

Mastergradsoppgave

Cecilie Raasok

Candidatus *neoehrlichia mikurensis*
i *Ixodes ricinus* i Norge



Høgskolen i Telemark

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Mastergradsavhandling i Natur-, helse- og miljøvern 2015

Cecilie Raasok

Candidatus *neoehrlichia mikurensis* i *Ixodes ricinus*
i Norge



Høgskolen i Telemark
Fakultet for allmenvitenskapelige fag
Institutt for natur og miljø
Gullbringvegen 36
3800 Bø

<http://www.hit.no>

© 2015 Cecilie Raasok

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Mikroorganismer som bakterier og virus kan overføres mellom mennesker og dyr, noen av disse kan være potensielt patogene. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* er en flåttbåren patogen bakterie som første gang ble karakterisert i Japan i 2004, den ble i Japan oppdaget i *Ixodes ovatus* og *Rattus norvegicus* (rotte), mens den nylig ble oppdaget i *Ixodes ricinus* (skogflått) her i Norge.

DNA konsentrasjon ble funnet ved kjøring av «Cutoff». Utvikling av en PCR miks og kjøring av Cutoff gav oss muligheten til å bruke Real-time PCR for å kartlegge prevalensen av «Neo» i flått i Norge.

Etter å ha testet 1005 flått fra 11 lokaliteter i Norge, Viser det seg at prevalensen er veldig variabel. «Neo» er mest prevalent i Kystnære områder på Østlandet og Sørlandet, men positiver er også funnet i Nord Norge. Det ble testet flått også i Hordaland og Rogaland, men her fantes det ingen positiver. Mens i Hillevågen i Mandal var det en total prevalens på opp imot 19%. Av all flåtten som ble testet var det en total prevalens på 7,9 % i Norge.

Flere av de positive prøvene viste variasjoner i smeltepunktet (T_m). PCR produktet varierte fra 71,9-74,4°C. Variasjonene i smeltepunkt kan tyde på sekvensvariasjoner. På noen av lokalitetene; Håøya, Tromøya, Hillevågen og Spjørøya er det tydelige variasjoner i smeltepunktet, mens ved Langøya og Brønnøya er det få variasjoner i smeltepunktene. Ca gjennomsnittlig smeltepunkt ligger rundt $T_m 73^\circ\text{C} \pm 0,5$

I denne studien ble det påvist Neo i norsk skogflått, det ble i tillegg påvist år til år variasjon i forekomsten av Neo. I noen lokaliteter ble bakterien ikke påvist, men det kan allikevel ikke utelukke tilstedeværelsen av Neo på bakgrunn av et enkelt studie. En større kartlegging av forekomsten kan bidra til bedre kunnskap om prevalensen til Neo i Norge.

Abstract

Microorganisms such as bacteria and viruses can be transmitted between humans and animals, some of which can be potentially pathogenic. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* is a tick-borne pathogen that was first characterized in Japan in 2004. In Japan the bacteria was detected in *Ixodes ovatus* and *Rattus norvegicus* (rat), while it was recently discovered in *Ixodes ricinus* (ticks) in Norway.

DNA concentration was found running "Cutoff". The development of the PCR mix, and the execution of Cutoff, gave us the opportunity to use Real-time PCR to identify the prevalence of "Neo" in ticks in Norway.

After testing 1,005 ticks from 11 sites in Norway, it turns out that the prevalence is very variable. "Neo" is most prevalent in Coastal areas in eastern and southern Norway, but positives are also found in northern Norway. Ticks were also tested from Hordaland and Rogaland, but here there were no positives. While in Hillevågen in Mandal, there was a total prevalence of up to 19%. Of all the ticks tested, there was a total prevalence of 7.9% in Norway.

Several of the positive samples showed variations in melting point (T_m). The PCR products ranged from 71.9 to 74.4 ° C. Variations in the melting point may indicate sequence variations. On some of the sites; Håøya, Tromøya, Hillevågen and Spjærøya there are clear variations in melting point, while at Langøya and Brønnøya there are few variations in the melting points. Approximately average melting point is $T_m 73 \text{ ° C} \pm 0.5$

In this study it was discovered Neo in Norwegian ticks, it was also proven year to year variation in the occurrence of Neo. In some localities, the bacteria were not detected, but there can not exclude the presence of Neo on the basis of a single study. A major survey of the occurrence can help improve knowledge about the prevalence of Neo in Norway.

Innhold

Mastergradsavhandling i Natur-, helse- og miljøvern 2015.....	1
Sammendrag	2
Abstract	4
Forord	6
Innledning	7
Flått.....	7
Ixodes ricinus	7
Kjennetegn på <i>Ixodes ricinus</i>	8
Livssyklus.....	8
<i>I. ricinus</i> som smittespreder	10
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	11
Oppdagelsen av sykdom.....	12
Infeksjon hos mennesker	12
Utbredelse.....	13
Mitt arbeid og bekreftelse av funn.....	13
Taksonomi <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	14
Bakgrunn og beskrivelse av PCR.....	17
Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
Real-time PCR.....	17
Material og Metode	19
Flått- materiale	19
Ekstraksjonsmetoder	20
Flått plukket av hund.....	20
Flått fra Langøya, Vest Agder, Rogaland og Hordaland.....	21
Flått fra resten av lokalitetene	21
Real-time PCR for påvisning av <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	22
Resultat	24
Deteksjonsgrensen (Cutoff).....	24
Prevalens og utbredelse i Norge	25
Smeltepunkt.....	27
Diskusjon	29
Konklusjon	32
Referanser	33

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet for Institutt for Natur, Helse og Miljøvern (INHM) ved fakultet for allmennvitenskapelige fag ved Høgskolen i Telemark. Oppgaven er utarbeidet i perioden august 2013- november 2014. Den praktiske delen av oppgaven ble utført ved laboratoriene på Høgskolen i Bø

Målet med denne oppgaven er å påvise og kartlegge *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Ixodes ricinus* i Norge

Takk til Professor Andrew Jenkins ved Høgskolen i Telemark, Overlege Dag Hvidsten ved avdeling for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset i Nord-Norge, tidligere mastergradsstudent Rikke Rollum ved Universitetet i Oslo. Professor Snorre Stuen ved Institutt for produksjonsmedisin ved Norges Veterinærhøgskole, Forsker Vivian Kjelland ved Sørlandet Sykehus HF og Universitetet i Agder, Seniorforsker Åshild Andresen på Virologisk avdeling ved folkehelseinstituttet for tilgang til flåttmateriale.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Professor Andrew Jenkins, som hele tiden har vist stort engasjement, alltid vært tilgjengelig for spørsmål, og sørget for at materiale og utstyr alltid har vært tilgjengelig for meg.

Sist men ikke minst må jeg få takke alle veiledere og ansatte ved INHM for noen fantastiske år ved Høgskolen i Telemark, avdeling Bø. Dere har gitt meg mye ny og nyttig kunnskap, samt mye fine turer og opplevelser.

Nittedal, mai 2015

Cecilie Raasok

Innledning

Flått

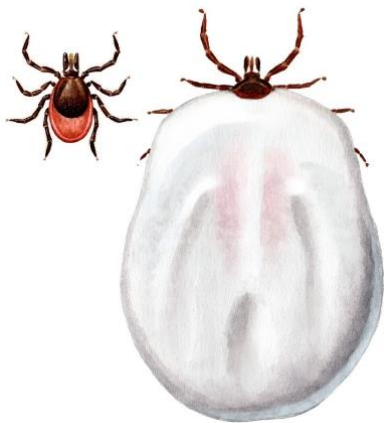
På verdensbasis er det registrert ca 850 forskjellige flåttarter (Soleng, A og Kjelland, V. 2012). Disse artene er fordelt på tre familier *Argasidae*, *Ixodidae*, og *Nuttalliellidae* (Barker og Murrell, 2008). Det er registrert 11 flåttarter i Norge, men kun 2 av disse er kjent for å suge blod av mennesker; *Ixodes ricinus* (Skogflått) og *Ixodes uriae* (Fuglefjellflått) (Mehl, 1999). *Ixodes uriae* forekommer ofte i og rundt polare områder, da også i fjellområder i Norge med mye fugler i flokk. *Ixodes ricinus* er den flåtten med størst forekomst i Norge Kempf, F og Boulmier T. 2009; Folkehelseinstitutt 2009).

Ixodes ricinus

Skogflåtten (*Ixodes ricinus*) tilhører sub-ordenen *Ixodida*, superfamilien *Ixodidoidea* og familie *Ixodidae* (Bakken, JS. 2003; Vredevoe L. 2001), den er utbredt i store deler av Europa. Den er også funnet i fjellområder i Nord- Afrika, de sørvestlige delene av Russland, Kaukasusområdet, Tyrkia og de nordlige delene av Kasakhstan. I Norge er *Ixodes ricinus* vanlig langs hele sørlandskysten, den er spesielt vanlig på Sørlandet, og følger kystlinjen opp til Vestlandet og til Trøndelag. Fra kysten sprer den seg inn langs fjordene. I dag er *Ixodes ricinus* forholdsvis vanlig helt opp til Helgeland i Nordland, den er også funnet sporadisk lenger nord, dette skyldes transport med fugler i trekk. Også i indre deler av Østlandet, Sørlandet og Telemark har flåtten blitt mer vanlig (Folkehelseinstituttet 2009)

Kjennetegn på *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus er et 6-8 beinet edderkoppdyr, som tilhører gruppen midd, antall bein avhenger av hvilket utviklingsstadium den er i. Hele kroppen er kompakt og det er ingen tydelig skille mellom hode, bryst og bakkropp (Se figur 1). *Ixodidene* kjennetegnes ved sin harde og ikke-elastiske ryggplate (Gray JS. 2003; Parola P. and Paroult D. 2001) Ryggplaten dekker kun fremsiden av ryggen på hunner, nymfer og larver, mens den dekker nesten hele ryggen på hannen (Gjerde B. 2001) *I. ricinus* har ingen antennesensoriske organer, alle 4 beinparrene (voksen flått) sitter på bakkroppen, samt genitalier og analåpning (Gjerde B. 2001; Parola P. and Paroult D. 2001). Organene henger sammen ved kapillæreffekten av en sirkulerende væske bestående av plasma og celler (hemocytter). Sentralnervesystemet er en enkel nerveklump som er samlet i den fremre delen av kroppen. (Parola P. and Paroult D. 2001).



