

Kokeellinen Borna-virusinfektio metsämyyrillä



Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Peruseläinlääketieteen laitos
Mikrobiologian ja epidemiologian oppiaine

Hanna Inkeroinen
Lisensiaatin tutkielma
2010

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET.....	6
1 JOHDANTO JA TAVOITTEET	8
2 JYRSIJÄTAUSTAA.....	9
2.1 Metsämyyrä	9
2.2 Villijyrsijät viruszoonoosien levittäjinä	10
3 BORNA-VIRUS	11
3.1 Genomi ja proteiinit	12
3.2 Borna-viruksen lisääntyminen	13
4 BORNAN TAUTI.....	14
4.1 Historiaa.....	14
4.2 Taudinkulku ja oireet.....	15
4.2.1 Luonnollisilla isäntäeläimillä	16
4.2.2 Koe-eläimillä.....	17
4.2.2.1 Rotta.....	17
4.2.2.2 Hiiri	20
4.2.2.3 Hamsteri	21
4.2.2.4 Gerbiili	21
4.2.3 Tauti ihmisillä?	22
5 BORNA-VIRUKSEN EPIDEMIOLOGIAA	22
5.1 Leviäminen ja tartunta	25
5.2 Reservoari	26
6.1 Käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktio.....	31
6.2 Immunofluoresenssimenetelmä	32
7 AINEISTO JA MENETELMÄT	34
7.1 Myyrät	34
7.2 Infektointi	35
7.4 Kudosten homogenointi ja RNA-eristys.....	38
7.5 Genomin etsiminen.....	38
7.6 Vasta-aineiden etsiminen	40
8.1 Myyrätulokset	41
8.2 Genomin osoittaminen.....	42
8.3 Vasta-ainelöydökset	43
9 POHDINTA.....	43
9.1. Myyränpaikaset.....	44

9.2. Myyräemot	45
9.4. IFA-tulosten pohdintaa.....	48
9.5 Jatkotutkimuksia ja tulevaisuutta	49
10 YHTEENVETO.....	51
KIRJALLISUUSLUETTELO	53
Bode, L. Human bornavirus infection-- towards a valid diagnostic system. [katsaus] APMIS Suppl. 2008, 124: 21-39.	54

Kannen kuva: Metsämyyrä omassa yksittäisilmastoidussa häkissään. Julkaistu P. Kinnusen luvalla.

1.

Tiedekunta - Fakultet – Faculty	Osasto - Institution – Department
Eläinlääketieteellinen tiedekunta	Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto

Tekijä - Författare – Author		
Hanna Inkeroinen		
Työn nimi - Arbetets titel – Title		
Kokeellinen Borna-virusinfektio metsämyyrillä		
Oppiaine- Läroämne – Subject		
Mikrobiologian ja epidemiologian oppiaine		
Työn laji- Arbetets art – Level	Aika - Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages
Lisensiaatin tutkielma	Huhtikuu 2010	47 (64)
Tiivistelmä - Referat – Abstract		
<p>Borna-virus on <i>Mononegavirales</i>-lahkon <i>Bornaviridae</i>-heimoon kuuluva RNA-virus, joka aiheuttaa Bornan tautia. Bornan tauti on etenevä, usein kuolemaan johtava aivotulehdus. Tautiin on perinteisesti sairastunut hevosia ja lampaista maantieteellisesti rajoittuneella endeemisellä alueella Keski-Euroopassa. Nykytiedon mukaan Borna-viruksen isäntäeläin kirjo käsittää muitakin eläinlajeja, kuten lintuja, tautitapauksia todetaan eri puolilta maailmaa, ja viruksen on esitetty olevan osallisena myös ihmisten psykiatrisissa sairauksissa eli mahdollisesti zoonoottinen. Suomessa Borna-virusspesifisiä vasta-aineita on löydetty ihmiseltä, hevoselta, kissalta, koiralta ja villijyrsijöiltä. Kokeellisesti Borna-viruksella on saatu infektoitua lukuisia koe-eläimiä erilaisista jyrsijöistä lintuihin ja kädellisiin.</p> <p>Borna-viruksen epidemiologiaa ei tunneta täysin. Avoimia kysymyksiä ovat viruksen maailmanlaajuinen levinneisyys, isäntälajikirjo, leviämistapa ja mahdollisen reservoaarin olemassaolo. Reservoaarin olemassaoloa epäillään, koska Bornan taudin ei ole todettu leviävän helposti eläinyksilöstä toiseen, ja viruskantojen perimät ryhmittyvät sekvenssianalyysissä maantieteellisesti eivätkä eläinlajin tai eristysvuoden mukaan. Vilejä pikkunisäkkäitä pidetään todennäköisimpinä reservoaarilajeina, mitä tukevat vastikään havaitut Borna-virusinfektiot sveitsiläisissä päästäisissä ja suomalaisissa metsä- ja lapinmyyrissä.</p> <p>Metsämyyrä on Suomen yleisimpiin kuuluva nisäkäs. Se kantaa ja levittää tauteja, myös viruszoonooseja. Myyristä löydetty Borna-virusvasta-aineet herättivät kysymyksen metsämyyrän roolista mahdollisena Borna-viruksen reservoaarina. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää 1) saadaanko metsämyyriä infektoitua kokeellisesti, ja jos saadaan, 2) millä infektiannonoksella, ja 3) aiheuttaako infektiota oireita ja/tai havaittavia vasta-aineita.</p> <p>Kokeeseen otettiin 15 paritettua metsämyyrää, jotka saivat yhteensä 52 poikasta. Poikaset infektoitiin aivoihin vuorokauden sisällä syntymästä käyttäen Borna-viruskannan He/80 4. rottapasaasista tehtyjä viruslaimennoksia 10^2, 10^3 ja 10^4 ffu. Myyräpoikaset lopetettiin ja elimet preparaatiin kahden, neljän, kuuden tai kahdeksan viikon kuluttua infektiosta. Aivonäytteistä etsittiin Borna-viruksen N-proteiinin geeniä käänteistranskriptio-PCR-menetelmällä ja verinäytteistä Borna-virusspesifisiä IgG-vasta-aineita immunofluoresenssimenetelmällä.</p> <p>Infektoiduista myyräpoikasista 24 prosenttia (10/42) oireili poikkeavasti verrattuna kontrollipoikasiin (n=9). Lähes kaikkien (40/42) infektoitujen myyräpoikasten, muttei yhdenkään verrokkimyyrän, aivonäytteistä monistui Borna-viruksen N-geeniä. Ensimmäiset positiiviset vasta-ainetulokset saatiin neljä viikkoa infektion jälkeen (p.i.), jolloin virusmäärällä 10^2 ffu havaittiin vasta-aineita 2/3 ryhmän myyristä ja virusmäärällä 10^3 ffu infektoiduista 1/5</p>		

