

Pro Gradu –tutkielma

**Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus metsämyyrän
(*Myodes glareolus*) metaboliaan**

Kirsi Perälä



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ekologia ja ympäristöhoito

17.1.2012

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ekologia ja ympäristönhoito

PERÄLÄ, K.: Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus metsämyyrän
(*Myodes glareolus*) metaboliaan

Pro Gradu –tutkielma: 22 s.

Työn ohjaajat: Dos. Janne Sundell, Dr. Lenka Trebaticka, Prof. Hannu Ylönen

Tarkastajat: FT Esa Koskela, Prof. Janne Kotiaho

Tammikuu 2012

Hakusanat: Lehmärokko, metaboliataso, metsämyyrä, Puumala-virus

TIIVISTELMÄ

Taudinaiheuttajat, kuten virukset ovat usein haitallisia isäntälajilleen. Virusinfektiot voivat heikentää mm. isäntälajinsa lisääntymistä ja selviytymistä, vaikka ne eivät aiheuttaisikaan näkyviä oireita isäntälajeilleen. Jyrsijöiden yksi yleisimmistä viruksista on hantaviruksiin kuuluva Puumala-virus, jonka isäntälaji on metsämyyrä (*Myodes glareolus*). Hantavirukset ovat RNA-viruksia ja ne leviävät tehokkaasti tiheissä myyräkannoissa. Puumala-virus voi levitä metsämyyrästä myös ihmisiin hengitysteiden kautta aiheuttaen myyräkuumetta. Puumala-viruksen ohella metsämyyrästä on löydetty myös lehmärokkovirusta, joka on DNA-virus. Lehmärokkoviruksen tiedetään vaikuttavan heikentävästi metsämyyrien lisääntymiseen ja talvella myös selviytymiseen. Myös lehmärokkovirus voi tarttua ihmiseen mm. kotikissoilta ihorikkojen kautta aiheuttaen punoittavia rakkuloita ja flunssan kaltaisia oireita ihmisille. Lehmärokkovirusinfektio ei ole jyrsijöillä krooninen, toisin kuin Puumala-virusinfektio, mutta niiden molempien on havaittu olevan haitallisia niiden isäntälajeilleen, mutta perimmäisiä syitä ei vielä tiedetä. Virukset saattavat vaikuttaa isäntälajin kelpoisuuteen muun muassa niiden metabolian eli aineenvaihdunnan kautta. Metaboliatasoon vaikuttavat mm. yksilön ikä, lisääntymisvaihe sekä muut stressitekijät, kuten taudinaiheuttajat. Tutkimuksessa oli tarkoituksena selvittää Puumala-viruksen ja lehmärokkoviruksen vaikutusta metsämyyrän lepo- ja rasisusmetaboliaan. Metsämyyräpopulaatiota seurattiin kesän 2011 aikana Lammin biologisen aseman läheisyydessä olevalla metsäalueella merkintä-takaisinpyyntimenetelmällä. Metsämyyrien lepo- ja rasisusmetaboliamittaukset suoritettiin laboratoriossa respirometrin avulla, joka analysoi myyrien uloshengitysilman CO₂-pitoisuuden. Myyrien rasisusmetabolia mitattiin sekä juosten että uiden ja lepometabolia ennen ja jälkeen juoksuosuituksen. Myyriltä otettiin verinäytteet, mistä analysoitiin Puumala-virus- ja lehmärokkovirusinfektiot. Puumala-virusinfektoituneita myyriä oli 24 kpl ja lehmärokkovirusinfektoituneita 21 kpl, kun yhteensä 62 myyrän lepo- ja rasisusmetaboliamittausten tulokset analysoitiin. Puumala-viruksella eikä lehmärokkoviruksella ollut vaikutusta lepo- ja rasisusmetaboliaan. Koiraiden rasisusmetaboliataso juosten mitattuna oli korkeampi kuin naaraiden ja samansuuntainen trendi oli havaittavissa uiden mitatussa rasisusmetaboliassa. Näin ollen tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa, että Puumala- tai lehmärokkovirusinfektoituneiden korkeampi metaboliataso olisi syynä heikompaan lisääntymiseen tai selviytymiseen metsämyyrillä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science

Ecology and Environmental Management

PERÄLÄ, K.: The effects of Puumala-virus and cowpox virus infection to metabolic rate of bank vole (*Myodes glareolus*)

Master of Science Thesis: 22 p.

Supervisors: Doc Janne Sundell, Dr. Lenka Trebaticka Prof. Hannu Ylönen

Inspectors: PhD. Esa Koskela, Prof. Janne Kotiaho

January 2012

Key Words: Bank vole, Cowpox virus, metabolic rate, Puumala-virus,

ABSTRACT

Pathogens such as viruses are often harmful to their host. Viral infections can impact host reproduction and survival of their species, even if they do not cause any obvious symptoms to their host. One of the most common viruses in rodents are hantaviruses of which Puumala virus is carried by the bank vole (*Myodes glareolus*). Hantaviruses are RNA viruses, which spread effectively in dense vole populations. Puumala virus can also spread from voles to humans through the respiratory tract, causing vole fever. In addition to Puumala virus also cowpox virus, which is a DNA virus, has been found in bank voles,. Cowpox virus can also spread from voles to humans through a domestic cat, causing reddish blisters and flu-like symptoms. Cowpox virus infection is not chronic in rodents, in contrast to Puumala virus infection, but they both have been found to be harmful to their host, but the cause is still unknown. Viruses may affect the fitness of their host through their metabolism. The aim of this study was to determine the effects of Puumala virus and cowpox virus infection to the resting and the maximum metabolic rate of bank voles. The population of the bank voles was monitored during the summer of 2011 at Lammi Biological Station in the vicinity of the forest area with the capture-recapture method. The resting and the maximum metabolic rates of the bank voles were measured in the laboratory where the voles were carried out. In the laboratory the measurements were done by the respirometry which was analyzing the CO₂ level. The maximum metabolic rate was measured by running and by swimming. The resting metabolic rate was measured before and after the treadmill test. Blood samples were analyzed for Puumala and the cowpox infection. When totally 62 bank voles were measured there were 24 Puumala virus infected and 21 cowpox infected voles. Neither Puumala virus nor cowpox virus had an effect on resting or the maximal metabolic rate. The maximum metabolic rate of the males measured by running was higher than that of females, and parallel trend was observed in maximal metabolic rate measured by swimming also. According to this study it can't be said if Puumala and cowpox virus infected bank voles with higher metabolic rate would have lower fitness level than non-infected ones.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
1.1. Taudinaiheuttajat populaatiossa	5
1.2. Puumala-virus	5
1.3. Lehmärokkovirus.....	6
1.4. Metaboliataso	7
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	8
2.1. Tutkimuslaji	8
2.2. Kokeiden aineisto ja järjestelyt	8
2.2.1. Metaboliamittaukset	9
2.2.2. Virusmääritykset	10
2.3. Tilastolliset analyysit	10
3. TULOKSET	12
3.1. Sukupuolen vaikutus lepo- ja rasisusmetaboliaan	12
3.2. Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus rasisusmetaboliaan	14
3.3. Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus lepometaboliaan	16
3.4. Yhdysvaikutukset	17
4. TULOSTEN TARKASTELU	19
Kiitokset	21
Kirjallisuus	21

1. JOHDANTO

Taudinaiheuttajat populaatiossa

Mikroparasiitit ja patogeenit ovat taudinaiheuttajia, jotka ovat mikroskooppisen pieniä esim. viruksia, bakteereja tai alkueläimiä. Parasiitit eli loiset tarvitsevat isäntälajin saadakseen tarvitsemansa energian ja lisääntyäkseen, minkä vuoksi ne ovat usein haitallisia isännilleen. Parasiiteilla voi olla merkittävä vaikutus isäntälajin selviytymiseen ja lisääntymiseen joko suoraan tai epäsuoran vaikutuksen kautta. Esimerkiksi ulkoloisen aiheuttama karvanlähtö voi altistaa eläimen muille taudinaiheuttajille tai kylmälle ja heikentää isäntälajin selviytymistä (Campbell & Reece 2005).

Virukset ovat solunsisäisiä loisia. Solun ulkopuolella virukset eivät pysty lisääntymään, vaan ne tarvitsevat isäntäsolun lisääntyäkseen. Virukset tunnistavat isäntäsolunsa solun pinnan reseptoreiden avulla ja tunkeutuvat solun sisään käyttäen isäntäsolun proteiinisynteesikoneistoa viruksen genomien ja proteiinien valmistamiseen. Osa viruksista on ns. lyyttisiä, eli ne tuhoavat isäntäsolun viruksen lisääntymisen jälkeen. Osa viruksista puolestaan on lysogeenisiä, eli ne käyttävät isäntäsolua lisääntyäkseen jatkuvasti tuhoamatta isäntäsoluaan (Madigan ym. 2006).

Erilaisten taudinaiheuttajien, kuten virusinfektioiden vaikutuksia isäntälajeihin tutkitaan paljon. Taudinaiheuttajat voivat olla haitallisia isäntälajeilleen, sillä esim. jotkin virusinfektiot voivat heikentää isäntälajin lisääntymistä (Telfer ym. 2005), alentaa hedelmällisyyttä (Feore ym. 1997) tai vaikeuttaa selviytymistä (Kallio ym. 2007). Patogeenit ovat usein kroonisia, eivätkä välttämättä aiheuta isäntälajilleen näkyviä oireita, mutta ne voivat silti olla haitallisia ja vaikuttaa jopa isäntälajinsa populaatiodynamiikkaan (Beldomenico ym. 2008).

Populaatiokoon ollessa suuri patogeenien määrä populaatiossa on useimmiten runsaimmillaan (Begon ym. 2006). Kuitenkin populaatioissa mm. yksilöiden sukupuolella, iällä ja lisääntymisvaiheella on merkitystä infektoitumisherkkydessä ja –alttiudessa patogeenin haitallisille oireille. Patogeeni saattaa aiheuttaa negatiivisia oireita vasta silloin kun olosuhteet ovat ankarat, kuten talvella ja silloin kun tiheys on suuri ja kilpailu resursseista kovinta.

Jyrsijöiden patogeenit ovat usein viruksia. Näistä yleisimpiä ovat hantavirukset, jotka kiertävät isäntälajinsa populaatiossa ja saattavat levitä myös ihmisiin, aiheuttaen jopa kuolemaan johtavia infektiotauteja (Vaheeri ym. 2008). Esimerkkejä hantavirusten sukuun kuuluvista viruksista ja niiden isäntälajeistaan ovat mm. Puumala-virus (metsämyyrä, *Myodes glareolus*), Dobrava (metsähiiri, *Apodemus flavicollis*), Hantaan (peltohiiri, *Apodemus agraris*) ja Sin Nombre (peurahiiri, *Peromyscus maniculatus*), joka leviää Pohjois-Amerikassa ja tautiin sairastuneista jopa 50 % johtaa kuolemaan (Plyusnin ym. 1996). Jyrsijöiden kannat vaihtelevat usein tietyissä sykleissä ja esim. metsämyyräkannat ovat tiheimmillään syksyllä 3-5-vuoden välein (Hansson & Henttonen 1985). Tiheissä myyräkannoissa virusten leviäminen on tehokasta myös muihin kuin varsinaiseen isäntälajiin, mikä näkyy myös ihmisillä myyräkuumetapauksien lisääntymisenä (Kallio ym. 2009).

