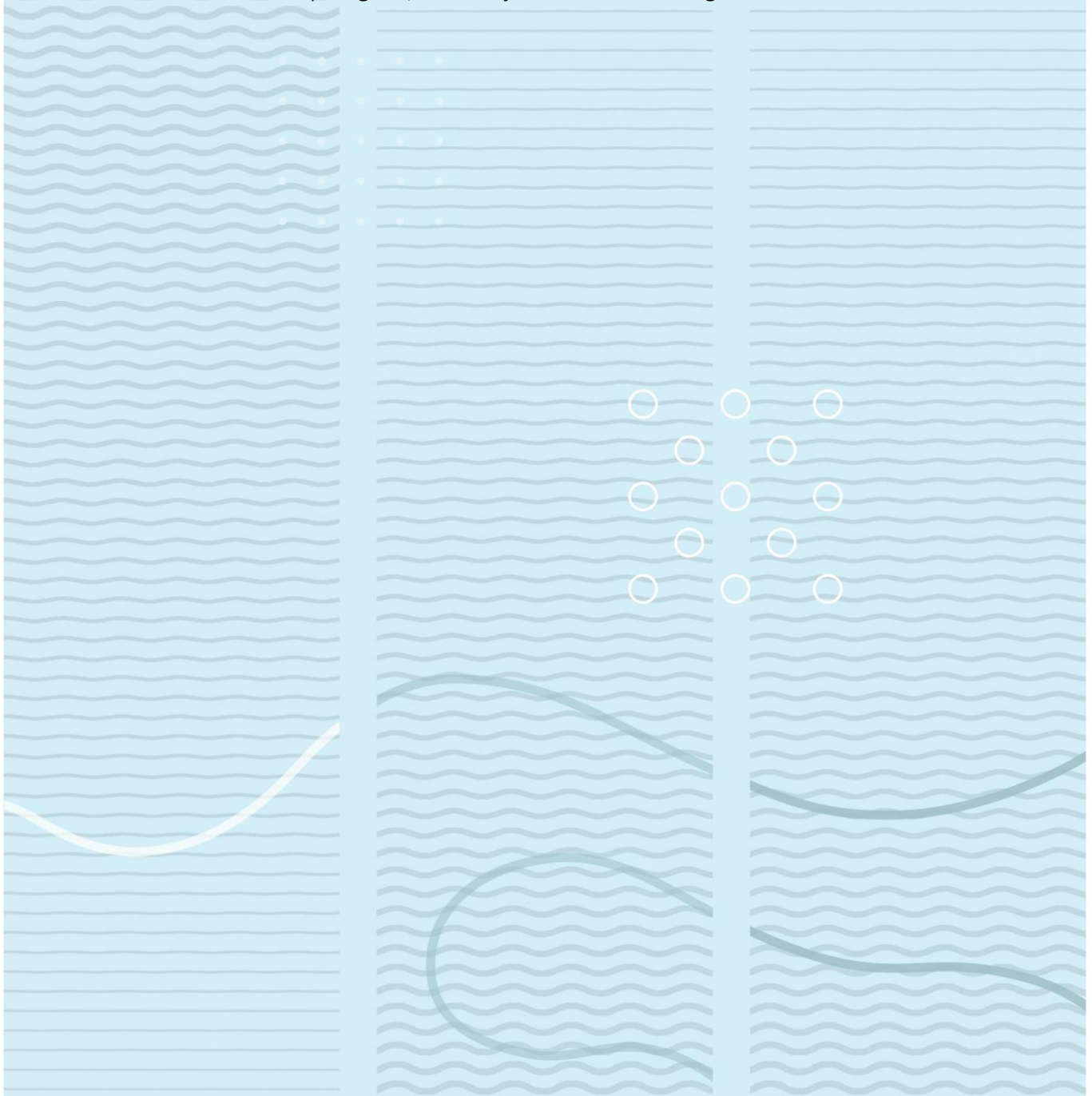


Amalie Kvandahl

## Prevalens av flåttborne patogena på Nordmøre

Prevalens av ulike flåttborne patogena, koinfeksjon mellom disse og flått-tettleik.



Universitetet i Sørøst-Noreg  
Fakultet for teknologi, naturvitskap og maritime fag  
Institutt for Institutt for natur, helse og miljø  
Postboks 235  
3603 Kongsberg

<http://www.usn.no>

© 2023 Amalie Kvandahl

Denne avhandlinga utgjer 60 studiepoeng

## Abstrakt

Vektorborne sjukdommar fører til meir enn 700 000 dødsfall på global basis. Eit døme på vektorborne sjukdommar er flåttborne sjukdommar. I dei siste åra har det både på global basis generelt, og i Noreg vore ein auving i desse sjukdommane. Ein av dei vanlegaste flåttborne sjukdommane i Europa er Lyme borreliose som er forårsaka av bakterie komplekset *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Ein annan aktuell sjukdom ein kan få frå flått er neoehrlichiose, forårsaka av bakterien *Neoehrlichia mikurensis*.

Studien var føretatt med bruk av flått innsamla sommaren 2022 i Surnadal kommune i Møre og Romsdal fylke. Studieområde var delt inn i to delområda, kalla Solligjerdet og Snekkvika. For innsamling av flått var hovudsakleg metoden flagging brukt. Deretter var det utført DNA-ekstraksjon ved bruk av ammonium hydroksid. Til slutt var tre ulike sanntids PCR brukt for påvising av flåttborne patogena. Desse var ein generell for *B.burgdorferi (s.l)*, ein spesifikk for *B.afzelii* og ein for *N.mikurensis*.

Totalt 502 flått var innsamla, der 80% var nymfer og 20% vaksen flått. Det var funnet ein prevalens på 22.7% (114/502) av *B.burgdorferi (s.l)* og 16.9% (85/502) av *N.mikurensis*. Av *B.burgdorferi (s.l)* artar identifisert var i rekkjefølgja *B.burgdorferi sensu stricto* (42/114), *B.afzelii* (29/114), *B.garinii* (29/114) og *B.valaisiana* (14/114). Det var funnet ein koinfeksjon mellom alle desse *B.burgdorferi (s.l)* artane og *N.mikurensis*. Totalt 6% av alle flått var dobbeltpositive for *B.burgdorferi (s.l)* og *N.mikurensis*. Derimot var berre ein koinfeksjon mellom *B.afzelii* og *N.mikurensis* signifikant høgare enn forventa. Dette er sannsynlegvis det første registrerte tilfellet av ein koinfeksjon mellom *B.burgdorferi (s.s)* og *N.mikurensis*.

## Abstract

Vector-borne diseases lead to more than 700 000 deaths on a global basis. One type of vector-borne disease is tick-borne diseases. In the recent years there has been an increase in these types of diseases both globally and in Norway. One of the most common tick-borne diseases in Europe is Lyme disease. The disease is caused by bacteria in the *B.burgdorferi sensu lato (s.l)* complex. A relatively newer tick-borne disease however is neorhlichiosis, which is caused by the bacteria *Neorhlichia mikurensis*.

The study was conducted using ticks collected during the summer of 2022 in Surnadal municipality in Møre and Romsdal county. The study area was divided into two subareas, called Solligjerdet and Snekkvika. Ticks were primarily collected by the method flagging. Afterwards all DNA-extraction were done using ammonium hydroxide. Lastly, three different real-time PCR were performed to check for tick-borne pathogens. These were a general *B.burgdorferi (s.l.)*, one *B.afzelii* specific and one *N.mikurensis* real-time PCR.

A total of 502 ticks were collected, in which 80% were nymphs and 20% adults. The total prevalence of *B.burgdorferi (s.l)* was 22.7% (114/502), whereas 16.9% (85/502) of ticks were infected by *N.mikurensis*. In order of most to least prevalent *B.burgdorferi (s.l)* species detected were *B.burgdorferi (s.s)* (42/114), *B.afzelii* (29/114), *B.garinii* (29/114) and *B.valaisiana* (14/114). A coinfection between all these species with *N.mikurensis* was found, and a total of 6% of all ticks were coinfecting with both *B.burgdorferi (s.l)* and *N.mikurensis*. However, the only significantly higher coinfection than expected was between *B.afzelii* and *N.mikurensis*. To my knowledge, this is the first study to have found a coinfection between *B.burgdorferi (s.s)* and *N.mikurensis*.

## Forord

Takk til professor Andrew Jenkins som rettleiar i masteroppgåva gjennom opplæring i lab og felt-metode, for gode tilbakemeldingar, og interessante diskusjonar.

Takk til doktorgradsstipendiaten Andrea Paola Cotes Perdomo for hyggeleg samarbeid med diverse lab-arbeid, og for gode råd ved lab-arbeid.

Til slutt, takk til samboar Helge Fjærli som assistent ute i felt, og for all støtte gjennom masteroppgåva.

## Formålet med studien

1. Undersøkje prevalensen av ulike arter innanfor *borrelia burgdorferi sensu lato* komplekset og *Neoehrlichia mikurensis* i flått, og om koinfeksjon mellom desse.
2. Prøve ut nye *Borrelia afzelii* spesifikke primere.
3. Utrekning av flått-tettleik.

## Forkortingar og omgrep

$\bar{x}$  = gjennomsnitt.

**Ct verdi-** syklusterskelen ved sanntids PCR.

**DNA** – deoksyribonukleinsyre

**DNA-ekstraksjon** – isolering av DNA frå ein prøve. Til dømes frå ein organisme

**Dobbelpositiv** – organisme infisert med to ulike patogena samtidig

**dNTP** - Nukleosid-5'-trifosfater

**Flåttborne sjukdommar** – Sjukdommar som spreier seg ved bruk av flått som vektor

**GC-** Guanin, Cytosin

**Patogen** – sjukdomsframkallande

**PCR** – Polymerasekjedereaksjon

**Primer-dimer-** to primere som festar seg til kvarandre på grunn av komplementære basar mellom kvarandre

**SYBR- green-** eit fargestoff som binder seg til dobbeltrådet DNA, brukt til sanntids PCR

**T<sub>m</sub>-** Smeltetemperatur ved ein sanntids PCR

**Vektor** - Ein organisme som overfører eit patogen frå ein vert til ein annan

# Innhald

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Forord.....	5
Formålet med studien.....	6
Forkortingar og omgrep.....	7
<b>1. Innleiing .....</b>	<b>11</b>
1.1. Flåttborne sjukdommar.....	11
1.2. Skogflått ( <i>Ixodes ricinus</i> ).....	11
1.2.1. Flåttens utbreiing i Noreg.....	12
1.2.2. Livssyklus.....	12
1.2.3. Leveområde.....	13
1.3. Overføring av patogena i flått .....	13
1.4. Flått-bakteriar.....	14
1.4.1. <i>Neoehrlichia mikurensis</i> og Neoehrlichiose.....	14
1.4.2. <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> og Lyme borreliose .....	15
1.5. Koinfeksjon.....	16
1.6. Åtferd hos infisert flått .....	16
1.7. Sanntids PCR.....	17
1.7.1. Smeltetemperatur.....	18
1.7.2. Kontaminasjon ved sanntids PCR .....	18
1.8. DNA-ekstrasjon.....	19
1.8.1. pH-indikator .....	19
<b>2. Studieområde .....</b>	<b>20</b>
2.1. Solligjerdet.....	21
2.2. Snekkvika.....	22
<b>3. Metode.....</b>	<b>24</b>
3.1. Feltmetode.....	24
3.1.1. Vegetasjonskartlegging og meteorologisk kartlegging .....	24
3.2. DNA-ekstraksjon.....	25
3.2.1. pH-indikator .....	25
3.3. Sanntids PCR.....	26



3.3.1.	<i>N. mikurensis</i> .....	26
3.3.2.	Test av inhibisjon .....	28
3.3.3.	<i>B. burgdorferi (s.l)</i> .....	29
3.3.4.	<i>B.afzelii</i> spesifikk sanntids PCR .....	29
3.4.	Statistikk .....	31
3.4.1.	Utrekning av flått-tettleik .....	31
3.4.2.	Smeltekurve-analyse .....	32
<b>4.</b>	<b>Resultat</b> .....	<b>33</b>
4.1.	Flåttinnsamling .....	33
4.2.	Meteorologisk data .....	34
4.3.	pH-indikator og sanntids PCR .....	34
4.3.1.	Ammonium hydroksid som DNA-ekstraksjon metode .....	35
4.3.2.	Flått frå Asdalstranda og Langøya .....	36
4.4.	Prevalens av flått-patogena i Surnadal .....	37
4.4.1.	<i>N.mikurensis</i> .....	37
4.4.2.	<i>B. burgdorferi (s.l)</i> .....	38
4.4.3.	Identifisering av <i>B.burgdorferi (s.l)</i> arter .....	39
4.5.	Smeltetemperaturar og smeltekurvar .....	41
4.5.1.	<i>N.mikurensis</i> .....	41
4.5.2.	<i>B.burgdorferi (s.l)</i> artar .....	43
4.5.3.	<i>B. afzelii</i> .....	44
4.6.	Ct-verdiar .....	46
4.6.1.	<i>N.mikurensis</i> .....	46
4.6.2.	<i>B.burgdorferi (s.l)</i> .....	47
4.6.3.	<i>B.afzelii</i> .....	48
4.7.	DNA oppformasjon av uspesifikke produkt .....	48
4.7.1.	<i>B.burgdorferi (s.l)</i> .....	49
4.7.2.	<i>B.afzelii</i> .....	49
4.8.	Koinfeksjon .....	50
4.8.1.	<i>B.burgdorferi (s.l)</i> artar og <i>N.mikurensis</i> koinfeksjon .....	51
4.9.	Flått-tettleik .....	52
4.9.1.	Luftfuktigheit og temperatur .....	54

<b>5.</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>55</b>
5.1.	Flåttinnsamling .....	55
5.2.	Variasjon i genetisk materiale ved NH <sub>4</sub> OH-metoden .....	55
5.2.1.	Nøytral raudt som pH-indikator .....	56
5.3.	<i>N. mikurensis</i> prevalens.....	56
5.3.1.	Moglege forklaringar på høg prevalens.....	57
5.3.2.	Forskjell i prevalens mellom Surnadal og Bamble kommune .....	57
5.4.	<i>B. burgdorferi (s.l)</i> prevalens .....	58
5.4.1.	Rekkjefølgje av prevalens hos <i>B.burgdorferi (s.l)</i> artar .....	58
5.4.2.	Prevalens etter livsstadium .....	59
5.5.	Variasjon i patogen prevalens etter studieområde .....	59
5.6.	Flått innsamla frå forfattarens klede .....	60
5.7.	sanntids PCR.....	61
5.7.1.	<i>B.burgdorferi (s.l)</i> .....	61
5.7.2.	<i>B. afzelii</i> spesifikk sanntids PCR .....	62
5.7.3.	<i>N.mikurensis</i> .....	62
5.8.	Koinfeksjon.....	63
5.9.	Flått-tettleik.....	64
5.9.1.	Solligjerdet.....	65
5.9.2.	Snekkvika.....	66
5.9.3.	Luftfuktigheit og temperatur.....	66
5.10.	Feilkjelder .....	67
5.11.	Flått og flåttborne sjukdommar i framtida .....	68
<b>6.</b>	<b>Forslag til framtidige studiar .....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>88</b>
9.1.	PCR protokoll.....	88
9.2.	Datasett frå feltarbeid .....	89
9.3.	Kji-kvadrat testar .....	90

# 1. Innleiing

## 1.1. Flåttborne sjukdommar

Ifølgje World Health Organization (2017) fører vektorborne sjukdommar til over 700 000 årlege dødsfall på global basis. Ein type vektorborne sjukdommar er flåttborne sjukdommar. Desse er meir viktige lokalt på spesifikke områder, og ikkje like betydeleg på global basis som Malaria og Zika virus (World Health Organization.,2017). Virus, parasitter og bakteriar i flått kan alle føre til flåttborne sjukdommar (Madison-Antenucci et al., 2020). Til dømes er skogflåttencefalitt forårsaka av virus, medan anaplasrose er ein bakterie-sjukdom (Madison-Antenucci et al., 2020). Flåttborne sjukdommar observert i Noreg er blant anna Lyme borreliose, Anaplasrose og Babesiose (Madison-Antenucci et al., 2020). Ein person kan bli smitta av desse sjukdommane gjennom flåttbit, særleg dersom flåtten ikkje blir fjerna innanfor eit viss tidspunkt (Madison-Antenucci et al., 2020). Dette tidspunktet kan variere mellom ulike flått-patogena (Madison-Antenucci et al., 2020).

## 1.2. Skogflått (*Ixodes ricinus*)

Flått er ein midd i edderkoppfamilien (Elven og Søli., 2021). Det finnes over 700 ulike *Ixodidae* (harde flått) flåttartar globalt (Guglielmone et al.,2010), deriblant 11 ulike flåttarter er registrert i Noreg (Mehl., 1983). Av desse flåttartane, er skogflåtten (*Ixodes ricinus*) den viktigaste vektoren for flåttborne sjukdommar i Europa (Qviller et al., 2014). Skogflåtten er kjenneteikna som ein hard generalist flått (Herrmann og Gern., 2015; Földvári., 2016) som i Noreg er aktiv frå April til November (Qviller et al., 2014).

### 1.2.1. Flåttens utbreiing i Noreg

Breiddegrada og meter over havet, habitatendringar for både flåtten og verten, vertens distribusjon og klimaendringar er alle faktorar som påverkar distribusjonen av skogflått i Europa (Medlock et al., 2013). Tidlegare i Noreg fann ein flått hovudsakleg langs kysten heilt opp til Brønnøysund (65.1°N) i Nordland fylke (Mehl., 1983). Medan ein kunne finne mindre og sporadiske populasjonar i resten av landet med nokre unntak (Mehl., 1983). Ein nyare studie observerte at den nordlegaste registrerte og samtidig etablerte skogflått-populasjon i Noreg er Dønna (66.2°N) i Nordland fylke (Hvidsten et al., 2020). Derimot når det gjelder høgde over havet, er den nye flåttgrensa for skogflått i Noreg sannsynlegvis minst 1000 m.o.h. (Pelsmaeker., 2021). Tidlegare var denne grensa på 583 m.o.h. i Noreg (Jore et al., 2011). Flått-tettleiken av nymfer har vore funnet til å vere høgare på Vestlandet samanlikna ved Austlandet (Mysterud et al., 2018). I tillegg har det vore observert ein høgare flått-tettleik ved omkring 100 m.o.h enn høgare oppe (~400 m.o.h) i Møre og Romsdal (Qviller et al., 2014).

### 1.2.2. Livssyklus

Livssyklusen til flått består av stadia egg, larve, nymfe og til slutt vaksen (Kahl og Gray., 2023). Flåtten skifter til neste livsstadium etter den har fått sugd seg full på blod, og kor lenge flåtten suger blod på ein vert avhenger av livsstadium (Földvári., 2016) Desse ulike livsstadia går på ulike typar vertedyr (Földvári., 2016), og generelt har harde flått tre vertar i løpet av si levetid (Sonenshine og Roe., 2013a). Flåtten finn desse vertedyra ved bruk av eit sanseorgan på forbeina, kalla Haller's organ (Lees., 1948). Sanseorganet kan samanliknast som ein antenne (Lees., 1948). Til dømes dersom det er ein auka konsentrasjon av CO<sub>2</sub> i lufta, vil flåtten prøve å gripe tak i det potensielle dyret som pustar ut denne gassen (Gherman et al., 2012). Størrelsen på verten som dei ulike flått-livsstadia

setter seg på er sannsynlegvis ikkje basert på preferanse, men på grunn av at mindre vertar kan vere utanfor rekkjevidde når nymfer og vaksen flått er på jakt (Sonenshine og Roe, 2013b). Dette er fordi dei ulike livsstadia av flått klatrar på ulike høgdar i vegetasjonen, sannsynlegvis fordi flått dei tidlege stadia er meir sensitive for uttørking på grunn av kroppsstørrelse, enn vaksen flått (Mejlon og Jaenson., 1997). Når det gjelder flått på menneskjer har blant anna Wilhelmsson et al., (2013) observert at dette hovudsakleg bestod av skogflått i nymfestadiet og deretter hoflått.

### 1.2.3. Leveområde

Generelt føretrekker flåtten områda med tett vegetasjon (Kahl og Gray., 2013) og høg luftfuktigheit (Estrada-Peña, Mihalca og Petney., 2017). Døme på slik vegetasjon kan vere lauvskog, blandingsskog og til tider barskog (Stanek et al., 2012). Utanom i skogen, kan skogflåtten også opphalde seg i parker og hagar (Kahl og Gray., 2013). Ein studie av Wongnak et al., (2022) fann at flått overlevde signifikant lenger ved høgare luftfuktigheit. Studien var føretatt ved bruk av skogflått-data frå 1950, ein parametrisk bayes-analyse overlevelses modell og ekspertar innanfor feltet. Studien foreslo at dersom luftfuktigheita var låg hadde temperaturen ei større betydning for overleving, blant anna at flått hadde høgare dødelegheit ved høge temperaturar dersom luftfuktigheita var låg. Derimot sidan datasettet brukt i studien var relativt gammalt, påpekte Wongnak et al., (2022) at flåtten som lever i dag kan ha tilpassa seg til desse utfordringane.

## 1.3. Overføring av patogena i flått

Patogena kan overførast mellom vert og vektor på ulike måtar (Steinbrink et al., 2022). Desse ulike måtane er systemisk, transstadial passasje, transovarian og overføring

gjennom samføring, som på engelsk er kjent som «co-feeding» (Steinbrink et al., 2022). Definisjonane av desse omgrepa er skildra av Randolph, Gern og Nuttall (1996); ein systemisk overføring er når patogenet fører til ein infeksjon i verten, og der ikkje-infiserte flått kan bli infisert via verten gjennom eit blodmåltid. Overføring av infeksjon frå eit livsstadium til det neste i ein individuell flått før det har skjedd eit nytt blodmåltid er ein transstadial passasje overføring. Transovarian overføring er ein overføring til eggja, og dermed til larvane via ein infisert vaksen hoflått. Til slutt, overføring gjennom samføring kan oppstå når infiserte og ikkje-infiserte flått tar seg eit blodmåltid samtidig frå den same verten. Verten i seg sjølv er ikkje med å spreie bakterien til den ikkje-infiserte flåtten (ikkje-systemisk) (Randolph, Gern og Nuttall, 1996).

## **1.4. Flått-bakteriar**

### **1.4.1. *Neoehrlichia mikurensis* og Neoehrlichiose**

*Neoehrlichia mikurensis* er ein bakterie i familien *Anaplasmataceae* (Kawahara et al., 2004). Bakterien var fyrst oppdaga i 2004 i Japan hos brunrottar (*Rattus norvegicus*) og i flåtten *Ixodes ovatus* (Kawahara et al., 2004). I Europa er det skogflåtten som er hovudvektoren for *N.mikurensis*, og basert på data frå 18 forskjellige land varierer prevelansen i Europa frå 0.1% til 24.3% (Portillo et al., 2018). I tillegg til å infisere flått, kan *N. mikurensis* føre til sjukdommen neoehrlichiose hos menneskjer, som var relativt nyleg oppdaga i Noreg (Quarsten et al., 2017). Ifølgje Labbé Sandelin (2022) er symptoma på neoehrlichiose ofte fråverande eller uspesifikke, men ubehandla infeksjon kan gi alvorlege konsekvensar hos særleg immunsvekka menneskjer (Silaghi et al., 2015). Labbé Sandelin (2022) fann ein prevalens av bakterien på 0.7% frå blod-donorar og 1.3% hos pasientar med symptoma antatt til å kome frå flått-bitt i Sverige.