Figur 1. tegning som viser hunnflått før og etter at den har sugd blod (Ill. Hallvard Elven, Folkehelseinstituttet)

Livssyklus

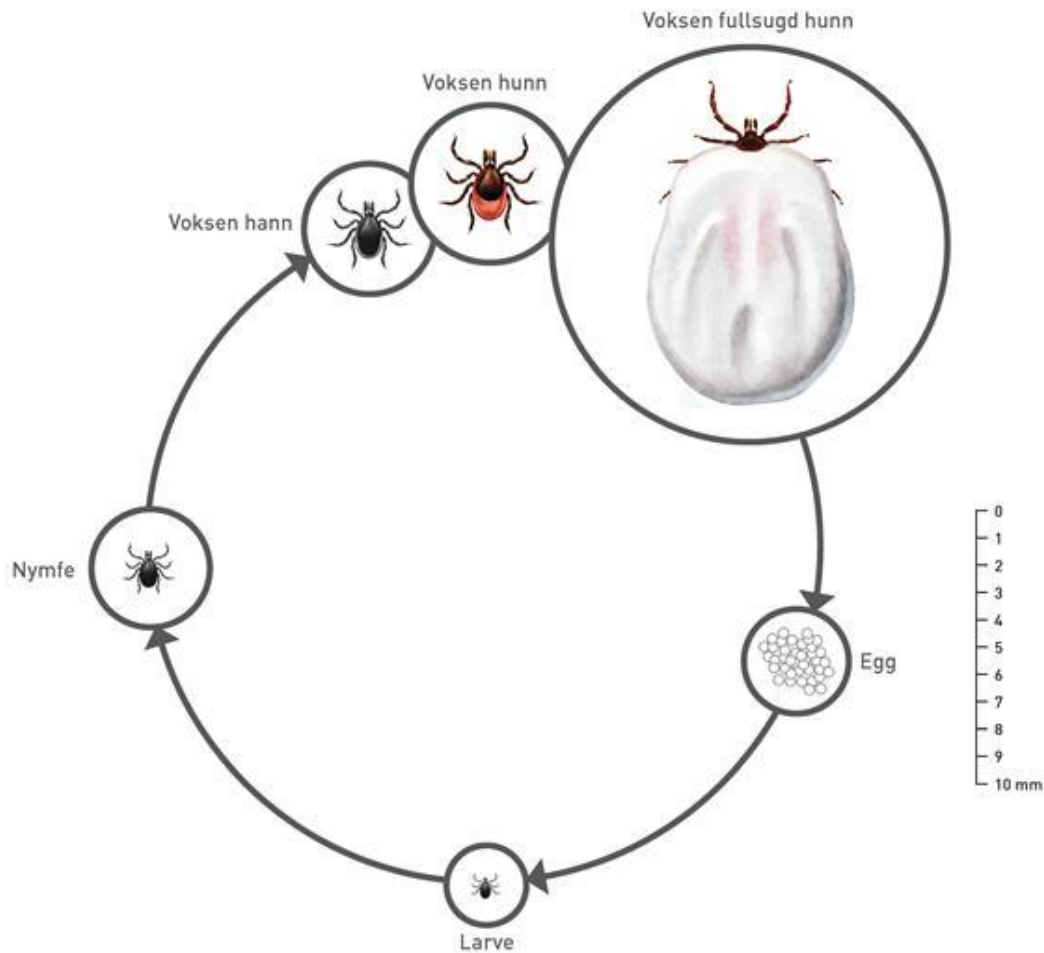
Livssyklusen til *I. ricinus* består av 4 utviklingsstadier; egg, larve, nymfe og fullvoksen hann eller hunn (figur 2) (Gray JS. 2003; Parola P. and Paroult D. 2001; Srabalo Z. and Deanovis Z. 1957). Larven og nymfen er avhengig av et blodmåltid for å kunne utvikle seg til neste

stadium, mens hunnen er avhengig av å suge blod for å kunne produsere egg. Hannen derimot er ikke avhengig av å suge blod, og den tiden den befinner seg på en vert, bruker den til å pare seg med hunnen (Jaenson TGT. Et al. 1994; Parola P. and Paroult D. 2001). Hvilket utviklingsstadium flåtten har og hvilken type vert, avgjør hvor lenge de suger blod (Parola P. and Paroult D. 2001). Larvene kan suge blod i 3-5 døgn, nymfene i 5-7 døgn og hunnene fra 7-13 døgn (Gray JS. 2003; Jaenson TGT. Et al. 1994). Etter at de voksne hunnene har sugd blod av et vertsdyr ramler de av, og de graver seg ned i strølaget på bakken. Etter at hun har lagt 2-3000 egg, dør hun (Gray JS. 2003; Parola P. and Paroult D. 2001). Etter noen uker klekker eggene, og de små larvene som er knappe 0,5 mm lange, kryper opp i markvegetasjonen. Disse larvene som kun har 3 par bein vil så sitte og vente på et passende forbigående offer, en fugl eller et dyr. Ofte kan det ta opptil flere måneder fra de har sugd blod til de skifter hud og utvikler seg videre til neste stadiet; Nymfe som blir ca 1.5 mm lang, de overvintrer ofte før de befester seg til et nytt vertsdyr. De voksne hannene er 2-3 mm og gråsvarte, mens de voksne hunnene er 3-4 mm med svart hode og bein, og rødbrun bakkropp. Fullsugd av blod kan imidlertid hunnen bli inntil 1,5 cm lang, og bakkroppen får da en gråblå farge. (FHI). Flåtten vil bevege seg høyere opp i vegetasjonen etter hvert som den utvikler seg (Gjerde B. 2001; Gray JS. 2003) Flåtten bruker så de fremre beina som er utstyrt med sanseorganer til å registrere og oppdage en vert i nærheten. Når verten passerer flåtten kryper den over og finner en egnet plass hvor den kan suge blod (Hillyard 1996; Parola and Raoult 2001; Folkehelseinstituttet 2009). Overføring av mikroorganismer skjer ved at flåtten biter hull i huden på en vert ved hjelp av et kutteorgan og presser hypostomet (en piggfestestruktur knyttet til flåttenes munnleder som den presser ned og inn i såret). Flåtten skiller ut en sementlignende veske som fester hypostomen fast i såret. Deretter vil flåtten skille ut et bedøvende stoff, som sørger for å hindre at ikke blodet koagulerer og en substans som hemmer betennelse i verten. (Gjerde B. 2001)

Flåtten finner en ofte i områder med mye tett tre- og buskvegetasjon, dette skyldes at den trenger over 80 % relativ luftfuktighet for å kunne overleve og utvikle seg. (Gray JS. 2003). Optimalt består biotopen til en flått av gress, buskvegetasjon og løvskog (Gray JS. 2003; Åkerstedt J. et al. 1996).

I. ricinus trenger i Nord-Europa i gjennomsnitt 3 år på å gjennomføre livssyklusen (figur 2), men den kan variere fra alt mellom 2 og 6 år, avhengig av klimatiske forhold og tilgang til vert

(Gray JS. 2003; Jaenson TGT. et al. 1994; Stuen S. 2003). En finner ofte at flåttene i hovedsak er aktiv i perioden fra april til oktober, men ved milde temperaturer kan den være aktiv også utover denne perioden. Det er ofte mest aktivitet i perioden mai-juni, men ofte kan det være flere «topper» i løpet av en sesong. (Terapi anbefaling. 1999).



Figur 2: Flåttens syklus (ill. Folkehelseinstituttet)

I. ricinus som smittespreder

Skogflåttene *Ixodes ricinus* er en vektor som er årsak til flere sykdommer hos mennesker og dyr, og både larver, nymfer og voksne hunner kan være smittebærere (Rosef O, 2005). I Norge kjenner vi til 5 sykdommer som kan overføres til mennesker via flåttene; Borreliose (Vandvik B. 1984), tularemi (Brantsæter AB. og Hoel T. 1998), human granulocytær anaplasmose (Kristiansen BE. og Jenkins A. 2001), skogflåttencefalitt (TBE) (Skarpaas T. and Ljøstad U. 2004) og babesiose (Hasle G. and Bjuna GA. 2010). Det vil i årene som

kommer, trolig bli oppdaget flere sykdommer som kan overføres via flåtten. (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2013).