Puumala-virus

Puumala-virus kuuluu hantavirusten sukuun. Hantavirukset ovat laajalle levinnyt ryhmä eläinperäisiä, jyrsijöissä syntyneitä viruksia. Jyrsijät toimivat hantavirusten kantajina ja esim. Puumala-viruksen isäntälaji on metsämyyrä, joka on Puumala-viruksen ainoa

isäntälaji (Kallio ym. 2007). Puumala-virus nimettiin vuonna 1980 sen löytöpaikan mukaan ja sitä esiintyy laajalti Euroopassa ja osittain myös Venäjällä.

Hantavirukset ovat vaipallisia negatiivisjuosteisia RNA viruksia, jotka leviävät kukin omassa isäntälajissaan (Vapalahti ym. 2003). Hantavirusinfektio on krooninen, eli isäntälajin puolustusmekanismit eivät tuhoa virusta ja viruksen replikoituminen on jatkuvaa. Hantavirukset leviävät horisontaalisesti, eli suoran tai välillisen viruskontaktin kautta, jolloin leviäminen on hyvin nopeaa tiheissä myyräkannoissa. Hantavirukset leviävät jyrsijöiden ulosteiden kosketuksesta tai ulosteiden saastuttaman ympäristön kautta. Tämän vuoksi taudin/virusten leviämisen oletetaan olevan tiheydestä riippuvaista (Mills ym. 1999). Hantaviruksista ainakin Puumala-viruksen tiedetään säilyvän infektoivana myös isäntälajinsa ulkopuolella, minkä vuoksi virus voi tarttua myös esim. ihmiseen, eikä tartunnassa tarvita näin ollen suoraa kontaktia myyrästä ihmiseen (Kallio ym. 2006).

Puumala-virus aiheuttaa ihmisillä myyräkuumetta (*nefropatia epidemica*) (NE), joka on munuaisoireinen verenvuotokuume. Tuhansia myyräkuume diagnooseja tehdään vuosittain Euroopassa (Vapalahti ym. 2003). Vuonna 2011 diagnosoituja myyräkuumetapauksia todettiin Suomessa 1786 kpl (<http://www3.ktl.fi/stat/>). Myyräkuumetta aiheuttava virus tarttuu ihmiseen hengitysteiden kautta usein pölyyn sitoutuneesta metsämyyrän ulosteista tai syljestä, mutta se ei tartu ihmisestä toiseen. Yleisimmät myyräkuumeen oireet ihmisillä ovat korkea kuume, päänsärky, vatsa- ja selkävivot, pahoinvointi ja lihaskivut (Pettersson ym. 2008). Kuolleisuus myyräkuumeeseen on hyvin alhainen, esimerkiksi Suomessa noin 0,1 % (Valtonen ym. 1995). Myyräkannat vaihtelevat paljon ja erityisesti tiheissä myyräkannoissa virusten leviäminen on tehokasta. Myyräkuumetapaukset ihmisillä yleistyvät aina myyrien runsastuessa, eli noin kolmen vuoden välein. (Vapalahti ym. 2003, Henttonen & Vaheri 2006, <http://www3.ktl.fi/stat/>) On mahdollista, että ilmaston muuttuessa myös myyrien elinotolot muuttuvat, mikä taas saattaa vaikuttaa viruksen dynamiikkaan ja ihmistartuntojen määriin.

Lehmärokkovirus

Puumala-viruksen ohella metsämyyristä on löydetty myös lehmärokkovirusta, jota esiintyy Euroopassa ja Länsi-Aasiassa. Metsämyyrän ohella lehmärokkoviruksen kantajia ovat lisäksi ainakin peltomyyrä (*Microtus agrestis*), peltohiiri (*Apodemus agrarius*) ja metsähiiri (*Apodemus flavicollis*) (Begon ym. 1999). Lehmärokkoviruksen esiintymisen on havaittu vaihtelevan vuodenaikojen mukaan, mutta kuitenkin syksyllä ja varsinkin uroksilla tapauksia on havaittu eniten (Hazel ym. 2000).

Lehmärokkovirus kuuluu eläinperäisiin ortopoxviruksiin, joista isorokkovirus lienee tunnetuin. Ortopoxvirukset ovat DNA-viruksia, jotka kiertävät isäntälajin populaatiossa. Lehmärokkoviruksen leviämistä isäntälajin populaatioiden sisällä ja lajien välillä ei tiedetä tarkasti, mutta sen oletetaan leviävän suoran kontaktin kautta (Baxby & Bennett 1999) aiheuttamatta kuitenkaan näkyviä oireita isäntälajilleen (Bennett ym. 1997). Lehmärokkoviruksen tiedetään kuitenkin vaikuttavan metsämyyrillä ja metsähiirillä mm. lisääntymiseen (Telfer ym. 2002) ja talvehtimiseen negatiivisesti (Telfer ym. 2005). Viruksen vaikutus kuitenkin vaihtelee vuodenaikojen mukaan, sillä kesällä lehmärokkoviruksen on havaittu lisäävän selviytymismahdollisuuksia, kun taas talvella se heikentää selviytymistä. Kesällä paremman selviytymisen arvellaan liittyvän infektoituneiden yksilöiden lisääntymisen lykkääntymiseen ja parantavan tällä tavoin selviytymismahdollisuuksia (Feore ym. 1997). Talvella lisääntyviä yksilöitä on joka tapauksessa vähemmän ja infektoituneiden yksilöiden selviytymisen on todettu olevan heikompaa kuin ei-infektoituneiden. Talvella jyrsijöiden kuolleisuus on riippuvainen

ravinnonsaannista ja näin ollen infektoituneiden yksilöiden on vaikeampi taistella virusta vastaan heikentyneen energiansaannin vuoksi (Telfer ym. 2002).

Lehmärokkovirus voi tarttua myös ihmiseen infektoituneesta jyr sijästä, kuten lemmikkirotasta, mutta tartunnan voi saada myös lemmikkikissoilta, jotka ovat syöneet infektoituneita jyr sijöitä. Euroopassa on tavattu viime vuosien aikana muutamia lehmärokkotapauksia ihmisillä (Ninove ym. 2009). Infektio tarttuu pienten ihorikkojen kautta ihmiseen ja iholle ilmaantuu 5-7 vuorokauden kuluttua punoittavia rakkuloita. Rakkuloiden lisäksi infektio voi aiheuttaa myös kuumetta, oksentelua ja lihassärkyä (Tarvainen ym. 2000). Lehmärokkoviruksen leviämisestä ja tarttumisesta ihmiseen on oltu huolissaan ympäri Eurooppaa (Vorou ym. 2008, Tarvainen ym. 2000, Ninove ym. 2009).

Lehmärokkovirusinfektio ei ole jyr sijöillä krooninen, toisin kuin hantavirusinfektiot, vaan tartunta kestää yleensä noin 4 viikkoa (Telfer ym. 2005). Lehmärokkoviruksen on osoitettu kuitenkin vaikuttavan haitallisesti ainakin peltomyyrän selviytymiseen luonnossa (Burthe ym. 2008), mutta laboratorio-olosuhteissa virus ei ole lisääntynyt kuolleisuutta myyrillä tai hiirillä (Bennett ym. 1997)..

Metaboliataso

Metabolia eli aineenvaihdunta perustuu solun kemiallisiin reaktioihin, joiden avulla solu pilkkoo ravintoaineita ja vapauttaa energiaa eliön käyttöön. Eliöt tarvitsevat energiaa tärkeiden peruselintoimintojen ylläpitämiseen, mutta sen lisäksi myös mm. liikkumiseen, saalistukseen, lisääntymiseen ja puolustukseen Resurssiallokaatioteorian mukaan eliöllä on käytettävissään rajoitettu määrä energiaa peruselintoimintojen lisäksi, joka voidaan suunnata mm. puolustukseen (Campbell & Reece 2002).

Perusmetaboliataso tai lepometaboliataso mitataan eliön ollessa levossa ja maksimaalinen metaboliataso, joka mitataan rasituksen aikana, vaihtelevat sekä lajien sisällä että välillä. Pienten nisäkkäiden maksimaalinen metaboliataso voidaan määrittää mittaamalla korkeinta hapen kulutuksen tasoa (VO_{2max}) joko kylmäältistuksella tai pakottamalla fyysiseen rasitukseen (Rezende ym. 2004). Eliön energiantarve voidaan määrittää myös mittaamalla yksilön hengityksen CO_2 -pitoisuutta, kuten Trebatickan ym. (2007) tutkimuksessa tehtiin. Korkea aerobinen kapasiteetti voi olla merkinä yksilön hyvästä fyysisestä kunnosta ja näin edesauttaa esim. saalistajan uhatessa (Boratynski & Koteja 2009).

Metaboliatason (levossa/rasituksessa) yhteyttä selviytymiseen ei vielä tiedetä. Vuodenajasta riippuen, alhainen metaboliataso voi merkitä alhaisempia kustannuksia peruselintoiminnoissa (Speakman ym. 2004) ja näin ollen edesauttaa selviytymistä, tai se voi myös alentaa yksilön selviytymistä, johtuen heikommasta kyvystä selviytyä fyysisesti ankarissa olosuhteissa (Król ym. 2003). Aiempien tutkimusten mukaan tiedetään, että rasitusmetaboliataso ennemmin kuin perusmetaboliataso vaikuttaa yksilön kelpoisuuteen metsämyyrillä (Boratynski & Koteja 2009). Ei ole kuitenkaan selvää, mikäli korkea maksimaalinen metaboliataso on suhteessa korkeampaan vai alhaisempaan selviytymiseen. Esimerkiksi korkea maksimaalinen metaboliataso voi tarkoittaa parempaa yksilöllistä kuntoa ja siinä mielessä parempia mahdollisuuksia hengissä selviytymiseen, esimerkiksi patogeenin tai saalistajan uhatessa. Toisaalta korkea aktiivisuustaso voi altistaa patogeenille tai pedoille ja johtaa huonompaan selviytymiseen (Boratynski & Koteja 2009).