myyristä. Kuusi viikkoa p.i. kaikki 10^3 ffu virusmäärällä infektoidut myyrät olivat vasta-ainepositiivisia, kun taas suurimmalla virusmäärällä 10^4 ffu infektoiduista poikasista havaittiin vasta-aineita vain puolella. Kaiken kaikkiaan vain 39 prosentilla infektoiduista poikasista havaittiin vasta-aineita veressä.

Tutkimustulokset osoittavat, että myyrät infektoituvat Borna-viruksella, pääasiassa ilman oireita. Vaikka tulokset ovat vasta alustavia, ne tukevat metsämyyrän mahdollista asemaa reservoaarieläinlajina, ja antavat suuntaa luonnonjyrsijöistä saatujen vasta-ainelöydösten tulkintaan.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

BDV, Bornan tauti, Borna-virus, IFA, jyrsijä, kokeellinen infektio, metsämyyrä, *Myodes glareolus*, PCR, reservoaari, zoonoosi

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Viikin kampuskirjasto, Helsingin yliopisto

Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s)

Johtaja: Professori Olli Vapalahti, LKT, kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri; Ohjaaja: Paula Kinnunen, ELL, Erikoiseläinlääkäri (tarttuvat taudit)

LYHENTEET

ABV	Avian Borna virus, avibornavirus
BPB	Bromophenol blue, bromifenolisininen
BDV	Borna disease virus, Borna-virus
BSL3	Biosafety Level 3 - turvalaboratorio
CF-koe	Complement fixation test, Komplementinsitoutumiskoe
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates, deoxynucleotide solution mix, dGTP, dTTP, dATP ja dCTP puskuriliuoksessa
ECLIA	Electrochemiluminescence assay, antigeeni-vasta-ainereaktioihin ja luminesenssi-ilmioon perustuva määritysmenetelmä
EDTA	<u>Ethylenediaminetetraacetic acid,</u> etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, antigeeni-vasta-ainereaktioihin perustuva määritysmenetelmä
ffu	Focus forming unit, fokusta muodostava yksikkö
FITC	Fluoresceine isothiocyanate, fluoreskeiini-isotiosyanaatti
G	Glykoproteiini
IFA	Indirect fluorescent antibody test, immunofluoresenssikoe vasta-aineiden osoittamiseksi
IGF-1	Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1
IHC	Immunohistochemistry, immunohistokemia, antigeenien paikannus vasta-aineilla, joihin on liitetty fluoreseiiniä tai värillisiä aineenvaihduntatuotteita tuottavia entsyymejä
IP	Immunoprecipitation, immuunisaostus, saostumaan johtava antigeenin ja vasta-aineen välinen reaktio
ISH	<i>In situ</i> –hybridisaatio
L	Polymeraasi
LCM-virus	Lymphocytic choriomeningitis -virus
M	Matriksiproteiini
M-MuLV RT-entsyymi	Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV, MMLV) Reverse Transcriptase, käänteistranskriptaasi

MRL-hiiri	Murphy-Roths Lymphoma –hiiri, sisäsiittoinen koe-eläinkanta
NNS-RNA-virus	Non-segmented negative-stranded RNA virus, segmentoitumaton negatiivisäikeinen RNA-virus
N	Nukleoproteiini
ORF	Open reading frame, avoin lukukehys
P	Fosfoproteiini
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PDD	Proventricular dilatation disease, papukaijalintujen ruoansulatuskanavan sairaus
p.i.	<i>post infection</i> , infektoinnin jälkeen
PUUV	Puumala-virus
RNP	Ribonukleoproteiini
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction, käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktio
TAE-puskuri	Tris-asetatti-EDTA -puskuri
TBE-virus	Tick-borne encephalitis –virus, puutiaisaivokuumevirus
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose, patogeenin (esim. virus) määrä, joka saa aikaan solun vaurioitumisen 50 prosentissa infektoidusta soluviljelmän soluista
WBA	Western blot analysis, proteiinien tunnistusmenetelmä

