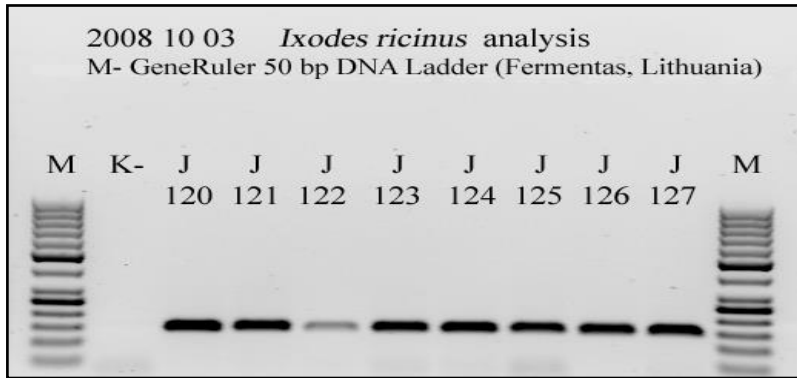
Syklus nr.	Temperatur	Tid	Antall repetisjoner
Syklus 1	95°C	15 min	
Syklus 2	95°C	30 s	} X 40
	65° C	90 s	
	72°C	60 s	
Syklus 3	72°C	2 min	
Syklus 4	4°C	Hold	

## Resultater

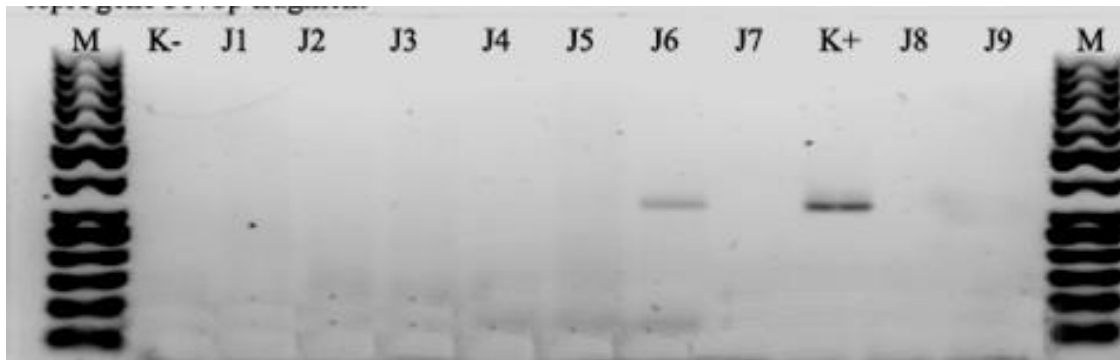
All flått ble verifisert som *I. ricinus* (n=328) (Figur 15). Det ble funnet 13 positive *B. burgdorferi* s.l.- prøver samlet fra Fjelløyvær, Straum, Tjore, Hinnebu og Jomfruland (Figur 16). Prevalensen varierte fra 0-7,6% med et gjennomsnitt på 4,0%. Lavest prevalens var på Fjelløyvær (0%) og Straum (1,9%). Høyest prevalens var det på Hinnebu med 7,6% (Tabell 14). *Borrelia afzelii* ble påvist i 53,8% (n=7), og *Borrelia garinii* i 30,8% (n=4) og *Borrelia burgdorferi* s.s. i 7,6% (n=1). En prøve positiv for *Borrelia burgdorferi* s.l. var negativ i genotypingstest, som vist i Figur 17. Forekomsten i voksen flått var høyere enn i nymfer med henholdsvis 5,6% og 1,5%. Det ble påvist færrest *B.burgdorferi* s.l. i områdene med tettest viltbestand og tørr lyng og furuskog (Straum og Fjelløyvær) i motsetning til områder med lavere viltbestand og mer gress og blandingsskog (Hinnebu og Tjore).