Metaboliatasoon vaikuttaa moni asia, kuten lämpötila, ikä, lisääntymisvaihe sekä muut stressitekijät, kuten saalistusriski (Trebaticka ym. 2007). Yhteistä kaikille kuitenkin on, että mitä korkeampi metaboliataso on (mitä enemmän energiaa tarvitaan ”stressitilanteiden sietämiseen”) sitä alhaisempi on kyky sopeutua johonkin toiseen energiaa vaativaan toimintaan, kuten selviytymiseen, lisääntymiseen tai immunologisiin toimintoihin.

Tutkimuksessa on tarkoituksena selvittää ns. myyräkuumeen aiheuttajan, Puumala-viruksen ja lehmärokkoviruksen vaikutusta metsämyyrän lepo- ja rasismetaboliatasoon. Aiemmissä tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että Puumala-virus infektoituneiden yksilöiden selviytyminen on huonompaa, mutta perimmäinen syy on vielä selvittämättä. Puumala-viruksen suhteen kroonisesti infektoituneen isäntälajin immuunipuolustus vaatii jatkuvasti energiaa ja eläin saattaa joutua koetukselle ankarissa olosuhteissa ravinnon saatavuuden ollessa huonompaa. Infektoituneen yksilön metaboliataso saattaa olla korkeampi ja energian tarve suurempi, mikä voi näin ollen vaikeuttaa talven yli selviämistä (Kallio ym. 2007). Puumala-virus eikä lehmärokkovirus aiheuta myyrissä näkyviä oireita, mutta ne voivat silti vaikuttaa infektoituneen yksilön kelpoisuuteen aineenvaihdunnan kautta. Oletuksena on, että infektoituneiden yksilöiden metaboliataso on korkeampi, millä saattaa olla vaikutusta yksilön kelpoisuuteen tai lisääntymiseen.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Tutkimuslaji

Metsämyyrä on yksi Suomen yleisimmistä myyrälajeista ja nisäkkäistä. Metsämyyrä on pieni jyrsijä, joka on yleinen koko Pohjois-Euroopassa ja sitä käytetään paljon tutkimustarkoituksessa, koska se lisääntyy helposti myös laboratorioissa ja niitä on helppo pyydystää (Oksanen ym. 2007). Metsämyyrän pääasiallisia elinympäristöjä ovat metsät ja pellot ja niiden ravinto koostuu versoista, marjoista, siemenistä ja sienistä (Hansson & Henttonen 1985).

Suomessa metsämyyrien lisääntymiskausi kestää toukokuusta syyskuulle, jonka aikana naaraat synnyttävät jopa neljä poikuetta 4-8 poikasta kerrallaan (Koivula ym. 2003). Metsämyyrät pystyvät lisääntymään jo 3-4 viikon ikäisinä, mutta yleensä vain ensimmäisen poikueen yksilöt lisääntyvät jo samana kesänä (Mappes ym. 1995). Metsämyyräpopulaatioiden kannan tiheydet vaihtelevat sekä kausittain että vuosittain. Kannan tiheydet voivat vaihdella 3-5 vuoden välein jopa satakertaisesti pohjoismaissa (Hansson & Henttonen 1985).

Lisääntymiskauden aikana sukukypsät naaraat elävät kukin omilla reviireillään ja naaraspoikasetkin asettuvat lähelle synnyinpaikkaansa. Koiraat taas liikkuvat huomattavasti suuremmilla alueilla (Bondrup-Nielsen & Karlsson 1985).

2.2. Tutkimusaineisto ja suunnittelu

Metsämyyrän luonnollista populaatiota seurattiin Helsingin yliopiston Lammin biologisen aseman läheisyydessä olevalla n. 2-3 ha:n alueella (61° 1' N, 16° 2' E). Alueen metsätyyppi oli tuoretta kuusimetsää ja lisäksi hyvin monipuolinen kasvillisuudeltaan. Puusto koostui pääasiassa kuusista ja männyistä, mutta osa alueesta oli hyvin tiheää koivikkoa. Alueen etelärinne rajautui Lammin Pääjärveen, länsi- ja pohjoisraja metsäautotiehen/polkuun. Itäraja rajautui tiheään koivikkoon ja luonnonsuojelualueen reunaan, joka oli lehtoa.

Tutkimusalueen myyräpopulaatiota seurattiin merkintä-takaisinpyyntimenetelmällä, käyttäen Ugglan elävänä pyytäviä pyydyksiä, joissa käytettiin syöttinä perunaa ja kauraa sekä joskus auringonkukan siemeniä. Pyydykset (130 kpl) oli sijoitettu tasaisesti alueelle sekä populaation liikkumisen seurannan vuoksi myös alueen rajoille.

Myyräpopulaation seuranta ja pyynti aloitettiin 30.5.2011 ja suoritettiin kaksi kertaa päivässä aamuin illoin 4 vrk ajan joka kolmas viikko 29.7.2011 saakka. Kaikki kiinniotetut yksilöt tuotiin kunkin seurantajakson ensimmäisenä päivänä laboratorioon, jossa ne merkittiin yksilöllisesti korvamärkein tarkistettiin sukupuoli ja lisääntymisvaihe, sekä

punnittiin 0,5 gramman tarkkuudella Pesola –jousivaa’alla ja otettiin verinäyte myyrän silmäkulmasta lasikapillaarin avulla noin 18 μ l (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Saksa). Kapilaarista veri tyhjennettiin muovisiin näyteputkiin. Näytteitä säilytettiin pakastettuina verinäytteiden analysointiin saakka. Viikon muina päivinä mittauksia varten laboratorioon tuotiin vain uudet kiinniotetut yksilöt.

Kantavat naaraat otettiin laboratorioon synnyttämään, missä niiden tilaa seurattiin päivittäin. Naarat asuivat häkeissä, missä niillä oli purua ja heinää kuivikkeena sekä pellettejä ja vettä ravintona. Poikasten synnyttyä poikueen koko tarkastettiin ja poikasten syntymäpaino mitattiin. Emo ja poikaset vapautettiin takaisin emon kiinniottopaikalle noin 10 vrk:n jälkeen poikasten syntymästä.

2.2.1. Metaboli mittaukset

Metaboli mittaukset aloitettiin 13.6.2011 harjoittelemalla ja testaamalla respirometrilaitteen (LI-COR, LI-7000 CO₂/H₂O Analyser, Lincoln, Nebraska, USA) toimintaa, joka oli kytkettynä tietokoneessa olevaan analysointiohjelmaan (ExpeData, Sable Systems Inc. Las Vegas, Nevada, USA). CO₂ ja kosteus poistettiin tuloilmasta suodattamalla ne soda lime kemikaalin ja silica geelin läpi ennen mittauskammioihin pääsyä. Virtausnopeus säädettiin (mass flow controller, Sierra Instruments, Monterey, California, USA) mahdollisimman korkealle, n. 85 % eli 1700 ml/min, mutta jokaisen yksilön virtausnopeus kirjattiin mittauksen ajalta ylös tulosten analysointia varten. Myyrien tuottama CO₂ –pitoinen ilma kulki vielä kolmen suodattimen läpi, jotka poistivat hengityskaasuista kosteutta ennen CO₂ analysointia. Tiedot tallentuivat sekunnin välein analysointiohjelmaan. Pilottitestit suoritettiin myyrillä, jotka eivät olleet tutkimusalueeltamme kiinniotettuja myyriä.

Alueen myyräpopulaation metaboli mittaukset tehtiin kesän aikana yhteensä 73 metsämyyrälle. Myyrät laitettiin kukin omaan häkkiin, jossa niillä oli kuivikkeita sekä ruokaa ja vettä. Myyriä pyrittiin pyytämään vain sen verran kerrallaan, jotta laboratorioissa vietetty aika ei ylittäisi 24 h ja niitä pidettiin omissa häkeissään inkubointikaapissa +25 asteen lämpötilassa.

Ensimmäisenä mittauspäivänä laboratorioon tuotaessa myyrien lepo- ja rasisitusmetaboliataso mitattiin respiometrillä juoksupyörän avulla ja toisena mittauspäivänä rasisitusmetaboliaa mitattiin laittamalla myyrät uimakammioon uimaan, joka oli kiinnitetty respiometriin. Ennen kumpaakin mittausta myyrät olivat ilman ruokaa ja vettä tunnin ajan.

Ensimmäisen päivän mittaukset suoritettiin inkubointikaapissa +25 asteen lämpötilassa, jossa myyrät laitettiin tiivistettyyn muovilaatikkoon, johon oli rakennettu juoksupyörä. Laatikko oli kiinnitetty ilmaputkien välityksellä respirometrilaitteeseen. Myyrät olivat laatikossa ensin 30 min tottuakseen uuteen ympäristöön, jonka jälkeen lepometaboliatasoa mitattiin 20 min ajan myyrien ollessa käytännössä paikallaan. Rasisitusmetaboliataso mitattiin juoksupyörän avulla, jossa myyrät juoksivat 12,5 min, kun juoksupyörän nopeus oli 25 r/min. Käytännössä kaikki myyrät eivät osanneet juosta kunnolla, vaan osa myyristä liukui ja yritti jarruttaa juoksupyörää vastaan. Lisäksi osa myyristä kiipesi juoksupyörän keskiakselin päälle ja odotti siellä kunnes juoksupyörä pysähtyi. Myyrät joutuivat kuitenkin koko ajan aktiivisesti liikkumaan testin aikana. Juoksun jälkeen myyrien annettiin levätä vielä 20 min, jotta nähtäisiin mille tasolle myyrän metaboliataso laskee rasisituksen jälkeen.

Toisen päivän mittaukset tehtiin uimakammiossa (suuri kannellinen lasipurkki), joka oli täytetty vedellä (+30 °C) siten, että myyrät eivät ulottuneet ottamaan pohjasta tukea, mutta niiden pään yläpuolelle jäi myös runsaasti tilaa. Lasipurkki laitettiin isoon muovilaatikkoon, joka myös täytettiin vedellä (+30 °C) ja lisäksi veteen upotettiin

lämmitin, joka piti veden lämpötilan vakiona. Ennen uimakammioon siirtämistä myyrät kastettiin ensin saippuaveteen, jotta ne eivät kelluisi laitettaessa ne veteen. Saippuavesi oli myös +30 asteista. Heti saippuaveteen kastamisen jälkeen myyrä laitettiin uimakammioon uimaan, jossa myyrät uivat keskimäärin 8-12 min riippuen kunkin myyrän uimataidosta. Jos myyrä keskeytti uimisen, se nostettiin pois vedestä ja mittaus keskeytettiin. Testien jälkeen myyrät palautettiin takaisin luontoon niiden kiinniottopaikalle.

2.2.2. Virusmääritykset

Myyriltä otetut verinäytteet analysoitiin Helsingissä virologian laitoksella. Verinäytteiden analysoinnissa käytettiin immunofluoresenssianalyysia (IFA), joka on yleisesti käytetty menetelmä, joka perustuu elimistön virusta vastaan kehittämien vasta-aineiden osoittamiseen verinäytteestä. Käytetty menetelmä havaitsee pitkäkestoiset IgG-vasta-aineet (Pelkonen ym. 2003, Kinnunen ym. 2011).