1 JOHDANTO JA TAVOITTEET

Borna-virus (Borna disease virus, BDV) aiheuttaa Bornan tautia eli etenevää, usein kuolemaan johtavaa, aivotulehdusta ainakin hevosilla ja lampailla (Staeheli ym. 2000). Virus infektoi myös lukuisia muita eläinlajeja ja ihmisiä. Ihmisiin infektoita on yhdistetty neuropsykiatrisiin sairauksiin, mutta syy-seuraussuhde on epäselvä. Borna-virus on siis mahdollisesti zoonoottinen. Kokeellisesti Borna-viruksella on saatu infektoitua laajasti erilaisia koe-eläimiä jyrksijöistä lintuihin ja kädellisiin. Vastikään, tämän tutkimuksen jo valmistuttua, on julkaistu perusteellisesti todistettuja havaintoja uudesta Borna-virussuvusta papukaijalinnuilla (Kistler ym. 2008) ja havaintoja endogeenisestä Borna-virusspesifisestä genomien eli perimän alueesta integroituneena eri nisäkkäiden genomiin (Horie & Honda ym. 2010).

Viruksen epidemiologiaa ei vielä tunneta tarkoin. Koska Borna-virus ei vaikuta tarttuvan kovin herkästi eläinyksilöstä toiseen, ja koska viruskannat ryhmittyvät sekvenssianalyyseissä maantieteellisesti eivätkä eläinlajin mukaan, on epäilty, että Borna-viruksella olisi luonnossa reservoaari eli säilymö, josta tartunta leviäisi tietyllä alueella useampaankin lajiin (Durrwald ym. 2006). Borna-virusinfektioita on vastikään havaittu kenttäsupiaisissa (Hilbe ym. 2006; Puorger ym. 2010) sekä villijyrksijöissä (Kinnunen ym. 2007). Villejä pikkunisäkkäitä pidetäänkin todennäköisimpinä reservoaarilajeina. Suomessa viitteitä Borna-virusinfektioista on löydetty ihmiseltä, hevoselta, kissalta, koiralta ja myös villijyrksijöiltä (Kinnunen ym. 2007). Vasta-ainepositiiviset jyrksijät olivat lapinmyyrä (*Microtus oeconomus*) ja kaksi metsämyyrää (*Myodes glareolus*).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää yhden Suomen yleisimmän nisäkkään, metsämyyrän, osuutta Borna-viruksen mahdollisena reservoaarieläinlajina pohjaksi mahdollisia laajempia tutkimuksia varten. Tarkoituksena oli selvittää, saadaanko metsämyyrä infektoitumaan kokeellisesti Borna-viruksella, ja jos saadaan, millä virusannoksella. Lisäksi tavoitteena oli selvittää, aiheuttaako mahdollinen infektiotilanne oireita metsämyyrillä. Menetelminä käytettiin havainnoinnin lisäksi epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää (IFA) vasta-aineiden osoittamiseksi ja käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktiomenetelmää (RT-PCR) virus-RNA:n osoittamiseksi.

2 JYRSIJÄTAUSTAA

2.1 Metsämyyrä

Metsämyyrä (*Myodes glareolus*) on metsäpäästäisen ja peltomyyrän kanssa runsaslukuisimpia nisäkkäitä Suomessa. Kantavaihteluista riippuen se on runsaimmillaan Suomen yleisin nisäkäs (Katajisto 2008). Pyöreäkorvainen metsämyyrä on selkäpuolelta punaruskea tai harmahtavan ruskea ja vatsapuolelta vaalean- tai kellanharmaa (Katajisto 2008, Jensen 1994). Kooltaan metsämyyrä on pieni; ruumiin pituus on 60 – 125 millimetriä, häntä noin puolet ruumiin pituudesta ja paino 8 – 40 grammaa. Metsämyyrän elinikä luonnossa on yleensä alle vuosi, korkeintaan kaksi vuotta. Lajia tavataan lähes koko Euroopan alueella (kuva 1). Levinneisyysalue Suomessa kattaa lähes koko maan, lukuun ottamatta ulkosaariston luotoja ja kuusirajan pohjoispuolista Lappia.



Kuva 1. Metsämyyrän levinneisyysalue (Amori ym. 2008)

Nimensä mukaisesti metsämyyrän elinympäristöä ovat erilaiset metsäalueet, erityisesti kosteat seka- ja havumetsät, mutta myös hakkuuaukeat, niityt ja pellonreunamat kelpaavat niiden asuinalueiksi (Katajisto 2008, Jensen 1994). Talviaikaan metsämyyrät voivat tunkeutua myös rakennuksiin ja kellareihin lämmön, kuivuuden ja ravinnon perässä. Ravintonaan metsämyyrä käyttää erilaisia heiniä, versoja, siemeniä ja marjoja sekä myös sienii, selkärangattomia eläimiä ja linnunmunia. Metsämyyrät ovat hyviä kiipeilemään, joten ne pääsevät syömään myös esimerkiksi naavaa tai havupuiden taimien latvakasvuja ja -silmuja sekä varastoimaan ruokiaan puihin. Metsämyyrä ei ole erityisen arka, ja sen voi nähdä liikkuvan myös päiväsaikaan.