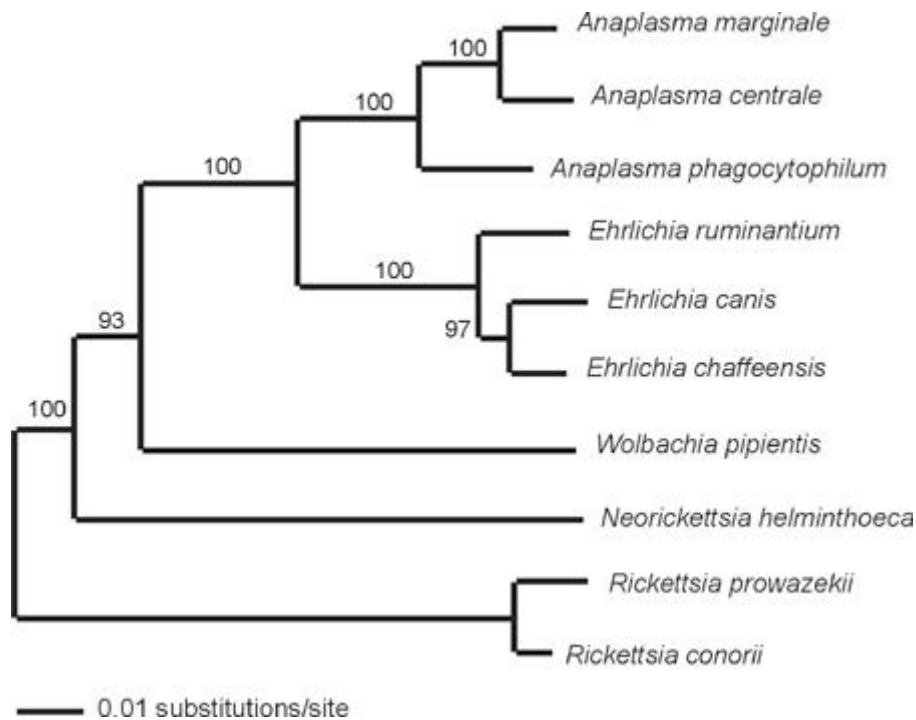
Mikroorganismer som bakterier og virus kan overføres mellom dyr og mennesker ved at flåtten suger blod fra ulike verter i løpet av livssyklusen (Parola P. and Paroult D. 2001). I de nordlige delene av Europa, regnes *I. ricinus* som den verste smittesprederen blant blodsugerne (FHI). Det er når flåtten begynner å suge blod at prosessen med opptak av mikroorganismer skjer, slik at flåtten blir infisert (Gjerde B. 2001; Gray JS. 2003, Parola P. and Paroult D. 2001; Sauer JR. et al 1995). Patogener som eventuelt infiserer flåtten, vil så bli tatt opp i tarmen, og infisere tarmvevet. Fra tarmvevet kan de invadere andre vev, for eksempel spyttkjertlene (Sauer JR. et al. 1995.). Etter bytte av utviklingsstadium vil den infiserte flåtten feste seg til en ny vert for å suge blod, og de patogene mikroorganismene kan så overføres fra flåtten til verten via spyttet (Gjerde B. 2001; Gray JS. 2003; Sauer JR. et al. 1995).

Candidatus Neoehrlichia mikurensis

En nyoppdaget bakterie som tidligere hadde infisert laboratorierotter ble isolert fra ville *Rattus norvegicus* rotter i Japan. Phylogenetisk analyse av 16S rRNA gensekvensen i bakterien ble utført, og funnet i *Rattus norvegicus* rotter og *Ixodes ovatus* flått i Japan. Denne undersøkelsen avslørte at det nå var funnet en ny bakterie som representerte en ny gruppe organismer i Anaplasmataceae familien. Bakterien som fikk navnet *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ble derfor først gang oppdaget og karakterisert i Japan i 2004. (Kawahara M. og Rikihisa Y. 2004).

Oppdagelsen var den samme som det noen år tidligere (2001-2003) på Telelab ble funnet. Det ble gjennomført en PCR undersøkelse på *Borrelia* og *Ehrlichia* (Nå *Anaplasma phagocytophilum*). På Telelab ble det påvist en Ehrlichia slektning som ikke tidligere har blitt beskrevet. Det var en Ehrlichia lignende organisme, ELO og Schotti, som var mest prevalent på prøvene som ble kjørt, og denne var tidligere påvist i flått fra Nederland (Schouls LM. og Van De Pol I. 1999). Denne Ehrlichia lignende organismen var til stede i 6-7 % av all flåtten som ble undersøkt. Etter oppdagelsen i Japan, kunne den nå bekrefte funnet av *Neoehrlichia mikurensis* i Norge også. (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2013; Jenkins A. and Kristiansen BE. 2001)

Ehrlichia og *Anaplasma* er α -Proteobacterier. De tilhører etter ny klassifisering orden *Rickettsiales*, familien *Anaplasmataceae* (Figur 3), som inkluderer ulike arter fordelt på genus *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Neorickettsia* og *Wolbachia* (Bakken, J.S. 2003; Dumler, J.S., Barbet A.F. 2001)



Figur 3: Fylogeni av Rickettsiales (Williams et al. 2007)

Oppdagelsen av sykdom

Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* har vist seg å være en patogen bakterie, dette er rapportert og bekreftet i opptil flere tilfeller (Welinder- Olsson C. and Kjelling E. 2010; Fehr JS. And Bloemberg GV. 2010; von Loewenich FD. And Geissdörfer W. 2010). Febril sykdom forårsaket av «Neo» er i flere tilfeller påvist hos pasienter i Europa, til og med så nærme som i Sverige er den påvist (Wennerås C. 2011)

Infeksjon hos mennesker

Sykdommen *Neoehrlichiose* kan gi vedvarende feber, eller tilbakefallsfeber, dette er et felles symptom i alle tidligere oppdagede tilfeller av infeksjonen. Ellers har leddsmerter, ødemer,

erysipelas og akutt diaré forekommet (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2013). Det viser seg også at denne infeksjonen ofte synes å ramme pasienter med nedsatt immunforsvar. Et dødsfall er så langt rapportert (Von Loewenich FD. And Geissdörfer W. 2010). Men det har flere ganger forekommet vellykkede behandling av infeksjon med doksyzyklin (200mg/d i 3 uker) ((Welinder- Olsson C. and Kjelling E. 2010; Von Loewenich FD. And Geissdörfer W. 2010; Pekova S. and Vydra J. 2011).

I de positive prøvene fra Norge viste det seg at det var en signifikant overhyppighet av flått som var dobbeltinfisert med både *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* og *Borrelia afzelii* (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2001). Det viser seg ofte at det er større mulighet for at en infeksjon kan bli forverret av en annen infeksjon med andre flåttbårne agenser (Jaenson TG. 2011).

Utbredelse

I Norge har vi fra før funnet «Neo» i flått fra Langøya i Bamble og Marka i Siljan Kommune (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2001; Jenkins A. and Kristiansen BE. 2013) Disse resultatene har blitt bekreftet og utvidet med real-time PCR (Raasok, C. 2013). Men *Candidatus neoehrlichia Mikurensis* synes å være generelt godt utbredt i Europa. Den beskrives som den nest vanligste flåttbårne patogen i Sentral-Europa, etter *Borrelia afzelii* (Richter D. and Matuscha FR. 2012). Den er påvist i flere land, blant annet i Baltikum, Danmark, Frankrike, Italia, Japan, Nederland, Russland, Slovakia, Spania, Sverige og Ungarn (Jenkins A. and Kristiansen BE. 2013). «Neo» er mest trolig utbredt i mesteparten av Europa, men den er enda ikke beskrevet i alle land.

Mitt arbeid og bekreftelse av funn

I 2013 begynte arbeidet mitt med *Neoehrlichia mikurensis*. Jeg fikk arbeide videre med materiale som ble undersøkt på Telelab i 2001-2003 (beskrevet over). Mastermix ble optimalisert ved hjelp en metode kaldt «Matrix dilution», her ble volum og konsentrasjon av primere og mastermix optimalisert. Allerede ved første kjøring fikk vi positive resultater, og vi hadde derfor bekreftet funnet av *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i Norsk flått- *Ixodes ricinus* beskrevet i Jenkins A. and Kristiansen BE. 2001.

Taksonomi *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Ikke mye er kjent om metabolismen til *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* annet enn at den er en fakultativ anaerob. Blodprøver av personer smittet med bakterien har blitt samlet i aerobe og anaerobe kolber, og begge scenariene presenteres samme 16S rRNA sekvens (Welinder- Olsson C. and Kjelling E. 2010).

Klassifikasjon av *Candidatus Neoehrlichia Mikurensis*:

Domain: Bakterie

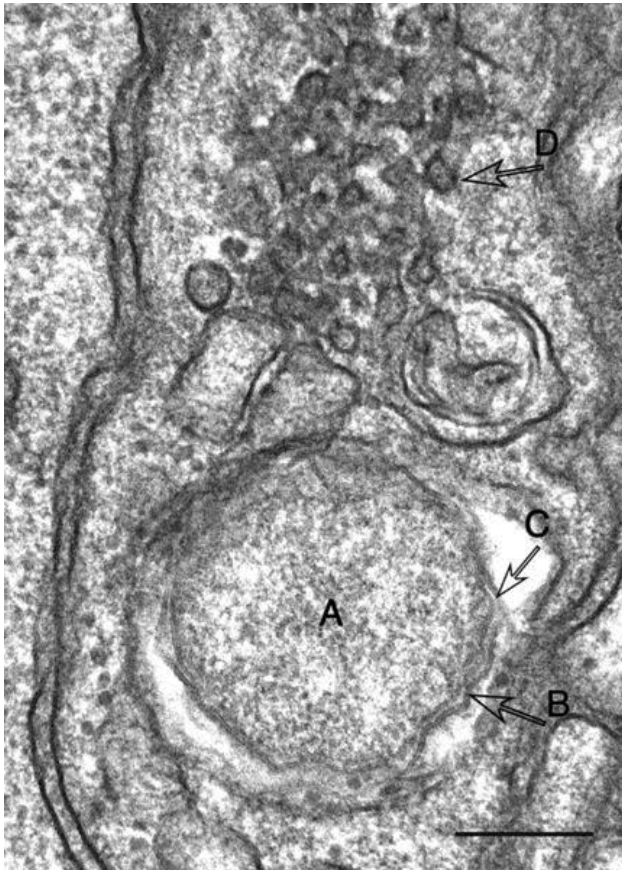
Phylus: Proteobacteria

Klasse: Alphaproteobacteria

Orden: Rickettsiales

Familie: Anaplasmataceae

Navnet *Neoehrlichia mikurensis* er sammensatt av *Ehrlichia* familien og *Mikurensis* fra Mikura Island, sør i Japan hvor bakterien ble funnet for første gang. Som medlem i *Rickettsiales* er den medlem av gram-negativ gruppen, men den mangler i motsetning til mange andre gram-negativ bakterier celleveggen helt. Den ble i Kawahara M. and Rikihisa Y. 2004, omtalt som en kokker bakterie som er kulerunde, men i figur 7 ser vi at cellen som er avbildet er ganske avlang generelt 0.5-1.2 μ m i lengde. En obligat intracellulær organisme (figur 4) (Kawahara M. 2004).