### 1.4.2. *Borrelia burgdorferi sensu lato* og Lyme borreliose

*Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l)* er eit kompleks av ulike spiroket-bakteriar (*Spirochetales*) (Stanek et al., 2012). Dei vanlegaste bakteriane innanfor komplekset i skogflått er *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto (s.s)* og *B. valaisiana* (Rauter, 2002; Tveten, 2013; Răileanu et al., 2021). Av alle desse er *B. afzelii* den mest vanlege borrelia-bakterien hos flått i Noreg, spesielt hos nymfer (Herrmann og Gern, 2010; Kjelland et al., 2018). Fleire av *B. burgdorferi s.l* bakteriane kan forårsake Lyme borreliose (Stanek et al., 2012). Lyme borreliose er den vanlegaste vektoroverførte sjukdommen i Europa, og i Europa skyldes den hovudsakeleg av *B. afzelii* og *B. garinii* (Madison-Antenucci et al., 2020; Lyngstad et al., 2021). Ifølgje ein oversiktsartikkel frå Steinbrink et al., (2022) tyder fleire studiar på at dei forskjellige borrelia-artane er assosiert med ulike reservoarvertar. *B. afzelii* har vanlegvis gnagarar som reservoarvert, medan både *B. garinii* og *B. valaisiana* bruker fuglar som reservoarvert. Derimot har *B. burgdorferi sensu stricto (s.s)* vore observert til å ha meir breitt utval av vertar, blant anna fuglar, gnagarar og kjøttetarar.

I både Vest-Europa generelt (Sykes og Makiello., 2016) og Noreg (MSIS., 2023) har det vore ein auking i førekomsten av sjukdommen Lyme borreliose. Til dømes frå 2003 til og med 2014 var det høgaste registrert antal tilfella i Noreg 356 i 2008 (MSIS., 2023). Derimot frå 2015 til 2022 var det registrert over 400 tilfella kvart år, med det høgaste registrerte på 557 i 2022 (MSIS., 2023). Kjenneteikn på sjukdommen er vanlegvis utslett (Stanek et al., 2012). Andre mindre vanlege symptoma er leddgikt og nevrologiske manifestasjonar (Stanek et al., 2012).

## 1.5. Koinfeksjon

Koinfeksjon er når ein individuell flått er infisert med meir enn ein patogen (merriam-webster.com, u.å). Ein koinfeksjon i flått med opptil fem ulike patogena har vore registrert av Moutailler et al., (2016). Derimot av flått som er infisert med fleire enn ein patogen, tyder det på at dobbel infeksjon er mest vanleg (Moutailler et al., 2016; Klitgaard et al., 2019). I tillegg har fleire studiar funnet at ein koinfeksjon er meir vanleg hos vaksne flått enn hos nymfer (Walk et al., 2009; Herrmann og Gern, 2010). Studien av Moutailler et al., (2016) som undersøkte vaksen hoflått i Frankrike fann at 45 % var infisert med minst ein patogen, og at halvparten av desse hadde blanda infeksjonar. Same studie observerte at bakteriar som fører til Lyme borreliose var dei mest gjentakande av 38 ulike patogen testa. Klitgaard et al., (2019) observerte også at slekta *Borrelia* var mest vanleg, men studien testa berre 17 ulike patogen. Når det kjem til koinfeksjon utanfor dette har Kjelland et al., (2018) oppdaga ein koinfeksjon mellom *B.afzelii* og *N. mikurensis* på 3.3% i Sør-Noreg.

## 1.6. Åtferd hos infisert flått

Ein oversiktsartikkel av Herrmann og Gern (2015) observerte at infisert flått moglegvis har annleis åtferd enn ikkje-infisert. Dette er ved å drive med jakt for ein vert høgare oppe i vegetasjonen, og betre yta ved både lågare luftfuktigheit og ekstreme temperaturar. Ulike hypotesar på kvifor infisert flått kan ha denne åtferda er høgare feittinnhald, endringar i genane og større måltid enn ikkje-infisert flått på grunn av virus eller bakteriane. Derimot fann Herrmann og Gern (2010) at dersom smittmengda er høg kan dette påverke overlevingsrata negativt. Denne trenden såg forfattarane i studien hos vaksne flått, men ikkje hos nymfer. Det har vore observert eit forhold mellom flått-bakterien *Anaplasma phagocytophilum* og *Ixodes scapularis* flått som kan moglegvis tyde



på ein symbiose (Neelakanta et al., 2010). Dette er på bakgrunn av at flått infisert av denne bakterien har ein auka sjanse for å overleve i kalde miljø gjennom eit frostbeskyttande glykoprotein (Neelakanta et al., 2010). I tillegg har det også vore observert at flått-bakteriar kan gi eit tilskot av B-vitaminer til flått, noko som flåtten vanlegvis ikkje får mykje av frå blodmåltid, som er spesielt viktig for utviklinga av hoflått (Duron et al., 2018).

## 1.7. Sanntids PCR

For å undersøkje om ein flått er infisert av ein bakterie eller virus kan ein bruke sanntids PCR (Holland et al., 1991; Higuchi et al., 1992). Før sanntids PCR var konvensjonell PCR mykje brukt for å identifisere patogena (Estrada-Peña et al., 2013). Før dette igjen var mørkefeltmikroskopi slik som av Alekseev et al., (2001) brukt for å identifisere blant anna *B.burgdorferi (s.l)* bakteriar. Ifølgje Bio-Rad laboratories (2006) er sanntids PCR ein metode der DNA oppformeras og blir visualisert i sanntid ved hjelp av fluorescerande molekyl i reaksjonen. Når nok DNA blir oppformert, resulterast det til eit målbart fluorescerande signal. Kor mange syklusar det tek før ein får dette signalet er kalla syklusterskelen (ct). Dess lågare ct-verdi ein prøve har, dess meir genetisk materiale er det i prøva. Utanom DNA-prøvene, kan komponentane i ein sanntids PCR bestå av primere og ein mastermix som innehalde blant anna DNA polymerase, dNTP og eit fargestoff (Bio-Rad laboratories., 2006). DNA polymerase er eit enzym som katalyserer forlenginga av nytt DNA ved å legge til fleire ulike dNTP på ein allereie eksisterande DNA-tråd (Campbell et al., 2018). Eit døme på eit fargestoff derimot er SYBR-green som binder seg til dobbeltrådet DNA (Bio-Rad laboratories., 2006). Fordelen med bruken av SYBR-green er at ein trengjer ingen DNA-prober, berre parallelle og antiparallelle primere (Bio-

Rad laboratories., 2006). Ulempa er at fargestoffet er uspesifikk, og kan difor binde seg til kva som helst dobbeltrådet DNA (Bio-Rad laboratories., 2006).

### **1.7.1. Smeltetemperatur**

For å skile mellom spesifikke og uspesifikke produkt ved sanntids PCR er smeltetemperaturen ( $T_m$ ) viktig.  $T_m$  er temperaturen der 50% av dobbeltrådet DNA har blitt til enkeltrådet DNA (Bio-Rad laboratories., 2006).  $T_m$  av eit produkt er påverka av faktorar som lengde, innhaldet av GC og sekvens (Ririe, Rasmussen og Wittwer, 1997). Difor kan ein bruke  $T_m$  for å skile mellom ulike patogen og ikkje-spesifikke produkt (Ririe, Rasmussen og Wittwer, 1997). Til dømes har ikkje-spesifikke produkt vanlegvis ein lågare  $T_m$  enn det spesifikke produktet (Ririe, Rasmussen og Wittwer, 1997).

### **1.7.2. Kontaminasjon ved sanntids PCR**

Det er ulike fordelar med å føreteke sanntids PCR samanlikna med konvensjonell PCR (Bio-Rad laboratories., 2006). Ved sanntids PCR trenger ein ikkje å gjere ein gelelektroforese etter oppformeringa av DNA (Bio-Rad laboratories., 2006). I tillegg minkar ein sjansen for kontaminasjon av prøvane sidan reaksjonen føretek seg i eit lukka system (Bio-Rad laboratories., 2006). Derimot det er framleis ein sjanse for kontaminasjon gjennom kryss-kontaminasjon mellom prøvar (Bio-Rad laboratories., 2006) via ureine pipettar og ved uforsiktig handtering av DNA-røyr (Kwok og Higuchi, 1989). For å unngå kontaminasjon var mastermix laget i eit separat rom enn der DNA-prøvane var oppbevart, bruk av eingangshanskar som jamleg var bytta og tilsetta DNA-prøvane sist i PCR-plata (Kwok og Higuchi, 1989).

## 1.8. DNA-ekstrasjon

Det er ulike metodar for å ekstrahere DNA frå flått for bruk ved sanntids PCR (Okeyo et al., 2019). Nokre av desse metodane er forskjellige kommersielle DNA-ekstrasjons kit og Ammonium hydroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Okeyo et al., 2019). Fyrstnemnte metode har ved fleire studiar vore observert til å gi betre resultat ved sanntids PCR enn  $\text{NH}_4\text{OH}$ -metoden (Ammazzalorso et al., 2015; Okeyo et al., 2019). Derimot er  $\text{NH}_4\text{OH}$ - metoden eit alternativt ved større mengda av flått, fordi den er både økonomisk billigare og mindre tidskrevande enn DNA-kits (Okeyo et al., 2019).

### 1.8.1. pH-indikator

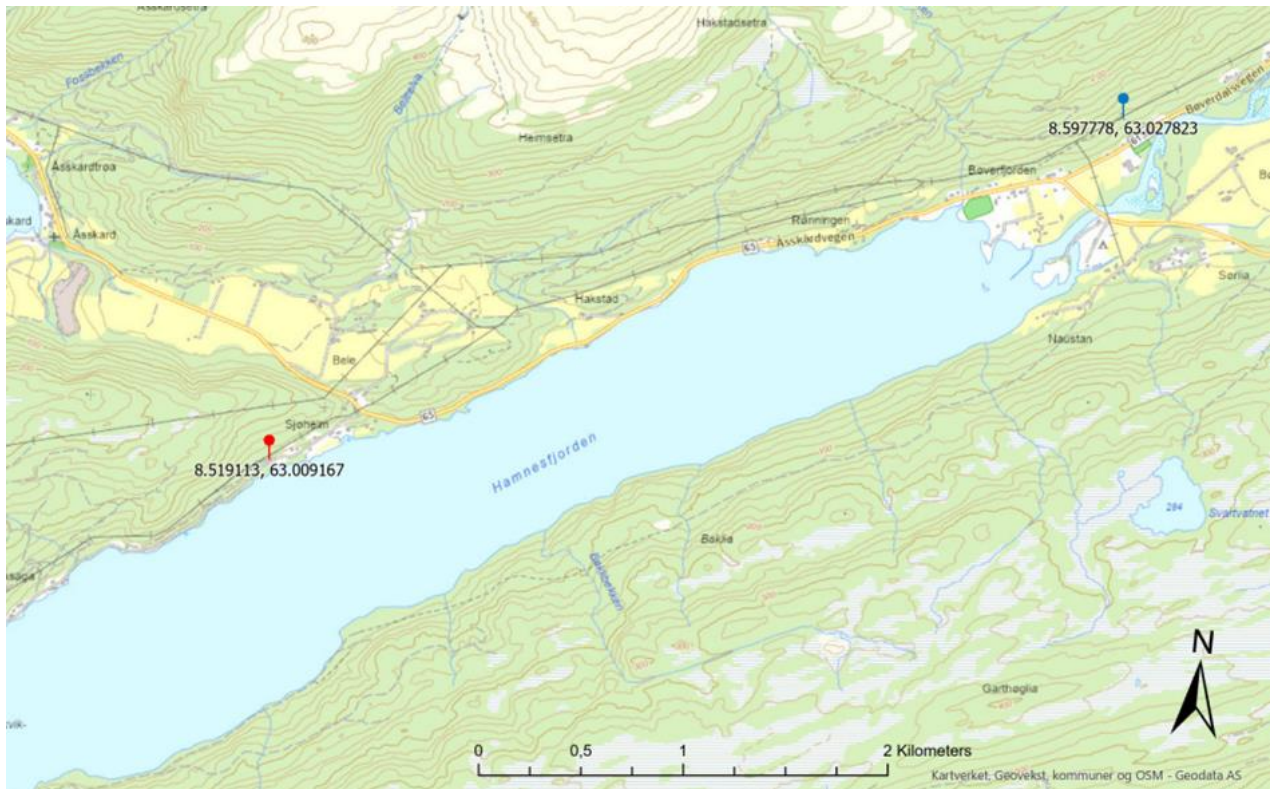
$\text{NH}_4\text{OH}$  har en pH-verdi på omkring 11.46 kalkulert basert på ein konsentrasjon på 0.5M/l og  $K_b$ - verdi på  $1.79 \times 10^{-5}$  (Weast og Astle, 1982), medan den optimale pH-verdien for sanntids PCR reaksjonen er omkring pH 8.3 - 9 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Difor er det viktig at mesteparten av  $\text{NH}_4\text{OH}$  har fordampa etter DNA-ekstraksjon. For å undersøkje dette kan ein bruke fargestoffet nøytral raudt (Barbosa og Peters., 1971). Nøytral raudt, kjent som «Neutral red» på engelsk, er ein svak base som kan brukes som pH-indikator (Barbosa og Peters., 1971). Dette er fordi fargestoffet er sensitiv til pH-endingar (Barbosa og Peters., 1971). Til dømes kan den enten vere raud-rosa, brun-oransje eller gul basert på pH-verdi hos ulike baser (Barbosa og Peters., 1971). Vanlegvis er fargestoffet raud-rosa ved  $\text{pH} < 6.8$ , gul ved  $\text{pH} > 8$  (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) og mellom pH 6.8 og 8 er fargestoffet oransje (LaManna., 1987).

## 2. Studieområde

Studieområde ligger i Surnadal kommune (omkring 63° N, 8.5°A) i Møre og Romsdal fylke (Fig. 1). Av dyreliv i kommunen er det blant annet registrert hjort (*Cervus elaphus*), og i perioden 2021 til 2022 var det felt 490 individ i kommunen (Statistisk sentralbyrå, 2022). Studieområdet var delt inn i to hovudområda, 4.7 kilometer frå kvarandre (Fig. 2). Hovudområda var deretter delt inn i til saman åtte delområda (vedlegg 9.2, tabell 2). Det var observert hjortestiar på begge studieområda.



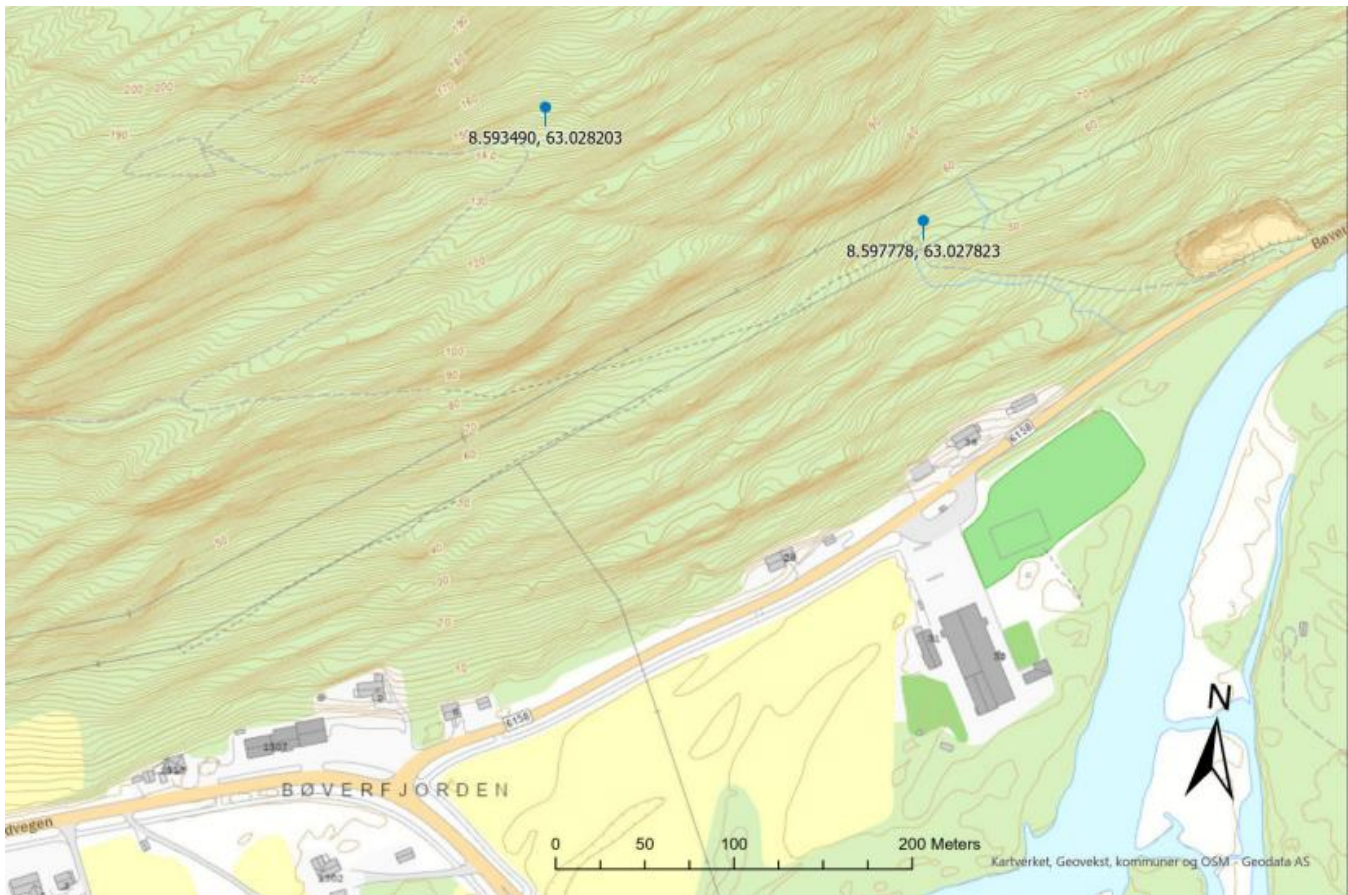
Figur 1. Viser kvar studieområde kommunen, Surnadal, er lokalisert i Noreg.



**Figur 2.** Distansen mellom startpunktet for studieområda i Snekkvika (rød prikk) og i Solligjerdet (blå prikk).

## 2.1. Solligjerdet

Studieområde på Solligjerdet (Start = 63.027823, 8.597778, slutt: 63.028203, 8.593490) var 599 meter lang med ein variasjon på 49 og 145 m.o.h. (**fig.3**). Delområde A var nedst i terrenget medan delområde D var høgast oppe. Vegetasjonen var ein blanding mellom fattig edellauvskog og blåbærfuruskog (Rekdal og Larssons, 2005). Artar identifisert i område var blåbær (*Vaccinium myrtillus*), furu (*Pinus sylvestris*), einstape (*Pteridium aquilinum*), Hassel (*Corylus avellana*), Bjørk (*Betula pubescens*), torvmose (*Sphagnum*), småmarimjelle (*Melampyrum sylvaticum*), rogn (*Sorbus aucuparia*), einer (*Juniperus*), tyttebær (*Vaccinium vitis-idaea*) og tepperot (*Potentilla erecta*).



Figur. 3. Start og slutt punkt for studieområde i Solligjerdet. Den stipla linja viser stien som blei brukt.

## 2.2. Snekkvika

Studieområde i Snekkvika (start = 63.009167, 8.519113 slutt: 63.005207, 8.509088) var eit 700 meter langt relativt flatt område med ein variasjon på 13 til 36 m.o.h. (fig.4). Vegetasjonen i området bestod hovudsakleg av blåbærfuruskog og mindre områda med fattig edellauvskog (Rekdal og Larssons, 2005). Dominerande plantar identifisert i område var blåbær, furu, etasjemose (*Hylocomium splendens*), einstape, bjørnekam (*Blechnum spicant*) og diverse lauvtrær. I tillegg vart myrtistel (*Cirsium palustre*), blokkebær (*Vaccinium uliginosum*), kråkefot (*Lycopodiaceae*), mjørdurt (*Filipendula ulmaria*), skoggullris (*Solidago virgaurea ssp. Virgaurea*), stormarimjelle (*Melampyrum pratense*), ørevier (*Salix aurita*), røsslyng (*Calluna vulgaris*), rogn, einer, tyttebær, osp (*Populus tremula*) og skogsvever (*Hieracium*) dokumentert på staden.



*Figur 4. Start og sluttunktet på studieområdet i Snekkvika der den stipla linja viser stien som var brukt.*

## 3. Metode

### 3.1. Feltmetode

Flått blei innsamla i juni og juli sommaren 2022 med metoden flagging (Estrada-Peña Mihalca og Petney, 2017). Flagging blei gjort ved bruk av eit kvit frottéhandkle festa på eit kosteskraft ved bruk av tradisjonelle teiknestiftar. All flått blei overført i enten 1.5ml eppendorfrøyr eller 50 ml sentrifuge røyr fylt med 96% etanol. Flagging var hovudsakleg føretatt på tørr vegetasjon og ved lite eller ingen vind. Handduken var bytta dersom den blei våt eller skitten slik som Qviller et al., (2016). I tillegg til flagging, var flått som satt seg på forfattarens klede i Snekkvika, innsamla i eit separat 50ml røyr. Forfattere påkledding var ein heildekkande kvit kjeledress, fjellsko og sokkar over buksebeina. Ingen flåttmiddel var tatt i bruk. Dersom det lèt seg gjerast var alle delområda flagga minst ein gong kvar feltdag. Berre nymfer og vaksne flått var innsamla, sidan larver var vanskelege å telle. Gjennomsnitt lengde per flagging var på 161 meter. All flått var lufttørka før DNA-ekstraksjon. Dette var fordi etanol kan føre til inhibisjon ved Sanntids PCR (Schrader et al., 2012; Okeyo et al.,2019).

#### 3.1.1. Vegetasjonskartlegging og meteorologisk kartlegging

Vegetasjonskartlegging var føretatt basert på observasjonar i felt og ved bruk av Rekdal og Larssons (2005) rettleiing i vegetasjonskartlegging. Lengdedata og koordinatar var registrert ved bruk av appen Geo tracker – GPS tracker (Ilya Bogdanovich., 2013). Deretter var koordinatane brukt til å finne ut meter over havet ved bruk av Norgeskart.no. Lufttemperatur var notert ned kvar feltdag utanfor huset i studiekommunen. I tillegg var YR.no brukt for innsamling av data for lufttemperatur og luftfuktigheit. Alle kart var genererte ved bruk av ArcGIS Pro (ESRI., 2011).