Metsämyyräkannat vaihtelevat Fennoskandian alueella kolmen - neljän vuoden jaksoissa eli sykleissä, jolloin kannan suuruus voi vaihdella monisatakertaisesti vuosien välillä (Hansson & Henttonen 1985). Kannanvaihtelut ovat voimakkaampia pohjoisilla levinneisyysalueilla. Erilaisia petoeläimiä (muun muassa lumikoita, kärppiä ja pöllöjä) pidetään suurimpana syynä myyrien kannanvaihteluihin (Kaikusalo & Henttonen 1995). Myyrätiheyteen vaikuttavat myös ravinnon määrän ja laadun vaihtelu sekä erilaiset taudit.

Metsämyyrän lisääntymiskausi Suomessa kestää keskimäärin toukokuusta syyskuuhun, mutta vaihtelee sääolosuhteista riippuen (Koivula ym. 2003). Kantoaika on 18 vuorokautta ja poikasia syntyy kahdesta kymmeneen. Kesän aikana voi syntyä kolmesta neljään poikuetta (Katajisto 2008, Jensen 1994). Metsämyyränaaraat tulevat sukukypsiksi runsaan kuukauden iässä ja urokset runsaan kahden kuukauden iässä, joten keväällä ja alkukesällä syntyneet poikaset ehtivät yleensä lisääntyä jo syntymäkesänään. Loppukesän poikaset muodostavatkin suurimman osan talvehtivasta metsämyyräkannasta.

2.2 Villijyrsijät viruszoonoosien levittäjinä

Villijyrsijät kantavat ja levittävät lukuisia zoonoottisia eli eläinten ja ihmisten välillä tarttuvia taudinaiheuttajia ympäri maailmaa (Syrjänen ym. 2005). Tauti voi tarttua jyrsijästä ihmiseen suorassa kontaktissa eläimen tai eritteiden kautta, kontaminoituneen ruuan tai juoman kautta tai toisen eläimen välityksellä. Zoonoottisia, jyrsijöitä infektioivia viruksia löytyy ainakin arena-, hanta-, pox- ja flavivirusten joukosta.

Suomen jyrsijät, muun muassa metsämyyrät, kantavat ja levittävät ainakin hanta-viruksiin kuuluvaa Puumala-virusta (Brummer-Korvenkontio ym. 1980), joka aiheuttaa myyräkuumeen, orthopox-viruksiin kuuluvaa lehmärokkovirusta ja flaviviruksiin kuuluvaa puutiaisten välityksellä leviävää TBE-virusta (Tick-borne encephalitis virus), joka aiheuttaa puutiaisaivokuumeen (Syrjanen ym. 2005). Arena-viruksiin kuuluvan lymfosyyttisen koriomeningiittiviruksen pääisäntänä toimii muun muassa kotihiiri (*Mus Musculus*). Suomessa tosin ei ole todettu varmistettuja tautitapauksia (Kallio-Kokko 2010). Suomalaisilta villijyrsijöiltä on löydetty spesifisiä Borna-viruksen vasta-aineita, mutta jyrsijöiden merkitystä taudin leviämisessä ei tunneta (Kinnunen ym. 2007).

3 BORNA-VIRUS

Borna-viruksen molekyylibiologiset ominaisuudet, neurotropismi eli hermosoluhakuisuus, patogeneesi ja erityisesti kyky aiheuttaa eläimille käytösmuutoksia tekevät siitä ainutlaatuisen taudinaiheuttajan.

Borna-virus on vaipallinen RNA-virus, joka kuuluu *Mononegavirales*-lahkoon (Cubitt ym. 1994a; ICTV 2010). Biologia ja geneettiset ominaisuudet erottavat sen muista lahkoon viruksista omaksi *Bornaviridae*-heimokseen. Viruksen genomi eli perimä koostuu yksijuosteisesta, negatiivisäikeisestä, segmentoitumattomasta RNA:sta ja on kooltaan 8,9 kiloemästä (Carbone ym. 1991a; Briese ym. 1992; Cubitt & de la Torre 1994). Klassisen Borna-viruksen (BDV) lisäksi heimoon kuuluu hiljattain linnuista löydetty avibornavirus (Avian Borna virus, ABV) (Kistler ym. 2008).

Muista eläimille tautia aiheuttavista segmentoitumattomista negatiivisäikeisistä RNA-viruksista (NNS-RNA-virus) poiketen Borna-viruksen replikaatio eli genomin kahdentuminen ja transkriptio eli lähetti-RNA:n muodostuminen tapahtuvat infektoituneen solun tumassa (Briese ym. 1992). Borna-viruksen genomin rakenne poikkeaa muista NNS-RNA-viruksista geenien aloitus- ja lopetussignaalien sekä geenien välisten alueiden osalta (Schneemann ym. 1994). Borna-viruksen genomissa avoimet lukukehykset (ORF), transkriptioyksiköt ja transkriptiosignaalit ovat osittain päällekkäisiä. Genomia hyödynnetään tehokkaasti lisäksi silmukoimalla lähetti-RNA:sta introneita transkription jälkeen (Schneider ym. 1994b; Cubitt ym. 1994b; Tomonaga ym.