2.3. Tilastolliset analyysit

Respirometri-laite oli kytkettynä metaboliamittausten aikana tietokoneeseen, jossa ExpeData analysointiohjelma piirsi kunkin yksilön CO₂ pitoisuudesta mittauskäyrän (Kuva 1). ExpeData analysointiohjelman avulla kunkin myyrän maksimaalinen metaboliataso (CO₂ ml/h) määritettiin mittauskäyrästä otetun yhtäjaksoisen 1 min huipun keskiarvona uinti- ja juoksutuloksista ja lepometaboliataso mittauskäyrän alimman yhtäjaksoisen 1 min keskiarvona juoksusuoritusta ennen ja jälkeen olleista mittauksista (Kuva 2). Kaikkien yksilöiden mittaustuloksille tehtiin ennen keskiarvon analysointia mittauskäyrän korjaus ja lineaarinen muunnos. Analysoinnissa otettiin huomioon kunkin yksilön mittauksessa käytetty virtausnopeus. Lämpötilaksi uintituloksia analysoitaessa asetettiin +30 °C, joka oli myyrrien uimaveden lämpötila ja juoksutulosten sekä lepometabolian analysoinnissa +25 °C, joka oli inkubointikaapin lämpötila.

Tilastolliset analyysit tehtiin PASW Statistic 18.0 ohjelmalla. Painon ja metaboliatason riippuvuus testattiin lineaarisella regressiolla. Koska metaboliataso oli hyvin vahvasti riippuvainen yksilön painosta, käytettiin muuttujien (sukupuoli, Puumalavirus ja lehmärokkovirus) vaikutuksien testaamisessa metaboliatason standardoituja jäännöksiä. Ennen jäännösten laskemista painolle ja metaboliatasolle tehtiin logaritimuunnokset, sillä muuttujat eivät olleet normaalijakauman mukaisia. Varianssien yhtä suuruus testattiin Levenen testillä, eikä tilastollisesti merkitsevää heterogeenisyyttä ollut havaittavissa.

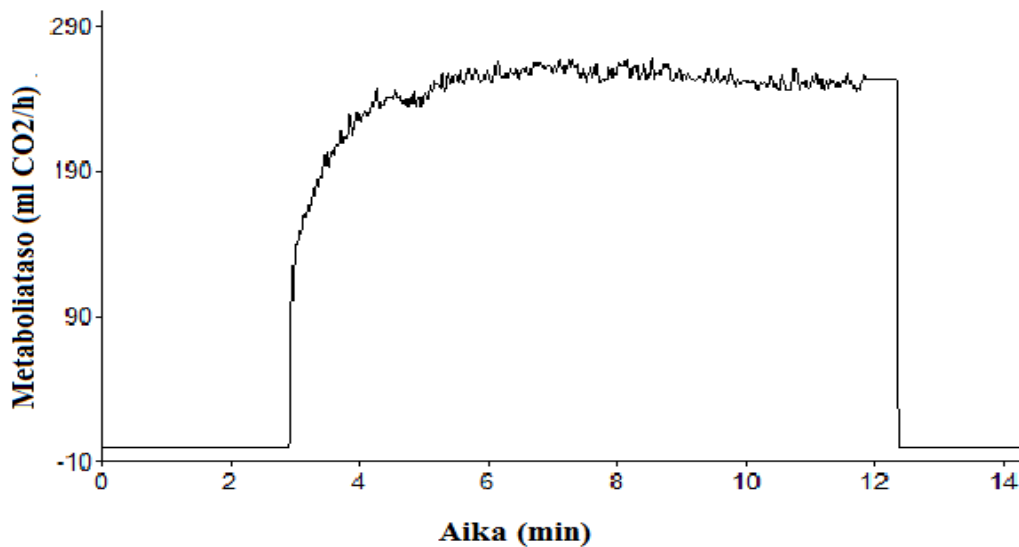
Sukupuolen, Puumalaviruksen ja lehmärokkoviruksen vaikutusta metaboliatasoon testattiin varianssianalyysillä (UNIANOVA). Riippuvana muuttujana käytettiin rasisetusmetaboliatason standardoituja jäännöksiä, jotta painon aiheuttama vaihtelu metaboliatasoon saatiin suljettua muuttujien vaikutuksesta pois.

Yhteensä 66 metsämyyrän rasisetusmetabolia pystyttiin mittaamaan uimalla kesän 2011 aikana. Loput 7 myyrää 73: sta mittauksissa olleista myyristä eivät kyenneet uimaan riittävän kauan, jotta mittaustulokset olisivat olleen luotettavia. Lisäksi yhden myyrän mittaustulokset piti jättää tulosten ulkopuolelle, sillä se poikkesi muista mittauksista selvästi ja yksi hyvin pienikokoinen myyrä jätettiin tulosten analysointien ulkopuolelle, koska yksilön verinäytteen Puumalaviruksen vasta-aineet saattavat olla peräisin sen emolta.

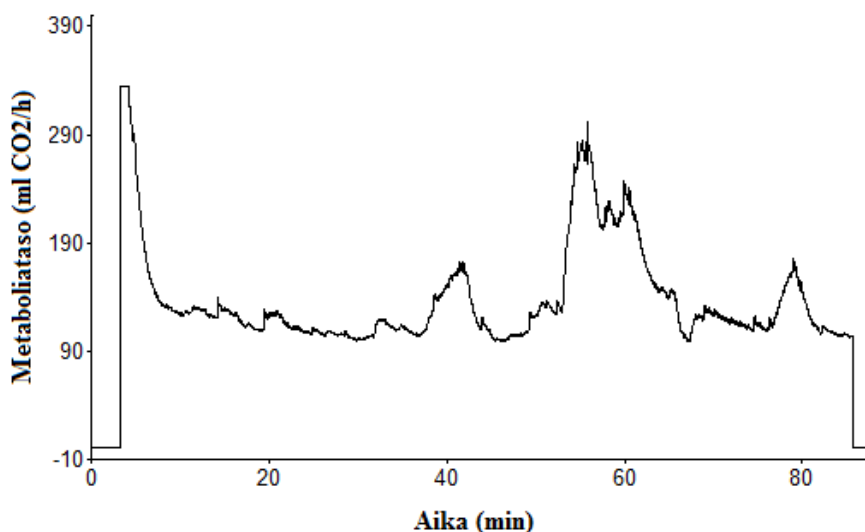
Yhteensä siis 64 myyrän rasisetusmetabolian mittaustulokset olisi pystytty määrittämään uiden. Näiden 64 myyrän rasisetusmetaboliatasojen tuloksia haluttiin tarkastella myös juoksemalla testatuille myyrille sekä lepometaboliatasot ennen juoksusuoritusta ja juoksusuorituksen jälkeen. Näistä 64: stä myyrästä kahden yksilön tulokset poikkesivat kuitenkin lepometaboliaa mitattaessa juoksupyörälaatikossa hyvin

paljon muista, joten ne jätettiin tulosten analysoinnin ulkopuolelle (Kuva 3). Kyseiset myyrät eivät pysyneet lainkaan paikoillaan lepometabolialla mitattaessa ja tulokset eivät sen vuoksi olleet verrannollisia muihin mittaustuloksiin. Näin ollen yhteensä 62 metsämyyrän lepometaboliatulokset analysoitiin ennen juoksusuoritusta ja juoksusuorituksen jälkeen ja rasisusmetaboliatulokset analysoitiin sekä uiden että juosten.

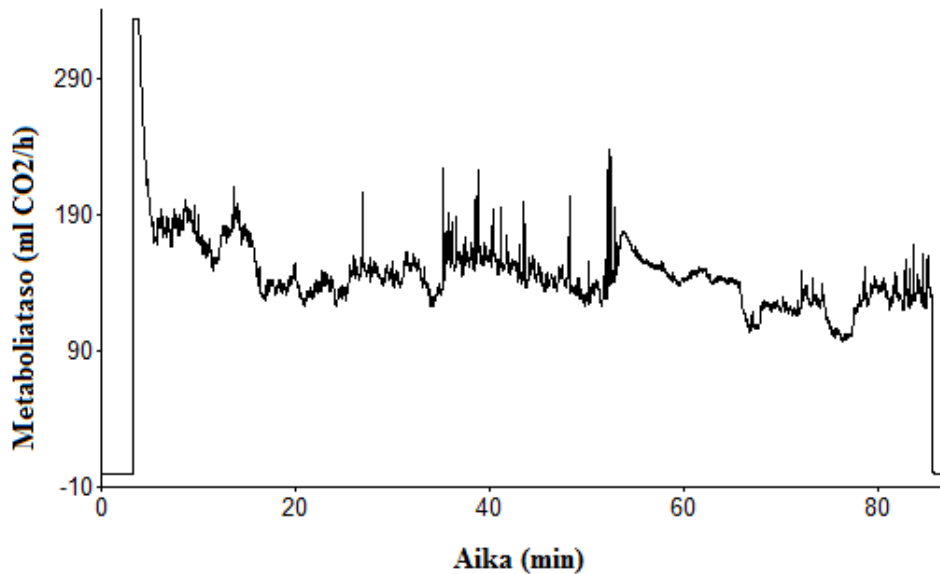
Uimalla saadut mittaustulokset olivat kaikkien mitattujen myyrien osalta tasaisempia, koska myyrillä ei ollut muita keinoja selviytyä vedessä kuin uida. Juoksupyörälaatikossa tehdyt mittaukset poikkesivat toisistaan myyrien erilaisen käyttäytymisen vuoksi enemmän, koska osa myyristä ei pysynyt lepometabolialla mitattaessa paikoillaan lainkaan ja juoksusuorituksissa oli vaihtelua.



Kuva 1. Yhden metsämyyrän uimalla mitatun rasisusmetaboliomittauksen tuloskäyrä, josta määritettiin ExpeData tietokoneohjelman avulla minuutin yhtäjaksoisen huipun keskiarvon avulla myyrän rasisusmetabolian maksimiarvo.



Kuva 2. Yhden myyrän lepo- ja rasisusmetaboliomittauksen mittauskäyrä juoksupyörälaatikossa, missä alussa (3-33 min) totuttautumis- ja lepojako (33-53 min) sekä juoksusuoritus (53-65,5 min) ja lopussa vielä lepojako.