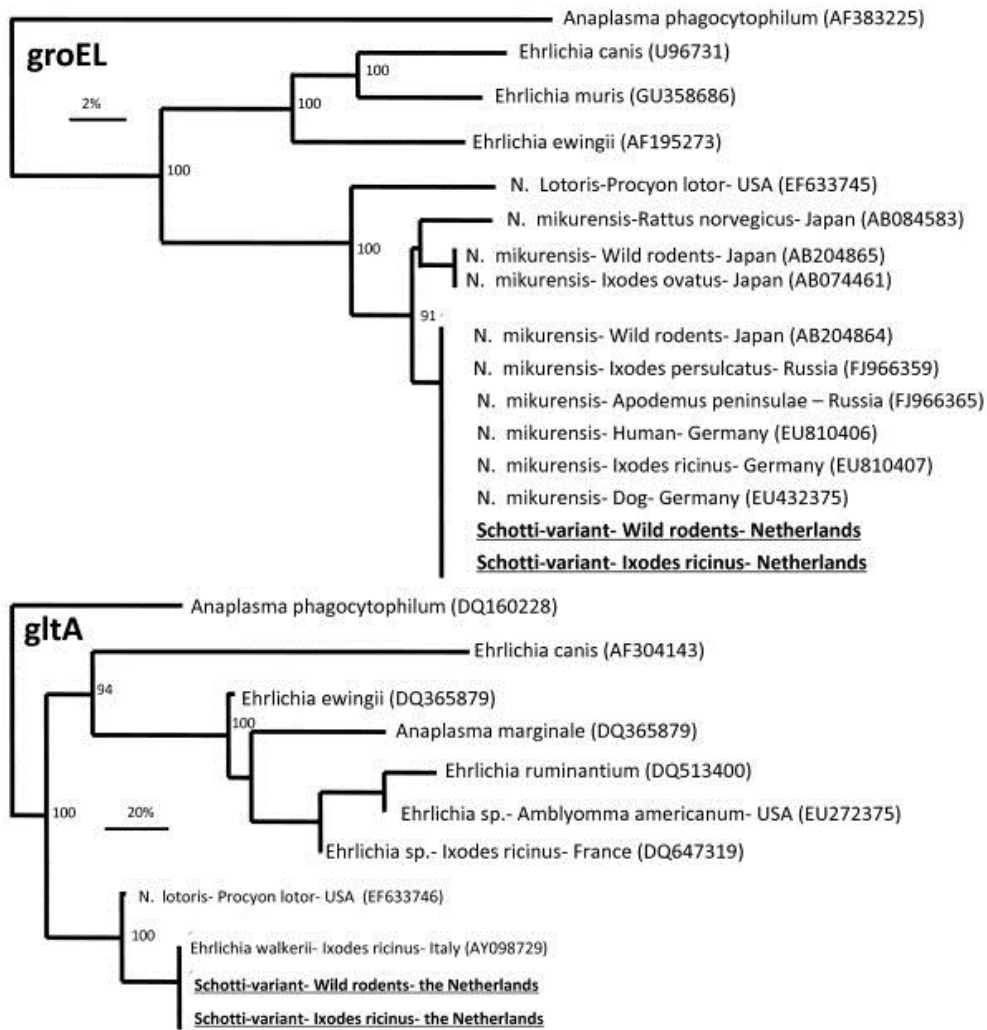


Figur 4: (A) viser den tynne, bølgede, ytre membran som er karakteristisk for *Candidatus Neohrlichia mikurensis*. (B) viser det uregelmessige, smale periplasmiske rommet mellom indre og ytre membran (C) canalicular system for endotelcellen (Kawahara M.2004)

16S rRNA og groEL gener har blitt brukt til å identifisere denne arten ved flere anledninger. 16S rRNA-genet er 1426 bp i lengde, og groEL genet er 1233 bp i lengde (Andersson M, Råberg L. 2011)

Transmisjonselektronmikroskopi av milt vev fra rotter som bærer *Candidatus Neohrlichia Mikurensis* viste grupper av små kokker omgitt av en indre membran og en tynn og knudret ytre membran. Disse kolonier er blitt funnet primært i membran-bundet slutninger innenfor cytoplasma av endotelceller (Welinder- Olsson C. and Kjelling E. 2010).

I figur 5 ser vi et fylogenetisk tre av Gro EL og gltA gener fra forskjellige *Anaplasma* og *Ehrlichia* arter og deres forhold til *Candidatus Neohrlichia mikurensis*.



Figur 5: Fylogenetisk tre av Gro EL (øverst) og gltA (nederst) gener fra forskjellige Anaplasma og Ehrlichia arter og deres forhold til Candidatus Neoehrlichia mikurensis (Kawahara 2004)

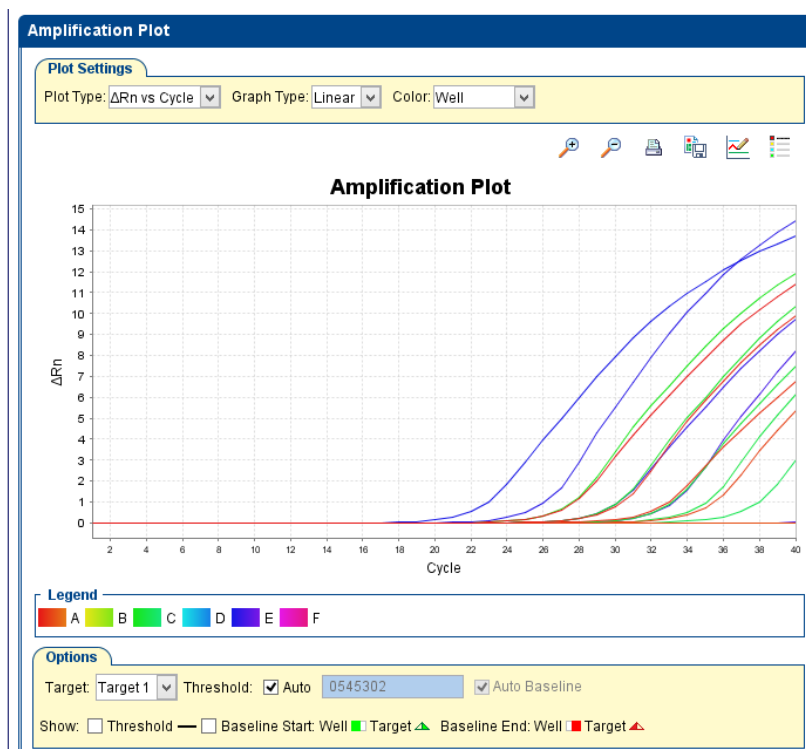
Bakgrunn og beskrivelse av PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for å amplifisere (kopiere) opp små mengder DNA, og for så å lage millioner av identiske kopier av en DNA sekvens. Amerikaneren Kary B. Mullis utviklet metoden tidlig på 1980-tallet, mens allerede i 1969 ble grunnprinsippet av PCR med bruk av DNA polymerase utviklet av den Norske biokjemikeren Kjell Kleppe ved Universitetet i Wisconsin, USA. (Kleppe et al. 1971; Bartlett JS. og Stirling D. 2003)

Real-time PCR

Realtime eller sanntids PCR ble utviklet tidlig på 2000-tallet er en metode som brukes for å amplifisere opp og detektere templatet i sann-tid. Det vil si at en under hele prosessen kan overvåke og lese av resultatene underveis i reaksjonen. (Sjøber NO. 2006)



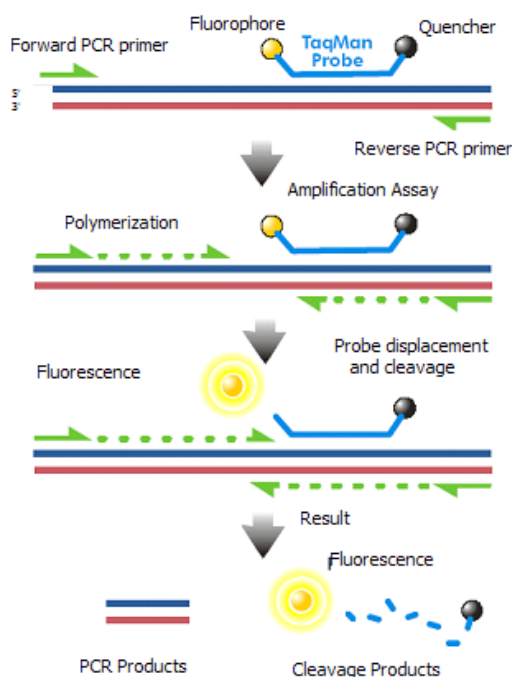
Figur 6 Viser hvordan Real-time PCR ser ut lest av OneStep® maskinen. Det er en proporsjonal økning i Fluorescensen med økning av PCR produktet (ref. egne prøver).

Det finnes to vanlige metoder for produkt påvisning ved kjøring av Real-time PCR.

1. Den første metoden brukes ofte SYBR®Green. Her blir det brukt ikke-spesifikke fluorescerende fargestoffer som binder seg til «minor Groove» i dsDNA.

2. I denne andre metoden brukes ofte TaqMan, men også metoder som Beacons og Scorpions er vanlig. Metoden er den samme; Her bruker en sekvens-spesifikke DNA-prober som består av oligonukleotider som er merket med et fluorescerende fargestoff (reporter) og et quencher molekyl (hemmer). Reporteren detekterer bare etter annealing av proben med det komplementære DNA templatet.

Ved hver PCR syklus vil det bli en fordobling i PCR produktet med hjelp av reportere. Økningen av fluorescens er proporsjonal på grunn av foredlingen av proben og frigjøringen av reporteren. Å derfor, jo mer PCR produkt, jo mer fluorescens frigjøres, og en vil få en lavere CT-verdi av produktet (Figur 7). (Schwaiger M. and Cassinotti P. 2003; Royuela E. et al. 2006)



Figur 7 Viser funksjon av PCR med en TaqMan probe. TaqMan prober består av en reporter bundet til 5'enden av en oligonukleotid-probe og en quencher ved 3'enden. (bilde ref. Wikipedia)

Material og Metode

Flått- materiale

Innsamlingen av flått foregikk stort sett med bruk av flagging, langs stier og veier. Flåtten er samlet inn fra områder spredt utover store deler av landet. Mange kystnære strøk, som blant annet Håøya, Tromøya, Brønnøya, Spjærøy, Vest- Agder og Langøya i Bamble. De kystnære strøkene har et typisk kystklima med blandingsskog i randsonen (figur 8). Flåtten fra Tromsø, Nord Norge og Drangedal ble plukket av hunder i disse områdene.