2000). Klassisen Borna-viruksen genomien emäsjärjestys on säilynyt huomattavan samankaltaisena vuodesta toiseen, riippumatta eläinlajista, josta virusta eristetään tai RNA:ta monistetaan ja sekvensoidaan (Pleschka ym. 2001; Sauder ym. 2002).

3.1 Genomi ja proteiinit

Borna-viruksen genomi on järjestäytynyt kolmeen transkriptioyksikköön (I-III), joita rajaa kolme transkription aloitussignaalia ja neljä lopetussignaalia (Schneemann ym. 1994). Geenien raja-alueiden rakenteet ovat epätyypillisiä verrattuna muihin *Mononegavirales*-lahkon viruksiin, sillä transkriptioyksiköt ja signaali-alueet ovat osittain päällekkäin, ja lopetussignaalia voidaan ohittaa läpikululla (Schneemann ym. 1995). Geenit ovat kuitenkin lahkon viruksille tyypillisessä järjestyksessä, ja ainakin kuudella avoimella lukukehyksellä (ORF) koodataan vähintään kuutta virusproteiinia (Briese ym. 1994; Schneemann ym. 1994; Walker ym. 2000).

Ensimmäinen transkriptioyksikkö (I) koodaa aminohappoja, joista muodostuu viruksen nukleoproteiinia (N) (Cubitt ym. 1994a; Briese ym. 1994). Nukleoproteiinilla on kaksi isomeerimuotoa (p38 ja p40), joiden merkitystä *in vivo* ei tunneta (Lipkin & Briese 2007). Toinen transkriptioyksikkö (II) koostuu päällekkäisistä avoimista lukukehyksistä, jotka koodaavat X- (p10) ja P- (fosfoproteiini, p23) proteiineja (Cubitt ym. 1994a; Briese ym. 1994; Wehner ym. 1997). Kolmannesta yksiköstä (III) voidaan tarpeen mukaan leikata pois introneita (Schneider ym. 1994b; Cubitt ym. 1994b; Tomonaga ym. 2000), ja siitä koodataan matriksiproteiini (M, p16), tyypin I solukalvon glykoproteiini (G, p57, gp94) ja RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi (L, p190) (Schneemann ym. 1994; Walker ym. 2000). Ensimmäisen ja toisen transkriptioyksikön kopioita esiintyy yhtä paljon infektoituneissa soluissa ja kudoksissa, kun taas kolmannen ryhmän kopioita ilmenee vähemmän (Walker ym. 2000; Briese ym. 1994).

Borna-viruksen, kuten muidenkin negatiivijusteisten RNA-virusten, aktiivinen transkriptio- ja replikaatiokompleksi on ribonukleoproteiini-kompleksi (RNP-kompleksi) (Neumann ym. 2002). RNP-kompleksi muodostuu RNA-riippuvaisesta RNA-polymeraasista (L), polymeraasientsyymien toiminnalle välttämättömästä, kofaktorina toimivasta fosfoproteiinista (P), ja nukleokapsidista, jossa RNA-genomia suojaa

nukleoproteiini (N). RNP-kompleksi on viruksen pienin infektiivinen yksikkö. Nukleoproteiinilla on tärkeä rooli sekä RNP-kompleksien tumansisäisessä kohdentamisessa että tumasta solulimaan tapahtuvassa viennissä (Kobayashi ym. 2001). Matriksiproteiini (M) osallistuu viruksen kokoamiseen (Chase ym. 2007). Sitä on havaittu sekä infektoituneen solun sytoplasmassa että tumassa. Ilmeisesti Borna-viruksen M-proteiini sitoutuu fosfoproteiiniin ja liittyy siten RNP-kompleksiin, mutta ei estä transkriptiota toisin kuin muilla yksijuosteisilla RNA-viruksilla. Glykoproteiini (G, vaippaproteiini) osallistuu viruksen kiinnittymiseen ja soluun tunkeutumiseen (Tomonaga ym. 2002). Glykoproteiini on välttämätön myös hermosolusta toiseen leviämässä (Bajramovic ym.2003). X-proteiini on pienin Borna-viruksen koodaama proteiini, joka estää viruksen RNA-synteesiä polymeraasiaktiivisuuden negatiivisena säätelijänä (Perez ym. 2003; Schneider ym. 2003; Poenisch ym. 2004; Schwardt ym. 2005; Yanai ym. 2006).

3.2 Borna-viruksen lisääntyminen

Borna-virus on *in vivo* erittäin neurotrooppinen (Hirano ym. 1983; Narayan ym. 1983a). Se pääsee kohdesolun sisään reseptorivälitteisellä, pH-riippuvaisella endosytoosilla, G-glykoproteiininsa avulla (Gonzalez-Dunia ym. 1997a,b). Viruksen vaipan fuusioituminen aiheutuu endosomin happaman ympäristön vaikutuksesta (Gonzalez-Dunia ym. 1998). Vapautuneet RNP-segmentit kuljetetaan tumakohdennussignaalien mukaisesti isäntäsolun tumaan (Cubitt & de la Torre 1994; Kobayashi ym. 2001).