Kuva 3. Tuloksien analysoinnin ulkopuolelle jätetyn myyrän mittauskäyrä juoksupyörälaatikossa, mistä on vaikea erottaa varsinaista lepojaksota (33-53 min) ja rasitusjaksoa (53-65,5 min) (verrattuna kuva 2)

3. TULOKSET

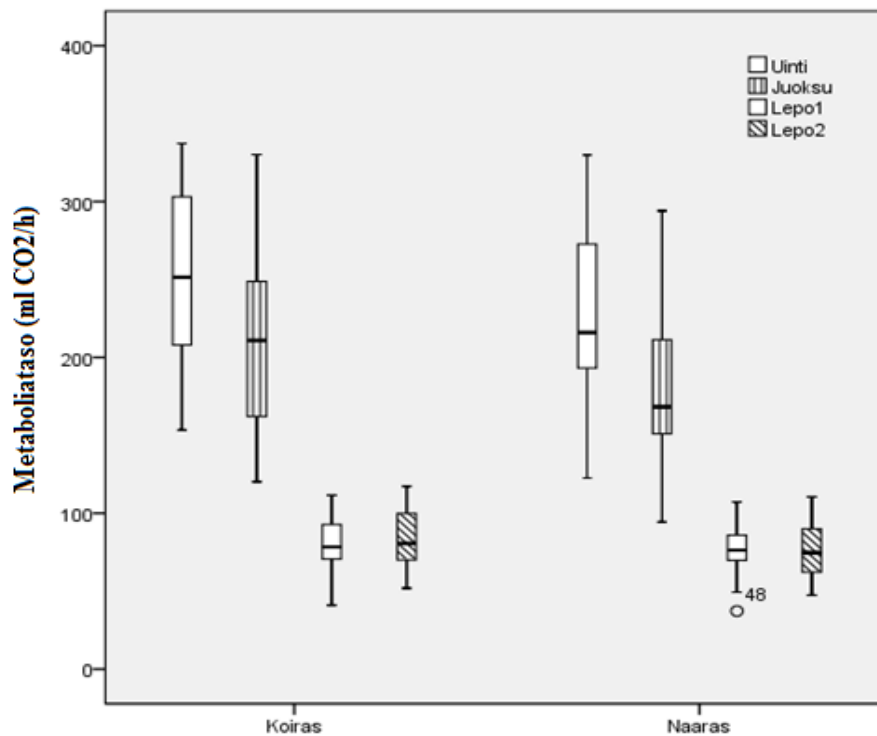
3.1. Sukupuolen vaikutus lepo- ja rasitusmetaboliaan

Yhteensä 62 metsämyyrän mittauksia analysoitiin. Myyristä 25 oli naaraita ja 37 koiraita (Taulukko 1, kuva 4). Rasitusmetaboliataso uimalla mitattuna vaihteli 122,63 – 337,28 ml CO₂/h välillä (SD ±58,04). Naaraiden keskiarvo oli 226,50 ml CO₂/h ja keskihajonta (SD ±58,18), joka on alhaisempi kuin koiraiden 250,98 ml CO₂/h (SD ±56,59), mutta sukupuolten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA, F₆₂ = 3,501, P = 0,066). Rasitusmetabolia juosten mitattuna vaihteli 94,32 – 330,13 ml CO₂/h välillä (SD ±56,67). Naaraiden keskiarvo oli 183,20 ml CO₂/h (SD ±52,26) ja koiraiden 213,47 ml CO₂/h (SD ±56,93). Naaraiden rasitusmetabolia myös juosten oli alhaisempi kuin koiraiden ja niiden välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero (ANOVA, F₆₂ = 7,348, P = 0,009)(Kuva 4).

Lepometabolia ennen juoksua mitattuna vaihteli 37,26 – 111,59 ml CO₂/h välillä (SD ±16,35). Naaraiden keskiarvo oli 76,25 ml CO₂/h (SD ±15,81) ja koiraiden 79,07 ml CO₂/h (SD ±16,81). Naaraiden ja koiraiden välillä ei ollut eroa ennen juoksua lepometaboliassa (ANOVA, F₆₂ = 0,017, P = 0,897). Lepometabolia mitattiin myös juoksusuorituksen jälkeen ja tällöin metaboliataso vaihteli 47,44 – 117,29 ml CO₂/h välillä (SD ±17,98). Naaraiden keskiarvo oli lähes sama kuin ennen juoksua, eli 77,39 ml CO₂/h (SD ±17,79) ja koiraiden 83,39 ml CO₂/h (SD ±17,94). Sukupuolten välillä ei lepometaboliassa juoksusuorituksen jälkeenkään ollut eroa (ANOVA, F₆₂ = 0,358, P = 0,358; Kuva 4).

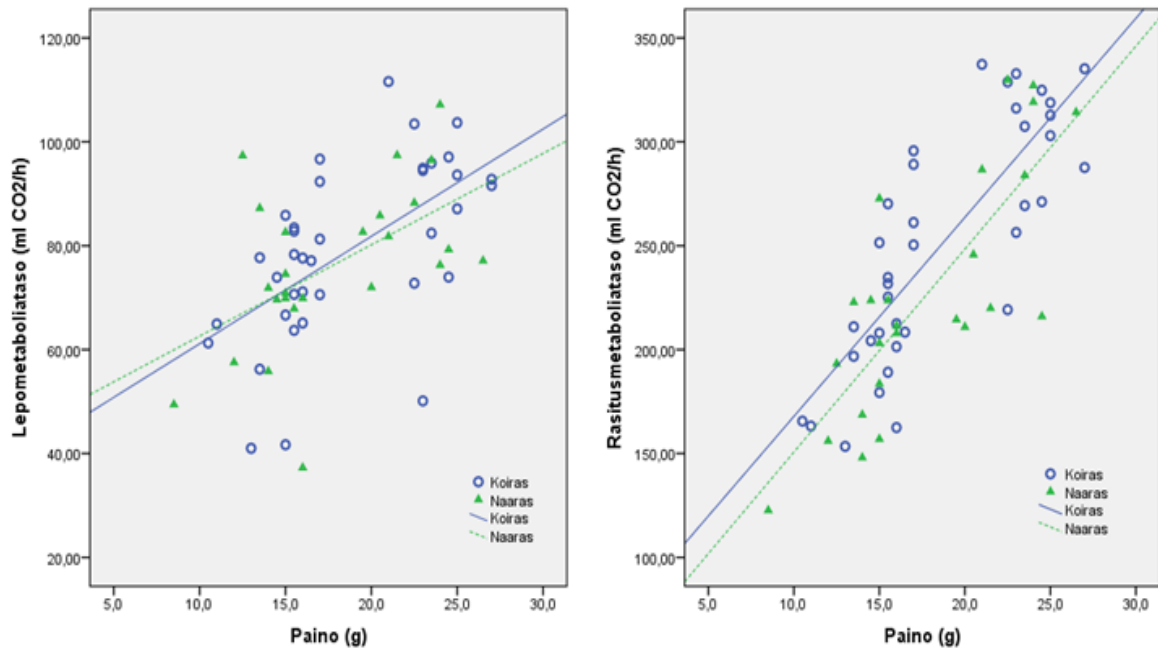
Taulukko 1. Naaras- ja koirasyksilöiden rasitus- ja lepometaboliatasojen keskiarvot ja keskihajonnat. (U = uimalla mitattu, J = juoksupyörällä mitattu, 1 = ennen juoksua, 2 = juoksun jälkeen)

	Naaras			Koiras		
	n	KA	SD	n	KA	SD
Paino (g)	25	17,8	4,75	37	18,7	4,78
Metaboliataso (U)(mlCO ₂ /h)	25	226,5	58,18	37	250,98	56,59
Metaboliataso (J)(mlCO ₂ /h)	25	183,2	52,26	37	213,47	56,93
Lepometabolia(1)(mlCO ₂ /h)	25	76,25	15,82	37	79,07	16,81
Lepometabolia(2)(mlCO ₂ /h)	25	77,39	17,79	37	83,39	17,94



Kuva 4. Koiras- ja naarasyksilöiden uiden ja juosten mitatut rasitusmetaboliatasot sekä ennen ja jälkeen juoksuosuoritusta mitatun lepometaboliatasojen keskiarvot, kvartiilit ja minimi- ja maksimi-arvot.

Kaikkien yksilöiden paino mitattiin ja se vaihteli 8,5-27,0 g:n välillä, keskiarvon ollessa 18,31 g (SD ±4,75). Naaraiden painon keskiarvo oli 17,7 g (SD ±4,75) ja koiraiden 18,7 g (SD ±4,78). Paino korreloi vahvasti sekä lepo- että rasitusmetaboliatasojen kanssa (Lepo: Pearsonin korrelaatio: $r = 0,568$, $n = 62$, $P < 0,001$ ja Uinti: Pearsonin korrelaatio, $r = 0,802$, $n = 62$, $P < 0,001$; Kuva 5).

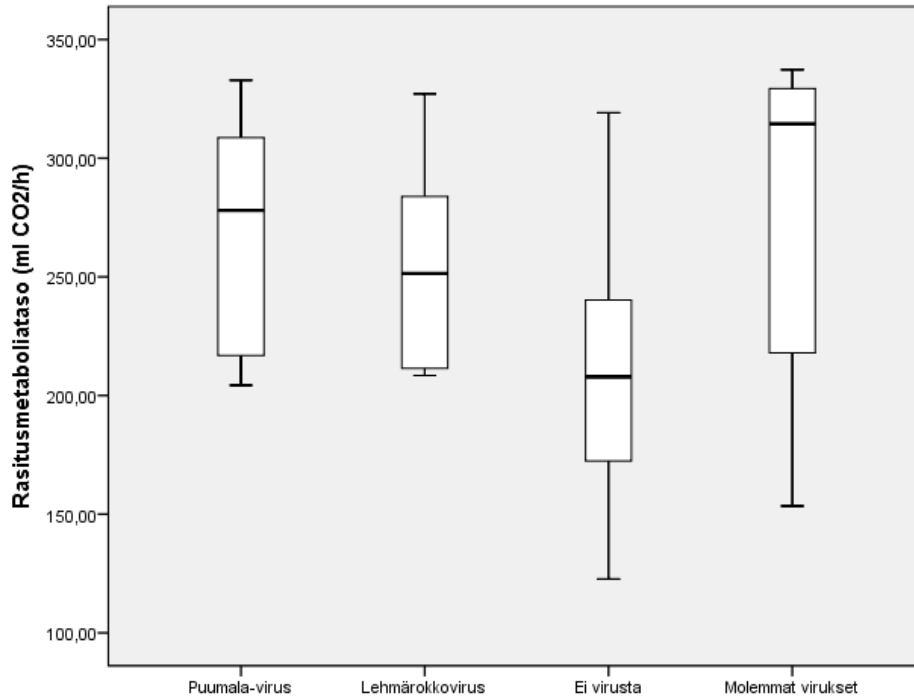


Kuva 5. Painon ja metaboliatason välinen korrelaatio. Vasemmalla ennen juoksuvoitusta mitatun lepometabolian ja painon välinen korrelaatio ja oikealla uimalla mitatun rasitusmetabolian ja painon välinen korrelaatio.