Figur 8: Kart over lokaliteter i Norge hvor flått har blitt samlet inn (Google)

I Tabell 1 er den en oversikt over lokaliteter flått er funnet, samt år, innsamlingsmetode og kilde.

Tabell 1 Viser lokaliteter flått er plukket fra, innsamlingsmetode, år og Kilde

<u>Nr</u>	<u>Lokalitet</u>	<u>Måned</u>	<u>År</u>	<u>Innsamlingsmetode</u>	<u>Kilde</u>
1	Vest- Agder	August	2000	Flagging	Lundset AL. 2004
2	Langøya, Bamble	-	01-03	Flagging	Lundset AL. 2004
3	Nord Norge*(Plukket av hund)	-	2009	Plukket av Hund	Jenkins A, Hvidsten D, et al. 2012
4	Drangedal*(Plukket av hund)	-	2009	Plukket av Hund	Jenkins A, Hvidsten D, et al. 2012
5	Rogaland	-	2000	Flagging	Lundset AL. 2004
6	Hordaland	-	2000	Flagging	Lundset AL. 2004
7	Spjærøya, Hvaler	September	2012	Flagging	Folkehelseinstituttet
8	Brønnøya, Asker	Juni	2013	Flagging	Folkehelseinstituttet
9	Håøya, Oslo	Mai	2013	Flagging	Folkehelseinstituttet
10	Tromøya, Arendal	Juni	2012	Flagging	Folkehelseinstituttet
11	Hillevågen, Mandal	Juni	2012	Flagging	Folkehelseinstituttet

Ekstraksjonsmetoder

Flått plukket av hund

Flått som ble plukket av hund fra Nord Norge, Troms og Finnmark (fra 65° 290`N; 12° 140`E til 70 ° 120`N; 28° 100`E) ble plukket av 23 veterinærer, og i Drangedal i Telemark (fra 58 °530`N; 9° 170`E til 59° 590`N; 8° 430`E) av 5 veterinærer. Flått ble lagt i plastikk rør som inneholdt 3 ml 70% ethanol før de ble sendt til videre til analyse.

Før ekstraksjon med bruk av nuclein syre, ble det tilsatt 450 µl RLT lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) som inneholdt 1 % vol/ vol β-mercaptoethanol ble tilsatt i røret. Rørene ble så fryst i 1 time på -180°C (Crampton et al.1996), for så å bli tint ved rom temperatur.

Oppløsning ble gjort ved hjelp av «bead beating» (25 Hz i 2 min) med en 5 mm rustfritt stål «bead» i et TissueLyserII instrument (Qiagen), ifølge instruksjoner fra produsenten. Etter sentrifugering på 20,000g i 3 min, ble 400 µl av super-natant brukt før nucleinsyre ekstraksjonen. Total Nukleinsyre-ekstraksjon ble så utført med bruk av MagAttract RNA Tissue Mini M48 Kit uten bruk av DNase trinnet, og det ble tilsatt 50 µl buffer før ekstraksjonen ble utført på et M48 instrument (Qiagen) (Jenkins A, Hvidsten D, et al. 2012)

Flått fra Langøya, Vest Agder, Rogaland og Hordaland

Flåtten fra Langøya, Vest Agder, Rogaland og Hordaland (Lundset AL. 2004) ble alle samlet inn ved hjelp av flagging. (Mejlon and Jaenson 1993). Før ekstraksjon ble overflødig ethanol fjernet, flåtten ble kuttet i to på langs med hjelp av en flamme-sterilisert skalpel og overført til et pellet rør (KontesScientificGlassware/Instruments, Vineland, N.J.) som inneholdt 60 µl proteinase K (40µg/ml)- 1- Tris HCL (pH 8.0)- 2mM EDTA-0.01% Tween 20 og knust ved bruk av en pellet stampe helt til alt det indre materiale var synlig. Etter inkubasjon på 65°C i 1 time og 100°C i 10 min ble det ekstraherte flåttmateriale oppbevart ved -20°C frem til kjøring av PCR. (Jenkins A, Kristiansen BE, et al. 2001)

Flått fra resten av lokalitetene

DNA'et som ble isolert fra flått materiale som ble samlet inn fra Håøya i Oslo, Tromøya i Arendal, Brønnøya i Asker og Spjærøy i Hvaler ble utført med fenol-kloroform. (Arbeidet med innsamling og ekstraksjon er gjort ved folkehelseinstituttet).

Løsninger som blir brukt i ekstraksjon ved bruk av fenol-kloroform; DNA-ekstraksjon buffer: 0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA (pH 8,0), 0,3 M Tris (pH 8,0), 5M NaCl, Fenol, Kloroform, Absolutt etanol, RNase A (10mg/ml).

Arbeidet er utført på flått plukket fra forskjellige lokaliteter i Norge til ulike formål, jeg har fått bruke dette materiale for å kunne kartlegge *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* utbredelse på landsbasis.

Real-time PCR for påvisning av *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Ved kjøring av Real-Time PCR er target som ble brukt gro E genet. Amplifikasjonsstørrelse var på 102 basepar. Primere ble designet av Andrew Jenkins, og jeg optimaliserte primere og probe, som skulle brukes sammen med SYBRGreen® eller TaqMan® i OneStep® Real-Time PCR. Primere og probesekvenser som ble brukt til amplifikasjon beskrevet i tabell 2.

Tabell 1 viser primere og probesekvens brukt i Real-time PCR analysen (designet av Andrew Jenkins, se vedlegg for hele sekvenssammenstillingen.)

Patogen		Primer sekvens (5' -> 3')
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	Probe NeoM	TTA CAG TTG AGG AAA GTA AAG GA-MGB (μ M 100)
	Forward Primer Neo f	GCA AAT GGA GAT AAA AAC ATA GGT AGT AAA (pmol/ μ l L100)
	Reverse Primer Neo r	CAT ACC GTC AGT TTT TTC AAC TTC TAA (pmol/ μ l L100)

DNA amplifikasjonen ble utført ved hjelp av SYBR® Green PCR Master Mix kit i en 1* konsentrasjon (Applied Biosystems). Tabell 3 viser oppsett før kjøring av Real-time PCR.

Primere og probe ble fortynnet til 10nM bruksløsninger. (10 μ l Neof/r + probe a 100 mM+ 90 μ l 1*TE buffer). Totalvolumet per kjøring i PCR reaksjonen var 25 μ l og bestod av 20 μ l SYBR®Green PCR Master Mix og 5 μ l templat (tabell 3).

PCR oppsettet og betingelser var følgende: Steg 1, 50° C i 2 min og 95° C i 10 min. Steg 2, 45 sykluser bestående av 95° C i 15 sekunder og 60°C i 1 min. I tillegg ble det kjørt smeltepunktsanalyse på alt materiale: 45 sykluser bestående av 95° C i 15 min, 60 ° C i 1 min og 95° C i 15 sek PCR reaksjonen ble kjørt på en StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems), og analysert av StepOne™ Software v2.0 (Applied Biosystems)

Det ble i alt i alt kjørt Real-Time PCR på 1005 flått fra 11 lokaliteter.

Tabell 2 viser PCR oppsettet til bruk ved kjøring på Neo

SYBR®Green PCR Master Mix	1 Prøve	50 Prøver
Mastermix *2	12,5 µl	625 µl
Forward Primer Neo f 10 nM	2 µl	100 µl
Reverse Primer Neo r 10 nM	2 µl	100 µl
H₂O	3,5 µl	175 µl
Totalt	20 µl	1000 µl

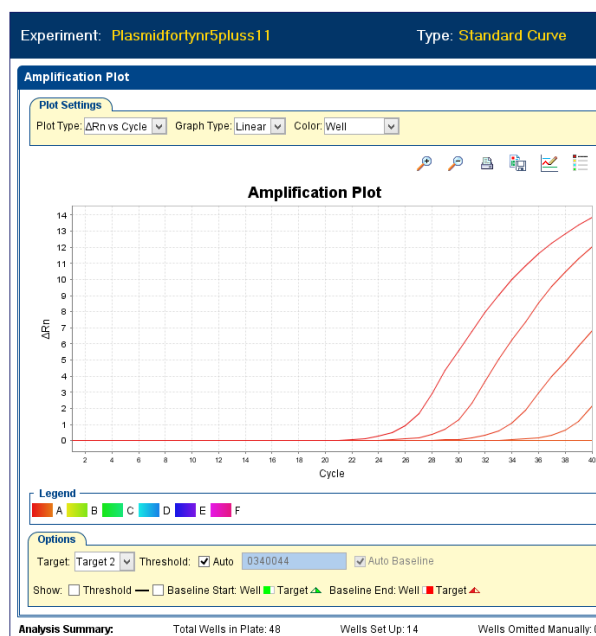
Resultat

Deteksjonsgrensen (Cutoff)

Ved testkjøring av prøver på Real-Time PCR lå effektiviteten av prøvene opp mot 85%. Som tabell 4 viser ligger deteksjonsgrensen på 1-5 kopier av DNA med en DNA konsentrasjon på 1 ag/μl. Figur 9 viser en standard kurve i Realtime for kjøring av PCR for å finne resultatet av cutoff.

Tabell 4 viser cutoff (deteksjonsgrensen ved bruk av plasmid av "Neo")

Navn	DNA konsentrasjon	Molekyler per 5 μl
Neo ⁰	1 ng/μl	1,6*10 ⁹
Neo ¹	100 pg/μl	1,6*10 ⁸
Neo ²	10 pg/μl	1,6*10 ⁷
Neo ³	1 pg /μl	1,6*10 ⁶
Neo ⁴	100 fg/μl	1,6*10 ⁵
Neo ⁵	10 fg/μl	1,6*10 ⁴
Neo ⁶	1 fg/μl	1,6*10 ³
Neo ⁷	100 ag/μl	1,6*10 ²
Neo ⁸	10 ag/μl	1,6*10 ¹
Neo ⁹	1 ag/μl	1,6*10 ⁰
Neo ¹⁰	100 zg/μl	1,6*10 ⁻¹



Figur 9 Viser eksempel på Cutoff resultatet i Real-time PCR Standard kurve

Prevalens og utbredelse i Norge

Resultatene av alle prøvene som ble kjørt i denne omgang viser at prevalensen av flått er svært variabel fra område til område (tabell 5 og figur 10). Neoehrlichia prevalens i vertssøkende flått varierte mellom 0% (Vest-Agder, Rogaland og Hordaland, 2000) og 19% (Langøya (2001-2003), Hillevågen 2012). Gjennomsnittet i alle områdene var 7,9 %.