**Tabell 14.** Funn av *B. burgdorferi* s.l. i de ulike samlingsområdene.

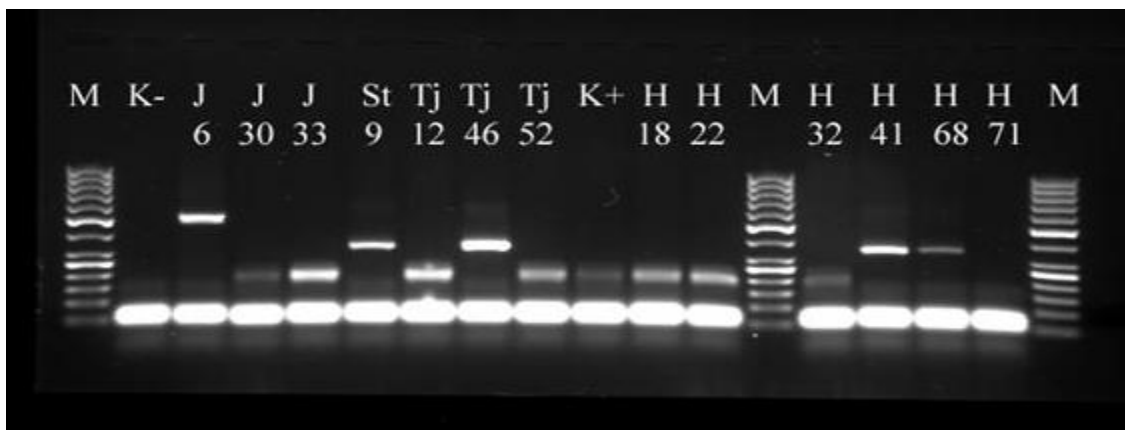
Lokaliteter	Hunnkjønn			Hannkjønn			Nymfer			Total		
	N	Andel smittet		N	Andel smittet		N	Andel smittet		N	Andel smittet	
		n	%		n	%		n	%		n	%
<b>Fjelløyvær</b>	9	0	0	8	0	0	43	0	0	<b>60</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Straum</b>	5	0	0	7	1	14,3	40	0	0	<b>52</b>	<b>1</b>	<b>1,9</b>
<b>Tjore</b>	24	1	4,2	14	0	0	20	2	10	<b>58</b>	<b>3</b>	<b>5,2</b>
<b>Hinnebu</b>	31	3	9,7	41	3	7,3	7	0	0	<b>79</b>	<b>6</b>	<b>7,6</b>
<b>Jomfruland</b>	29	3	10,3	30	0	0	20	0	0	<b>79</b>	<b>3</b>	<b>3,8</b>
<b>Sum</b>	98	7	7,1	100	4	4,0	130	2	1,53	<b>328</b>	<b>13</b>	<b>4,0</b>
N = antall analyserte flått. n = andel flått smittet av bakterien												



**Figur 15.** Bestemmelse av *I.ricinus* ved PCR. Kolonnene J120 – J127 viser positive resultater. M er standardmarkør, K<sup>-</sup> er negativ kontroll. Positiv kontroll vises ikke på figurutsnittet.



**Figur 16.** Bestemmelse av *B.burgdorferi* s.l. ved elektroforese. Prøven i kolonnene J6 (307 bp fragment) er positiv for *B.burgdorferi* s.l. K<sup>-</sup> og K<sup>+</sup> er negativ og positiv kontroll. M er størrelsesmarkør.



**Figur 17.** Genotypebestemmelse av de 13 påviste *B. burgdorferi* s.l. M er størrelsesmarkør. K<sup>-</sup> er negativ kontroll (ddH<sub>2</sub>O), H = Hinnebu, Tj = Tjore, J = Jomfruland og St = Straume. J6 viser *Borrelia burgdorferi* s.s. (544bp). J33, Tj12, Tj52, H18, H22 og H32 viser *Borrelia afzelii* (189bp). St9, Tj46, H41 og H68 viser *Borrelia garinii* (345bp). Det kunne ikke påvises noen av de tre genospecies i prøve H71.

## Diskusjon

Totalt ble 328 flått innsamlet og analysert. Alle tilhørte *Ixodes ricinus* som er den mest vanlige arten i Norge. Det har vært diskutert om *Ixodes trianguliceps* kan være involvert i sirkulasjonen av *Borrelia* spp. Denne arten er imidlertid først og fremst knyttet til smånagere og har muligens betydning for sirkulasjonen av *Anaplasma phagocytophilum* (Rosef et al. 2009), og ble ikke funnet i foreliggende undersøkelse.

Resultatene fra denne studien er i samsvar med tendensen fra 2006 og 2007 (Rosef et al. 2009), som viser svært få tilfeller av infiserte flått på Hitra (Fjelløyvær og Straum). På disse lokalitetene er det spesielt stor tetthet av rådyr og hjort. Vilt har naturlige antistoffer som hindrer etableringen og formeringen av borreliapiroketen i flåtten (Jaenson og Tälleklint 1992). En regner med at vilttettheten vil kunne gi en «fortynningseffekt» på *Borrelia* i flåtten, som beskrevet av Rosef et al. (2009). Datamaterialet i studien er relativt lite, og det er usikkert om prevalensforskjellene er statistisk signifikante. Konklusjonen om at høy vilttetthet gir lav *Borrelia* prevalens, må derfor regnes som noe usikker.