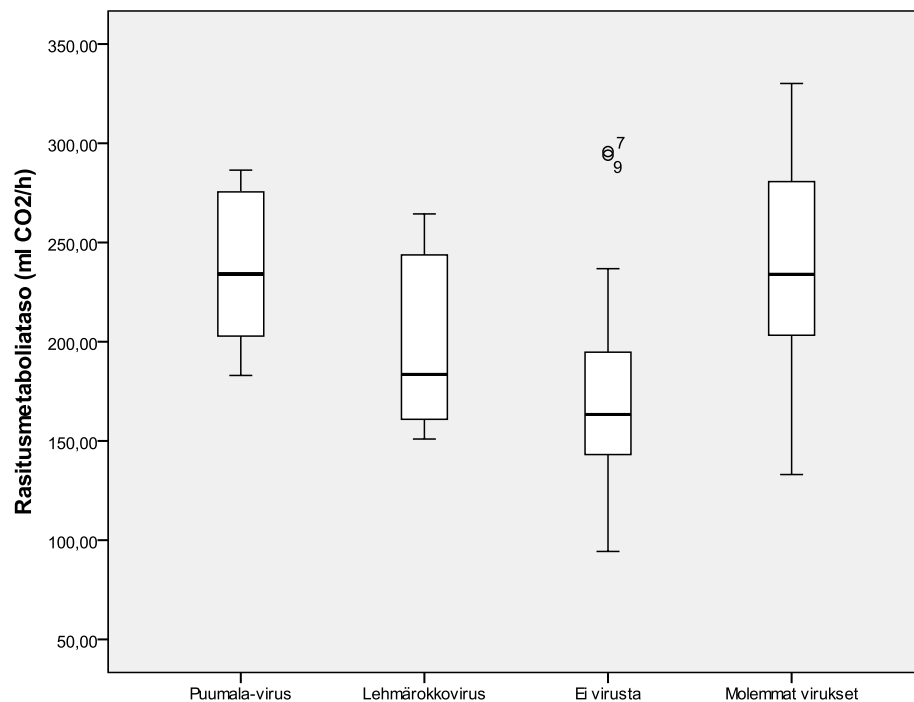
3.2. Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus rasitusmetaboliaan

Kaikkien mitattujen myyriä verinäytteet analysoitiin. Puumala-virus infektioituneita myyriä oli 24 kpl, joista naaraista oli 8 kpl eli 32 % naaraista oli infektioituneita ja koiraita 16 eli noin 43 % koiraista oli infektioituneita. Ei-infektioituneita myyriä oli 38 kpl, joista naaraista 17 kpl eli 68 % ja koiraita 21 kpl eli noin 57 %. Kaikkien ei-infektioituneiden yksilöiden rasitusmetabolian keskiarvo uimalla mitattuna oli 220,61 ml CO₂/h (SD ±49,54) ja infektioituneiden 273,56 ml CO₂/h (SD ±56,51). Infektioituneiden ja ei-infektioituneiden, myyriä rasitusmetaboliassa ei ollut tilastollisesti eroa (ANOVA F₆₂ = 0,591, P = 0,445). Juosten mitattuna Puumala-virusinfektioituneiden rasitusmetabolian keskiarvo oli 236,72 ml CO₂/h (SD ±49,26) ja ei-infektioituneiden 178,88 ml CO₂/h (SD ±49,56) (Taulukko 2). Rasitusmetaboliassa ei ollut eroa myöskään juosten mitattuna (ANOVA, F₆₂ = 0,125, P = 0,725).

Lehmärokkovirusinfektioituneita myyriä oli 21 kpl, joista naaraista oli 8 kpl, eli 32 % naaraista ja koiraita 13 kpl eli noin 35 % koiraista. Ei-infektioituneita myyriä oli 41 kpl, joista naaraista 17 kpl eli 68 % naaraista ja koiraita 24 kpl eli noin 65 %. Ei-infektioituneiden yksilöiden rasitusmetabolian keskiarvo oli uimalla mitattuna 226,85 ml CO₂/h (SD ±53,88) ja infektioituneiden 268,93 ml CO₂/h (SD ±56,90). Infektioituneiden ja ei-infektioituneiden yksilöiden välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa (ANOVA, F₆₂ = 0,429, P = 0,515) (Kuva 7). Juosten mitattuna lehmärokkovirusinfektioituneiden rasitusmetabolian keskiarvo oli 221,95 ml CO₂/h (SD ±55,91) ja ei-infektioituneiden 190,67 ml CO₂/h (SD ±54,72). Myöskään juosten mitattuna infektioituneiden ja ei-infektioituneiden välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa (ANOVA F₆₂ = 0,429, P = 0,515).



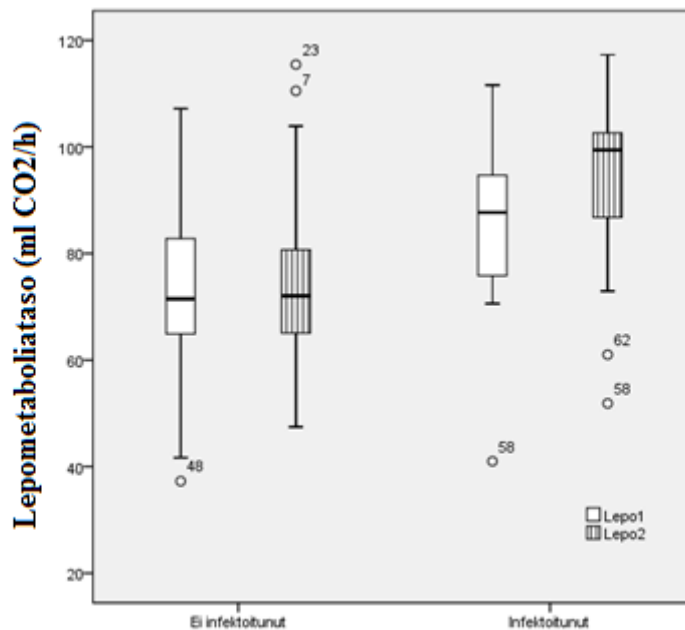
Kuva 6. Puumala-virus- ja lehmärokkovirusinfektoituneiden sekä ei-infektoituneiden yksilöiden rasiitusmetaboliatason keskiarvot, kvartiilit ja minimi- ja maksimi-arvot uimalla mitattuna.



Kuva 7. Puumala-virus- ja lehmärokkovirusinfektoituneiden sekä ei-infektoituneiden yksilöiden rasiitusmetaboliatason keskiarvot, kvartiilit ja minimi- ja maksimi-arvot juosten mitattuna.

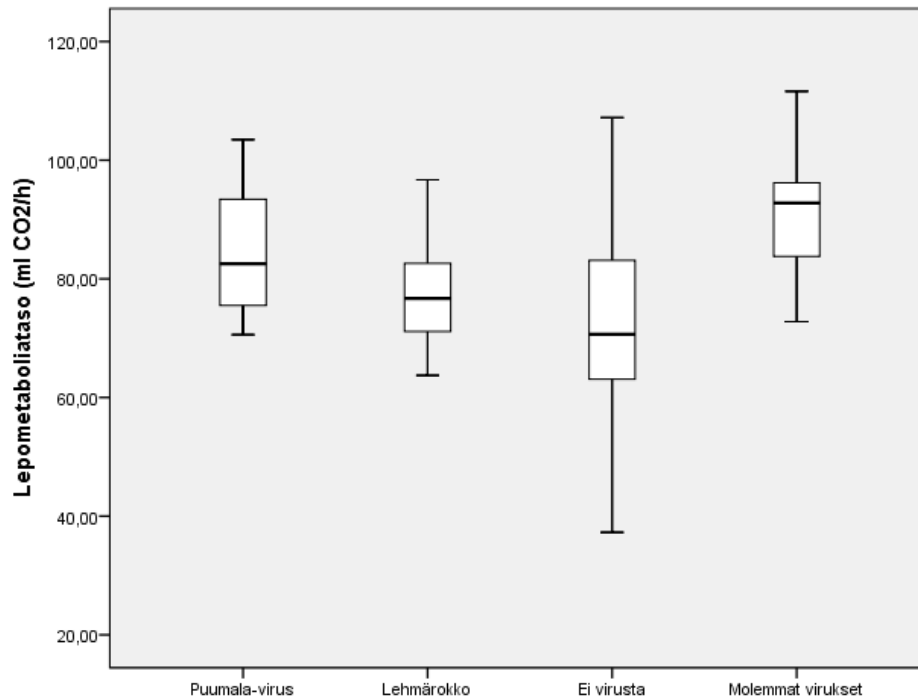
3.3. Puumala- ja lehmärokkoviruksen vaikutus lepometaboliaan

Lepometabolian ennen juoksusuoritusta mitattaessa Puumala-virusinfektoituneiden keskiarvo oli 85,69 ml CO₂/h (SD ±14,64) ja ei-infektoituneiden 73,03 ml CO₂/h (SD ±15,61). Infektoituneiden ja ei-infektoituneiden välillä ei ollut eroa metaboliatasossa ennen juoksusuoritusta (ANOVA, $F_{62} = 0,125$, $P = 0,725$). Juoksusuorituksen jälkeen metaboliataso infektoituneilla oli 93,07 ml CO₂/h (SD ±15,85) ja ei-infektoituneilla 73,33 ml CO₂/h (SD ±14,90). Juoksusuorituksen jälkeen infektoituneiden myyrien lepometaboliataso oli korkeampi kuin ei-infektoituneiden, mutta niiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA $F_{62} = 2,809$, $P = 0,099$)(Kuva 8).



Kuva 8. Juoksusuorituksen jälkeen Puumala-virusinfektoituneiden ja ei-infektoituneiden myyrien maksimi- ja minimiarvot, kvartiilit ja keskiarvot.

Lehmärokkovirusinfektoituneiden myyrien lepometabolian keskiarvo ennen juoksusuoritusta oli 83,30 ml CO₂/h (SD ±15,93) ja ei-infektoituneiden 75,18 ml CO₂/h (SD ±16,06). Infektoituneiden ja ei-infektoituneiden välillä ei ollut eroa (ANOVA $F_{62} = 0,007$, $P = 0,935$) (Kuva 9). Juoksusuorituksen jälkeen lepometaboliataso infektoituneilla oli 85,72 ml CO₂/h (SD ±19,17) ja ei-infektoituneilla 78,53 ml CO₂/h (SD ±17,07), mutta myöskään tällöin ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (ANOVA $F_{62} = 1,314$, $P = 0,256$).



Kuva 9. Puumala- ja lehmärokkovirusinfektoituneiden myyrien keskiarvot, kvartiilit ja minimi- ja maksimi-arvot ennen juoksusuoritusta mitattuna.