Det er en signifikant forskjell mellom resultatene fra Vest- Agder 2000 og Tromøya i Arendal 2012. I 2000 er det ingen positiver, mens på Tromøya 2012 er det en prevalens på 8,4%.

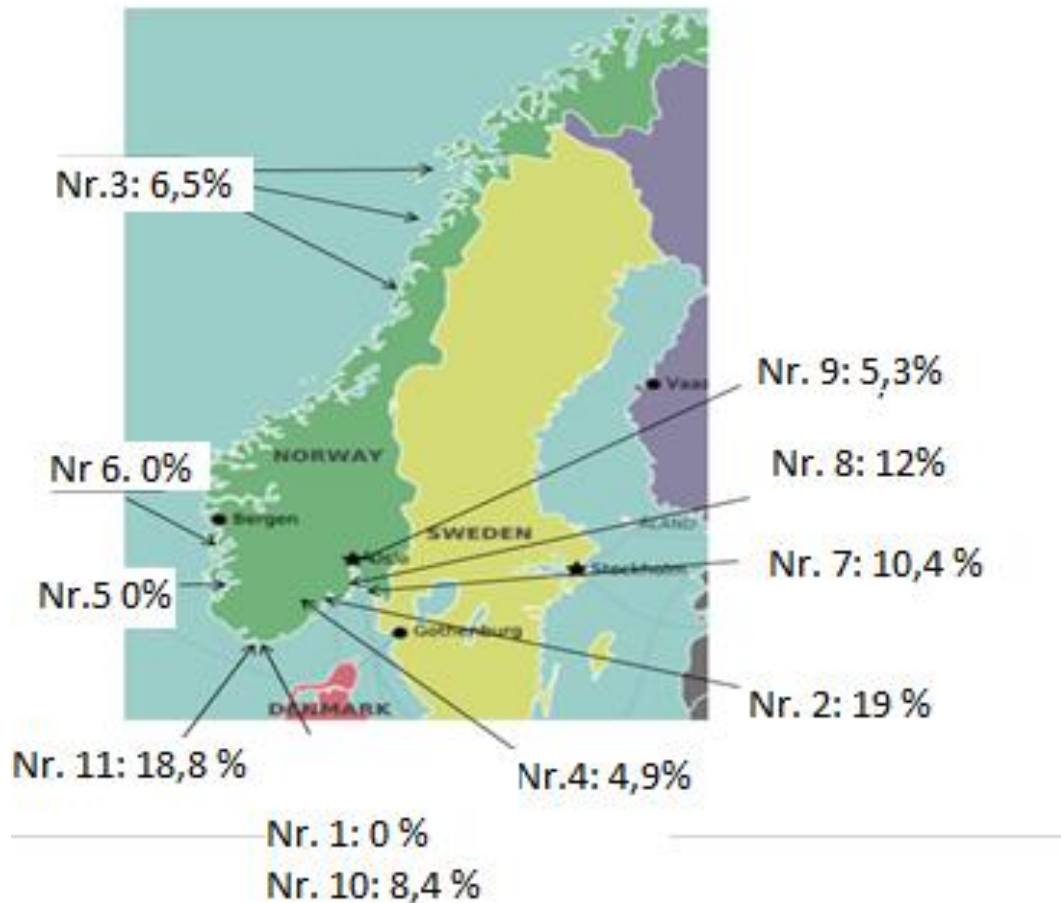
Forskjeller i prevalens mellom nymfer, hanner og hunner kan kun sammenlignes på Langøya flåtten, Her har nymfene en prevalens på 22% og hanner og hunner en prevalens på 16%.

Det er noen signifikante forskjeller fra gjennomsnitts prevalensen på 7,9 %. Dette gjelder fra både Vest- Agder, Rogaland og Hordaland (2000) hvor prevalensen var 0 %, samt Langøya i Bamble (2001-2003) 19 % og Hillevågen i Mandal (2012) 18,8%.

Tabell 5 viser oversikt over funn av *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Ixodes ricinus* i Norge

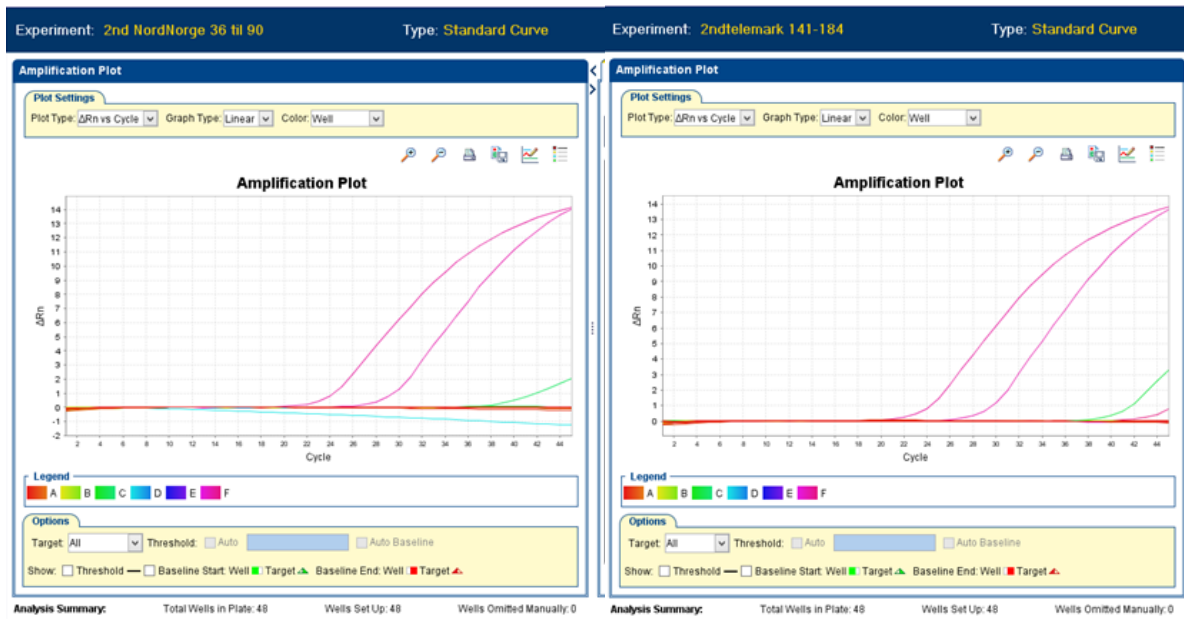
<u>Nr</u>	<u>Lokalitet</u>	<u>Måned</u>	<u>År</u>	<u>Antal I flått</u>	<u>Positive Nymfer</u>	<u>Positive hanner</u>	<u>Positive hunner</u>	<u>Totalt positive</u>	<u>Prevalen s i %</u>
1	Vest- Agder	August	2000	132	-	-	-	0	0
2	Langøya, Bamble	-	01-03	100	11/50	4/25	4/25	19	19%
3	Nord Norge*(Plukket av hund)	-	2009	139	-	-	-	9	6,5%
4	Drangedal*(Plukket t av hund)	-	2009	103	-	-	-	5	4,9%
5	Rogaland	-	2000	29	-	-	-	-	-
6	Hordaland	-	2000	73	-	-	-	-	-
7	Spjærøya, Hvaler	September	2012	67	7/67	0	0	7	10,4%
8	Brønnøya, Asker	Juni	2013	92	11/92	0	0	11	12%
9	Håøya, Oslo	Mai	2013	95	5/95	0	0	5	5,3%
10	Tromøya, Arendal	Juni	2012	95	8/95	0	0	8	8,4%
11	Hillevågen, Mandal	Juni	2012	80	15/80	0	0	15	18,8%
	TOTALT	-		1005	-	-	-	79	7,9%

'-': ikke spesifisert



Figur 10 Viser lokaliteten og prevalensen av Neoehrlichia mikurensis i Ixodes ricinus på de forskjellige lokalitetene i Norge (Jenkins, SNÅFF 2014)

Flått plukket fra hund i Nord Norge (6,5%) og Drangedal (4,9 %) har positiver. I figur 11 og 12 er det to klare positive fra begge figurer, dette er sammenlignings positiver. Mens positive som kommer opp sent i syklusene stammer fra flått plukket av hund (*Canis lupus familiaris*) på disse lokalitetene. Det er litt lavere prevalens prosent på flått fra hund en fra totalgjennomsnittet fra både vertssøkende flått og flått fra hund på 7,9%.



Figur 11 og 12 viser Standard Kurver fra PCR kjøring på flått plukket fra hund. De to klare positiver på begge bilder er sammenlignings positiver, mens positivene som kommer opp sent i syklusene er fra flåtten plukket av hund i Nord Norge og Drangedal.

Smeltepunkt

Flere av de positive prøvene viste variasjoner i smeltepunktet (T_m) (Tabell 6 og figur 13).

PCR produktet varierte fra 71,9-74,4°C. Variasjonene i smeltepunkt kan tyde på sekvensvariasjoner. På noen av lokalitetene; Håøya, Tromøya, Hillevågen og Spjørøya er det tydelige variasjoner i smeltepunktet, mens ved Langøya og Brønnøya er smeltepunktene veldig stabile.