Når det gjelder forekomsten av *B. burgdorferi* s.l., viser resultatene færrest tilfeller av infisert flått samlet fra gress-, lyng- og beitemark. Lokalitetene Fjelløyvær og Straum representerer disse habitattypene. Resultatene er i samsvar med tidligere undersøkelser, både i Norge og i Litauen, der det ble funnet signifikante forskjeller i forekomst av *B. burgdorferi* s.l. i forhold til habitattyper; høyest forekomst i løv- og blandingsskog og lavest forekomst på beitemark (Paulauskas et al. 2008).

De voksne flåttene har generelt høyere forekomst av borreliainfeksjon, på grunn av muligheten for infeksjon ved blodsuging gjennom larve- og nymfestadiet (Rauter and Hartung, 2005). En kan derfor anta at smitterisikoen fra flåtten er lavere fra nymfer.

Resultatene fra denne undersøkelsen viser en overvekt av voksne borreliainfisert flått, med 5,6% mot 1,5% i nymfer, og er i samsvar med funn fra andre studier (Jenkins et al. 2001b).

Nyere undersøkelser fra Nord Norge (Soleng og Kjelland, 2013) viser høy forekomst av *Borrelia* i flått også i denne regionen med en infeksjonsrate på 11,3% av nymfene og 33,3% av de voksne. Hvidsten et al. (2013) gjorde undersøkelser på flått fra hund og katt, og fant også høy infeksjonsgrad. Høyest ved Brønnøysund (29%), men lavere (4%) fra området lenger nord. Det er uklart hvor den nordligste utbredelsen av *I. ricinus* er, men data fra Folkehelseinstituttet ([www.msis.no](http://www.msis.no)) viser bare få infiserte personer i siste tiårsperiode i de tre nordligste fylkene, med nesten fravær i Finnmark.

Resultater av undersøkelsen viser høyest prevalens av *Borrelia* i flått fra Hinnebu og Tjore, med henholdsvis 7,6% og 5,2%. Biotopene ved disse lokalitetene er bar- og blandingskog og beiteland. Jomfruland representerer en mellomtype av biotopene på Hinnebu/Tjore og Fjelløyvær/Straum, men er også et stoppested for trekkfugl som kan ta med seg flått fra kontinentet (Hasle et al. 2011). Resultater fra Hasle et al. (2011) viser en høy forekomst av *B. garinii* i flått tatt fra trekkfuglene. Rosef et al. (2014) viser imidlertid i sin undersøkelse at det er en dominans av *B. afzelii* både i flått fra vegetasjonen og fra smånagere i samme området (Jomfruland og Lista).

I dette studiet ble både *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, og *B. afzelii* påvist. En av flåttene fra Hinnebu kunne ikke artsbestemmes, sannsynligvis fordi at sensu lato-primerne påviser alle genospecies, mens de artsspesifikke primerne påviser bare *B. afzelii*, *B. garinii* og *B. burgdorferi* sensu stricto.

*B. burgdorferi* s.s. ble funnet i 8% av de positive flåttprøvene, *B. garinii* i 31% og *B. afzelii* i 54%. Paulauskas et al. (2008) viste at infeksjonen i flått fra vegetasjonen var dominert av *B. afzelii* (68%) fulgt av *B. garinii* (21%) *B. burgdorferi* s.s. (11%). Det samme bildet med

dominans av *B. afzelii* ser vi fra de siste undersøkelsene fra Nord Norge (Soleng og Kjelland, 2013. Hvidsten et al. 2013).

En oversikt over forekomsten i 2360 flått fra 24 lokaliteter er gitt i vedlagte artikkel:

*The prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in questing Ixodes ricinus ticks in Norway.* I dette studiet var forekomsten 7,2% *B. burgdorferi* s.l. med en dominans av *B. afzelii* på 71,9% fulgt av *B. garinii* med 12,9%, *B. burgdorferi* s.s. med 7% og *B. valaisiana* på 1,2%.