Taulukko 2. Puumala-virusinfektoituneiden (Puuv +) ja ei-infektoituneiden (Puuv -) sekä lehmärokkovirusinfektoituneiden (Pox +) ja ei-infektoituneiden (Pox -) myyrien rasitusmetaboliatasojen keskiarvot ja keskihajonnat uimalla (U) ja juosten (J) mitattuna sekä lepometaboliatasot ennen juoksua (1) ja juoksun jälkeen (2).

	Puuv (+)			Puuv (-)			Pox (+)			Pox (-)		
	n	ka	sd	n	ka	sd	n	ka	sd	n	ka	sd
Metabolia(U)(mlCO ₂ /h)	24	273,56	56,51	38	220,61	49,54	21	268,93	56,90	41	226,85	53,88
Metabolia (J)(mlCO ₂ /h)	24	236,72	49,26	38	178,88	49,56	21	221,95	55,91	41	190,67	54,72
Lepomet.(1)(mlCO ₂ /h)	24	85,69	14,64	38	73,03	15,61	21	83,30	15,93	41	75,18	16,06
Lepomet.(2)(mlCO ₂ /h)	24	93,07	15,85	38	73,33	14,89	21	85,72	19,17	41	78,53	17,07

3.4. Yhdysvaikutukset

Myös molempien virusten ja sukupuolen yhdysvaikutuksia rasitusmetaboliatasoon tutkittiin sekä uimalla (Taulukko 3) että juosten (Taulukko 4). Sukupuolella, Puumala-viruksella ja lehmärokko-viruksella ei ollut tilastollisesti merkitsevää yhdysvaikutusta myyrien rasitusmetaboliatasoon. Myöskään parittaisten vertailujen suhteen muuttujien välillä ei havaittu eroja rasitusmetaboliassa.

Taulukko 3. Muuttujien (Puuv = Puumala-virus, POX = Lehmärokkovirus, SP = Sukupuoli) yhdysvaikutukset rasisusmetaboliaan (uimalla) testattiin varianssianalyysillä: vapausasteet (df), keskiarvon neliö (MS), testisuure (F), todennäköisyys (P)

	df	MS	F	P
Puuv*POX*SP	1	0,935	0,965	0,33
SP*POX	1	0,236	0,243	0,624
SP*PUUV	1	1,669	1,749	0,191
POX*Puuv	1	0,893	0,935	0,338
Virhe	58	0,966		

Taulukko 4. Muuttujien (Puuv = Puumala-virus, POX = Lehmärokkovirus, SP = Sukupuoli) yhdysvaikutukset rasisusmetaboliaan (juosten) testattiin varianssianalyysillä: vapausasteet (df), keskiarvon neliö (MS), testisuure (F), todennäköisyys (P)

	df	MS	F	P
Puuv*POX*SP	1	0,755	0,795	0,377
SP*POX	1	0,162	0,173	0,679
SP*PUUV	1	0,159	0,168	0,683
POX*Puuv	1	0,341	0,371	0,545
Virhe	58	0,909		

Molempien virusten ja sukupuolen yhdysvaikutuksia tutkittiin myös lepometaboliatasoon ennen myyrien juoksusuoritusta (Taulukko 5) ja juoksusuorituksen jälkeen (Taulukko 6). Sukupuolella, Puumala-viruksella ja lehmärokkoviruksella ei ollut yhdysvaikutusta myyrien lepometaboliaan, eikä myöskään parittaiset vertailut muuttujien välillä ollut merkitseviä.

Taulukko 5. Muuttujien (Puuv = Puumala-virus, POX = Lehmärokkovirus, SP = Sukupuoli) yhdysvaikutukset lepometaboliatasoon ennen juoksua testattiin varianssianalyysillä: vapausasteet (df), keskiarvon neliö (MS), testisuure (F), todennäköisyys (P)

	df	MS	F	P
Puuv*POX*SP	1	0,508	0,471	0,496
SP*POX	1	0,343	0,329	0,568
SP*PUUV	1	0,549	0,522	0,473
POX*Puuv	1	0,063	0,059	0,809
Virhe	58	1,031		

Taulukko 6. Muuttujien (Puuv = Puumala-virus, POX = Lehmärokkovirus, SP = Sukupuoli) yhdysvaikutukset lepometaboliatasoon juoksen jälkeen testattiin varianssianalyysillä: vapausasteet (df), keskiarvon neliö (MS), testisuure (F), todennäköisyys (P)

	df	MS	F	P
Puuv*POX*SP	1	0,522	0,534	0,468
SP*POX	1	0,542	0,568	0,454
SP*PUUV	1	0,044	0,046	0,832
POX*Puuv	1	1,670	1,763	0,190
Virhe	58	0,960		

4. TULOSTEN TARKASTELU

Metsämyyrien paino korreloi hyvin vahvasti sekä lepo- että rasisusmetabolian suhteen. Painon vaikutuksen huomioimisen jälkeen Puumala-virus- tai lehmärokkovirusinfektoituneilla metsämyyrillä ei kuitenkaan ollut korkeampi rasisus- eikä lepometaboliataso. Myyrän sukupuolella sen sijaan oli merkitystä juoksupyörän avulla mitattuun rasisusmetaboliaan. Koiraiden metaboliataso oli korkeampi kuin naaraiden metaboliataso juosten mitattuna, sama trendi näkyi myös uinnin aikaisessa metaboliatasossa. Sukupuolten välillä ei kuitenkaan ollut eroa lepometaboliaa mitattaessa.

Eläinperäisten virusten vaikutuksia niiden isäntälajien metaboliatasoon ei ole tiettävästi tutkittu aiemmin. Aikaisemmissa tutkimuksissa on selvitetty mm. metaboliatason yhteyttä kelpoisuuteen metsämyyrillä, missä ennemmin rasisusmetabolialla kuin perusmetaboliatasolla on todettu olevan merkitystä (Boratynski & Koteja 2009). Toisaalta taas Puumala-viruksen tiedetään heikentävän metsämyyrän selviytymistä talven yli (Kallio ym. 2007) ja lehmärokkoviruksen vaikuttavan metsämyyrien lisääntymiseen negatiivisesti (Feore ym. 1997).

Suurta ruumiin kokoa pidetään yleisesti ottaen etuna ja sen tiedetään korreloivan monien kelpoisuutta mittaavien ominaisuuksien suhteen (Falconer & Mackay 1996). Myös metsämyyrällä painon tiedetään korreloivan kelpoisuuden suhteen (Oksanen ym. 2007). Aiemmissa tutkimuksissa on saatu myös viitteitä siitä, että metsämyyrän koolla (paino ja päänleveys) on merkitystä sekä perus- että rasisusmetaboliatasoon (Boratynski & Koteja 2009). Myös tämän työn perusteella paino korreloi hyvin vahvasti sekä lepo- että rasisusmetaboliatason kanssa. Painon korreloinnissa metaboliatason kanssa sukupuolten välillä ei ollut eroa, vaan mitä painavampi myyrä oli, sitä korkeampi myös sen metaboliataso oli. Koiraat olivat keskimäärin hieman painavampia kuin naaraat, mutta niiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa.

Kun myyrien painon vaikutus suljettiin pois metaboliatasosta, ei muilla muuttujilla ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta rasisusmetaboliaan. Aineiston sukupuolijakauma oli suhteellisen tasainen kun naaraita oli 40 % ja koiraita 60 % aineistosta. Koiraat liikkuvat naaraita enemmän ja suuremmalla alueella (Bondrup-Nielsen & Karlsson 1985), joten oli luonnollista, että koiraita saatiin enemmän kiinni tutkittavaksi kuin naaraita.

Naaraiden rasisusmetaboliatason keskiarvo juosten mitattuna oli alhaisempi kuin koiraiden, mutta uimalla mitattuna metaboliatasossa oli vain samansuuntainen trendi. Kallion ym. (2007) tutkimuksen perusteella metsämyyräkoiraiden selviytyminen talven yli oli huonompaa kuin naaraiden, mutta ainakaan tämän työn perusteella ei voida päätellä, että koiraiden alhainen selviytyminen johtuisi ainakaan täysin varmasti niiden korkeammasta metaboliatasosta. Eroa rasisusmetaboliassa sukupuolten välillä ei voida yleistää koko populaatioon pelkästään näiden tulosten perusteella, sillä juoksuosuoritukset vaihtelivat hyvin paljon myyrien välillä, toisin kuin uintisuoritukset, joten tulokseen pitää suhtautua pienellä varauksella. Mikäli sukupuolijakauma olisi ollut tasaisempi tai aineiston koko suurempi, olisi sukupuolten välillä saattanut olla suurempi ero.

Metsämyyrä on yksi Puumala-viruksen kantajista ja tässä työssä tutkituista myyristä yhteensä 24 yksilöllä oli Puumala-virusinfektio, eli noin 39 % kaikista mittauksissa olleista myyristä. Ei-infektoituneita myyriä oli 38 kpl, eli noin 61 %. Naaraista 31 % oli infektoituneita ja koiraista 45 %. Nuorten myyrien verikoetuloksiin piti suhtautua varauksella, mutta aineistossa nuorten infektoituneiden myyrien osuus oli minimaalinen ja hyvin pieniä infektoituneita myyriä oli vain yksi, joka jätettiin tulosten analysoinnin ulkopuolelle.

Tämän työn perusteella myös Puumala-virusinfektio näyttäisi aiheuttavan hieman korkeamman rasisusmetaboliatasoon verrattuna ei-infektoituneisiin myyriin sekä juosten että uimalla mitattuna, mutta ryhmien välillä ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkitsevää eroa. Myöskään lepometaboliatasoissa ennen ja jälkeen juoksusuorituksen, ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, vaikkakin juoksusuorituksen jälkeen Puumala-virusinfektoituneiden metaboliataso oli hieman korkeammalla tasolla kuin ennen juoksusuoritusta. Lisäksi huomionarvoista on ei-infektoituneiden suuri vaihtelu sekä lepo- että rasisusmetaboliassa verrattuna infektoituneisiin.