## 3.2. DNA-ekstraksjon

DNA ekstraksjon av flått var føretatt ved bruk av 2.5 % ammonium hydroksid (NH<sub>4</sub>OH) (Guy og Stanek., 1991). Tørre flått var overført i 2 ml mikrosentrifugerør røyr fylt med 100 µl 2.5 % ammonium hydroksid ved bruk av sterile podeøser. Lokket på røyra var satt hol på med ein 0.8 sprøytenål. Dette var for å unngå produsering av overtrykk som kan gjere at lokket spretter opp, som kan føre til at røyra faller og tømmer seg sjølv i inkubasjonssprosessen (professor A. Jenkins 2023, personleg kommunikasjon, April). Inkubasjonen var føretatt i 20 minuttar ved 100 °C med lokket igjen, etterfølgd av ein inkubasjon på 10 minuttar med lokket opent. Sentrifugering i omkring 30 sekund var føretatt etter kvar inkubasjon for å fjerne damp som la seg på veggane på røyra. Til slutt var røyra markert og oppbevart i ei veke ved 4 °C før dei var overført i tette 1.5 ml røyr.

### 3.2.1. pH-indikator

Saman med doktorgradsstipendiaten Andrea Paola Cotes Perdomo var det undersøkt om ein kunne bruke fargestoffet nøytral raudt som pH-indikator ved ammonium hydroksid DNA-ekstraksjon. Dette var gjort med å observere fargeendingar hos prøvar tilsett fargestoffet. I tillegg var det undersøkt om fargestoffet påverka sanntids PCR. Fire ulike sanntids PCR testar, med bruk av flått innsamla frå Langøya og Asdalstranda i Bamble kommune i mai 2011 av Dag Hvidsten (professor A. Jenkins, 2023, personleg kommunikasjon, Mai) var føretatt. Alle flått var ekstrahert DNA frå ved bruk av NH<sub>4</sub>OH-metoden (Jf. **kapittel 3.2**), berre at det var tilsett 25 µl av fargestoffet i 1000 µl 2.5% ammoniakk. Konsentrasjonen på fargestoffet var omkring 100 mg/ml. I tillegg til dette var det tilsett ekstra fargestoff i en av to fortynningsrekker. Dette bestod av 50 µl nøytral raudt fargestoff i 1000 µl sterilt vatn. Ved test 1 var 5 µl av denne blandinga tilsette i 1 av 2 Neo5. Medan ved test 2 var same mengde tilsette i 1 av 2 neo7 og neo8. For detaljert

skildring for kvar test, sjå **tabell 1**. Alle flått var testa for *N.mikurensis* ved bruk av sanntids PCR skildra i **kapittel 3.3.1**.

**Tabell 1.** Metode for test av nøytral raudt ved *N.mikurensis* sanntids PCR.

Test	DNA-ekstraksjon metode	Dagar etter DNA-ekstraksjon*	Antal flått-prøver
Test 1	Med fargestoff	~ 2 dagar	15 nymfer frå Asdalstranda
Test 2	Med fargestoff, 1:5 fortynning med TE buffer	~ 3 dagar	Alle flått frå test 1.
Test 3	Utan fargestoff	~ 0 dagar	6 hannflått, 6 hoflått og 6 nymfer frå Langøya.
Test 4	Utan fargestoff	~ 7 dagar	Alle flått frå test 3.

\* kor mange dagar etter DNA-ekstraksjon at sanntids PCR var utført.

### 3.3. Sanntids PCR

Alle Sanntids PCR testane var føretatt med bruk av ein StepOnePlus maskin frå Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA), og ved bruk av protokollen i **vedlegg 9.1**. Basert på antal flått testa, var det tatt i bruk enten ein 96 eller 48 PCR plate PCR maskin. I tillegg var alle eksperimenta kvantitative – standard kurve med ein standard ~ 2 timars ramp hastigheit. For kvar eksperiment var det brukt eit reaksjonsvolum på 25 µl væske i kvar platehol, der 20 µl var mastermix og 5 µl var enten DNA-prøva eller kontroll. For negativ kontroll var det tilsett 5 µl med DNA-fri vatn i staden for DNA-prøve. Alle primerane brukt i studien var bestilt frå Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).

#### 3.3.1. *N. mikurensis*

Sanntids PCR metoden utvikla av Jenkins et al., (2019) retta mot *groEL* genet var føretatt for å identifisere flått infisert med *N.mikurensis*. Dette var ved bruk av SYBR-green

mastermix og Neo2f/Neo2r primere slik som Jenkins et al., (2019) (**tabell 2**). For positiv kontroll var ein 10-foldig fortynningsrekke av pNeo med molekylar frå  $1.6 \times 10^9$  til  $1.6 \times 10^5$  per 5  $\mu$ l (Jenkins et al., 2019), kalla Neo5-Neo9 brukt. Mastermix var laga slik som oppskrifta i **tabell 3**, medan den termiske profilen stod på slik som i **tabell 4**.

**Tabell 2.** Primere brukt for *N.mikurensis* sanntids PCR, laga av Jenkins et al., (2019).

Parallell primer (forward)	5'GCAAATGGAGATAAAAAC ATAGGTAGTAAA 3'
Antiparallell primer (reverse)	5'CATAACCGTCAGTTTTTTTCA ACTTCTAA 3'

**Tabell 3.** Mastermix for *N.mikurensis* sanntids PCR for 10 prøvar.

Komponent	Mengde i $\mu$ l
300 nM PowerUp SYBR-green mastermix*	125
Parallell (forward) primer	15
Antiparallell (Reverse) primer	15
DNA- fri vatn	45

\*Av Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA)

**Tabell 4.** PCR termisk profil 1. Programmet bestod av 45 syklusar med to startsyklusar.

Fase	Steg	Temperatur ( °C)	Tid
Haldingsfase	1	50 °C	2 minutt
	2	95 °C	10 minutt
Syklusfase	1	95 °C	15 sekund
	2	60°C	1 minutt
Smeltekurve-fase	1	95 °C	15 sekund
	2	60 °C	1 minutt
	3	65 °C	5 sekund
	4	65-80°C	15 sekund, + 0.3 °C
Haldingsfase	1	15 °C	1 minutt

### 3.3.2. Test av inhibisjon

Utanom fortynningsrekke som positiv kontroll, var ein kopi av kvar enkelt DNA-prøve tilsett 1.5 µl av neo5. Dette er kalla «spiking» som var brukt for å teste for inhibisjon. Spiking var gjort for å få ein konstant mengde av den spesifikke bakteriens DNA, som skal føre til positive resultat dersom sanntids PCR testen fungerer slik den skal. Til dømes er det eit teikn på inhibisjon dersom den spiked prøven er negativ eller har ein ekstremt høg ct-verdi enn forventa (professor A. Jenkins 2023, personleg kommunikasjon, Mai).

### 3.3.3. *B. burgdorferi* (s.l)

Påvising av *B. burgdorferi* (s.l) positive flått var utført ved bruk av ein sanntids PCR utvikla av Jenkins et al., (2012), retta mot *flaB* genet. **Tabell 5** viser *flaB* primere sekvensane som var brukt. For positiv kontroll var ein *B. burgdorferi* 10-foldig fortynningsrekke på  $3 \times 10^6$  til 3 molekylar per 5  $\mu$ l (Jenkins et al., 2012), kalla borr3-borr9 brukt. I tillegg som hjelp til å tolke smeltekurve-analysane og som positiv kontroll for dei ulike borrelia-artane var flått positive for *B. garinii*, *B. afzelii* og *B. valaisiana* inkludert. Fortynningsrekkeja var brukt til å identifisere *B. burgdorferi* (s.s). *B. afzelii* kontroll var frå mai 1998 frå Langøya, nyleg testa av Saber (2022). PCR termisk profil var lik *N. mikurensis* sanntids PCR (jf. **Tabell 4**), medan mastermix var laget slik som i **tabell 6**.

**Tabell 5.** *FlaB* primere brukt for *B. burgdorferi* s.l. sanntids PCR.

Parallell primer (forward)	5' TCA AGA AAT AAT GST ATT AAT GCT GCT AA 3'*
Antiparallell primer (Reverse)	5' CCA GCA GCA TCA TCA GAA GCT 3'

\*S= C+G, primere utvikla av Jenkins et al., (2012).

**Tabell 6.** Mastermix oppskrift for *B. burgdorferi* (s.l) PCR (10 prøvar).

Komponent	Mengde i $\mu$ l
340 nM PowerUp SYBR-green mastermix*	125
Parallell (forward) primer	17
Antiparallell (Reverse) primer	17
DNA-fri vatn	41

\*Av Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA)

### 3.3.4. *B. afzelii* spesifikk sanntids PCR

Alle *B. burgdorferi* (s.l.) positive ved metoden frå **kapittel 3.3.3** var testa på nytt for *B. afzelii* ved bruk av nye *B. afzelii* spesifikke primere. Desse primerane var laga av Regine

Bøe og Emely Marie Hegna Hagen (2022) i kurset Applied genetics på USN (**Tabell 7**). Disse primerane vart kalla *BafER*. Mastermix oppskrift var laga slik som i **tabell 3**. To ulike PCR termiske profil program var eksperimentert på, termisk profil 1 (**jf. Tabell 4**) og termisk profil 2 (**tabell 8**).

**Tabell 7.** *B. afzelii* spesifikke primere laget av Bøe og Hagen (2022) i kurset Applied genetics på USN.

Parallell primer (forward)	5' TTG GAA GTA AAA GAA GGA ACC GTT A '3
Antiparallell primer (Reverse)	5' TTT TTA GTA GCC TGA GTA GTG TTA GTG '3

**Tabell 8.** PCR termisk profil 2. Programmet bestod av 40 syklusar med ein startsyklus.

Fase	Steg	Temperatur ( °C)	Tid
Haldingsfase	1	95 °C	1 min
Syklusfase	1	95 °C	10 sekund
	2	60 °C	1 min
Smeltekurve-fase	1	95 °C	15 sekund
	2	60 °C	1 min
	3	95 °C	15 sek, + 0.3 °C

For positiv kontroll var ein kombinasjon av flått positive for *B.afzelii* frå Langøya i 1998 (Saber., 2022) og flått testa i denne studien brukt. Desse hadde ein ID på L2 152, L2 172, S10722M02 og S2X22M14. For å sjekke at DNA frå andre *B.burgdorferi* (*s.l*) artar ikkje oppformerte, var *B.garinii* positive flått brukt som kontroll. I tillegg var Borr3 frå fortynningsrekkja ved *B.burgdorferi* (*s.l*) sanntids PCR (**jf. Kapittel 3.3.3**) brukt som kontroll for *B.burgdorferi* (*s.s*).

I nokre tilfella var det usikkert om ein flått var positiv for *B.afzelii* eller *B.valaisiana* ved *B.burgdorferi* (*s.l*) sanntids PCR. I desse tilfella var ein flått registrert som positiv for *B.afzelii* dersom dei var positive ved minst 2 av 3 *B.afzelii* sanntids testar. Derimot var dei registrert som *B.valaisiana* positive dersom dei var negative ved minst 2 av 3 *B.afzelii* sanntids PCR. Same prosedyre var også føretatt dersom ein prøve var positiv ved den eine termiske profilen, men negativ ved den andre.

Hos flått identifisert som *B.garinii* eller *B.burgdorferi* (*s.s*) ved *B.burgdorferi* (*s.l*) sanntids PCR, var desse berre testa ein gong ved *B.afzelii* sanntids PCR dersom dei var negative ved fyrste test.

### **3.4. Statistikk**

Statistiske analysar var føretatt ved bruk av programmet R versjon 4.0.2 (R Core Team., 2022) med pakken «Rcmdr», og Excel (Microsoft Corporation, 2018). Statistiske testar utøva var Kji-kvadrat test (Excel-ark av A. Jenkins., 2016), 95 % konfidensintervaller (Excel-ark av A. Jenkins., 2004), Pearsons korrelasjonskoeffisient , t – testar med både ein og to grupper, paret t- test, Fishers eksakte test og einvegs variasjonsanalyse. Resultat med ein p-verdi på  $< 0.05$  var sett som statistisk signifikante. Utrekning med meteorologisk data var basert på informasjon i vedlegg 9.2 **tabell 3**.

#### **3.4.1. Utrekning av flått-tettleik**

Utrekning av flått-tettleik var basert på data i vedlegg 9.2 **tabell 2**. Antal timar med flagging inkluderte berre timar med aktivt flagging, og inkluderte ikkje tida brukt for å fjerne flåtten frå handduken. I tillegg var flått innsamla ved andre metodar enn flagging

ikkje brukt for utrekning av flått-tettleik. Formelen nedanfor viser korleis flått-tettleiken var utrekna.

$$\text{Flått – tettleik} = \frac{\text{Antal flått samlet ved flagging}}{\text{Antal timar med flagging}}$$

### 3.4.2. Smeltekurve-analyse

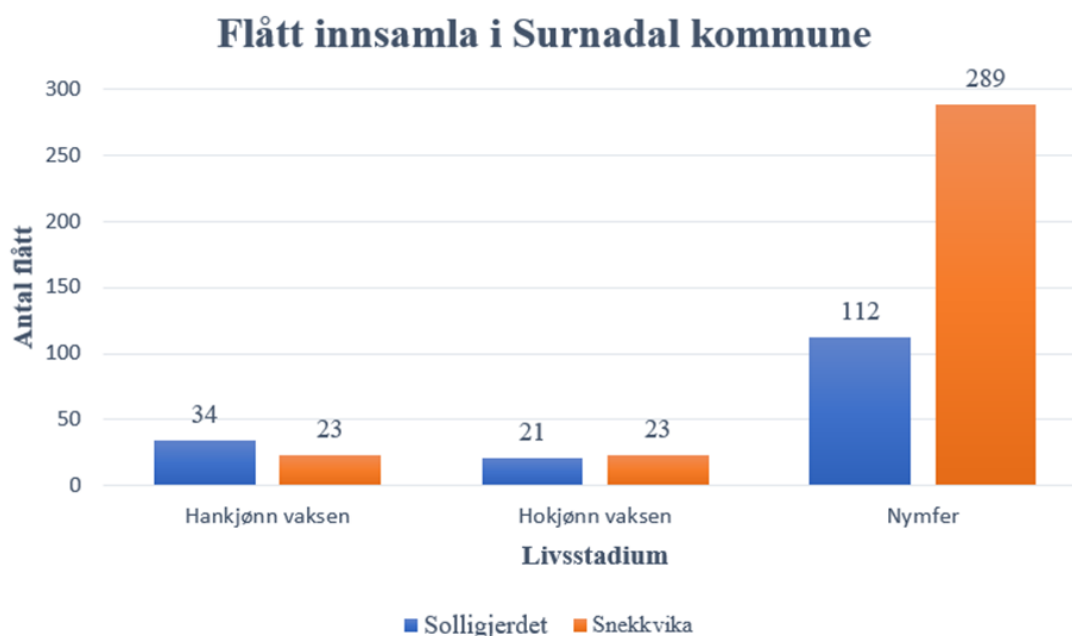
Smeltekurve-analyser var føretatt for å differensiere mellom negativ resultat og oppformasjon av DNA for både spesifikke og uspesifikke produkt ved sanntids PCR. Dette gjekk ut på å samanlikne smeltekurva og T<sub>m</sub> med positiv kontroll. Dermed var ein test sett som positiv for den spesifikke patogen-gruppa dersom den hadde en smeltetemperatur ± 1.5 °C frå positiv kontroll, og en ct- verdi under 45 ved termisk profil 1 eller ct-verdi under 40 ved termisk profil 2 (professor A. Jenkins 2023, personleg kommunikasjon, februar).



## 4. Resultat

### 4.1. Flåttinnsamling

Alle flått innsamla var identifisert som skogflått basert på morfologi. Totalt var 502 flått innsamla, der 79 % (395 av 502) var bekrefta å bli fanget ved bruk av flagging, 11.5 % (58 av 502) innsamla frå forfattarens klede, medan resten (49 av 502) av innsamla flått hadde ein ikkje-registeret innsamlingsmetode. Nærmare bestemt var dei enten fanget ved test-flagging eller frå forfattarens klede frå Solligjerdet. 20 % (101) av all flått var i vaksenstadiet (**fig.5**), der fordelinga mellom kjønn var på 56% hankjønn og 44% hokjønn. Dermed var 80% av innsamla flått nymfer, med fleire innsamla frå Snekkvika (72%) samanlikna med hos Solligjerdet (28%) (**fig.5**). Av flått innsamla frå forfattarens klede i Snekkvika, var 29 nymfer, 15 hoflått og 14 hanflått. Totalt 8.6 aktive timer med flagging var registeret, 2.6 timer i Solligjerdet og 6 timer i Snekkvika.



**Figur 5.** Diagrammet viser antal flått innsamla kategorisert etter livsstadium og studieområde. Data inkluderer flått innsamla med både flagging, frå forfattarens klede og ikkje-registeret innsamlingsmetode. Data inkluderer ikkje flått som av ulike grunnar var tapt.

## 4.2. Meteorologisk data

Gjennomsnittstemperaturen i feltperioden var 18.5°C (standardavvik 2.85°C), medan luftfuktigheita var i gjennomsnitt på 70.6% (Standardavvik 10.4 %). Luftfuktigheita varierte i gjennomsnitt mellom studieområda på 75.6 % i Snekkvika, og 64.2% i Solligjerdet. Derimot viste ein t- test med to grupper ingen signifikant forskjell i verken lufttemperaturen ( $t = -0.84$ ,  $df = 11$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ,) eller luftfuktigheit ( $t = 1.93$ ,  $df = 11$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) mellom dagane ute i felt føretatt på dei to ulike studieområda. Det var heller ingen signifikant forskjell ( $P\text{-verdi} = > 0.5$ ) mellom temperatur observert utanfor huset i studieområde- kommunen og data henta frå Yr.no.

## 4.3. pH-indikator og sanntids PCR

Det var observert ulike fargeendringar ved bruk av fargestoffet nøytral raudt som pH-indikator ved NH<sub>4</sub>OH DNA-ekstraksjon. Før inkubasjon var fargestoffet raud-rosa, medan rett etter prøvane var kokt ved DNA-ekstraksjon var dei brun-oransje. Etter eit par dagar i kjøleskapet vart dei raud-rosa igjen. Dette vil seie at pH var mellom 6.8 og 8 rett etter DNA-ekstraksjon, til pH < 6.8 etter lagring.

Ved sanntids PCR var det signifikant lågare ct-verdiar hos spiked – prøvar etter fortynning av fargestoffet ( $t = 3.4$ ,  $df = 14$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ) ved ein paret t-test (**tabell 9**) enn fargestoff utan fortynning. I tillegg nesten halverte antal spiked flått mislykka for DNA-oppformasjon etter fortynninga av fargestoffet (**Tabell 9**). Det var også ein redusert inhibisjon hos både fortynningsrekkejer generelt og fortynningsrekkejene tilsett fargestoff etter fortynninga (**tabell 9**).

**Tabell 9.** Resultat frå sanntids PCR av DNA ved bruk ammoniakmetoden og fargestoffet nøytral raudt. Test 1-2 og test 3-4= same prøver. Mislykka = mislykka for oppformasjon av DNA. Inhibisjon mellom to like fortynningsrekkje er utanom fargestoff-kontroll.  $\bar{x}$ =gjennomsnitt.

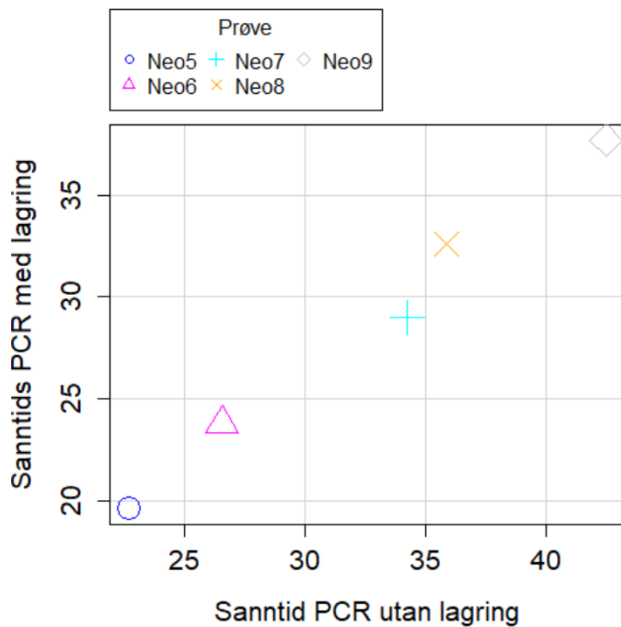
Test	Ct- verdier	Inhibisjon (forskjell i ct-verdier)	
		Forskjell mellom to fortynningsrekkjer*	Forskjell mellom Fargestoff og ingen fargestoff
Med fargestoff	$\bar{x}$ = 44.4, Median: 45, mislykka: 14 flått	$\bar{x}$ =6.75, Median: 7.35	Neo5: 27.2.
Fargestoff med 1:5 fortynning med TE buffer	$\bar{x}$ = 37.6, Median: 32.6, Mislykka: 8 flått	$\bar{x}$ = 1.1 , Median = 1	Neo7= 3.0 Neo8= 4.7.

\*Utanom prøvane i fortynningsrekkja tilsett fargestoff som kontroll

#### 4.3.1. Ammonium hydroksid som DNA-ekstraksjon metode

Etter lagring av DNA-prøvane i ei veke etter DNA-ekstraksjon utan fargestoff var det i gjennomsnitt ein signifikant lågare ct-verdi hos fortynningsrekkja ( $t= 7.72$ ,  $df= 4$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ) ved ein paret t-test, enn ved sanntids PCR rett etter DNA-ekstraksjon (**fig. 6**). Ved same test var det ingen signifikant forskjell mellom spiked prøvar før og etter lagring ( $t=1$ ,  $df=17$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ). Derimot reduserte spiked flått mislykka for oppformasjon av DNA frå 1 utan lagring til 0 etter lagring.

Hos spiked flåttprøvar var den gjennomsnittlege ct-verdien på 26.3 (median:24.7) utan lagring, medan etter lagring reduserte ct-verdien seg til eit gjennomsnitt på 24.7 (median 24.7).



**Figur 6.** Viser forskjellen i gjennomsnitt ct-verdi (X-og Y aksen) hos fortynningsrekke ved sanntids PCR same dag som DNA-ekstraksjon med NH<sub>4</sub>OH, og sanntids PCR etter lagring ei veke i kjøleskapet.

#### 4.3.2. Flått frå Asdalstranda og Langøya

Ved bruk av Fishers eksakte test var det ingen signifikant ( $p$ -verdi =  $> 0.1$ ) forskjell i prevalens av *N.mikurensis* mellom Asdalstranda og Langøya i Bamble kommune. Den totale prevalensen av bakterien i kommunen var på 15.2% (5 av 33 flått) med eit 95% konfidensintervall på 5.7% til 32.7%.