Viruksen RNA ei itsessään ole infektiivinen (Cubitt & de la Torre 1994; Cros & Palese 2003). Infektioon tarvitaan koko RNP-kompleksi ja siihen sisältyvä polymeraasiaktiivisuus sekä geneettinen informaatio, joka ohjaa Borna-virusmakromolekyylien, proteiinien ja nukleiinihappojen, sekä infektiivisten viruspartikkelien syntyä.

Tuman sisällä tuotetaan negatiivisäikeisen genomisen RNA:n mukaisia lähetti-RNA-molekyyliä, joista solulimassa tapahtuvassa translaatiossa tuotetaan virusproteiineja. Lisäksi RNA-polymeraasi katalysoi koko genomien pituisen komplementaarisen RNA-säikeen tuottamista; säie toimii mallina uusille negatiivisäikeille. Borna-viruksen N- ja P-proteiinien määrien välinen suhde säätelee siirtymistä transkriptiosta kokonaisen

vastingenomien tuotantoon ja vaihtelee infektion vaiheesta riippuen (Watanabe ym. 2000). Infektion akuutissa vaiheessa N- proteiinin määrä on suurempi kuin P-proteiinin määrä, kun taas kroonisessa vaiheessa P-proteiinia on kahdeksankertainen määrä verrattuna N-proteiiniin. Borna-virus ei tuhoa infektoimaansa solua, joten uusien viruspartikkeleiden tuotto voi jatkua pitkään (Mayr & Danner 1974; Herzog & Rott 1980).

Borna-virus on vaipallinen virus (Gonzalez-Dunia ym. 1997a; Kohno ym. 1999). Infektoituneessa solussa tuotetut viruspartikkelit vapautuvat silmikoitumalla solusta ulos. Huolimatta Borna-viruksen aktiivisesta transkriptiosta ja replikaatiosta solussa vain vähän viruspartikkeleita vapautuu solusta ulos (Pauli & Ludwig 1985; Carbone ym. 1993; Bajramovic ym. 2003). Viruksen leviäminen elimistössä tapahtuukin pääasiassa suoraan solusta toiseen (Morales ym. 1988).

4 BORNAN TAUTI

Bornan tauti on pitkään tunnettu, usein kuolemaan johtava, Borna-viruksen aiheuttama etenevä aivotulehdus, johon perinteisesti on sairastunut hevosia ja lampaita maantieteellisesti rajoittuneella endeemisellä alueella (Staeheli ym. 2000). Taudin tutkimuksen etenemisen myötä tietoa Borna-virusinfektiosta ja sen seurauksista elimistössä on saatu myös lukuisilta muilta luonnollisilta isäntäeläinlajeilta ja koe-eläimiltä. Borna-virus infektoi myös ihmisiä (de la Torre 1996) ja on mahdollisesti zoonoottinen.

4.1 Historiaa

Bornan taudille tyypillisiä oireita on kuvattu eteläsaksalaisilla hevosilla ensimmäisiä kertoja jo 1700-luvulla (von Sind 1767, 1781, Durrwald & Ludwig 1997 mukaan). Ensimmäiset raportit taudista lampanlampailla löytyvät 1890-luvulta. Taudin nykyinen nimitys (saksalainen alkuperäasu 'Borna'sche Krankheit') juontuu Saksassa sijaitsevasta Bornan pikkukaupungista. Kaupungin ympäristössä oli 1800-luvun lopulla laaja epidemia, jossa sairastui ja kuoli paljon hevosia.

Bornan taudin tutkimus pääsi vauhtiin 1900-luvun alussa, kun tutkijat, muiden muassa Joest ja Degen sekä Zwick ryhmineen, alkoivat selvittää taudin ja taudinaiheuttajan perusominaisuuksia (Durrwald & Ludwig 1997, Lipkin & Briese 2007). Taudin diagnostiikan kannalta merkittävä löydös oli Joestin ja Degenin histopatologisissa tutkimuksissaan havaitsemat tumansisäiset Borna-virukselle tyypilliset inkluusiokappaleet (Joest-Degen body) hermosoluissa. Zwick ryhmineen osoitti taudinaiheuttajan virukseksi muun muassa infektoimalla sairaiden hevosten aivohomogenaatilla erilaisia koe-eläimiä ja taas hevosia. Muita merkittäviä saavutuksia Bornan taudin historiassa olivat 1970- ja 1980 -luvun tienoilla viruksen soluviljelymenetelmien kehittäminen ja patogeneesin tutkiminen muun muassa infektoimalla eri-ikäisiä rottia. 1980-luvulla Borna-virusta alettiin tutkia myös mahdollisena taudinaiheuttajana ihmisten psykiatrisien sairauksien taustalla (Amsterdam ym. 1985; Rott ym. 1985). Viruksen aiheuttaman immuunipuolustusreaktion tutkiminen jatkui tiiviinä 1990-luvun alkupuolelle saakka.

Vasta 1990-luvulla, molekyylogeneettisten tutkimusten myötä, Bornan taudin aiheuttajavirus pystyttiin tunnistamaan ja luokittamaan (Briese ym. 1992, 1994; Schneemann ym. 1994; de la Torre 1994; Lipkin ym. 1990; Schneider ym. 1994a). 1990-luvulta alkaen Bornan tautia on diagnosoitu hevosilla ja lampailla myös endeemisen alueen ulkopuolella ja sittemmin myös lukuisilla muilla luonnollisesti infektoituneilla eläinlajeilla ympäri maailmaa (Ikuta ym. 2002).