Lehmärokkoviruksella ei myöskään ollut vaikutusta lepo- ja rasisusmetaboliatasoon. Lehmärokkoviruksen sukupuolijakauma ja infektiotajakauma olivat lähes samanlaisia kuin Puumala-viruksen suhteen mitattujen myyrien joukossa, mutta erot infektoituneiden ja ei-infektoituneiden välillä sekä lepo- että rasisusmetaboliassa olivat pienempiä verrattuna Puumala-virukseen. Telferin ym. (2002) tutkimuksen perusteella lehmärokkoviruksen tiedetään vaikuttavan selviytymiseen metsämyyrällä sekä positiivisesti että negatiivisesti riippuen vuodenajasta. Kesällä selviytyminen oli parempaa infektoituneilla yksilöillä, jonka syyksi Terlfer ym. Arvelivat dispersion vähenemisen sekä lisääntymisen lykkäämisen. Infektoituneiden myyrien rasisusmetaboliataso oli hieman korkeampi sekä uiden että juosten mitattuna kuin ei-infektoituneilla, mutta ero saattoi johtua näin pienessä aineistossa myös sattumasta, eikä voida varmasti sanoa, mikäli infektoituneiden yksilöiden korkeampi rasisusmetaboliataso johtui lehmärokkoviruksesta vai jostakin muusta. Lepometabolian suhteen lehmärokkovirusinfektoituneiden ja ei-infektoituneiden myyrien välillä ei ollut eroa ennen ja jälkeen juoksusuoritusta. Toisin kuin Puumala-virusinfektoituneiden ja ei-infektoituneiden myyrien välillä, ero lehmärokkovirusinfektoituneiden ja ei-infektoituneiden välillä oli huomattavasti pienempi.

Korkea metaboliataso voi olla merkki hyvästä fyysisestä kunnosta (Boratynski & Koteja 2009), mutta korkea metaboliataso vaatii myös paljon energiaa ja erilaiset stressitekijät vaikuttavat metaboliatasoon (Trebaticka ym. 2007) ja näin ollen sopeutuminen muihin energiaa vaativiin toimintoihin saattaa heikentyä. Työssä tutkittiin myös kahden viruksen yhdysvaikutusta lepo- ja rasisusmetaboliatasoon, mutta kahdella viruksella ei ollut metaboliatasoon vaikutusta, eli kumpikaan viruksista ei lisännyt tai vähentänyt hiilidioksidin tuottoa siihen nähden, että myyrällä olisi ollut vain jompikumpi viruksista tai molemmat virukset.

Metsämyyriä pyrittiin käsittelemään samalla tavalla kaikissa vaiheissa ja toistamaan mittaukset identtisinä, jotta käsittely ei olisi aiheuttanut ylimääräistä tai erilaista stressiä myyrille. Rasisusmetaboliala mitattaessa uimalla, uimakammioon laitettaessa myyrien hengityskäyrästä pystyi näkemään, että alkujärkytyksen jälkeen mittauskäyrä vakiintui tietylle tasolle ja loppua kohden laskien, kun myyrät väsyivät uudessaan. Juoksusuoritukset ja lepomittaukset sen sijaan vaihtelivat enemmän, kuten jo edellä mainittiin, mutta aineisto antaa kuitenkin jonkinlaisia viitteitä metsämyyrien metaboliatasoista eri tilanteissa. Saadut tulokset olivat kuitenkin ennusteiden suuntaisia, eli infektoituneiden metsämyyrien metaboliatasot kaikissa mittauksissa olivat korkeampia kuin ei-infektoituneiden, vaikkakaan tilastollisesti merkitseviä tuloksia ei saatu. Mahdollisten jatkotutkimusten avulla olisikin mielenkiintoista selvittää, olisiko tilastollisia eroja syntynyt aineiston kokoa kasvattamalla. Myös seuraamalla myyräpopulaatiota pidemmän aikaa olisi mielenkiintoista selvittää metaboliatasoon merkitystä myyrien lisääntymiseen ja selviytymiseen.

KIITOKSET

Tahdon kiittää ohjaajiani Janne Sundellia ja Hannu Ylöstä sekä ennen kaikkea Lenka Trebatickaa, jonka projektissa sain olla mukana. Kiitos myös Petr ?ille avusta myyrien pyydystykseen ja testaamiseen osallistumisesta. Suurkiitos myös Lammin biologiselle säätiölle rahoituksesta, joka mahdollisti minun työskentelyn koko kesän ajan Lammin biologisella asemalla.

KIRJALLISUUS

- Baxby D. & Bennett M. 1999. Cowpox virus (Poxviridae). *Encyclopedia of Virology*, 2. julk. (eds R.G. Webster & A. Granoff), 298–304. Academic Press, London.
- Begon M., Hazel SM., Baxby D., Bown K., Cavanagh R., Chantrey J., Jones T. & Bennett M. 1999.. Transmission dynamics of a zoonotic pathogen within and between wildlife host species. *Proc Biol Sci.* 266:1939–45.
- Begon M., Townsend C.R, Harper J.L. 4th edn. Blackwell Publishing; Oxford, UK: 2006. Ecology: from individuals to ecosystems.
- Beldomenico P. M., Telfer S., Gebert S., Lukomski L., Bennett M. & Begon M. 2008. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *The Royal Society* 275: 1753 – 1759.
- Bennett M., Crouch, A.J., Begon, M., Duffy, B., Feore, S., Gaskell, R.M., Kelly, D.F., McCracken, C.M., Vicary, L. & Baxby, D. 1997. Cowpox in British voles and mice. *Comparative Pathology*, 116, 35–44.
- Bondrup-Nielsen, S. & Karlsson, F. 1985: Movements and spatial patterns in populations of *Clethrionomys* species: a review. *Annales Zoologici Fennici.* 22: 385–392.
- Boratynski Z. & Koteja P. 2009. The association between body mass, metabolic rates and survival of bank voles. *Functional ecology* 23: 330–339.
- Burthe S., Telfer S., Begon M., Bennett M., Smith A. & Lambin X. 2008. Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: significant negative impacts on survival. *Journal of animal ecology.* 77: 110–119.
- Campbell N. A. & Reece J. B. 2005. *Biology*. Pearson Education 7. painos, San Francisco, s. 1164.
- Falconer D. S. & Mackay T. F. C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Pearson Education, England, s. 464.
- Feore, S. M., Bennett, M., Chantrey, J. et al. 1997. The effect of cowpox virus infection on fecundity in bank voles and wood mice. *Proceedings of the Royal Society of London Series B.* 264: 1457 – 1461.
- Hazel SM, Bennett M, Chantrey J, ym. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents. *Epidemiol Infect* 2000;124:551–62.
- Hansson L. & Henttonen H. 1985. Gradients in density variations of small rodents: the importance of latitude and snow cover. *Oecologia* 67:394–402.
- Henttonen H. & Vaheri A. 2006. Hemorrhagic fever with renal syndrome - Finland: update. <http://www.promedmail.org>, ark. no. 20060423.
- Kallio E. R., Poikonen, A. Vaheri, O. Vapalahti, Henttonen H., Koskela E. ja Mappes T. 2006b. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proceeding of the Royal Society B* 273:2771–2776
- Kallio E. R., Voutilainen L., Vapalahti O., Vaheri A., Henttonen H., Koskela E. ja Mappes T. 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 8.1911 – 1916.
- Kallio E. R., Begon M., Henttonen H., Koskela E., Mappes T., Vaheri A. & Vapalahti O. 2009. Cyclic hantavirus epidemics in humans—predicted by rodent host dynamics. *Epidemics* 1:101-107.
- Kinnunen P., Henttonen H., Hoffmann B., Kallio E. R., Korthase C., Laakkonen J., Niemimaa J., Palva A., Schlegel M., Sheikh Ali H., Suominen P., Ulrich R. G., Vaheri A. & Vapalahti O.

2011. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 11: 1133–1140.
- Koivula M., Koskela E., Mappes T. & Oksanen T. 2003. Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. *Ecology* 84: 398–405.
- Król E. & Speakman J. R. 2003. Limits to sustained energy intake. VII. Milk energy output in laboratory mice at thermoneutrality. *Journal of Experimental Ecology*. 206: 4267–4281.
- Madigan, M.T., & Martinko, J.M.(2006), Brock, Biology of micro organisms, 11. painos (Pearson Education Inc., ISBN 0-13-196893-9).
- Mappes T., Ylönen H. & Viitala J. 1995. Higher reproductive success among kin groups of bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Ecology* 76: 1276 – 1282.
- Mills J. N., Ksiazek T. G., Peters C. J. & Childs J. E. 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: A synthesis. *Emerging Infectious Diseases*. 5: 135-142.
- Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C. & Charrel RN.2009. Cowpox virus transmission from pet rats to humans. *Emerging Infectious Diseases*. 15: 781 – 784.
- Oksanen T., Koivula M., Koskela E. & Mappes T. 2007. The cost of reproduction induced by body size at birth and breeding density. *Evolution* 61-12: 2822–2831.
- Pelkonen PM., Tarvainen K., Hynninen A., Kallio ER. Henttonen H., Palva A., Vaheria A. & Vapalahti O. 2003. Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerging Infectious Diseases*. 9:1458–1461.
- Pettersson L., Boman J., Juto P., Evander M. & Ahlm C. 2008. Outbreak of Puumala-virus infection, Sweden. *Emerging infectious diseases*. 14: 808–810.
- Plyusnin A., Vapalahti O. & Vaheri A. 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *Journal of General Virology* 77: 2677–2687.
- Rezende E. L., Bozinovic F. & Garland T. Jr. 2004. Climatic adaptation and the evolution of basal and maximum rates of metabolism in rodents. *Evolution*. 58: 1361–1374.
- Speakman J.R., Król, E. & Johnson, M.S. 2004. The functional significance of individual variation in basal metabolic rate. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77, 900–915.
- Tarvainen K., Vapalahti O., Reijonen T., Hyödynmaa R., Hynninen A. & Ryyänen A. 2001. Lehmärokko – Zoonoositulokas Suomessa. *Duodecim*. 117: 1545–1550.
- Telfer S., Bennett M., Bown K., Carslake D., Cavanagh R., Hazel S., Jones T. ja Begon M. 2005. Infection with cowpox virus decreases female maturation rates in wild populations of woodland rodents. *Oikos* 109:317–322.
- Telfer S., Bennett M., Bown K., Cavanagh R., Crespín L., Hazel S., Jones T. & Begon M. 2002. The effects of cowpox virus on survival in natural rodent populations: increases and decreases. *Journal of Animal Ecology* 71:558–568.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2012. Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta 2011. <http://www3.ktl.fi/stat/> Luettu 2.1.2012.
- Trebaticka L., Ketola T., Klemme I., Eccard J & Ylönen H. 2007. Is reproduction really costly? Energy metabolism of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) females through the reproductive cycle. *Ecoscience*. 14: 306–313.
- Vaheri A., Vapalahti O. & Plyusnin A. 2008. How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. *Reviews in medical virology*. 18: 277–288.
- Valtonen M., Kauppila M., Kotilainen P., Lähdevirta J., Svartbäck C-M, Kosunen O., Nurminen J. & Sarkkinen H. 1995. Four fatal cases of nephropathia epidemica. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 27: 515–517.
- Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., & Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infectious Diseases* 3:653–661.
- Vorou R. M., Papavassiliou, Vassilios G; Pierrousakos & Ioannis N. 2008. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Infectious diseases*. 21: 153–156.