Det var ingen signifikant forskjell hos verken ct-verdiar ( $t= 3.2$ ,  $df=2$ ,  $p$ -verdi =  $> 0.05$ ) eller  $T_m$  ( $t= 3.4$ ,  $df=2$ ,  $p$ -verdi =  $> 0.05$ ) hos positive flått ved sanntids PCR utan fargestoff rett etter DNA-ekstraksjon eller etter ei veke, ved bruk av ein paret t-test. 16.7% (3 av 18) av flåtten frå Langøya var positive for *N.mikurensis*. Desse positive flåttane bestod av to hanflått og ein hoflått. I gjennomsnitt varierte ct-verdien hos positive flått mellom 22.2 til 30.9, medan  $T_m$  varierte på 72.42 °C- 72.86 °C.

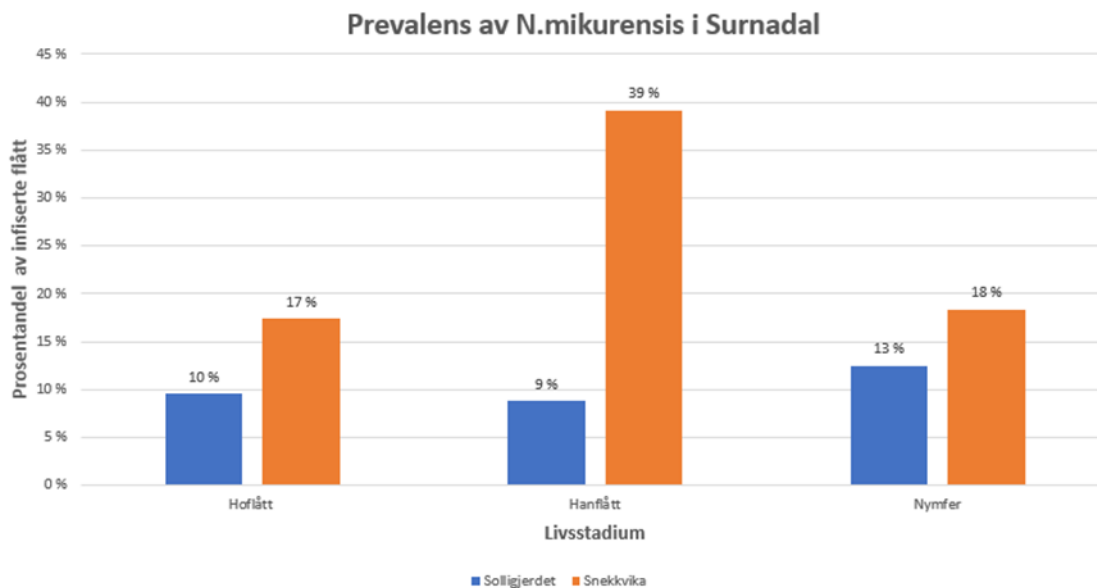
Det var heller ingen signifikant forskjell hos ct-verdiar ( $t= 0.15$ ,  $df= 1$ ,  $p\text{-verdi}= > 0.05$ ) hos positive flått ved sanntids PCR med fargestoff og fortynning av fargestoffet, ved bruk av ein paret t-test. Det var også ingen forskjell i  $T_m$  med og utan fortynning av fargestoffet hos dei positive flåttane. Totalt 13.3% (2 av 15) nymfer frå Asdalstranda var positive for *N.mikurensis*. Ct-verdiane hos dei to positive nymfene varierte frå 35-45, medan  $T_m$  var 72.7°C og 73.3°C. Den eine nymfa var negativ ved fyrste sanntids PCR, og var positiv etter fortynning av fargestoffet.

#### **4.4. Prevalens av flått-patogena i Surnadal**

##### *4.4.1. N.mikurensis*

Det var ingen signifikant forskjell i *N.mikurensis* prevalensen hos verken nymfer ved ein kji-kvadrat test ( $X^2 = 2.07$ ,  $df= 1$  og  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) eller hoflått ved Fishers eksakte test ( $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) mellom studieområda. Derimot var det signifikant fleire infiserte hanflått i Snekkvika ved bruk av sistnemnte test ( $p\text{-verdi} = < 0.05$ ) (**figur 7**).

Totalt var 16.9 % (85 av 502) av flåtten infisert med *N.mikurensis*, med eit 95% konfidensintervall på 13.8%-20.6%. Rekkjefølgja frå minst til mest prevalens etter livstadium var 13.6% hos vaksen hoflått, 16.7% hos nymfer og 21.1% i vaksen hannflått. Prevalensen av bakterien var nesten dobbelt så høg i Snekkvika (19.7%) enn i Solligjerdet (11.4%). Av flått innsamla frå forfattarens klede var 17.2 % (10 av 58) *N.mikurensis* positive.

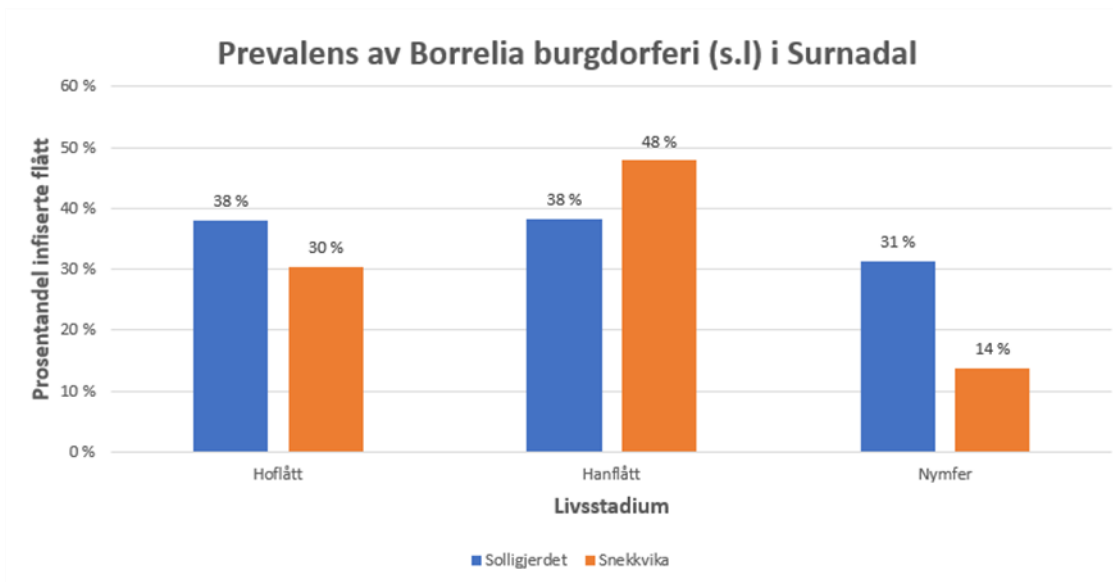


**Figur 7.** Prevalensen av positive flått for bakterien *N.mikurensis* kategorisert etter livsstadium i flått og etter studieområde.

#### 4.4.2. *B. burgdorferi* (s.l)

Ved kji-kvadrat testar var det ein signifikant forskjell i *B.burgdorferi* (s.l) infiserte nymfer ( $\chi^2= 15$ ,  $df= 1$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ), men ingen signifikant forskjell hos infiserte vaksen flått ( $\chi^2 = 0.009$ ,  $df= 1$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) mellom studieområda (**fig. 8**).

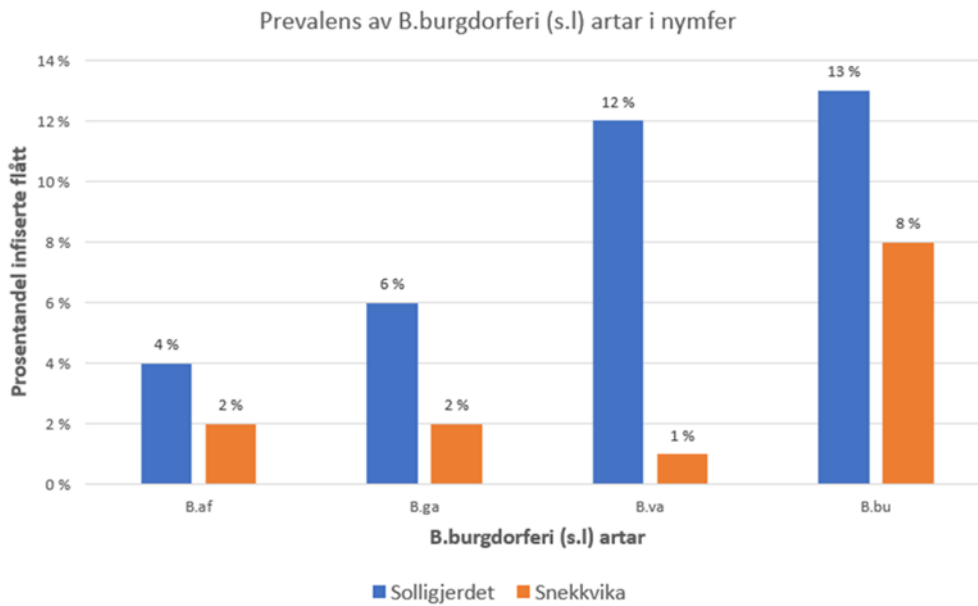
Totalt var 22.7% (114 av 502) av flåtten positive for *B.burgdorferi* (s.l.) med eit 95% konfidensintervall på 19.2%-26.7%. Prevalensen var størst hos vaksen hannflått (42.1%), deretter hoflått (34.1%) og minst hos nymfer (18.7%). Mellom studieområda var prevalensen størst i Solligjerdet med 33.5%, medan i Snekkvika var denne på 17.3%. Til tross for dette, hadde vaksen hannflått frå sistnemnte studieområde den høgaste prevalensen på 47.8% (**fig.8**). Hos flått innsamla frå forfattarens klede var prevalensen på 15.5% (9 av 58).



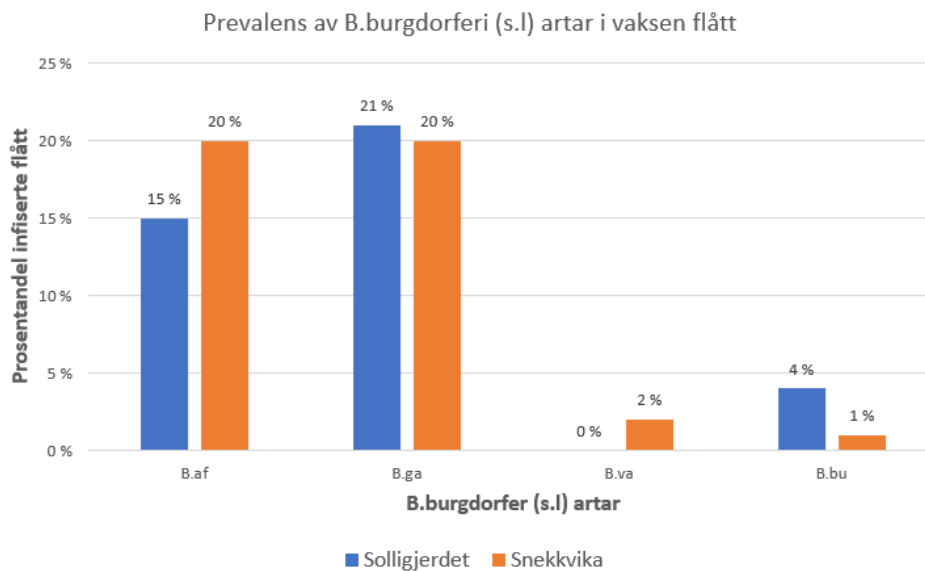
**Figur 8.** Prevalensen av *B.burgdorferi (s.l)* positive flått kategorisert etter livsstadium og studieområde i Surnadal kommune.

#### 4.4.3. Identifisering av *B.burgdorferi (s.l)* arter

Av dei *B.burgdorferi (s.l)* positive flåttane var 36.8% (42/114) identifisert som *B.burgdorferi (s.s)*, 25.4% (29/114) *B.afzelii*, 25.4% (29/114) *B.garinii* og 12.1% (14/114) *B.valaisiana*. Mellom studieområda hadde *B.burgdorferi (s.s)* berre den største prevalensen i Snekkvika med 43.1%, medan i Solligjerdet var prevalensen størst hos *B.garinii* på 32.1%. *B.valaisiana* og *B.burgdorferi (s.s)* var hovudsakeleg observert i nymfer (**fig.9**), medan *B.afzelii* og *B.garinii* hadde størst prevalens hos vaksen flått (**fig. 10**). Flått frå forfattarens klede var positive for *B.afzelii* (5 av 58) og *B.garinii* (2 av 58) og *B.valaisiana* (2 av 58).



**Figur 9.** Prevalensen av ulike artar innanfor *B.burgdorferi* (s.l) komplekset hos vaksen flått kategorisert etter studieområde, med forkortingar (*B.af* = *B.afzelii*, *B.ga* = *B.garinii*, *B.va* = *B.valaisiana* og *B.bu* = *B.burgdorferi* s.s.).



**Figur 10.** Prevalensen av ulike artar innanfor *B.burgdorferi* (s.l) komplekset hos nymfer kategorisert etter studieområde, med forkortingar (*B.af* = *B.afzelii*, *B.ga* = *B.garinii*, *B.va* = *B.valaisiana* og *B.bu* = *B.burgdorferi* s.s.).

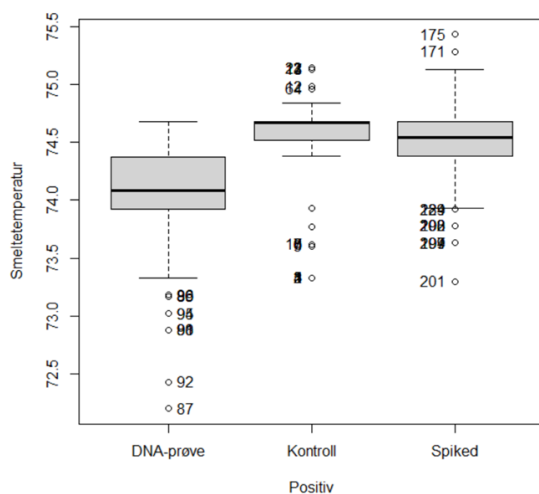


## 4.5. Smeltetemperaturar og smeltekurvar

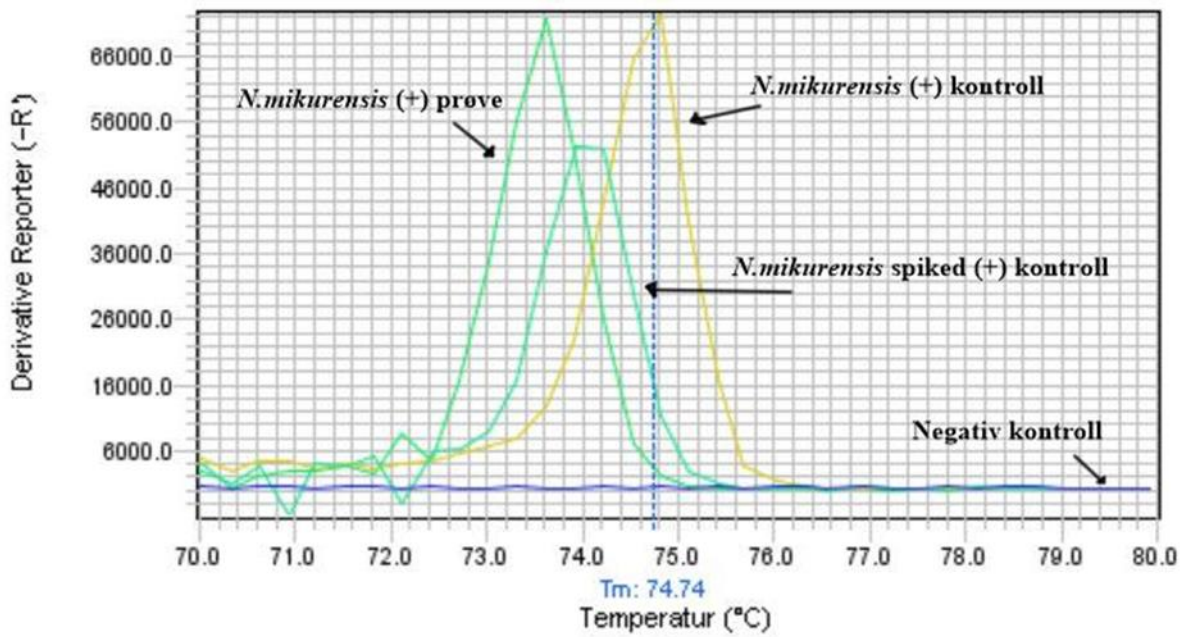
### 4.5.1. *N.mikurensis*

Ved bruk av ein t-test med to grupper var det ein signifikant forskjell i  $T_m$  mellom fortynningsrekkeja og positive flått ( $t = 6.1$ ,  $df = 168$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ). Derimot var det ingen signifikant forskjell mellom spiked prøvar og fortynningsrekkeja ( $t = -0.86$ ,  $df = 156$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) ved same test. **Figur 11** visualiserer forskjellane, medan **figur 12** viser smeltetoppene. Ved ein einvegs variasjonsanalyse var det observert 10 positive flått med ekstremverdiar samanlikna med resten av *N.mikurensis* positive flått (**figur 11**). Difor var dei positive flåttane delt inn i to grupper, prøvar 1 og prøvar 2. Prøvar 2 var for gruppa med ekstremverdiar.

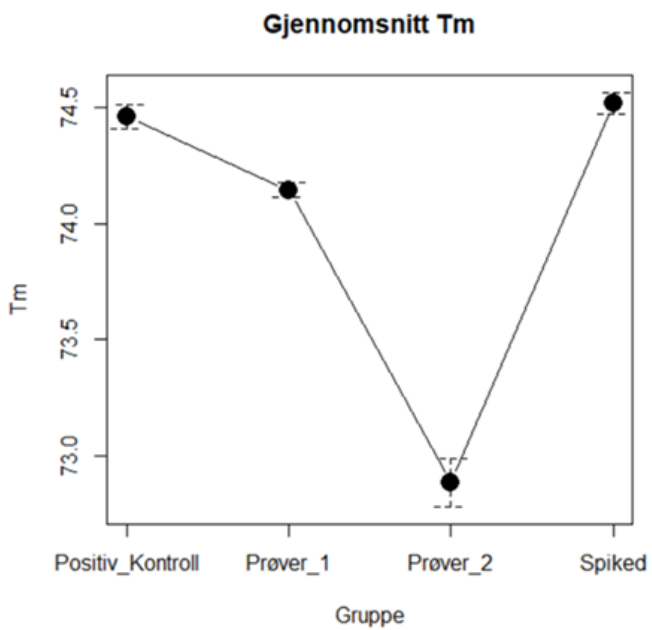
Gjennomsnittleg  $T_m$  hos dei ulike gruppene var  $74.46\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $74.51\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $74.14\text{ }^\circ\text{C}$  og  $72.88\text{ }^\circ\text{C}$  i rekkjefølgja positiv kontroll, spiked prøver, prøvar 1 og prøvar 2 (**fig.13**). Negativ kontroll hadde ein gjennomsnitt  $T_m$  på  $70.83\text{ }^\circ\text{C}$  med eit standardavvik på  $2.8\text{ }^\circ\text{C}$ . Berre to flått hadde heilt lik  $T_m$  som positiv kontroll, i tillegg var det to flåttprøvar som var utanfor både gruppe 1 og 2 av positive flått.



**Figur 11.** Variasjonen i smeltetemperatur hos *N.mikurensis* hos positiv kontroll, spiked prøver og positive ikkje-spiked prøver (DNA-prøve).



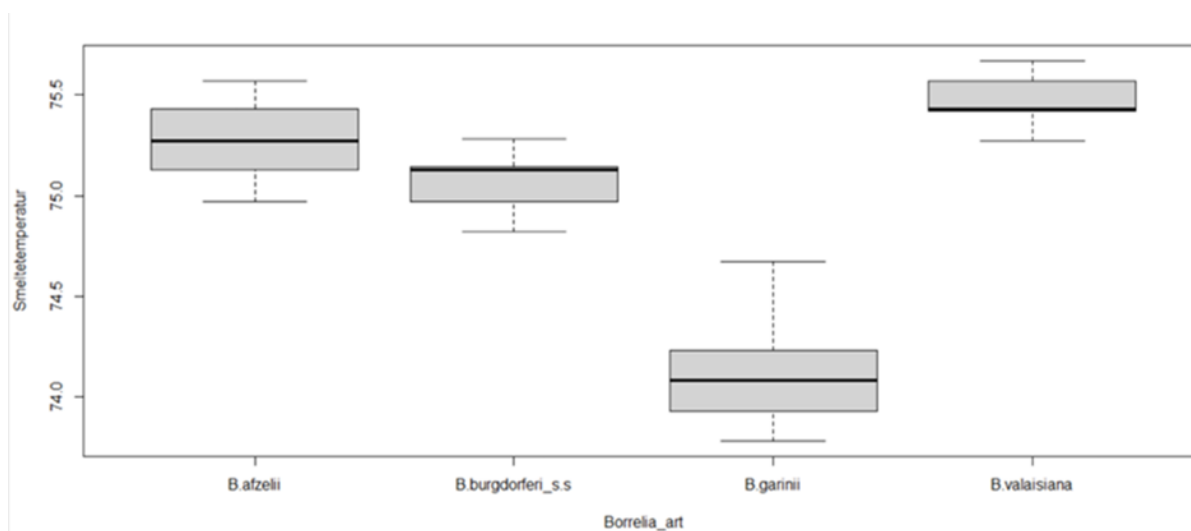
Figur 12. Smeltekurve ved *N.mikurensis* sanntids PCR. *N.mikurensis* spiked (+) kontroll er den same som den positive prøven, berre tilsetta litt av *N.mikurensis* positiv kontroll. Negativ kontroll består av DNA-fri vatn.



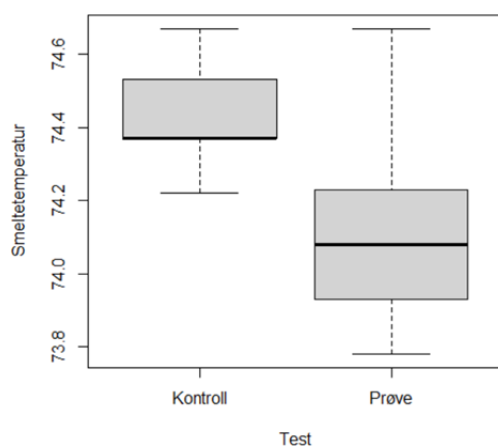
Figur 13. Forskjellen i gjennomsnitt  $T_m$  for positiv kontroll, spiked prøvar, og ikkje spiked prøvar (prøver1 og prøver2).