4.2 Taudinkulku ja oireet

Borna-virusinfektion aiheuttama kliininen kuva luonnollisesti ja kokeellisesti infektoituneilla eläimillä riippuu eläinlajin lisäksi eläinkannasta, viruskannasta ja virusmäärästä sekä yksilön puolustuskyvystä. Oireita on koottu yhteen useissa katsausartikkeleissa, esimerkiksi Gonzales-Dunia ym. (1997b); Ikuta ym. (2002); Richt & Rott (2001); Rott & Becht (1995). Tyypillinen kliininen kuva vaihtelee oireettomasta vakavampaan oireiluun, johon kuuluvat muun muassa erilaiset käyttäytymismuutokset, ruokahaluttomuus, ataksia, kehänkierto, sekä taudin loppuvaiheessa halvaantuminen ja lopulta kuolema. Taudin inkubaatioaika vaihtelee useista päivistä vuosiin, jona aikana Borna-virus saattaa vaikuttaa solunsisäisiin viestintäjärjestelmiin ja aiheuttaa molekyyli- ja solutason muutoksia keskushermostossa (Planz ym. 2009). Spontaania paranemista

on havaittu satunnaisesti, huolimatta keskushermoston pysyvistä infektoitumisesta (Richt & Rott 2001; Ikuta ym. 2002a). Oireilu tosin saattaa alkaa uudelleen myöhemmin.

4.2.1 Luonnollisilla isäntäeläimillä

Luonnollista Bornan tautia on kuvattu hevosilla, lampailla ja yksittäistapauksina useilla hevoseläimillä, vuohilla, naudoilla, koirilla, kaneilla, linnuilla, hirvillä ja monilla eläintarhaeläimillä (Staeheli ym. 2000; Ikuta ym. 2002). Lisäksi Bornan taudin kaltaista tautia on kuvattu myös kissoilla, strutseilla ja vastikään papukaijalinnuilla (Staeheli ym. 2000; Ikuta ym. 2002; Kistler ym. 2008). Borna-virusinfektio voi aiheuttaa luonnollisille isäntäeläimille akuutin taudin, johon liittyy yleensä aivojen ja aivokalvojen tulehdus (Rott & Becht 1995). Luonnollisten isäntäeläinten oireet vaihtelevat hieman heikentyneestä koordinaatiokyvystä halvaantumiseen ja kuolemaan. Oireita on koottu katsausartikkeleissa (Durrwald & Ludwig 1997; Gonzales-Dunia ym. 1997b; Richt & Rott 2001; Ikuta ym. 2002; Rott & Becht 1995).

Hevosilla ja lampailla oireet ovat hyvin samankaltaisia (Ikuta ym. 2002; Rott & Becht 1995). Inkubaatioaika on pitkä, vähintään neljä viikkoa. Taudin alkuvaiheessa voi esiintyä epäspesifisiä oireita, kuten toistuvaa kuumeilua, ähkyoireita, ummetusta tai anorektistyyppistä syömishäiriötä. Neurologiset oireet pahenevat taudin edetessä. Joillakin yksilöillä on havaittu eksitaatio-oireita, toisilla depressiota, ja osalla sekä että. Oireisiin vaikuttaa Borna-viruksen infektoima aivojen alue: virus viihtyy erityisesti limbisen järjestelmän ja hippokampuksen soluissa. Taudin loppuvaiheessa esiintyy usein vakavaa refleksien ylikorostunutta reagoitua erilaisiin ärsykkeisiin, aggressiivisuutta tai letargiaa (syvää unta muistuttava horrostila, josta potilas saadaan heräämään vain hetkeksi), somnolenssia (unenhorros, etenkin hidastuneet liikkeet), stuporia (horros, vähäinen reagoitua ulkoisiin ärsykkeisiin) tai koomaa. Halvaantuminen on tavallista sairastuneilla hevosilla. Yli 80 prosenttia hevosista kuolee neljän viikon sisällä taudin oireiden alkamisesta.

Muidenkin luonnollisten isäntäeläinten taudinkuvaa leimaavat asteittain pahenevat neurologiset oireet, jotka johtavat usein liikkumisvaikeuksiin, halvaantumiseen,

koomaan ja lopulta kuolemaan (Caplazi ym. 1994; Okamoto ym. 2002a,b; Weissenbock ym. 1998a), koottu artikkelissa Ikuta ym. (2002).