## Referanser

- Aavitsland P, Berild D, Emmert A, Horn M, Rørtveit G.** 2014. Vitenskapelighet og forsvarlighet. Tidsskrift for Norsk Legeforening 2014; 134: 138–9
- Anguita J, Hedrick MN, Fikrig E.** 2003. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. FEMS Microbiol Rev 27: 493–504
- Barbour AG, Hayes F.** 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50: 381-400.
- Barbour AG, Fish D.** 1993. The biological and social phenomenon of Lyme disease. Science 260: 1610-1616.
- Barthold SW.** 1995. Animal models for Lyme disease. Lab. Invest. 72: 127–130.
- Bergstrøm S, Noppa L, Gylfe Å, Østberg Y.** 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pp 47-90 (Chap. 3) In: Gray JS, Kahl O, Lane RS Stanek G (eds.) Lyme borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. New York, Cabi International publishing, 347 pp.
- Bowman AS, Ball A, Sauer JR.** 2008. Tick salivary glands: the physiology of water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. In: Ticks; Biology, Disease and Control. Ed. Bowman AS, Nuttall PA. pp 73-91. Cambridge Univ. Press.
- Brown RN, Lane RS, Dennis DT.** 2005. Geographic distribution of tick-borne diseases and their vectors. In: Tick borne diseases of humans. Ed. Goodman JL, Dennis DT, Soenenshine DE. pp. 363-391. ASM Press. ISBN 1-55581-238-4.
- Bunikis J.** 2001. Structure and Function of the Surface Proteins of *Borrelia* Spirochetes. Part of the proceedings of the symposium Current Research on Tick-Borne Infections, Kalmar, Sweden, March 28–30, 2001. Zooeco.org
- Bunikis J, Barbour AG.** 1999. Access of Antibody or Trypsin to an Integral Outer Membrane Protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* Is Hindered by Osp Lipoproteins. Infect Immun. 67: 2874–2883.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Gruwaldt E, Davies JP.** 1982. Lyme disease- a tick borne spirochetosis? Science 216: 1317-1319.



**Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson G, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM.** 2000.

A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiol.* 35: 490-516.

**Charon NW, Goldstein SF, Block SM, Curci K, Ruby JD, Kreiling JA, Limberg RJ.** 1992. Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. *J. Bacteriol.* 174: 832–840.

**Charon NW, Goldstein SF.** 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu. Rev. Genet.* 36: 47–73.

**Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, Concalves L, Babtsta S, Vieira ML, Cunha C.** 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1316-1318.

**Demaerschalck I, Messaoud A B, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E.** 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: 602-608.

**Dautel H, Knülle W.** 1997. Cold hardiness, supercooling ability and causes of low-temperature mortality in soft tick, *Argas reflexus*, and the hard tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodoidea) from Central Europe. *Journal Insect Physiol.* 43: 843-854.

**Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B.** 1995. Expression of Outer Surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Journ Clin Microbiol* 33: 1867–1869.

**Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonard S, Hofman H, Weber K, Pfliser K, Strle F, Wilske B.** 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 279-290.

**Folkehelseinstituttet (FHI).** 2015a. Mikroskopimetode ikke egnet for å påvise borrelia og babesia. <http://www.fhi.no/artikler/?id=114253>

**Folkehelseinstituttet (FHI).** 2015b.

Skogflåttencefalitt.<http://www.fhi.no/artikler/?id=103135>

**Foynes S, Dorrel N, Ward SJ, Stabler RA, McColm AA, Rycroft AN, Wren BW.** 2000.

*Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect. Immun.* 68: 2016–2023.

**Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Feismann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterbach T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC.** 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.

**Garcia-Monco JC, Fernandez Villar B, Calvo Alen J, Benach JL.** 1990. *Borrelia burgdorferi* in the central nervous system: experimental and clinical evidence for early invasion. *J. Infect. Dis.* 161: 1187–1193.

**Ge Y, Li C, Corum L, Slaughter CA, Charon NW.** 1998. Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriology* 180: 2418-2425.

**Gilmore RD Jr., Piesman J.** 2000. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* Migration from the Midgut to the Salivary Glands following Feeding by Ticks on OspC-immunized mice. *Infect Immun* 68: 411–14

**Goldstein SF, Charon NW, Kreiling JA.** 1994. *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3433–3437

**Hanssen-Bauer I** (red.). 2009. Klima i Norge 2100. Bakgrunnsmateriale til NOU Klimatilpasning. Norsk klimasenter. 148 s.

**Hasle G, Bjune G, Midthjell L, Røed KH, Leinaas HP.** 2011. Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. *Ticks and Tickborne Diseases.* 2: 37-43.