#### 4.5.2. *B.burgdorferi* (s.l) artar

Ved bruk av ein einvegs-variasjonsanalyse var det ein signifikant forskjell i gjennomsnitt  $T_m$  mellom alle positive flått for dei fire *B.burgdorferi* (s.l) artane ( $df= 3$ ,  $F\text{-verdi}= 299$ ,  $Pr(>F) = < 0.05$ ) (**fig. 14**). I tillegg var det ingen signifikant forskjell i  $T_m$  mellom både positiv kontroll og flått hos *B.afzelii* ( $t= 1.9$ ,  $df= 56$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ), *B.valaisiana* ( $t=1$ ,  $df=26$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) og *B.burgdorferi* (s.s) ( $t=0.4$ ,  $df=82$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) ved ein t-test med to grupper. Derimot var det ein signifikant forskjell hos *B.garinii* (**fig.15**) ved same test ( $t= 6$ ,  $df=56$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ).

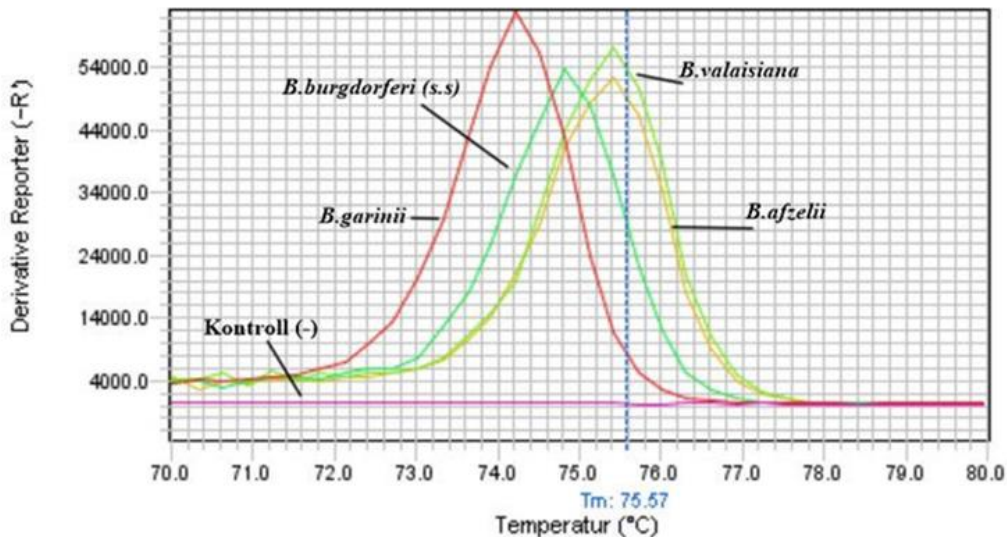


**Figur 14.** Variasjonen i smeltetemperatur hos dei ulike *B.burgdorferi* (s.l) artane, berre for positive prøver. Positiv kontroll er ikkje inkludert. Y-aksen viser  $T_m$  medan X-aksen viser *Borrelia*- art. Data for  $T_m$  er berre frå *B.burgdorferi* (s.l) sanntids PCR.



**Figur 15.** Viser forskjellen i  $T_m$  mellom kontroll og positiv prøve for *B.garinii*.

Det var ikkje mogleg å skile mellom *B.afzelii* og *B.valaisiana* positive flått berre ved bruk av *B.burgdorferi* (*s.l.*) sanntids PCR. Dette var fordi  $T_m$  hos positiv kontrollane var heilt like i 4 av 6 testar. I tillegg var smeltekurvane ganske like samanlikna med forskjellen i smeltekurvane til *B.garinii* og *B.burgdorferi* (*s.s.*) (fig. 16). Difor vart *B.afzelii* identifisert ved bruk av spesifikke primere (jf. Kapittel 3.3.4).



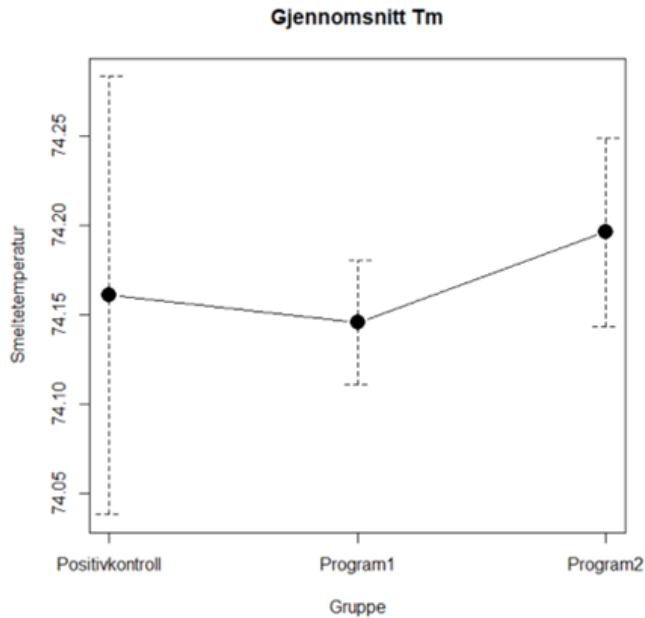
**Figur 16.** Smeltekurver ved *B.burgdorferi* (*s.l.*) sanntids PCR. Dei ulike artane er for positiv kontroll. Negativ kontroll er DNA-fri vatn.

I gjennomsnitt var  $T_m$  hos positive flått hos *B.garinii* 74.13 °C, medan kontroll var 74.40°C. Hos dei andre *B.burgdorferi* (*s.l.*) artane var  $T_m$  hos positive flått i gjennomsnitt 75.27 °C, 75.46 °C og 75.04 °C i rekkjefølgja *B.afzelii*, *B.valaisiana* og *B.burgdorferi* (*s.s.*). Negativ kontroll hadde ein gjennomsnitt  $T_m$  på 69.52 °C (standardavvik 2.4 °C).

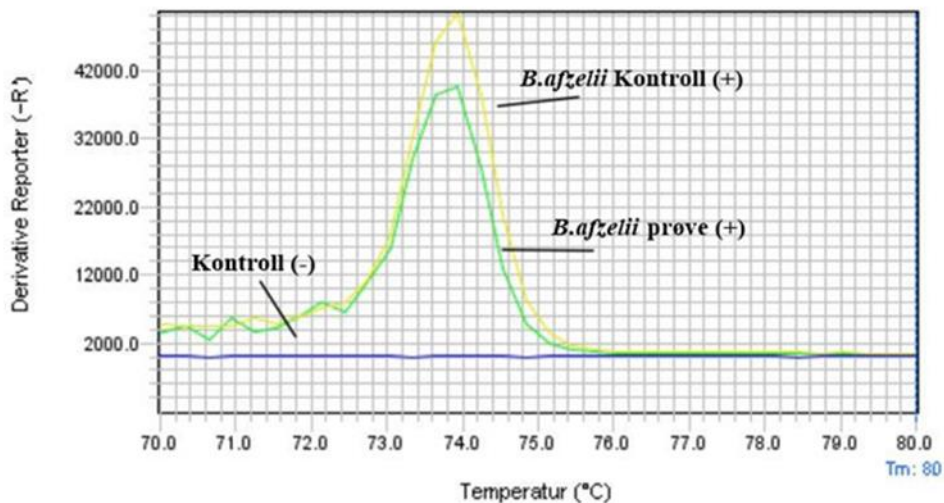
#### 4.5.3. *B. afzelii*

Det var ingen signifikant forskjell i gjennomsnitt  $T_m$  mellom prøvar med begge termiske profilane og positiv kontroll (df= 2, F-verdi= 0.18, Pr(>F) = > 0.05) ved ein einvegs variasjonsanalyse (fig.17). I tillegg var smeltekurvane for positiv kontroll og prøve ganske

lik ved termisk profil 1 (fig.18). Ved bruk av Fishers eksakte test var det ein ikkje-signifikant forskjell i *B.afzelii* positive flått som var negative ved enten termisk profil 1 eller 2 (p-verdi = > 0.05).



**Figur 17.** Variasjon i gjennomsnitt smelte temperatur hos positive flått ved to ulike termiske profiler og positiv kontroll ved *B.afzelii* sanntids PCR. Positiv kontroll er for begge termiske profila.



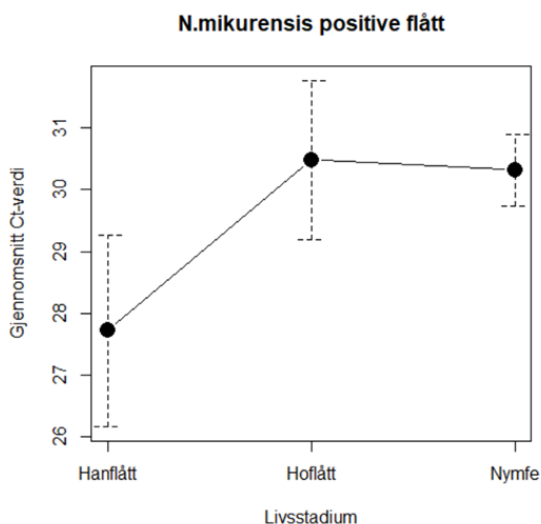
**Figur 18.** Smeltekurve frå *B.afzelii* sanntids PCR. (-) = negativ, (+) = positiv kontroll. For negativ kontroll var DNA-fri vatn brukt. Resultatet er for termisk profil 1.

*B.afzelii* positive flått var negative ved termisk profil 1 5% av gongane (2 av 37), medan dei var negative 11% av gongane ved termisk profil 2 (2 av 18). Tm var i gjennomsnitt ved program 1, program 2 og positiv kontroll i den rekkjefølga 74.14 °C, 74.19 °C og 74.16°C. Tm hos negativ kontroll var i gjennomsnitt på 75.48 °C (standardavvik= 2.9 °C) ved profil 1 og 63.72 °C (standardavvik = 2.9°C) ved profil 2.

## 4.6. Ct-verdiar

### 4.6.1. *N.mikurensis*

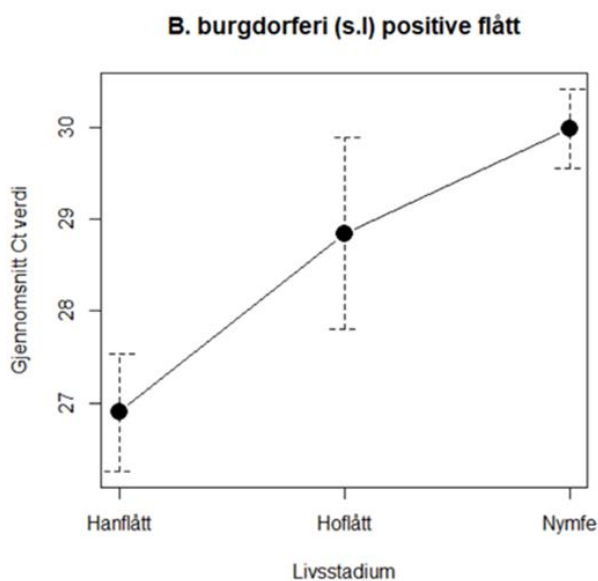
Ved bruk av ein einvegs variansanalyse var det ingen signifikant forskjell i gjennomsnitt mengde genetisk materiale basert på ct-verdi mellom livsstadia og kjønn ( $Pr(>F) = > 0.05$ , F-verdi = 1.4, Df = 2) (fig. 19). Derimot var det ein signifikant høgare mengde genetisk materiale hos spiked prøvar enn ikkje-spiked ved ein t-test med to grupper ( $t= 12.5$ ,  $df= 156$ ,  $p\text{-verdi} = < 0.05$ ). I gjennomsnitt var ct-verdien på 30 (standardavvik:4.8) hos ikkje-spiked prøvar, medan den var på 22.5 (standardavvik: 1.9) hos spiked prøvar.



**Figur 19.** Gjennomsnitt ct-verdi kategorisert etter livsstadium og kjønn hos *N.mikurensis* positive flått.

#### 4.6.2. *B.burgdorferi* (s.l)

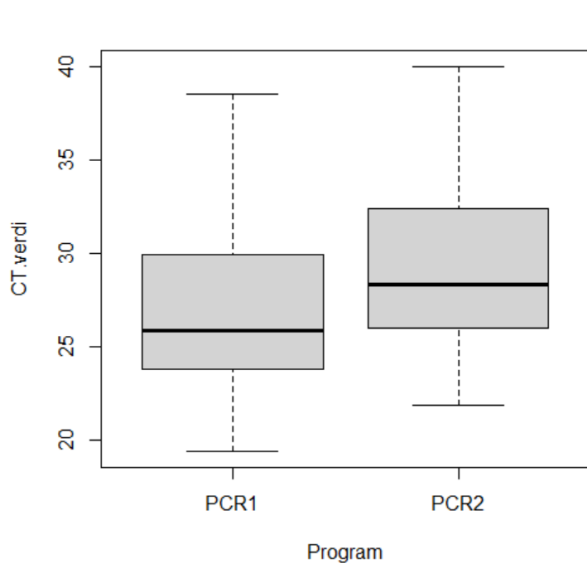
Ved bruk av ein einvegs variansanalyse var det ein signifikant forskjell i mengde genetisk materiale hos minst ein av livsstadia hos *B. burgdorferi* (s.l.) positive flått (  $Pr (> F) = < 0.05$ , F- verdi = 6.56, Df = 2) (**fig. 20**). Ved bruk av t-test med to grupper, var det hanflått som hadde i gjennomsnitt ein signifikant høgare mengde genetisk materiale enn dei to andre gruppene (  $t = - 3.4$ , df = 112, p-verdi =  $< 0.05$ ). Det var dermed ingen signifikant forskjell mellom hoflått og nymfer (  $t = -1$ , df = 88, p-verdi =  $> 0.05$ ) ved same test. I gjennomsnitt hadde ein positiv prøve for *B.burgdorferi* (s.l) ein ct-verdi på 29.2 (standardavvik:3.8).



**Figur 20.** viser forskjellen i gjennomsnitt ct-verdi kategorisert etter livsstadium og kjønn hos *B.burgdorferi* (s.l) positive flått.

### 4.6.3. *B.afzelii*

Det var ingen signifikant forskjell i ct-verdiar mellom dei to ulike termiske profil programma ( $t = -1.7$ ,  $df = 45$ ,  $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) ved ein t-test med to grupper (**fig.21**). Likevel hadde flått positive ved termisk profil 1 ein gjennomsnittsverdi lågare på 27.3 ct-verdi (standardavvik 4.4) samanlikna med termisk profil 2 med ein ct-verdi i gjennomsnitt på 29.7 (Standardavvik: 3.6).



**Figur 21.** Variasjonen i ct-verdi hos *B.afzelii* positive flått ved termisk profil 1 (PCR1) og termisk profil 2 (PCR2).

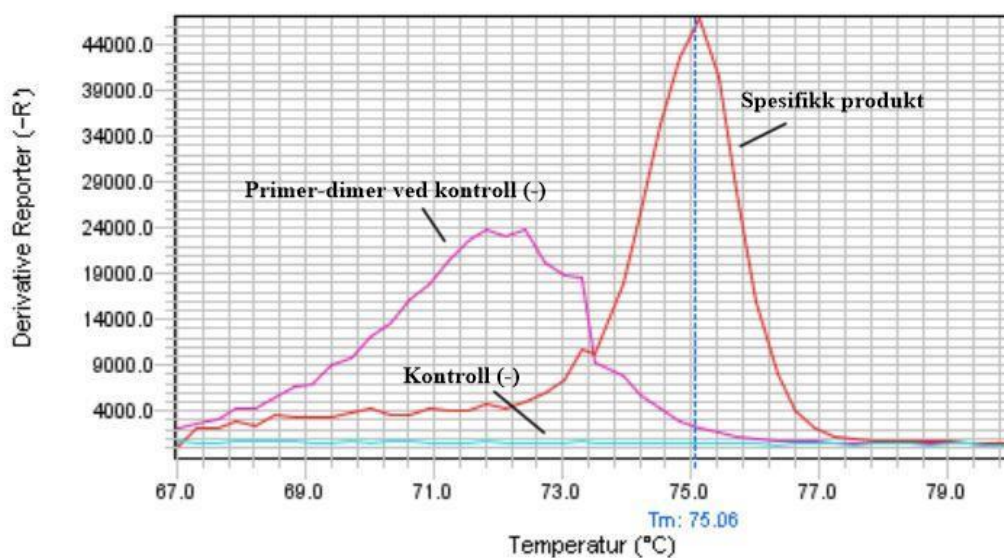
## 4.7. DNA oppformasjon av uspesifikke produkt

Fleire smeltekurve-analysar var utført for å fastslå oppformasjon av DNA frå uspesifikke produkt. Uspesifikke produkt var observert ved både *B.burgdorferi* (s.l) og *B.afzelii* sanntids PCR, men ikkje ved *N.mikurensis* sanntids PCR.



#### 4.7.1. *B.burgdorferi* (s.l)

42% (211 av 502) av flåtten hadde uspesifikk oppformasjon av DNA ved *B.burgdorferi* (s.l) sanntids PCR. Av desse såg 56% til å vere primer-dimer og 44% av andre ukjente årsaker. Gjennomsnitt Ct-verdi hos flått med primer-dimer var 36.8. Medan oppformasjon av uspesifikke produkt av ukjente årsaka hadde ein gjennomsnitt ct-verdi på 40.9. Hos negativ kontroll var det oppformasjon av primer-dimer i 45 % (5 av 11) av tilfella (**fig. 22**). Primer-dimer ved negativ kontroll hadde ein gjennomsnitt Tm på 71.40°C med eit standardavvik på 0.68°C.



**Figur 22.** Smeltekurver for negativ kontroll med og utan primer-dimer, og for det spesifikke produktet. I dette tilfellet er det spesifikke produktet *B.burgdorferi* (s.s) positiv kontroll.

#### 4.7.2. *B.afzelii*

Det var ingen signifikant forskjell i oppformasjon av DNA hos verken *B.valaisiana* (p-verdi = > 0.05) eller *B.burgdorferi* (s.s) (p-verdi = > 0.05) mellom dei ulike termiske profilane ved Fishers eksakte test. Det var til saman oppformasjon av DNA i 28.2% (24 av 85) av *B.burgdorferi* (s.l) artar ikkje identifisert som *B.afzelii* (**Tabell 10**). Dette vil seie at dei var

positive ved *B.afzelii* sanntids PCR ved en av tre testar. *B.garinii* positiv kontroll hadde oppformasjon av DNA ved ein test.

**Tabell 10.** Oppformasjon av DNA hos *B.burgdorferi* (s.l) flått ikkje identifisert som *B.afzelii*.

Termisk profil	<i>B.valaisiana</i>	<i>B.burgdorferi</i> (s.s)	<i>B.garinii</i>
Termisk profil 1	6/14 (43%)	12/42 (28.5%)	0/29 (0%)
Termisk profil 2	2/9 (22%)	4/18 (22%)	0/29 (0%)

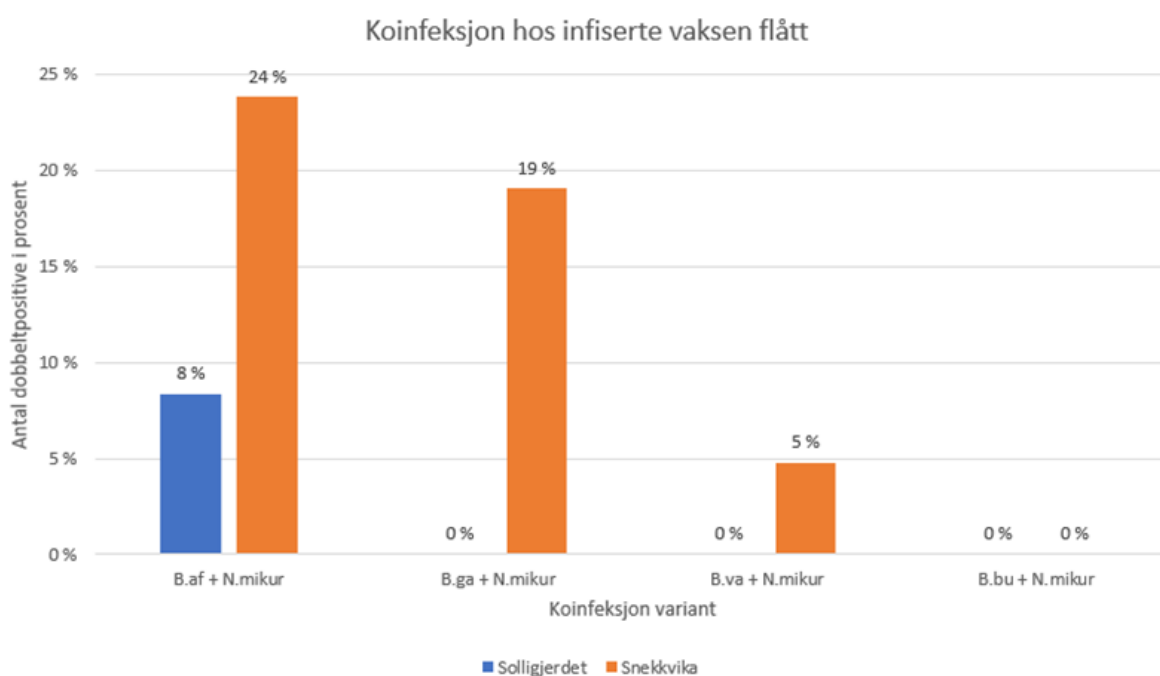
## 4.8. Koinfeksjon

Det var ingen signifikant forskjell i dobbeltpositive flått mellom studieområda ( $\chi^2= 0.02$ ,  $df=1$ ,  $p\text{-verdi} > 0.05$ ) ved ein Kji-kvadrattest. Ved same test var det signifikant ( $P < 0.05$ ) fleire dobbeltpositive av *N.mikurensis* og *B.burgdorferi* (s.l) enn forventa (**Kapittel 9.3, fig. 1**). I tillegg var det signifikant fleire vaksen flått (13%) enn nymfer (4%) som hadde ein koinfeksjon ( $\chi^2= 7.9$ ,  $df= 1$ ,  $p\text{-verdi} < 0.05$ ).