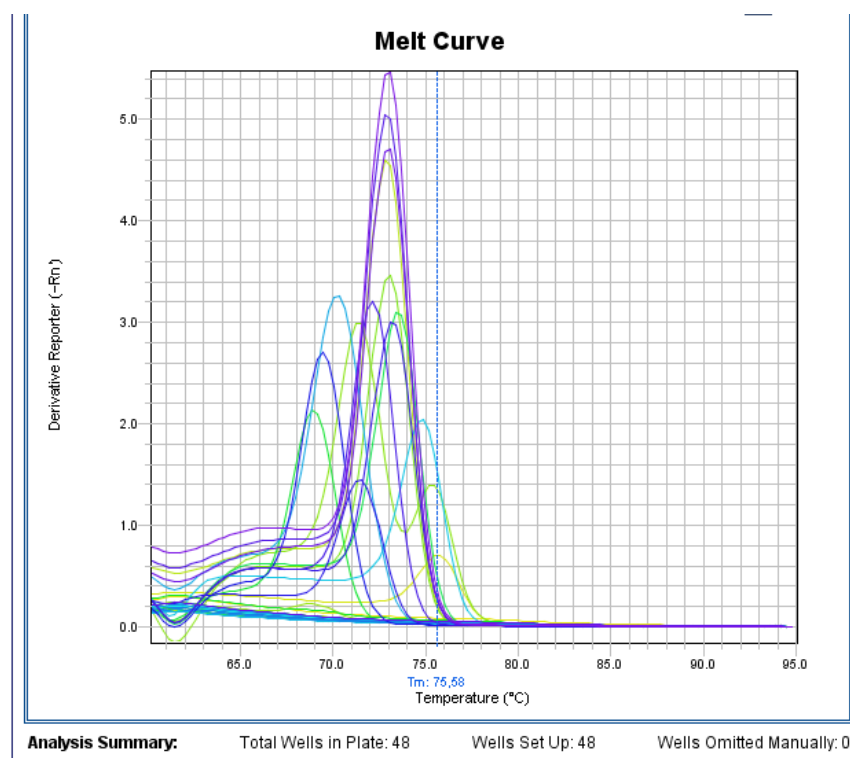
Smeltepunktet av flått plukket fra Hund i Nord Norge (73,1°C) og Drangedal (73,8°C) har en liten variasjon.

Flåtten plukket fra Langøya og Drangedal har et generelt høyere smeltepunkt (73,65-73,8) enn flåtten plukket lenger sør; eksempel Hillevågen ved Mandal med et smeltepunkt på ca 71,9. Ca gjennomsnittlig smeltepunkt ligger rundt T_m 73°C \pm 0,5 se figur 13.

Tabell 6 Viser variasjoner i smeltepunkter fra de ulike lokalitetene

	Lokalitet	Smeltepunkt (Tm) 1	Antall	Smeltepunkt(Tm) 2	Antall
1	Vest- Agder	0		0	
2	Langøya, Bamble	73,65	19	-	-
3	Nord Norge*(Plukket av hund)	73,1	5	-	-
4	Drangedal*(Plukket av hund)	73,8 (Uklare Tm)	4	-	-
5	Rogaland	0	-	0	-
6	Hordaland	0	-	0	-
7	Spjærøya, Hvaler	72,9	4	73,4	3
8	Brønnøya, Asker	72,6	11		
9	Håøya, Oslo	72,9	3	74,3	2
10	Tromøya, Arendal	72,5	6	72,9	2
11	Hillevågen, Mandal	71,9	13	74,3	2
	Gjennomsnitt Tm	Ca 73			

‘-’: ikke spesifisert



Figur 13 viser smeltepunkt (Tm) variasjoner i prøvene som er utført

Diskusjon

I denne studien har vi brukt en nyutviklet real time PCR til å undersøke prevalensen av *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i flått fra 11 ulike lokalisasjoner i Norge.

Dette er en landsdekkende studie, men som i hovedsak har det meste av materialet fra Østlandet, Vestlandet og Sørlandet.

Prevalensen av *Neoehrlichia mikurensis* var 7,9 % på gjennomsnitt og varierte mellom 0 % og 19%.

I rapporten Kristiansen BE. Og Jenkins A. 2001 ble det oppdaget 1,7 % av den da kalt Ehrlichia-lignende organismen fra flått plukket på Sør-Østlandet (Langøya), dette er som tidligere nevnt *Neoehrlichia mikurensis* som ble beskrevet noen år senere i Japan. Det vil si at gjennomsnittet av mine resultater er relativt mye høyere enn hos Kristiansen BE. og Jenkins A. 2001. Men i Nederland ble Ehrlichia varianten oppdaget i 25 og 50 % i alle positive prøvene som ble kjørt (Schouls L. 1999). Dette betyr ikke at det var Neo som ble funnet i disse prøvene. Men sammenligning med Kristiansen BE. og Jenkins A. 2001, er fullt mulig med tanke på at jeg har kjørt PCR på flere av de samme prøvene som ble testet i denne rapporten fra 2001. Det kan derfor tyde på at vi har klart å optimalisere en PCR som er så effektiv at prevalensen i prøvene våre øker betraktelig, siden første gang de ble kjørt.

Geografiske forskjeller vil oppstå med tanke på tilgjengelighet på verter, og klima.

Flåtten som ble plukket i Vest- Agder i år 2000 ga ingen positiver, dette var merkelig da det fra andre prøver viste seg at dette var et område med svært høy prevalens. Vi begynte å mistenkte at DNA materiale var blitt ødelagt i løpet av årene som var gått, men da det tidligere viste seg at noen av disse var positive for Anaplasma, ble det kjørt en PCR rettet mot dette, og denne PCR kjøringen ga nye positiver for Anaplasma, altså var ikke materialet ødelagt, men det var rett og slett ikke positiver for «Neo». Flåtten plukket i Vest Agder 2012 (Hillevågen), hadde derimot svært høy prevalens, blant de høyeste på 18,8 %. En kan derfor spekulere i hvorfor det ikke var positiver i disse prøvene. Prøvene fra 2000 ble plukket i august, mens prøvene fra 2012 ble plukket i juni, tidlig og sensommer. Det kan tenkes at det skyldes område hvor flåtten ble plukket, lav/høysesong og at det dette året var klima og værforhold som kan ha bidratt til at det var dårlige levevilkår for flåtten og «Neo»

Patogenprevalens er sesongbetinget, det mistenkes derfor at det også er årsaken til null-prevalensen i Rogaland og Hordaland i år 2000.

Etter kjøring av flått (*Ixodes ricinus*) plukket fra Hund (*Canis familiaris*) fra Nord-Norge og viste det seg at det var få positive for *Neoehrlichia mikurensis*. De fleste positive er svært svake og kommer opp sent på Realtime PCR, One Step®. Noen få har en lav Ct-verdi, men disse vises ikke som graf i OneStep°. Det er flere ting som kan ha påvirket dette resultatet, og først og fremst kan det virke som at bakterien kan ha blitt hemmet etter å ha sugd blod av hunden. Kan det være noe i dette? Jeg kjørte senere flere prøver fra Drangedal, dette var også flått plukket fra hund. Vi visste fra tidligere at prevalensen i Telemark var høy, så dette kunne bidra til å bekrefte eller avkrefte teorien om at hundeblood hemmer bakterien; prevalensen var enda lavere her! Teorien står fortsatt, og videre testing kan kanskje bidra til å endelig kunne bekrefte eller avkrefte om det faktisk er noe i dette. Hvis en ser bort i fra denne teorien, kan både ekstraksjonsmetode og oppbevaring av materiale ha en påvirkning.

Flåtten er stort sett samlet inn med bruk av flagging, men også noe av flåtten ble plukket rett av hund av dyrleger. Flåtten har blitt samlet inn på forskjellige måter og fra forskjellige lokaliteter, men også behandling av flåtten og typer ekstraksjonsmetoder som er brukt, er gjort på forskjellige måter. Mye av flått-materiale har vært oppbevart lenge, og noe kan også ha blitt tatt opp og ned av fryser flere ganger, slik at det ekstraherte materiale kan ha tatt skade, eller blitt ødelagt. Dette kan være avgjørende for at resultatene kan variere en del, selv om flåtten er plukket i områder nær hverandre.

De fleste prøvene våre ble som tidligere nevnt tatt fra Vestlandet, Sørlandet og Østlandet, men vi har også tydelige positive fra flåtten plukket av hund Nord-Norge. Det er derfor ingen grunn til å tro at «Neo» er mindre prevalent i Nord-Norge enn i Sør-Norge.

Smeltepunktet av PCR produktene varierte fra 71,9-74,4 °C, noe som kan tyde på sekvensvariasjon i målsekvensen. Sekvensvarianter vil si at det er forskjeller i genene, og gen-forskjeller kan bety at bakterier med ulike gener, kan ha ulike egenskaper. Hvis forskjellen er signifikant, kan det være avgjørende om en bakterie er patogen eller ei. Men det kan også være så enkelt, at det bare er underarter med like egenskaper.

Vi ser at vårt PCR kan påvise angivelig sekvensvarianter av Neo, men det er ønskelig å bekrefte funnene med bruk av sekvensering. Det er også tenkelig at smeltepunktvarianter

ikke er varianter av *N. mikurensis*, men av *N. lotori*, eller andre hittil uoppdagede *Neoehrlichia* arter.

Cutoff/ deteksjonsgrensen kjørte jeg opptil flere ganger, og fant til slutt at endelig deteksjonsgrense ga en DNA konsentrasjon på 1 ag/μl, altså $1,6 \cdot 10^0$ molekyler pr 5 μl.

Deteksjonsgrensen ble satt til den konsentrasjonen der vi alltid fikk en positiv.

Deteksjonsgrensen ga oss derfor svar på hvor mye DNA av bakterien vi måtte ha i prøvene for å få positive resultater senere.

Cutoff til denne PCR som ble utviklet bekrefter høy sensitivitet og effektivitet, flere har også valgt *groE* genet som målgen ved kjøring av PCR nettopp på grunn av dette.

Det har som tidligere nevnt, blitt bekreftet *Neoehrlichiose* hos pasienter i flere land i Europa, også i nabolandet vårt Sverige. Med tanke på den høye prevalensen (19%) i noen områder, er sannsynligheten stor for at norske pasienter også kan ha hatt sykdommen uten at de er blitt diagnostisert.