**Hasle G.** 2011. Endringer i epidemiologien for flått-bårne sykdommer som følge av global oppvarming. Prøveforelesning i forbindelse med Ph D disputas.

[http://www.reiseklinikken.no/Gunnar\\_Haslepr%C3%B8veforelesning\\_til\\_PhD.pdf](http://www.reiseklinikken.no/Gunnar_Haslepr%C3%B8veforelesning_til_PhD.pdf)

**Hillyard PD.** 1996. Ticks of North-West Europe. Synopses of the British Fauna. Ed. Barnes RSK, Chothers JH. No 52. The Dorset Press ISBN 1-85153-257-9.

**History Of Vaccine.** 2014. The History of the Lyme Disease Vaccine.

<http://www.historyofvaccines.org/content/articles/history-lyme-disease-vaccine>

**Hollstrøm E.** 1951. Successful treatment of erythema migrans Afzelius. Acta Derm Venereol. 31: 235–243.

**Hvidsten D, Stuen S, Jenkins A, Dienus O, Olsen RS, Kristiansen BE, Mehl R, Matussek A.** 2013. *Ixodes ricinus* and *Borrelia* prevalence at the Arctic Circle in Norway. Ticks Tick Borne Diseases. 10.1016/j.ttbdis.2013.09.003

**Jaenson TG, Tälleklint L.** 1992. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. J Med Entomol. 29: 813-7.

**Jenkins A, Handeland K, Stuen S, Schouls L, van de Pol I, Meen RT, Kristiansen BE.** 2001a. Ehrlichiosis in a Moose Calf in Norway. J Wild Dis. 37: 201-203.

**Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, Aakre RK, Strand L, Kleveland EJ, van de Pol I, Schouls L.** 2001b. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. J Clin Microbiol. 39: 3666-71.

**Johnson PD, Russell C, Fred W, Hyde BS, Catherine M, Rumpel BS.** 1984. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. The Yale Journal of Biology and Medicine. 57: 529-537.

**Jongejan F, Ringenier M, Putting M, Berger L, Burgers S, Kortekaas R, Lenssen J, van Roessel M, Wijnveld M, Madder M.** 2015. Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium.

Parasites & Vectors 8:232

**Jore S, Viljugrein H, Hofshagen M, Brun-Hansen H, Kristoffersen A B, Nygård K, Brun E, Ottesen P, Sævik B K, Ytrefhus B.** 2011. Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. Parasites & Vectors 4: 84

- Karlsen SR, Høgda KA, Wielgolaski FE, Tolvanen A, Tømmervik H, Kubin E, Poikolainen J.** 2009. Trends in the growing season in Fennoscandia as measured from satellite and phenology data for the 1982–2006 period. *Climate Research* 39: 275–286.
- Karlsen SR, Solheim I, Beck PSA, Høgda KA, Wielgolaski FE, Tømmervik H.** 2007. Variability of the start of the growing season in Fennoscandia, 1982–2002. *Int. J. Biometeorol.* 51: 513–524.
- Karlsen SR, Elvebakk A, Høgda KA, Johansen B.** 2006. Satellite based mapping of the growing season and bioclimatic zones in Fennoscandia. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 15: 416–430.
- Kimsey RB, Spielman A.** 1990. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* 162: 1205–1208.
- Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A.** 2010. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in southern Norway. *Acta Vet. Scand.* 52: 59.
- Li C, Xu H, Zhang K, Liang FT.** 2010. Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FliG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity. *Mol. Microbiol.* 75: 1563–1576.
- Labuda M, Nuttall PA.** 2008. Viruses transmitted by ticks. In: *Ticks; Biology, Disease and Control*. Ed. Bowman AS, Nuttall PA. pp 253-280. Cambridge Univ. Press.
- Luft BJ, Jiang W, Munoz P, Dattwyler RJ, Gorevic PD.** 1989. Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity.* 57: 3637-3645.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Cark DP.** 2009. *Biology of Microorganisms*. Pearson International Edition, 1061 pp + appendices.
- Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Scott Samuels D, Charon NW.** 2000. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10899–10904.
- Motaleb MA, Miller MR, Li C, Bakker RG, Goldstein SF, Silversmith RE, Bourret RB, Charon1 NW.** 2005. CheX is a phosphorylated CheY phosphatase essential for *Borrelia burgdorferi* chemotaxis. *Journal of bacteriology.* 187: 7963–7969.

**MSIS 2015.** Meldingssystem for smittsomme sykdommer, Nasjonalt folkehelseinstituttstatistikk , <http://www.msis.no/>.

**Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC.** 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* 330: 229-234.