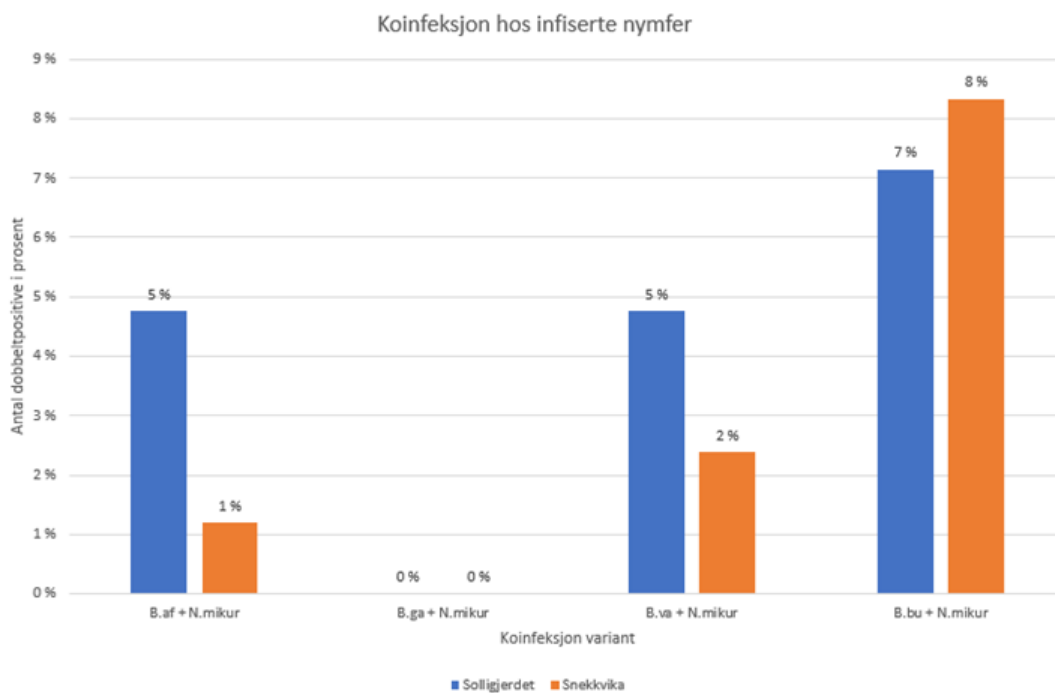
Totalt 6 % (28 av 502) av alle flåttane var dobbeltpositive for *B.burgdorferi* (s.l) og *N.mikurensis*, med eit 95% konfidensintervall mellom 3.8% til 8.1%. Av alle positive flått for minst eit patogen var 14% (28 av 199) positive for begge patogen-gruppene. Flått fanget frå forfattarens klede hadde ein prevalens på 5% av *N.mikurensis* og *B.burgdorferi* (s.l) (3 av 58) koinfeksjon.

#### 4.8.1. *B.burgdorferi* (s.l) artar og *N.mikurensis* koinfeksjon

Koinfeksjon var observert hos alle fire *B.burgdorferi* (s.l) artane med *N.mikurensis*. Det var derimot berre ein signifikant høgare koinfeksjon enn forventa mellom *B.afzelii* og *N.mikurensis* ( $p < 0.05$ ) (kapittel 9.3, **fig. 2 til 5**). Fordelinga av koinfeksjon etter borrelia-art med *N.mikurensis* var 5%, 5%, 2% og 2% i rekkefølga *B.afzelii*, *B.burgdorferi* (s.s), *B.garinii* og *B.valaisiana*. *B.afzelii* og *B.garinii* infiserte med *N.mikurensis* var meir en trend hos vaksen flått (**fig. 23**), medan *B.valaisiana* og *B.burgdorferi* (s.s.) dobbeltpositive med same bakterie var hovudsakleg funnet hos nymfer (**fig.24**).



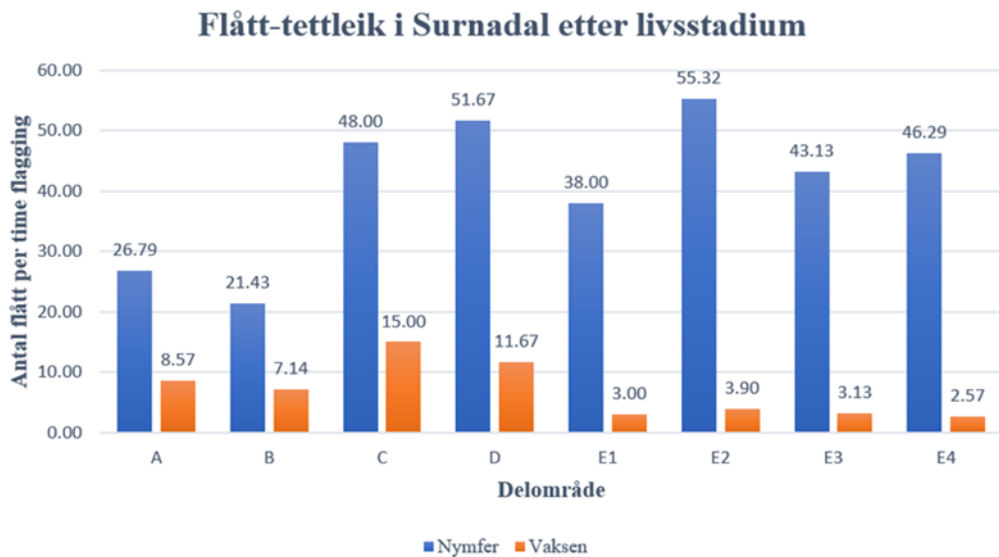
**Figur 23.** Prevalensen av koinfeksjon av *N.mikurensis* (*N.mikur*) og ulike artar innanfor *B.burgdorferi* (s.l) komplekset (*B.af* = *B.afzelii*, *B.ga* = *B.garinii*, *B.va* = *B.valaisiana* og *B.bu* = *B. burgdorferi* s.s) i vaksen flått.



**Figur 24.** Prevalensen av koinfeksjon av *N.mikurensis* (*N.mikur*) og ulike artar innanfor *B.burgdorferi* (*s.l*) komplekset (*B.af* = *B.afzelii*, *B.ga* = *B.garinii*, *B.va* = *B.valaisiana* og *B.bu* = *B. burgdorferi s.s*) i nymfer.

## 4.9. Flått-tettleik

Ein t-test med to grupper viste ingen signifikant ( $p\text{-verdi} = > 0.05$ ) forskjell i den totale flått-tettleik ved dei åtte ulike delområda mellom studieområda. Ved bruk av same test, var det derimot ein signifikant høgare ( $p\text{-verdi} \leq 0.05$ ) flått-tettleik hos vaksen flått i Solligjerdet enn Snekkvika (**fig.25**). Ved bruk av ein t – test med ein gruppe, var det også ein signifikant forskjell i flått-tettleiken både mellom dei ulike delområda i Solligjerdet ( $p\text{-verdi} < 0.05$ ,  $df = 3$ ,  $t = 5.3$ ) og i Snekkvika ( $p\text{-verdi} < 0.01$ ,  $df = 3$ ,  $t = 12.7$ ).

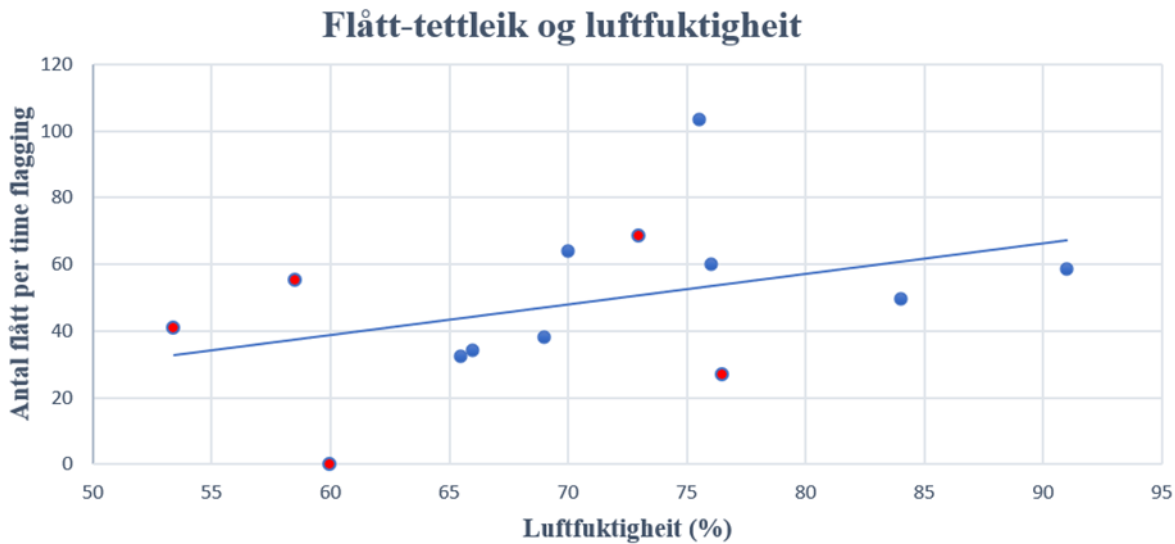


**Figur 25.** Flått-tettleiken variasjon mellom delområda etter livsstadium. Delområde A-D= Solligjerdet, E1-E4= Snekkvika.

Flått-tettleiken totalt var på 46.5 flått per time flagging, med ein variasjon på 43.6/time i Solligjerdet og 47.8/time i Snekkvika. Etter livsstadium var det i gjennomsnitt flagget 41.4 nymfer i timen, og 5.1 vaksen flått/timen. Standardavviket mellom delområda i Solligjerdet var på 18.9, og 7.6 i Snekkvika. Totalt var 33.98 nymfer/timen i Solligjerdet og 44.6 nymfer/timen i Snekkvika. Flått-tettleik frå forfattarens klede var på 9.6 flått per time ute i felt.

#### 4.9.1. Luftfuktigheit og temperatur

Det var ein ikkje- signifikant positiv korrelasjon mellom flått-tettleik og luftfuktigheit ( $t=1.38$ ,  $df=11$ ,  $p > 0.05$ ,  $cor = 0.38$ ) ved bruk av ein Pearsons korrelasjonskoeffisient (**fig. 26**). Det var heller ingen signifikant korrelasjon mellom flått-tettleik og temperatur ( $t=0.27$ ,  $df=11$ ,  $p > 0.05$ ,  $cor: 0.082$ ) ved same test.



**Figur 26.** Viser ein ikkje-signifikant korrelasjon med bruk av mellom flått-tettleik og luftfuktigheit. Rød = feltdaga i Solligjerdet, Blå= feltdaga i Snekkvika.

## 5. Diskusjon

### 5.1. Flåttinnsamling

Meir enn dobbelt så mange nymfer var innsamla i Snekkvika enn i Solligjerdet. Sannsynlegvis var dette fordi det var føretatt 2.3 gongar fleire timar med aktiv flagging i Snekkvika enn Solligjerdet. Fyrstnemnte område var prioritert etter kvart i feltperioda sidan Solligjerdet hadde generelt fleire insekter, bratt terreng og tok lenger tid før vegetasjonen tørka. Når det kjem til innsamla flått fordelt etter livsstadium, var det hovudsakleg nymfer, og deretter vaksen flått som var innsamla. Dette samsvarar med fleire tidlegare studiar (Tack et al., 2011; Dantas-Torres et al., 2013).

### 5.2. Variasjon i genetisk materiale ved NH<sub>4</sub>OH-metoden

Det var ein signifikant høgare mengde genetisk materiale av *B.burgdorferi (s.l)* hos hanflått enn både nymfer og hoflått. I tillegg var det ingen signifikant forskjell i genetisk materiale mellom livsstadia hos *N.mikurensis* positive flått. Dette resultatet er delvis motstridande samanlikna med studien av Ammazalorso et al., (2015). Studien observerte at NH<sub>4</sub>OH-metoden for DNA-ekstraksjon fungerte dårleg hos nymfer gjennom låg oppformasjon av DNA (Ammazzalorso et al., 2015). Derimot var studien av Ammazalorso et al., (2015) gjort på *Ixodes scapularis* flått, og ikkje skogflått. Ein forklaring på at mengda av genetisk materiale varierte hos *B.burgdorferi (s.l)* positive flått kan vere slik som av Herrmann og Gern (2010). Herrmann og Gern (2010) fann at smittmengda av *B.burgdorferi (s.l)* hos vaksen flått var generelt høgare enn hos nymfer. Ein liknande studie av Okeyo et al., (2019) observerte at kommersielle DNA- ekstraksjon Kits fungerte betre, men forskjellen var berre på 3 ct-verdiar ved kvantitativ PCR.

### 5.2.1. Nøytral raudt som pH-indikator

Fargestoffet nøytral raudt som var brukt for å undersøkje om mesteparten av  $\text{NH}_4\text{OH}$  fordampa eller ikkje etter DNA-ekstraksjon, fungerte bra til dette. Til dømes var pH-verdien  $< 6.8$  hos DNA-prøvane etter lagring, som kan tyde på at mesteparten av  $\text{NH}_4\text{OH}$  fordampa. Dette er basert på at sterilt vatn har ein pH på omkring 7 (Thermo-Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Derimot førte fargestoffet til ein inhibisjon ved sanntids PCR. Dette skjedde sjølv etter ein fortynning av fargestoffet. Difor vart ikkje fargestoffet brukt vidare i studien etter desse testane. Dei fire ulike testane viste dermed at sanntids PCR gav best resultat utan fargestoff, og etter omkring ei veke med lagring. Denne lagringa gjorde at restande av  $\text{NH}_4\text{OH}$  fordampa hos DNA-prøvane frå DNA-ekstraksjonen, før utføring av sanntids PCR.

### 5.3. *N. mikurensis* prevalens

Prevalensen av *N. mikurensis* observert i denne studien varierte mellom 11.4% til 19.7% på ulike studieområda og ved forskjellige innsamlingsmetodar. Prevalensen av bakterien var drastisk høgare enn observert tidlegare av både Jenkins et al., (2019) og Pedersen et al., (2019) i regionen. Jenkins et al., (2019) observerte at prevalensen av bakterien varierte frå 0-16% langs kysten i Noreg, med vestlandet som eit låg-prevalens område. Til dømes fann Pedersen et al., (2019) at 3.3% av vaksne flått innsamla i Kanestraum i Møre og Romsdal var infisert av bakterien (Pedersen et al., 2019). Medan i denne studien, der studieområde låg omkring 32 km frå Kanestraum (Google maps, u.å.), var prevalensen på 17.8% hos vaksen flått. Dette er samanliknbar med dei høge prevelansane funnet i Austerrike på 19.2-23.5% (Derdáková et al., 2014), og 24.2-26.6% i Tyskland (Silaghi et al., 2012). Silaghi et al., (2012) innsamla flått frå forskjellige friluftslivområda,



medan Derdáková et al., (2014) fann den høgaste prevalens i flått innsamla frå skog av bøk (*Fagus*) og edelgran (*Abies*).

### 5.3.1. Moglege forklaringar på høg prevalens

Med tanke på at det var ein relativ stor forskjell i prevalensen av bakterien på ein avstand på mindre enn 5 km i denne studien, er det ikkje alt for overraskande av forskjellen mellom Kanestraum (Pedersen et al., 2019) og Surnadal kommune. Derimot er det ulike hypotesar på forskjellen i prevalensen. Til dømes observerte Derdáková et al., (2014) at *N.mikurensis* infeksjon hos flått var positiv assosiert med *Anaplasma phagocytophilum* infiserte flått i Austerrike. Det hadde difor vore interessant for framtidige studiar, å samanlikne *A. phagocytophilum* prevalensen med områda med høg og låg *N.mikurensis* prevalens i Noreg. Det kan hende at dette kan vere ein faktor for den høge prevalensen observert i denne studien. I Møre og Romsdal var det relativt nyleg observert at prevalensen av *A. phagocytophilum* varierer frå 5-17.6% i ulike livsstadia av flått innsamla ved flagging (Stigum et al., 2019). Til samanlikning fann Derdáková et al., (2014) ein total prevalens mellom 0-11.5% i områda med høg *N.mikurensis* infeksjon. Ein annan hypotese er at gnagarsamansetninga kan vere annleis mellom dei to områda i fylket, basert på at prevalensen av *N.mikurensis* vaierar mellom ulike artar av gnagarar (Obiegala et al., 2014), og at bakterien brukar gnagarar som hovudvert (Obiegala et al., 2014).

### 5.3.2. Forskjell i prevalens mellom Surnadal og Bamble kommune

Det var minimale forskjellar i den totale prevalensen mellom kommunane Surnadal og Bamble. Dette er basert på at totalt 15% (5/33) var positive frå Bamble, medan 16.9% (85/502) var positive frå Surnadal. Derimot sidan det var ein del færre flått testa frå Bamble kommune, hadde 95% konfidensintervall ein større variasjon i øvre og nedre

grensar. Medan Surnadal kommune hadde ein nedre grense på 13.8% var den nedre grensa i Bamble på 5.7%. Derimot hadde Bamble ein høgare øvre grense på 32.7% enn Surnadal på 20.6%. Det hadde difor vore interessant for framtidige studiar å teste fleire flått frå Bamble kommune for å finne ut om prevalensen er meir på den øvre eller nedre grensa.

#### **5.4. *B. burgdorferi (s.l)* prevalens**

Prevalensen av *B.burgdorferi (s.l)* både ved ulike innsamlingsmetoda og studieområda varierte mellom 15.5% - 33.5% i kommunen. Dei høgaste prevalensane er samanliknbar med slik som observert av Kjelland et al., (2010) på 22.1%-31.3% i skogområda i Sør-Noreg. Medan dei lågaste prevalensane samsvarar med funnet av Tveten., (2013) i Møre og Romsdal, med ein infeksjonsrate på 14.3% til 18.7% over ein periode på 3 år. Sidan Tveten., (2013) observerte at prevalensen av bakterie-komplekset varierte frå år til år, er det vanskeleg å seie om prevalensen funnet sommaren 2022 er høgare eller lågare enn andre år. Derimot det 95% konfidensintervall på 19.2%-26.7% av den totale prevalensen kan gi ein antyding.

##### **5.4.1. Rekkjefølgje av prevalens hos *B.burgdorferi (s.l)* artar**

I rekkjefølgja frå minst til mest prevalens av *B.burgdorferi (s.l)* artane var *B.burgdorferi (s.s)* mest prevalent (36.8%), deretter lik prevalens av *B.afzelii* og *B.garinii* (25.4%), og minst hos *B.valaisiana* (12.1%). Dette er hovudsakleg den same rekkjefølgja som observert i andre tidlegare studiar (Kjelland et al.,2010; Tveten., 2013). Forskjellen er at hos mange andre studiar er *B.afzelii* den mest prevalente *B.burgdorferi (s.l)* arten (Tveten., 2013; Răileanu et al., 2021; Saber., 2022). I tillegg til at *B.burgdorferi (s.s)* prevalensen er ofte relativ låg (Kjelland et al., 2010; Tveten., 2013). Til dømes fann

Tveten., (2013) ein infeksjonsrate på 0.3%-0.7% i same fylke, medan Kjelland et al., (2010) observerte at 10% av *B.burgdorferi (s.l)* positive var *B.burgdorferi (s.s)*. Unntak er studiar slik som av Răileanu et al., (2021) i Tyskland som fann at *B.burgdorferi (s.s.)* var den nest mest prevalente.

#### 5.4.2. Prevalens etter livsstadium

Fleire vaksen flått (39%) enn nymfer (18.7%) var infisert med bakterie-komplekset *B.burgdorferi (s.l)*, som tidlegare også observert av Herrmann og Gern (2010). *B.afzelii* hadde ein større variasjon mellom livsstadia enn tidlegare observert av Saber (2022). Saber (2022) fann at 15 % av vaksen flått og 11.4 % av nymfer var infisert av bakterie-arten. Medan i denne studien var fordelinga på 2-4% hos nymfer og 15-20% hos vaksen flått mellom studieområda. *B.garinii* var hovudsakleg observert også hos vaksen flått, noko som samsvarer med andre studiar (Herrmann og Gern., 2010; Kjelland et al., 2010). *B.valaisiana* og *B.burgdorferi infeksjon (s.s)* var hovudsakleg sett hos nymfer, dette er motsett enn observert tidlegare i Noreg, der vanlegvis vaksen flått har størst infeksjonsrate hos desse borrelia-artane (Kjelland et al., 2010; Tveten., 2013).

### 5.5. Variasjon i patogen prevalens etter studieområde

Medan *B. burgdorferi (s.l)* dominerte hos flått frå Solligjerdet, dominerte *N.mikurensis* i Snekkvika. Ein mogleg forklaring på dette kan vere ulike vertar som oppheld seg på dei to studieområda (Mysterud et al., 2016). Til dømes kan ein høg hjort-tettleik føre til ein høgare tettleik av nymfer infisert med *B. burgdorferi (s.l)* (Gandy et al., 2021), men også ein lågare prevalens av bakterie-komplekset sannsynlegvis på grunn av fortynningseffekten (Mysterud et al., 2016; Gandy et al., 2021). Det var signifikant fleire *B.burgdorferi (s.l)* infiserte nymfer i Solligjerdet, men ingen signifikant forskjell i

prevalensen hos vaksen flått mellom studieområda. Basert på dette kan det hende hjorten i kommunen opphelder seg meir i Solligjerdet enn Snekkvika. Ein annan faktor som støtter denne hypotesen er at Gandy et al., (2021) observerte at ein høg hjortetettleik førte til færre gnagarar og lågare vegetasjon. Basert på at *N.mikurensis* er assosiert med gnagarar (Obiegala et al., 2014), kan det hende færre hjort opphelder seg i Snekkvika. *N.mikurensis* har vore funnet i flått innsamla frå hjort, men prevalensen var tilnærma lik flått innsamla frå vegetasjonen (Jahfari et al., 2012). Derimot, sidan det ikkje var gjort forsøk på hjorteferdsel i denne studien kan ein ikkje kome med ein konklusjon.

## 5.6. Flått innsamla frå forfattarens klede

Halvparten av all flått innsamla frå forfattarens klede var flått i vaksenstadiet, medan berre 14% av flått innsamla ved flagging i Snekkvika var i vaksenstadiet. Forklaringa på dette kan vere at vaksen flått generelt setter seg på vertar som er større i kroppsmasse enn vertane til nymfer og larver (Mysterud, Hügli og Viljugrein., 2021). Handduken var hovudsakleg lågt nede i vegetasjonen. Dette kan ha moglegvis simulert mindre vertsdyr blant annet sidan fleire nymfer enn vaksne var innsamla ved flagging. Det kan også ha vore ein delvis observasjons-feilkjelde, mange av nymfene som satt seg på kleda kunne ha falt av før dei blei innsamla.

Flått innsamla frå forfattarens klede hadde den lågaste prevalensen av *B.burgdorferi* (s.l), medan dei hadde den nest høgaste prevalensen for *N.mikurensis*. Derimot kom desse flåttane berre frå Snekkvika, der prevalensen av *B.burgdorferi* (s.l) var relativt låg og høg *N.mikurensis* prevalens. Ein liknande studie føretatt av Faulde og Robiins (2008) i Tyskland fann at signifikant fleire hoflått innsamla frå menneskjer enn innsamla ved metoden 'dragging' var infisert med borrelia-bakteriar. Alle testpersonane i studien hadde

heildekkande kledning, slik som i denne studien. Denne trenden var derimot ikkje observert i denne studien, da raten av infiserte vaksen hoflått var 2.5 gongar større hos vaksen hoflått innsamla med flagging i Snekkvika enn frå kleda. Ein må derimot teke omsyn til at både denne studien og den av Faulde og Robbins (2008) hadde relativt få vaksen flått.