Prevalensen hos Neo ser ut til å være relativ lik, både for nymfer, hanner og hunner. Men for *Borrelia* derimot er prevalensen nesten dobbelt så høy i voksne som hos nymfer. Dette er antagelig fordi de har hatt to blodmåltider og to sjanser å bli smittet. Hva kan være grunnen til at dette ikke er tilfelle hos Neo? Bakterien kan ha en annen funksjon enn *Borrelia*, eller det kan tenkes at Neo er mye mer tilgjengelig for flåtten (vertene) allerede når de er nymfer.

Konklusjon

I denne studien viste vi at *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ble påvist i flått innsamlet fra de forskjellige lokalitetene i Norge. Studien påviste også år til år variasjon i forekomst av «Neo» i flått. Denne variasjonen innen samme lokalitet kan skyldes forskjeller i klima, vekstsesong og eksisterende flått og pattedyr bestand i de forskjellige lokalitetene.

I lokaliteter der «Neo» ikke ble påvist kan dette skyldes at bakterie nivået i flått var svært lav slik at vår test metode ikke var i stand til å påvise det. Man kan ikke utelukke tilstedeværelse av Neo i flått på bakgrunn av et enkelt studium. Det er derfor viktig å kartlegge forekomst av Neo i flått i flere studier for å kunne bekrefte eller avkrefte bakterie forekomsten på de forskjellige lokalitetene.

Dette studiet danner et viktig grunnlag for prevalensen av Neo i Norge, og det er tydelig at det finnes Neo, og derfor også Neoehrlichiose.

Referanser

1. Andreassen, A., et al. (2012). "Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway." *Parasit Vectors* 5: 177
2. Andersson M, Råberg L. Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, southern Sweden. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep [2013 April 22]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1709.101058>
3. Bakken, J.S. 2003. Human anaplasmosis (human granulocytotropic ehrlichiosis). Doktorgradsavhandling. Universitetet i Tromsø.
4. Barker, S.C. and A. Murrell (2008). «Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names «In Bowman, A.S., Nutall, P. (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and control*. Cambridge University Press, Cambridge,; S1-39
5. Bartlett JS. And Stirling D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR PROTOCOLS. J.S.Bartlett and D.Stirling, Humana Press. 226: 3-6.
6. Brantsaeter, AB., Hoel, T., Kristianslund TI et al. Tularemi etter flåttbitt i Vestfold. *Tidsskrift Norsk lægeforening* 1998; 118:1191-3
7. Danielová, V., et al. (1983). "Influence of microclimatic factors on the development and virus infection rate of ticks *Ixodes ricinus* (L.) under experimental conditions." *Folia Parasitol (Praha)* 30: 153-161.
8. Dumler, J.S., Barbet A.F., Bekker C. P.J., Dasch, G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa, Y. and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 2145-2165.
9. Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia Mikurensis*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1127-9.

10. Folkehelseinstituttet (2009). Skogflåtten (*Ixodes Ricinus*), <http://www.fhi.no/dokumenter/955ff49224.pdf>
11. Gjerde, B. 2001. Skogflåtten, *Ixodes ricinus*. Norsk Veterinærtidsskrift. 113: 279-283.
12. Gray, J.S. 2003 .The biology of *Ixodes* ticks, with special reference to *Ixodes ricinus*. www.rczee.org/szeelcrtbi/proc/grey.htm. 20.05.03
13. Hasle, G., Bjune, GA., Christensson, D. Et al. Detection of *Babesia divergens* in southern Norway by usikn an immunofluorescence antibody test i cow sera. Acta vet Scand 2010;52:55.
14. Hillyard, P.D. (1996). Ticks of North- West Europe. «Synopses of the British Fauna» (New Series) No.52. The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal Sciences, Montford Bridge, U.K. ISBN 1-85153-257-9.
15. Jaenson, T.G.T, Talleklint, L. and Mejlom, H. 1994. Sjukdomsoverfdrande fåstingar i Sverige. Svensk Veteriniirtidning. 46: 343-349.
16. Jaenson TG. Svårdiagoserad sjukdom efter fåstingbett. Läkartidningen 2011;108:2083
17. Jenkins A, Hvidsten D, Matussek A, Lindgren PE, Stuen S and Kristiansen BE. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Norway: evaluation of a PCR test targeting the chromosomal flab gene. Exp Appl Acarol. 58: 431-439 (2012).
18. Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, Aakre RK, Strand L, Kleveland EJ, van de Pol I and Schouls L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp in *Ixodes* ticks from Southern Norway. J Clin Microbiol. 39: 3666-3671 (2001).
19. Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG et al. (2001) *Borrelia burgdorferi* sensu lato an *Ehrlichia* spp. In *Ixodes* Tics from southern Norway. J Clin Microbiol 2001; 39; 3666-71
20. Jenkins A, Kristiansen BE. (2013) Neohherlichia- nok en flåttbakterie. Tidsskrift Norsk Legeforening nr, 2013; 133.
21. Jenkins A. 2014. Presentasjon Snäff
22. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H et al. (2004) Ultrastructure an phylogenetic analysis of Candidatus *Neohherlichia mikurensis* in the

family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* Tics. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1837-43

23. Kempf, F., Boulinier, T., De Meeus, T., Arnathau, C. and McCoy, K. D. (2009), Recent evolution of host-associated divergence in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Molecular Ecology*, 18: 4450–4462.
24. Kleppe K. et al. 1971. «Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication on short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. «*Journal of Molecular Biology* 56(2):341-361
25. Kristiansen, BE., Jenkins, A., Tveten, Y. et al. Human granulocytær ehrlichiose i Norge. *Tidsskrift Norsk lægeforening* 2001;121:805-6
26. Lundsett AL. Flåtten *Ixodes ricinus* som sykdomsvektor i Sør-Norge. Hovedfagsoppgave til Cand. Scient. Høgskolen i Telemark. 2004.
27. Mejlom, H. A. and T. G. Jaenson (1993). "Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden." *Scand J Infect Dis* 25(4): 449-456
28. Mehl, R. (1999). «Flått og borreliose i norge- epidemiologi. Nytt om legemidler. Behandling og profylakse av flåttbårne sykdommer, «:22:15-16.
29. Parola, P. and Raoult, D (2001). «Ticks and Tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat.» *Clin Infect Dis* 32(6).897-928
30. Pekova S, Vydra J, Kabickova H et al. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* infection identified in hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69:266-70.
31. Raasok C. 2013. Optimalisere og utvikle en god PCR på *Neoehrlichia mikurensis*. Rettleia oppgave for Høgskolen i Telemark.
32. Randolph, S. E., et al. (1999). "Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate." *Parasitology* 118 (Pt 2): 177-186.
33. Richter, D., Matuschka, FR. «Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*,» *Anaplasma phagocytophilum*, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol* 2012;50:943-7.
34. Rosef, O. Og Rosef, L. 2005. Helse og mikrobiologi. ISBN 82-91768-06-4

35. Royuela. E. et al. (2006). «Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. «Journal of Virological Methods 133(1):14-19.
36. Schouls, L. M., I Van de Pol, S.G.T Rijpkema, and C.S. Schott. 1999. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia Burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. J. Clin. Microbil. 37;2215-2222.
37. Sauer, J.R., McSwain J.L., Bowman, A.S. and Essenberg R.C. 1995. Tick salivary gland physiology. Annu! reviews of entomology. 40: 245-67.
38. Schwaiger M. and Cassinotti P. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. «Journal of Clinical Virology 27(2): 136-145.
39. Sjøberg NO. 2006. Molekylær genetikk. Genteknologi-humant DNA. 4utg. ISBN: 82-412-0625-9. 176-180.
40. Skarpaas, T., Ljøstad, U., Sundøy, A. First human cases of tickborne encephalitis, Norway. Emerg Infect Dis 2004; 10: 2241-3.
41. Skrabalo, Z. and Deanovic, Z. 1957. Piroplasmosis in man. Documenta de medicina geographica et tropica. 9: 11-16.
42. Soleng, A and Kjelland, V (2012) « Borrelia burgdorferi sensu lato an Anaplasma phagocytophilum i ixodes ricinus ticks i brønnøysund i northern Norway. «Ticks and Tick-borne Diseases (0).
43. Stuen, S. 2003. Anaplasma phagocytophilum (formely Ehrlichia phagocytophila) infection in sheep and wild ruminants in Norway. Doktorgradsavhandling. Norges Veterinærhøgskole.
44. Terapiabefaling: Behandling og profylakse av flåttbårne sykdommer. 1999. Nytt om legemidler. 22: 4-45.
45. Vandvik, B. Borreliose. Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) 1984, uke 19. Oslo: Nasjonalt folkehelseinstitutt, 1984.
46. Vayssier- Taussat M, Moutailler S, Michelet L, Deviller E, Bonnet S et al. (2013) Next Generation Sequencing Unexpected Bacterial Pathogens In Tick in Western Europe.

47. von Loewenich FD, Geissdörfer W, Disqué C et al. Detection of «Candidatus Neoehrlichia Mikurensis» in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol 200; 48: 2630- 5
48. Vredevoe, L. 2001. Background information on the biology ofticks.
www.entomology.ucdavis.edu/faculty.!rbkimsey/tickbio.html
49. Welinder- Olsson C, Kjellin E, Vath K, Jacobsson S, Wennerås C. (2010) First Case Of Human «Candidatus Neoehrlichia Mikurensis» Infection in a Febrile Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. 48:1956-9
50. Wennerås C. För tidigt dra slutsatser om ny infeksjonssjukdom. Läkartidningen 2011; 108: 2172.
51. Williams, K. P.; Sobral, B. W.; Dickerman, A. W. (2007). "A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria". Journal of Bacteriology 189 (13): 4578–4586.
52. Åkerstedt, J., Blakstad, E. and Artursson, K. 1996. Seroprevalens av Borrelia burgdoiferi sensu lato og Ehrlichia sp. hos hund fra et kystområde i Aust-Agder. Norsk Veterinærtidskrift. 108: 8-9.
53. <http://en.wikipedia.org/wiki/TaqMan>
54. <http://www.fhi.no/artikler/?id=58877>
55. <http://ndla.no/nb/node/28425>