**Ostfeld RS, Canham CD, Oggenfuss K, Winchcombe RJ, Keesing F.** 2006. Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in Lyme-disease risk. *Plos Biol.* 6: 1058-1068.

**Ottesen P.** 2010. Vektorer. I: Helsekonsekvenser av klimaendringer i Norge. Bakgrunnsmateriale til NOU Klimatilpasning. Nasjonalt Folkehelseinstitutt og Helsedirektoratet: 57-67.

**Pal U, Fikrig E.** 2003. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes Infect* 5: 659–666

**Parola P, Raoult D.** (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans; an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32: 897-928.

**Paulauskas A, Ambrasiene D, Radzijeuskaja J, Rosef O, Turcinaviciene J.** 2008. Diversity in prevalence and genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in Lithuania and Norway. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 180-187.

**Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Rosef O, Petkevičius S, Mažeika V, Rekašius T.** 2013. The propensity of voles and mice to transmit *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection to feeding ticks. *Veterinary Parasitology* 197: 318 – 325.

**Rauter C, Hartung T.** 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7203-7216.

**Rosa PA, Tilly K.** 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 129-143

**Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J.** 2009. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet. Scand.* 51: 47.

- Rosef O, Radzijeuskaja J, Kløcker L, Paulauskas A.** 2014. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing *Ixodes ricinus* ticks in Norway. *Biologija* 1: 33 - 45.
- Ruzic-Sablic E, Zore A, Strle F.** 2008. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated by pulse-field gel electrophoresis after MluI restriction of genomic DNA. *Research in Microbiology*. 159: 441- 448.
- Rudenko N, Golovchenko M, Mokracek A, Piskunova N, Ruzek D, Mallatova N, Grubhoffer L.** 2008. Detection of *Borrelia bissetii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3540-3543.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH.** 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Tick Tick Borne Dis.* 2: 123-128.
- Sal MS, Li C, Motalab MA, Shibata S, Aizawa S, Charon NW.** 2008. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J. Bacteriol.* 190: 1912 - 21.
- Shi W, Yang Z, Geng Y, Wolinsky LE, Lovett MA.** 1998. Chemotaxis in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 18: 231–235.
- Sing S, Girshick H.** 2004. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet, Infectious Diseases* 4: 575-583.
- Soleng A, Kjelland V.** 2013. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Bønnøysund in northern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 218-221.
- Stanczak J, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Lozowska W, Dabrowski J, Adamczyk A, Markowska M.** 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different polish woodlands. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6: 127-132.
- Stanek G, Klein J, Bittner R, Glogar D.** 1990. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 322: 249–252.

- Stanek G, Reiter M.** 2011. The expanding Lyme Borrelia complex-clinic significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 487-493.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L. (2005).** "Lyme Borreliosis" ss 176 – 206 i Dennis DT, Shonenshine DE, Goodman JL (red.). *Tick-Borne Diseases of Humans*. Washington D.C: ASM Press.
- Steere AC, Malawista S, Hardin J, Ruddy S, Akenase W, Andiman W.** 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86: 685-698.
- Strle F, Stanek G.** 2009. Clinical manifestations of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 37: 51-110.
- Sultan SZ, Manne A, Stewart PE, Bestor A, Rosa PA, Charon NW, Motaleb MA.** 2013. Motility Is Crucial for the Infectious Life Cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity.* 81: 2012–2021.
- Sze CW, Zhang K, Kariu T, Pal U, Li C.** 2012. *Borrelia burgdorferi* needs chemotaxis to establish infection in mammalian and to accomplish its enzootic cycle. *Infect. Immun.* 80: 2485-2492.
- Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG.** 1987. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 55: 2311-2313.
- Wójcik-Fatla A, Bartosik K, Buczek A, Dutkiewicz J.** 2012. *Babesia microti* in Adult *Dermacentor reticulatus* Ticks from Eastern Poland. *Vector-Borne Zoonotic* 12: 841–3.
- Wressnigg W, Pöllabauer EM, Aichinger G, Portsmouth D, Löw-Baselli A, Fritsch S, Livey I, Crowe BA, Schwendinger M, Brühl P, Pilz A, Dvorak T, Singer J, Firth C, Luft B, Schmitt B, Zeitlinger M, Müller M, Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Esen M, Kremsner PG, Ehrlich HJ, Noel Barrett P.** 2014. Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis in healthy adults; a double-blind, randomised, dose-escalation phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 13: 680–689