## 5.7. sanntids PCR

### 5.7.1. *B.burgdorferi* (s.l)

*B.valaisiana* og *B.afzelii* var vanskeleg å identifisere berre ved bruk av den generelle *B.burgdorferi* (s.l) sanntids PCR, basert på ganske like smeltekurver og Tm. Ein forklaring på dette kan vere slik som observert av Jenkins et al., (2012), at *FlaB* sanntids PCR kan potensielt ha ein redusert sensitivitet hos *B. valaisiana*. Eit annet problem var at verken borr 8 og Borr 9 i *B.burgdorferi* fortynningsrekkja fungerte slik som forventa. Ein grunn til dette kan vere at fortynningsrekkja var litt gammal. Blant anna kan lagring over tid føre til degradering av DNA gjennom depurinering og hyppige tilfella av frysing og smelting (Rossmann et al., 2010). Derimot kunne ein differensiere mellom ulike *B.burgdorferi* (s.l) artar gjennom samanlikning av både *B.burgdorferi* (s.l) og *B.afzelii* sanntids PCR.

*B.burgdorferi* (s.l) sanntids PCR førte til ein del primer-dimer oppformasjon. Dermed, i framtidige eksperiment kan ein eventuelt bruke Taq (*Thermus aquaticus*)- DNA polymerase og prober (Holland et al., 1991) i staden for SYBR-green. Fordelen er at dei er meir spesifikke enn SYBR-green, noko som gjer at ein unngår oppformasjon av til dømes primer-dimers (Houghton og Cockerill, 2006). Metoden er derimot meir økonomisk dyrt enn SYBR-green (Houghton og Cockerill, 2006).

### 5.7.2. *B. afzelii* spesifikk sanntids PCR

Til tross for at det var ingen signifikant forskjell mellom dei to termiske profilane ved *B.afzelii* spesifikk sanntids PCR, var termisk profil 1 meir sensitiv. Dette var med i gjennomsnitt 2.4 ct-verdiar lågare enn termisk profil 2 og færre tilfella der *B.afzelii* positive flått var negative. Ein må dermed teke omsyn til at ikkje alle *B.burgdorferi* (*s.l*) positive flått var testa med termisk profil 2, men alle ved termisk profil 1. Ein ulempe med *B.afzelii* sanntids PCR derimot var oppformasjon av DNA frå nesten kvar fjerde *B.burgdorferi* (*s.l*) bakterie ikkje identifisert som *B.afzelii*. Derimot var ikkje det dobbeltsjekka at *B.valaisiana* DNA oppformerte ved *B.afzelii* sanntids PCR eller ikkje. Dette var fordi DNA frå flått bekrefta til å vere *B.valaisiana* var ikkje tilgjengeleg, sidan desse var brukt opp ved *B.burgdorferi* (*s.l.*) sanntids PCR. Difor var berre flått mistenkt til å vere *B.valaisiana* positive, brukt som kontroll.

Ein liknande studie som testa ein anna *B.afzelii* spesifikk PCR med andre primere var Saber (2022). Saber (2022) prøvde ut fleire ulike temperaturar, og fann at ein hybridiseringstemperatur på 65 °C gav 0% falske positive. Studien fann også at *B.afzelii* positive hadde ein T<sub>m</sub> på 74 °C, berre 0.14-0.19 °C lågare enn i denne studien. I framtidige studiar kan ein eventuelt eksperimentere på ulike primer konsentrasjonar, sidan primer konsentrasjonen kan påverke presentasjonen til sanntids PCR testane (Mikeska og Dobrovic, 2009). I tillegg hadde det vore interessant å prøve ut primerane med metoden av Saber (2022).

### 5.7.3. *N.mikurensis*

Det var for det meste ingen problema ved *N.mikurensis* sanntids PCR. Derimot var det to positive flått for *N.mikurensis* som hadde ein relativ låg T<sub>m</sub> samanlikna med resten av

positive flått. Til tross for dette var dei forsett innanfor rekkjevidda 71.7 °C – 75 °C akseptert av Jenkins et al., (2019). I tillegg var det berre to flått som hadde heilt lik Tm som positiv kontroll. Dermed basert på at det var ein signifikant forskjell mellom *N.mikurensis* ved positiv kontroll og hos positive flått kan det hende at flåtten frå Surnadal var infisert av ein annan *N.mikurensis* variant enn kontrollen.

I seinare tid har andre neoehrlichia-bakteriar vore identifisert slik som *Candidatus neoehrlichia lotoris* (Yabsley et al., 2008) og *Candidatus Neoehrlichia chilensis* (Müller et al., 2018). Fyrstnemnte var funnet i vaskebjørn (*Procyon lotor*) i USA, som sannsynlegvis var overført via harde flått (Yabsley et al., 2008). Medan *Ca. N. Chilensis* var observert i milten hos gnagarar i Chile (Müller et al., 2018). Dermed hadde det vore interessant for framtidige studiar å undersøkje om det er fleire *N.mikurensis* variantar eller *Neoehrlichia*-bakteriar i Noreg.

## 5.8. Koinfeksjon

Omkring tre gongar så mange flått i vaksenstadia enn nymfer var dobbeltpositive. Denne trenden har vore tidlegare observert av Herrmann og Gern (2010). Ein mogleg forklaring på dette kan vere fordi flått i vaksenstadia har fått i seg fleire blodmåltid enn nymfer (Földvári., 2016), og dermed fleire moglegheiter til bli infisert av patogena gjennom til dømes andre flått eller vertsdyr (Randolph, Gern og Nuttall, 1996). Koinfeksjons-raten totalt på 6% var høgare enn observert av Wielinga et al., (2006) i Nederland med ein prevalens på 1.6%.

Den minste prevalensen av dobbeltpositive var hos *B.valaisiana* og *B.garinii* med *N.mikurensis*. Ein grunn til dette kan vere på grunn av ulike reservoarvertar. Til dømes

bruker begge desse *B.burgdorferi* (*s.l*) artane fuglar som vert (Steinbrink et al., 2022), medan *N.mikurensis* brukar gnagarar (Kawahara et al., 2004). *N.mikurensis* har vore nyleg observert i flått frå migrerende fuglar i Sverige, men dette var på «berre» på 2.1% (Labbé Sandelin., 2022). Den einaste koinfeksjon kombinasjonen som var signifikant høgare enn forventa var *B.afzelii* med *N.mikurensis*. Denne kombinasjonen var tidlegare observert hos 5% av vaksne flått i Noreg (Saber., 2022). Dette samsvarar mest med resultatata i Solligjerdet med 8% i vaksen flått, medan minst med resultatata i Snekkvika med ein prevalens på 24%. Moglegvis var det observert ein relativ høg koinfeksjon i denne studien mellom desse bakteriane sidan begge bruker gnagarar som hovudvert (Kawahara et al., 2004; Steinbrink et al., 2022).

Det var også observert ein relativ stor koinfeksjon av *B.burgdorferi* (*s.s*) med *N.mikurensis*. Men denne kombinasjonen var ikkje signifikant større enn forventa. Ein hypotese på dette er fordi *B.burgdorferi* (*s.s*) har eit større utval av vertar (Steinbrink et al., 2022), enn *N.mikurensis* (Kawahara et al., 2004), og difor ikkje like mange dobbeltpositive samanlikna med antal flått infiserte av *B.burgdorferi* (*s.s*). Sannsynlegvis er dette fyrste gongen at ein koinfeksjon av *B.burgdorferi* (*s.s*) med *N.mikurensis* har vore registrert. Koinfeksjon mellom *N.mikurensis* og dei tre andre *B.burgdorferi* (*s.l*) artane har derimot vore observert før hos flått frå Romania (Raileanu et al., 2017).

## 5.9. Flått-tettleik

Flått-tettleiken i kommunen varierte frå 2.6 til 55.3 flått i timen etter delområde og livsstadium. I gjennomsnitt var det ein høgare flått-tettleik hos nymfer (41.4/timen) enn vaksen flått (5.1/timen). Desse resultatata hos vaksen flått er omkring det same observert av Dantas-Torres et al., (2013) i Italia på 5.6 flått/timen. Derimot var det observert nesten



dobbelt så høg flått-tettleik hos nymfer i denne studien enn av Dantas-Torres et al., (2013) som fann 22.3 nymfer/timen. Ein hypotese på variasjonen i flått-tettleiken kan vere vegetasjonssamansetning (Dantas-Torres et al., 2013) og ferdsel hos flått-vertar (Mysterud et al., 2016). Til dømes kan hjort, eller ein vert generelt, føre til ein større flåttpopulasjon (Mysterud et al., 2016). Dette viste seg å vere tilfelle med hjort i Møre og Romsdal om våren (Mysterud et al., 2016). Derimot ein hypotese på kvifor det var ein signifikant høgare flått-tettleik hos vaksne i Solligjerdet enn snekkvika kan vere på grunn av tilskott av B-vitamina (Duron et al., 2018) frå *B.burgdorferi (s.l)* bakteriar. Dette er spesielt med tanke på at det var signifikant høgare *B.burgdorferi (s.l)* infeksjon hos nymfer i Solligjerdet enn Snekkvika.

### 5.9.1. Solligjerdet

I Solligjerdet var flått-tettleiken nesten dobbelt så høg ved delområda høgast oppe på stien (C og D), enn lenger nede (A og B). Ein mogleg forklaring på dette kan vere på grunn av vegetasjonsforskjellar. Til dømes bestod delområde A og B hovudsakleg av einstape og røsslyng, medan meir grasvegetasjon ved delområda C og D. Wielinga et al., (2006) fann den lågaste flått-tettleiken i vegetasjon samansett av røsslyng, medan Tack et al., (2011) fann ein signifikant lågare antal skogflått i einstape dominerande områda enn ved områda ved gras. Tack et al., (2011) sin hypotese var at når vegetasjonen er høg, slik einstape kan vere, er innsamling av flått vanskelegare. Ein annan hypotese kan vere at hjorten ikkje oppheld seg så mykje i delområde A, sidan einstape vanlegvis ikkje er ein stor del av dietten deira (Gebert og Verheyden-Tixier, 2001). Generelt føretrekker hjorten gras, starr, røsslyng, bærlyngslekta og buskar (Gebert og Verheyden-Tixier, 2001), noko som samsvarar meir med vegetasjonen i delområda C-D.

### 5.9.2. Snekkvika

I snekkvika var forskjellane mellom delområda mindre enn samanlikna ved Solligjerdet. For flått-tettleiken hos nymfer var det ein forskjell på 17 nymfer/timen frå delområde med høgast (E2) og lågast (E1) flått-tettleik. Basert på personlege observasjonar bestod store delar av E1 av einstape, og difor kan det vere same moglege grunn som delområde A for at det var færre flått innsamla derifrå (**Jf. kapittel 5.9.1**).

### 5.9.3. Luftfuktigheit og temperatur

Det var ingen signifikant korrelasjon mellom temperatur og flått-tettleik. Ein grunn til dette kan vere fordi lufttemperaturen var alltid over 10 grader, som er grensa for at skogflått skal utvikle seg (Stuen., 2023). Det var heller ingen signifikant korrelasjon mellom flått-tettleiken og luftfuktigheita i felt, men korrelasjonen var positiv. Grunnen til dette kan vere fordi datasettet var for lite. Parametriske testar som Pearsons korrelasjonskoeffisient kan brukes på små datasett, men det må vanlegvis til ein større effekt i datasettet for at resultat skal vere signifikante (Norman., 2010).

Derimot må ein teke omsyn til at luftfuktigheit-data frå offisielle vêrstasjonar ikkje er nøyaktig nok til å konkret seie korleis dei meteorologiske forholda er i skogen, der flåtten vanlegvis lever (Boehnke et al., 2017). Til dømes observerte Boehnke et al., (2017) at den relative luftfuktigheita var i gjennomsnitt opptil 24 % tørrare enn i flåttenens mikroklima. Basert på denne informasjonen kan det hende at eigentlege luftfuktigheita som flåtten opplevde var høgare enn den gjennomsnittlege på 70.6%. Det kan då hende at luftfuktigheita for flåtten var for det meste over 80%, som flåtten trenger over tid for å overleve (Tessem., 2023).

## 5.10. Feilkjelder

Det var nokre feilkjelder innanfor DNA-ekstraksjon, identifisering av flått, metoden for innsamling av flått og utføring av sanntids PCR. Ved DNA-ekstraksjon var eit ukjent antal flått mista i prosessen, og difor var det reelle talet av innsamla flått over 502. I tillegg var det nokre flått som med uhell var ekstrahert i lag med andre flått. Desse var S10622F01 (1 vaksen hoflått + 1 nymfe), S20722N142 (2 nymfer) og S1X22M14 (1 vaksen hannflått + 1 nymfe). Derimot av alle desse var berre S20722N142 positiv for patogena (*N.mikurensis*).

Ved sanntids PCR av *N.mikurensis* var det med uhell ikkje brukt spiking ved dei første testane, og då var berre fortynningsrekkeja brukt som positiv kontroll. Medan ved *B.afzelii* Sanntids PCR var ikkje alle flått testa ved termisk profil 2 fordi dette var eit program som var brukt med uhell. I tillegg til desse var det minst eit tilfelle det var tilsett dobbelt opp med prøve DNA (10 µl i staden for 5µl), men dette var enkelt å identifisere.

Ved metoden flagging, var tida det gjekk å flagge over delområda målt berre ein gong. Dette vil seie at gå-tempoet kan ho vore raskare nokre dagar enn andre. Det er usikkert kor mykje dette kan ha påverka resultat. I tillegg, sidan det var ingen signifikant forskjell verken i luftfuktigheit eller lufttemperatur i feltdagane mellom studieområda, er desse faktorane sannsynlegvis ikkje ein stor grunn til forskjellane i flått-tettleik. Til slutt må ein teke omsyn til at utrekning av flått-tettleik basert på berre flagging ikkje kan brukas til å berekne populasjonstørrelsen for flått i eit område (Soleng et al., 2018).

Sidan flått i denne studien berre var identifisert basert på morfologi utan mikroskop er det ein sjanse for at nokre flått ikkje var skogflått. Dette er basert på at skogflåtten i utsjånad liknar på flåtten *Ixodes inopinatus* (Noll et al., 2023) som har vore observert i Nord-Tyskland (Hauck et al., 2019). Ein annan art som liknar på skogflåtten er *Ixodes persulcatus*, som har vore registrert i Sverige (Noll et al., 2023).

Til sist, det er ein reell sjanse for feil-identifikasjon av dei ulike *B.burgdorferi s.l* artane. Spesielt med tanke på at det var påvist drastisk fleire *B.burgdorferi (s.s)* positive flått enn andre studiar i Noreg. I tillegg har ikkje bruken av smeltekurve-analyse ved *flaB* sanntids PCR produkta vore skikkeleg evaluert, og *FlaB* sanntids PCR var heller ikkje designet til dette formålet (Jenkins et al., 2012). Dette er blant anna fordi Jenkins et al., (2012) identifiserte ulike *B.burgdorferi (s.l)* artar ved bruk av DNA-sekvensering, og ikkje berre med sanntids PCR. I tillegg observerte Jenkins et al., (2012) ein redusert sensitivitet hos variantar av *B.burgdorferi (s.s)*.

### **5.11. Flått og flåttborne sjukdommar i framtida**

Med dagens klima er vestlandet eit av dei mest eigna plassane for skogflått i Nord-Europa (Alkishe, Peterson og Samy., 2017). Same studie fann basert på klima-modellar at i framtida kan det hende skogflåtten etablerer seg i nye områda, spesielt var denne trenden synleg i Nord-Europa. Derimot hadde fleire av klima-modellane for framtida stor usikkerheit når det gjaldt Noreg.

Ein anna konsekvens av klimaendringar, som allereie har vore observert, er at flåttborne sjukdommar aukar globalt (Caminade, McIntyre og Jones., 2018). Dette er blant anna gjennom høgare lufttemperaturar som kan føre til ein auking i områda eigna for flått,

men kan også føre til nedgang i flåttens overlevingssevne (Nuttall, 2021). I tillegg kan kortare vintre føre til at menneskjer blir meir utsett for flåttbit, og dermed ein auka risiko for å bli smitta av flåttborne-sjukdommar (Bouchard et al., 2019). Eit tiltak til dette, foreslår både Medlock et al., (2013), og Sykes og Makiello (2016) at betre flåttovervaking må til for å lettare kunne forstå distribusjonen av skogflått i Europa. Eit døme på flåttovervaking kan vere flåttkartet som nyleg var laga på nett av Flåttsenteret (2022). Utanom dette kan ein unngå flåttborne sjukdommar ved å fjerne flått så fort som mogleg, og å bruke flåttmiddel for å unngå at flått setter seg på menneskjer i fyrste omgang (Stanek et al., 2012).

## 6. Forslag til framtidige studiar

- Undersøkje meir om korleis prevalensen av ulike flått-patogena kan variere på relativ små distansar.
- Undersøkje samanhengen mellom flått-tettleik og vertsdyr.
- Undersøkje meir om koinfeksjon av *B.burgdorferi (s.l)* artar med *N.mikurensis*.  
Spesielt koinfeksjon mellom *B.burgdorferi (s.s)* og *N.mikurensis*.
- Undersøkje fleire områda på vestlandet for *N.mikurensis*.

## 7. Konklusjon

Studien viser at fargestoffet nøytral raudt fungerer bra som pH-indikator for DNA-ekstraksjon med ammonium hydroksid, men at fargestoffet førte til ein inhibisjon ved sanntids PCR. I tillegg var det observert at sanntids PCR fungerte betre etter at DNA-prøvane vart lagra i eit par dagar etter DNA-ekstraksjon. Dette var fordi NH<sub>4</sub>OH førte til ein signifikant inhibisjon, og lagringa gjorde at restane av NH<sub>4</sub>OH fordampa.

Når det gjelder prevalensen av flåttpatogen var *B.burgdorferi (s.l)* prevalensen omkring slik som forventa i regionen. Derimot var det funnet ein høgare prevalens av *N.mikurensis* enn tidlegare registrert i Møre og Romsdal. Det er usikkert kva grunnen til dette kan vere, men ein hypotese er forholdet mellom *N.mikurensis* og *A. phagocytophilum* infeksjon i eit område. Studien demonstrerte også at både prevalensen av flått-bakteriar og flått-tettleiken kan variere ved relativ små distansar. Til slutt, dette er sannsynlegvis den fryste gongen det har vore observert ein koinfeksjon mellom *B.burgdorferi (s.s)* og *N.mikurensis* i flått.

## 8. Litteraturliste

- Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Van De Pol, I. og Schouls, L.M. (2001). Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* Ticks in the Baltic Regions of Russia. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6), pp.2237–2242. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.39.6.2237-2242.2001>.
- Alkishe, A.A., Peterson, A.T. og Samy, A.M. (2017). Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. PLOS ONE, 12(12), p.e0189092. doi:10.1371/journal.pone.0189092.
- Ammazzalorso, A.D., Zolnik, C.P., Daniels, T.J. og Kolokotronis, S.-O. (2015). To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). PeerJ, [online] 3, p.e1147. doi:10.7717/peerj.1147.
- Barbosa, P. og Peters, T.M. (1971). The effects of vital dyes on living organisms with special reference to Methylene Blue and Neutral Red. *The Histochemical Journal*, 3(1), pp.71–93. doi:<https://doi.org/10.1007/bf01686508>.
- Bio-Rad laboratories (2006) Real-Time PCR Applications Guide. [online] Tilgjengeleg frå: [https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_52\\_79.pdf](https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_52_79.pdf) (Henta: 4. oktober.2022).
- Boehnke, D., Gebhardt, R., Petney, T. og Norra, S. (2017). On the complexity of measuring forests microclimate and interpreting its relevance in habitat ecology: the example of *Ixodes ricinus* ticks. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2498-5>.
- Bouchard, C., Dibernardo, A., Koffi, J., Wood, H., Leighton, P. og Lindsay, L. (2019). N Increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes.



Canada Communicable Disease Report, [online] 45(4), pp.83–89. Tilgjengeleg frå:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6587693/>.

Campbell, N.A., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. og Reece, J.B. (2018). *Biology: a Global Approach*. 11th ed. New York Pearson.

Caminade, C., McIntyre, K.M. og Jones, A.E. (2018). Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), pp.157–173.

Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Capelli, G. og Otranto, D. (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Experimental and Applied Acarology*, 61(1), pp.119–127. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-013-9671-0>.

Derdáková, M., Václav, R., Pangrácova-Blaňárová, L., Selyemová, D., Koči, J., Walder, G. a og Špitalská, E. (2014). Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of Central Europe. *Parasites & Vectors*, 7(1), p.160. doi:<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-160>.

Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F. og Vial, L. (2018). Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Current Biology*, 28(12), pp.1896-1902.e5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>.

Elven H. og Sjøli G. (red.) (2021). Kunnskapsstatus for artsmangfoldet i Norge 2020. Utredning for Artsdatabanken 1/2021. Artsdatabanken, Norge.

ESRI (2011). ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.

- Estrada-Peña, A., Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S. og Nijhof, A.M. (2013). Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [online] 3. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00029>.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D. og Petney, T.N. eds., (2017). Ticks of Europe and North Africa. Cham: Springer International Publishing.
- Faulde, M.K. og Robbins, R.G. (2008). Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 44(2), pp.137–145. doi:[10.1007/s10493-008-9131-4](https://doi.org/10.1007/s10493-008-9131-4).
- Flåttsenteret (2022). *Flåttkartet*. [online] Tilgjengelig frå: <https://flattkart.no/> [Henta: 28 Feb. 2023].
- Földvári, G. (2016). 3. Life cycle and ecology of *Ixodes ricinus*: the roots of public health importance. *Ecology and Control of Vector-borne Diseases*, pp.31–40. doi:[https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4\\_3](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4_3).
- Gandy, S., Kilbride, E., Biek, R., Millins, C. og Gilbert, L. (2021). Experimental evidence for opposing effects of high deer density on tick-borne pathogen prevalence and hazard. *Parasites & Vectors*, [online] 14(1), p.509. doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-021-05000-0>.
- Gebert, C. og Verheyden-Tixier, H. (2001). Variations of diet composition of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) in Europe. *Mammal Review*, 31(3 & 4), pp.189–201. doi:[10.1046/j.1365-2907.2001.00090.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2001.00090.x).

- Gherman, C.M., Mihalca, A.D., Dumitrache, M.O., Györke, , A., Oroian, I., Sandor, M. og Cozma, V. (2012). CO2 flagging - an improved method for the collection of questing ticks. *Parasites & Vectors*, 5(1), p.125. doi:<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-125>.
- Google Maps. (u.å). Google Maps. [online] Tilgjengeleg frå: <https://www.google.com/maps/dir/Kanestraum> [henta: 3 Mar. 2023].
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R. og Barker, S.C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, [online] 2528(1), pp.1–28. doi:<https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1>.
- Guy, E.C. og Stanek, G. (1991). Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, 44(7), pp.610–611. doi:10.1136/jcp.44.7.610.
- Hauck, D., Springer, A., Pachnicke, S., Schunack, B., Fingerle, V. and Strube, C. (2019). *Ixodes inopinatus* in northern Germany: occurrence and potential vector role for *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., and *Anaplasma phagocytophilum* in comparison with *Ixodes ricinus*. *Parasitology Research*, 118(12), pp.3205–3216. doi:<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06506-4>.
- Herrmann, C. og Gern, L. (2010). Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) Under Challenging Conditions of Temperature and Humidity Is Influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato Infection. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), pp.1196–1204. doi:10.1603/me10111.
- Herrmann, C. og Gern, L. (2015). Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, [online] 8. doi:10.1186/s13071-014-0526-2.

- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. og Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*, 10(4), pp.413–417. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. og Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 88(16), pp.7276–7280. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>.
- Houghton, S.G. og Cockerill, F.R. (2006). Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery*, 139(1), pp.1–5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.02.010>.
- Hvidsten, D., Frafjord, K., Gray, J.S., Henningsson, A.J., Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Lager, M., Rognerud, B., Slåtsve, A.M., Stordal, F., Stuen, S. og Wilhelmsson, P. (2020). The distribution limit of the common tick, *Ixodes ricinus*, and some associated pathogens in north-western Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(4), p.101388. doi:[10.1016/j.ttbdis.2020.101388](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101388).
- Ilya Bogdanovich. (2013). Geo Tracker - GPS tracker (Versjon 5.1.5.) [mobil app] Henta: juni-juli 2022.
- Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E.-J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J.M., Heylen, D., Kleve, J. og Sprong, H. (2012). Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasites & Vectors*, 5(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-74>.
- Jenkins, A., Hvidsten, D., Matussek, A., Lindgren, P.-E., Stuen, S. og Kristiansen, B.-E. (2012). *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from Norway: evaluation

- of a PCR test targeting the chromosomal *flaB* gene. *Experimental and Applied Acarology*, 58(4), pp.431–439. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-012-9585-2>
- Jenkins, A., Raasok, C., Pedersen, B.N., Jensen, K., Andreassen, Å., Soleng, A., Edgar, K.S., Lindstedt, H.H., Kjelland, V., Stuen, S., Hvidsten, D. og Kristiansen, B.-E. (2019). Detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Norway up to the northern limit of *Ixodes ricinus* distribution using a novel real time PCR test targeting the *groEL* gene. *BMC Microbiology*, 19(1). doi:10.1186/s12866-019-1502-y.
- Jore, S., Viljugrein, H., Hofshagen, M., Brun-Hansen, H., Kristoffersen, A.B., Nygård, K., Brun, E., Ottesen, P., Sævik, B.K. og Ytrehus, B. (2011). Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasites & Vectors*, 4(1).
- Kahl, O. og Gray, J.S. (2023). The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, [online] 14(2), p.102114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102114>.
- Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., Suto, C., Shibata, S., Zhang, C. og Tsuji, M. (2004). Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), pp.1837–1843. doi:10.1099/ijs.0.63260-0.
- Kjelland, V., Paulsen, K.M., Rollum, R., Jenkins, A., Stuen, S., Soleng, A., Edgar, K.S., Lindstedt, H.H., Vaino, K., Gibory, M. og Andreassen, Å.K. (2018). Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks collected from recreational

- islands in southern Norway. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(5), pp.1098–1102.  
doi:10.1016/j.ttbdis.2018.04.005.
- Kjelland, V., Stuen, S., Skarpaas, T og Slettan., A (2010) Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42:8, 579-585, DOI: [10.3109/00365541003716526](https://doi.org/10.3109/00365541003716526).
- Klitgaard, K., Kjær, L.J., Isbrand, A., Hansen, M.F. og Bødker, R. (2019). Multiple infections in questing nymphs and adult female *Ixodes ricinus* ticks collected in a recreational forest in Denmark. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(5), pp.1060–1065.  
doi:10.1016/j.ttbdis.2019.05.016.
- Kwok, S. og Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339(6221), pp.237–238. doi:<https://doi.org/10.1038/339237a0>.
- Labbé Sandelin, L. (2022). PhD- project: *Neoehrlichia mikurensis* in Sweden: An emerging tick-borne human pathogen. [online] Tilgjengeleg frå: <https://www.researchgate.net/publication/363485385>.
- LaManna, J.C. (1987). Intracellular pH determination by absorption spectrophotometry of neutral red. *Metabolic Brain Disease*, 2(3), pp.167–182.  
doi:<https://doi.org/10.1007/bf00999608>.
- Lees, A.D. (1948). The Sensory Physiology of the Sheep Tick, *Ixodes Ricinus* L. *Journal of Experimental Biology*, 25(2), pp.145–207. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.25.2.145>.
- Lyngstad TM, Astrup E, Brandal LT, Eide HN, Feruglio SL, Grøneng GM, Valcarcel BS, Johansen TB, Jore S, Lange H, Lund H, MacDonald E, Naseer U, Hyllestad S, Nygård K og Vold, L. (2021) «[Årsrapport 2020 Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer]». [2020 Annual Surveillance Report for Zoonotic,

Food, Water and Vector-borne Infectious Diseases]. Rapport 2020. Oslo: Folkehelseinstituttet.

Madison-Antenucci, S., Kramer, L.D., Gebhardt, L.L. og Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). doi:10.1128/cmr.00083-18.

Medlock, J.M., Hansford, K.M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.-C., Golovljova, I., Jaenson, T.G.T., Jensen, J.-K., Jensen, P.M., Kazimirova, M., Oteo, J.A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S.E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M.M., Sprong, H, Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H., og Bortel, W.V. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, 6(1).

Mehl, R., (1983). The distribution and host relations of Norwegian ticks (Acari, Ixodidae), *Fauna Norv. Ser. B.* 30, 46–51.

Mejlon, H.A. og Jaenson, T.G.T. (1997). Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 21(12), pp.747–754. doi:<https://doi.org/10.1023/a:1018421105231>.

Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) (2023), Folkehelseinstituttet,

Tilgjengeleg frå: <https://msis.no/> (Henta: 09.04.23).

Merriam-webster.com. (u.å.). Definition of COINFECTION. [online] Tilgjengeleg frå: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/coinfection> [Henta: 30 Mar. 2022].

Microsoft Corporation, (2018). *Microsoft Excel*, Tilgjengeleg frå: <https://office.microsoft.com/excel>.

Mikeska, T. og Dobrovic, A. (2009). Validation of a primer optimisation matrix to improve the performance of reverse transcription – quantitative real-time PCR assays. *BMC Research Notes*, 2(1), p.112. doi:<https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-112>.

- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.-F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourc'h, G. og Vayssier-Taussat, M. (2016). Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), p.e0004539. doi:10.1371/journal.pntd.0004539.
- Müller, A., Monti, G., Otth, C., Sepúlveda, P., Bittencourt, P., Nachum-Biala, Y., Gutiérrez, R. og Harrus, S. (2018). 'Candidatus Neoehrlichia chilensis' sp. nov.: Molecular detection and characterization of a novel Anaplasmataceae in wild rodents from Valdivia, southern Chile. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), pp.357–362. doi:https://doi.org/10.1111/tbed.12815.
- Mysterud, A., Easterday, W.R., Stigum, V.M., Aas, A.B., Meisingset, E.L. og Viljugrein, H. (2016). Contrasting emergence of Lyme disease across ecosystems. *Nature Communications*, 7(1).
- Mysterud, A., Hügli, C. og Viljugrein, H. (2021). Tick infestation on medium–large-sized mammalian hosts: are all equally suitable to Ixodes ricinus adults? *Parasites & Vectors*, 14(1). doi:10.1186/s13071-021-04775-6.
- Mysterud, A., Stigum, V.M., Seland, I.V., Herland, A., Easterday, W.R., Jore, S., Østerås, O. og Viljugrein, H. (2018). Tick abundance, pathogen prevalence, and disease incidence in two contrasting regions at the northern distribution range of Europe. *Parasites & Vectors*, [online] 11(1). doi:https://doi.org/10.1186/s13071-018-2890-9.
- Neelakanta, G., Sultana, H., Fish, D., Anderson, J.F. og Fikrig, E. (2010). Anaplasma phagocytophilum induces Ixodes scapularis ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *Journal of Clinical Investigation*, 120(9), pp.3179–3190. doi:https://doi.org/10.1172/jci42868.



- Noll, M., Wall, R., Makepeace, B.L. og Hannah Rose Vineer (2023). Distribution of ticks in the Western Palearctic: an updated systematic review (2015–2021). *Parasites & Vectors*, 16(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05773-6>.
- Norman, G. (2010). Likert scales, levels of measurement and the 'laws' of statistics. *Advances in Health Sciences Education*, 15(5), pp.625–632. doi:<https://doi.org/10.1007/s10459-010-9222-y>.
- Nuttall, P (ed.) (2021), *Climate, Ticks and Disease*, kapittel 25, *Climate Impact on Lyme Borreliosis and Its Causative Agents* CAB International, Oxford. Tilgjengeleg frå: ProQuest Ebook Central. [31 January 2023]
- Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Tiedemann, T., Thiel, C., Balling, A., Karnath, C., Woll, D. og Silaghi, C. (2014). Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasites & Vectors*, 7(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-014-0563-x>.
- Okeyo, M., Hartberger, C., Margos, G., Straubinger, R.K., Sing, A. og Fingerle, V. (2019). Comparison of methods for economic and efficient tick and *Borrelia* DNA purification. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(5), pp.1041–1045. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.05.002.
- Pedersen, B.N., Jenkins, A., Paulsen, K.M., Okbaldet, Y.B., Edgar, K.S., Lamsal, A., Soleng, A. og Andreassen, Å.K. (2019). Distribution of *Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks along the coast of Norway: The western seaboard is a low-prevalence region. *Zoonoses and Public Health*, 67(2), pp.130–137. doi:10.1111/zph.12662.
- Pelsmaecker, N.D. (2021): *Altitudinal Distribution and Host- Parasite Relations of Ticks in Norway*. USN Open Archive: De pelsmaecker, N, Korslund, L, Steifetten, Ø. High-

elevation occurrence of two tick species, *Ixodes ricinus* and *I. trianguliceps*, at their northern distribution range, in review for *parasites and vectors*.

Portillo, A., Santibáñez, P., Palomar, A.M., Santibáñez, S. og Oteo, J.A. (2018). ' Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in Europe. *New Microbes and New Infections*, 22, pp.30–36. doi:10.1016/j.nmni.2017.12.011.

Quarsten, H., Grankvist, A., Høyvoll, L., Myre, I.B., Skarpaas, T., Kjelland, V., Wenneras, C. og Noraas, S. (2017). Candidatus Neoehrlichia mikurensis and Borrelia burgdorferi sensu lato detected in the blood of Norwegian patients with erythema migrans. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(5), pp.715–720. doi:https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.004.

Qviller, L., Grøva, L., Viljugrein, H., Klinge, I. og Mysterud, A. (2014). Temporal pattern of questing tick *Ixodes ricinus* density at differing elevations in the coastal region of western Norway. *Parasites & Vectors*, 7(1), p.179. doi:https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-179.

Qviller, L., Viljugrein, H., Loe, L.E., Meisingset, E.L. og Mysterud, A. (2016). The influence of red deer space use on the distribution of *Ixodes ricinus* ticks in the landscape. *Parasites & Vectors*, [online] 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1825-6.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Tilgjengeleg frå: <http://www.R-project.org/>.

Răileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G og Vayssier-Taussat M (2017) *Borrelia* Diversity and Co-infection with Other Tick Borne Pathogens in Ticks. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:36. doi: 10.3389/fcimb.2017.00036.

Răileanu, C., Silaghi, C., Fingerle, V., Margos, G., Thiel, C., Pfister, K. og Overzier, E. (2021). *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Questing and Engorged Ticks from Different Habitat

Types in Southern Germany. *Microorganisms*, 9(6), p.1266.  
doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061266>.

Randolph, S.E., Gern, L. og Nuttall, P.A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12(12), pp.472–479.  
doi:10.1016/s0169-4758(96)10072-7.

Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M. og Hartung, T. (2002). Distribution of Clinically Relevant *Borrelia* Genospecies in Ticks Assessed by a Novel, Single-Run, Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp.36–43.  
doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.36-43.2002>.

Rekdal, yngve og Larsson, John. Y. (2005). Veiledning i vegetasjonskartlegging. M 1:20 000 – 50 000. Norsk institutt for jord- og skogkartlegging, Ås.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. og Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, [online] 245(2), pp.154–60. doi:<https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>.

Rossmannith, P., Röder, B., Frühwirth, K., Vogl, C. og Wagner, M. (2010). Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), pp.407–417.  
doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2943-2>.

Saber, J.S (2022) Co-occurrence of *Borrelia afzelii* and *Neohhrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks along the coast of Norway. Master Thesis, University of South-Eastern Norway Faculty of Technology, Natural Sciences and Maritime Sciences, Department of Natural Sciences and Environmental Health.

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. og Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp.1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Silaghi, C., Beck, R., Oteo, J.A., Pfeffer, M. og Sprong, H. (2015). Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Experimental and Applied Acarology*, 68(3), pp.279–297. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-015-9935-y>.
- Silaghi, C., Woll, D., Mahling, M., Pfister, K. og Pfeffer, M. (2012). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasites & Vectors*, 5(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-285>.
- Soleng, A., Edgar, K.S., Paulsen, K.M., Pedersen, B.N., Okbaldet, Y.B., Skjetne, I.E.B., Gurung, D., Vikse, R. og Andreassen, Å.K. (2018). Distribution of *Ixodes Ricinus* ticks and prevalence of tick-borne encephalitis virus among questing ticks in the arctic circle region of northern Norway. *Ticks and Tick-borne diseases* 9, pp 97-103.
- Sonenshine, DE, & Roe, RM (eds) (2013a), *Biology of Ticks Volume 1*, kapittel 3. Oxford University Press, Incorporated, Cary. Tilgjengeleg frå: ProQuest Ebook Central. [Hentet: 3 Oktober 2022],
- Sonenshine, DE, & Roe, RM (eds) (2013b), *Biology of Ticks Volume 2*, kapittel 1. Oxford University Press, Incorporated, Cary. Tilgjengeleg frå: ProQuest Ebook Central. [hentet: 3 Oktober 2022].
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J. og Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), pp.461–473. doi:[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60103-7).

Statistisk sentralbyrå (2022). Hjortejakt, 03434: Felte hjort, etter region, statistikkvariabel, intervall (år), alder og kjønn. Tilgjengeleg frå: <https://www.ssb.no/statbank/table/03434/tableViewLayout1/?loadedQueryId=10033921&timeType=top&timeValue=2> (Henta: 04.04.22).

Steinbrink, A., Brugger, K., Margos, G., Kraiczy, P. og Klimpel, S. (2022). The evolving story of *Borrelia burgdorferi sensu lato* transmission in Europe. *Parasitology Research*, 121(3), pp.781–803. doi:10.1007/s00436-022-07445-3.

Stigum, V.M., Jaarsma, R.I., Sprong, H., Rolandsen, C.M. og Mysterud, A. (2019). Infection prevalence and ecotypes of *Anaplasma phagocytophilum* in moose *Alces alces*, red deer *Cervus elaphus*, roe deer *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* ticks from Norway. *Parasites & Vectors*, 12(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-018-3256-z>.

Stuen, s., (2023). *Flåtten øker i utbredelse og tetthet*. Norsk veterinær-tidsskrift nr 2.

Sykes, R.A. og Makiello, P. (2016). An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *Journal of Public Health*, p.fdw017.

Tack, W., Madder, M., De Frenne, P., Vanhellefont, M., Gruwez, R. og Verheyen, K. (2011). The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. *Experimental and Applied Acarology*, 54(3), pp.285–292. doi:10.1007/s10493-011-9444-6.

Tessem, s., (2023) *Flåtten øker i utbredelse og tetthet*. Norsk veterinær-tidsskrift nr 2.

Tveten, A.-K. (2013). Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia valaisiana* in *Ixodes ricinus* ticks from the northwest of Norway. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45(9), pp.681–687. doi:<https://doi.org/10.3109/00365548.2013.799288>.

- Walk, S.T., Xu, G., Stull, J.W. og Rich, S.M. (2009). Correlation between Tick Density and Pathogen Endemicity, New Hampshire. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), pp.585–587. doi:10.3201/eid1504.080940.
- Weast, R.C. og Astle, M.J. (1982). *CRC handbook of chemistry and physics a ready-reference book of chemical and physical data*. Boca Raton, Fla Crc Press, Inc
- Wielinga, P.R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Akkerhuis Op Jagers, G., Schouls, L.M., Borgsteede, F. og van der Giessen, J.W.B. (2006). Longitudinal Analysis of Tick Densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* Infections of *Ixodes ricinus* Ticks in Different Habitat Areas in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), pp.7594–7601. doi:https://doi.org/10.1128/aem.01851-06.
- Wilhelmsson, P., Lindblom, P., Fryland, L., Nyman, D., Jaenson, T.G., Forsberg, P. og Lindgren, P.-E. (2013). *Ixodes ricinus* ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. *Parasites & Vectors*, 6(1). doi:https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-362.
- Wongnak, P., Bord, S., Donnet, S., Hoch, T., Beugnet, F. og Chalvet-Monfray, K. (2022). A hierarchical Bayesian approach for incorporating expert opinions into parametric survival models: A case study of female *Ixodes ricinus* ticks exposed to various temperature and relative humidity conditions. *Ecological Modelling*, 464, p.109821. doi:10.1016/j.ecolmodel.2021.109821.
- World Health Organization; (2017). *Global vector control response 2017–2030*. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Yabsley, M.J., Murphy, S.M., Luttrell, M.P., Wilcox, B.R., Howerth, E.W. og Munderloh, U.G. (2008). Characterization of ‘Candidatus *Neoehrlichia lotoris*’ (family Anaplasmataceae)

from raccoons (*Procyon lotor*). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND  
EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58(12), pp.2794–2798.  
doi:<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65836-0>.

## 9. Vedlegg

### 9.1. PCR protokoll

Tabell 1. Metode for sanntids PCR preparering.

Steg	Metode	Notat
1.	Gjer sanntids PCR instrumentet klart.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tildel positive og negative kontroll</li><li>➤ Tildel DNA-prøve namn: dato, sted, nummer på lått.</li><li>➤ Dobbeltsjekk at det står på riktig termisk profil program</li></ul>
2.	Kalkuler volumet for mastermix.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Kapittel 3, Tabell 3 eller 6.</li></ul>
3.	Lag mastermix i PCR1 og ta den til PCR2 lab.	
4.	Porsjoner mastermix i enten 98 eller 46 sanntids PCR plate (20 µl).	
5.	Tilfør DNA-prøvane (5 µl), i tillegg til positiv og negativ kontroll.	
6.	Forsegl plata ved bruk av spesialteip.	
7.	Ta den ferdige PCR-plata til PCR3 lab.	
8.	Sett plata i maskinen og start programmet.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Vent til prosessen startar før du drar.</li></ul>
9.	Hugs å lagre resultata, og skru av maskinen når den er ferdig.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Lagre gjerne med dato.</li></ul>



## 9.2. Datasett frå feltarbeid

*Tabell 2. Data brukt for utrekning av flått-tettleik. Delområde A-D = Solligjerdet, E1-E4= Snekkvika.*

Delområde	Lengde (meter)	Antal flagginger	Tid per flagging (minutt)	antal vaksne	antal nymfer	Total antal flått
A	193	7	8	8	25	33
B	149	7	6	5	15	20
C	126	4	5	5	16	21
D	131	6	6	7	31	38
E1	189	15	8	6	76	82
E2	135	14	5.5	5	71	76
E3	190	12	8	5	69	74
E4	178	10	7	3	54	57

*Tabell 3. Meteorologiske data i tillegg til start og slutt-tidspunkt for felt-dagane. Temperatur 1 er data innsamla frå YR.no, medan Temperatur 2 er data innsamla utanfor huset i kommunen. 27.06 – 11.07 er feltdaga frå Solligjerdet, medan 13.07 – 25.07 er feltdaga i Snekkvika.*

Dato	Start (klokkeslett)	Slutt (Klokkeslett)	Temperatur (1)	Temperatur (2)	Luftfuktigheit %	Vaksen flått	Antal nymfer
27.06.22	11.20	12.10	23	18.5	73	5	11
30.06.22	11.20	13.15	24	19	53.4	6	24
03.07.22	11.20	11.52	18	19	60	0	0
04.07.22	12.20	15	19.5	18.9	58.5	12	45
11.07.22	17.16	18.15	19.5	20	76.5	2	7
13.07.22	12.15	13.10	17	17.3	66	2	14
15.07.22	11.50	12.30	11.5	12.6	91	3	18
19.07.22	12.25	15.22	18	18	70	1	74
20.07.22	11.15	12.15	19	19.6	75.5	5	32
22.07.22	11.50	14.10	15.5	15.3	84	5	42
23.07.22	12.13	14.20	19	16	65.5	1	34
24.07.22	12.07	14.45	19	17.9	69	1	45
25.07.22	15	15.30	24	24.9	76	0	6

### 9.3. Kji-kvadrat testar

		Observert			
		Positive	Negative	Totaler-rad	Beskrivelse
Positive		28		86	114 0x
Neg		57		445	502 1x
		85		531	616 Totaler-kolonne
		Forventet			
		15.73051948		98.26948052	
		69.26948052		432.7305195	
		p= 0.000223432			p-verdi

Figur 1. Kji-kvadrat test for koinfeksjon mellom *N.mikurensis* og *B.burgdorferi* (s.l).

		Observert			
		Positive	Negative	Totaler-rad	Beskrivelse
Positive		10		32	42 0x
Neg		75		427	502 1x
		85		459	544 Totaler-kolonne
		Forventet			
		6.5625		35.4375	
		78.4375		423.5625	
		p= 0.128330567			p-verdi

Figur 2. Kji-kvadrat test for koinfeksjon mellom *B.burgdorferi* (s.s) og *N.mikurensis*.

		Observert			
		Positive	Negative	Totaler-rad	Beskrivelse
Positive		4		25	29 0x
Neg		81		421	502 1x
		85		446	531 Totaler-kolonne
		Forventet			
		4.642184557		24.35781544	
		80.35781544		421.6421846	
		p= 0.73801521			p-verdi

Figur 3. Kji-kvadrat test for koinfeksjon mellom *N.mikurensis* og *B.garinii*.

		Observert			
		Positive	Negative	Totaler-rad	Beskrivelse
Positive		10		19	29 0x
Neg		75		427	502 1x
		85		446	531 Totaler-kolonne
		Forventet			
		4.642184557		24.35781544	
		80.35781544		421.6421846	
	p=	0.005260607			p-verdi

Figur 4. Kji-kvadrat test for koinfeksjon mellom *B.afzelii* og *N.mikurensis*.

		Observert			
		Positive	Negative	Totaler-rad	Beskrivelse
Positive		4		10	14 0x
Neg		81		421	502 1x
		85		431	516 Totaler-kolonne
		Forventet			
		2.30620155		11.69379845	
		82.69379845		419.3062016	
	p=	0.215978587			p-verdi

Figur 5. Kji-kvadrat test for koinfeksjon mellom *B.valaisiana* og *N.mikurensis*.