4.2.2 Koe-eläimillä

Kokeellisesti Borna-viruksella on saatu infektoitua lukuisia eri eläinlajeja. Ainakin rotalle (Narayan ym. 1983a,b; Hirano ym. 1983), hiirelle (Kao ym. 1984; Rubin ym. 1993; Hallensleben ym. 1998), hamsterille (Anzil ym. 1973), gerbiilille (Watanabe ym. 2001), kanille, marsulle, tupajalle (Sprankel ym. 1978), rhesusmakakille (Stitz ym. 1981), kanalle ja ponille (Katz ym. 1998) on saatu aiheutettua infektiota (katso esimerkiksi katsausartikkelit Durrwald & Ludwig (1997), Rott & Becht (1995) ja Pletnikov ym. (2002a)). Koe-eläinten taudinkuva muistuttaa luonnollisesti infektoituneiden eläinten tautia. Kuitenkin inkubaatioaika, kuolleisuus ja oireet ovat erilaisia eri eläinlajeilla, kannoilla ja käytetyillä viruskannoilla. Herkimpiä taudille ovat Lewis-rotta, kani ja marsu (Jordan & Lipkin 2001; Richt ym. 1997). Kana, apina, nautakarja ja tupaija ovat vähemmän herkkiä, eikä osa eläimistä (muun muassa hamsteri, musta-huppu- värimuunnos –rotta, useat hiirikannat, fretti, kyyhkyne ja koira) sairastu tautiin lainkaan huolimatta persistoivasta Borna-virusinfektiosta keskushermostossa.

4.2.2.1 Rotta

Rotta on Borna-viruksen tutkimuksessa käytetyin, ja siten parhaiten tunnettu koe-eläin. Kokeellisen infektion aiheuttama taudinkuva riippuu rotan geneettisistä ominaisuuksista (eri laboratoriorottakannat), iästä, immuunipuolustuksen tilasta ja käytetystä viruskannasta (Rott & Becht 1995; Richt ym. 1989, Narayan ym. 1983b).

Aikuinen rotta

Eri sisäsiitteisillä laboratoriorottakannoilla kokeellinen Borna-virusinfektio ilmenee hyvin erilaisilla tavoilla. Borna-virusinfektio ei aiheuta enkefaliittia eikä taudin oireita musta-huppu-värimuunnosrotilla (black-hooded, BH), vaikka niiden keskushermostossa voidaan todeta viruksen persistoivaa monistumista (Herzog ym. 1991). Wistar-kannan rotat ovat vähemmän herkkiä taudille kuin Lewis-rotat, mutta niille saadaan kuitenkin aiheutettua vakavaoireinen infektiota (Hirano ym. 1983). Aikuisilla Lewis-kannan

laboratoriorotilla Borna-virusinfektio aiheuttaa aivojen ja aivokalvojen tulehduksen (meningoenkefaliitti) ja siihen liittyen immuunivälitteisen syndrooman käyttäytymismuutoksineen (Narayan ym. 1983b; Hatalski ym. 1998). Taudin oireet alkavat sitä nopeammin, mitä lähempänä keskushermostoa viruksen inokulaatiokohta on (Morales ym. 1988; Carbone ym. 1987). Sieraimensisäisen infektion jälkeen oireet alkavat noin 20 vuorokautta infektion jälkeen, kun taas jalkapohjaan injektoinnin jälkeen 45 - 60 vuorokauden jälkeen. Hiranon tutkimusryhmän (1983) havaintojen mukaan kuukauden ja kahden kuukauden iässä infektoiduista rotista noin 20 prosenttia kuolee kolmesta neljään viikon kuluessa infektiosta. Kahden kuukauden iässä infektoiduista rotista noin 50 prosenttia kuolee neljä kuukautta p.i. mennessä (Hirano ym. 1983).

Aikuisina infektoiduilla rotilla taudinkuva on kaksivaiheinen (Narayan ym. 1983a,b). Akuutissa vaiheessa Lewis-rotat ovat vimmaisista, hyperaktiivisia ja reagoivat voimakkaammin ulkoisiin ärsykkeisiin. Liikkeet voivat olla epäorientoituneita ja juoksu ja hyppiminen huonosti koordinoitua. Stereotyyppinen käyttäytyminen on tavallista. Osa rotista muuttuu aggressiiviseksi häkkitovereitaan kohtaan ja useilla esiintyy lisääntyttä ruokahalua. Urosrotilla voi esiintyä jatkuvaa erektiota (priapismi). Taudin akuutissa vaiheessa soluvälitteinen immuunivaste on voimakas, jolloin keskushermoston perivaskulaari- ja parenkymialueiden solukertymisissä korostuvat CD4+- ja CD8+ -T-solut, tappaja-solut ja makrofagit sekä Th1-tyypin sytokiinit (Hatalski ym.1998).

Kiihkeän vaiheen jälkeen, taudin kroonistuessa, vielä elossa olevat rotat muuttuvat passiivisiksi ja letargisiksi, eivätkä ole kiinnostuneita itsensä hoitamisesta, ympäristöstään tai toisista rotista (Narayan ym. 1983a,b). Useimmat rotat sokeutuvat. Priapismi ja puremaherkkyys saattavat jatkua taudin loppuvaiheessakin. Osa rotista lihoo moninkertaiseksi, kun taas jotkut laihtuvat runsaasta syömisestä huolimatta. Lihominen saattaa riippua käytetystä viruskannasta (Herden ym. 2000). Kroonisessa vaiheessa solukertymät keskushermoston verisuonten ympäriltä ja aivokudoksesta vähenevät, Th2-tyypin sytokiinit lisääntyvät ja humoraalinen eli vasta-ainevälitteinen immuunipuolustus korostuu (Hatalski ym. 1998).

Vastasyntynyt rotta

Borna-virusinfektio aiheuttaa vastasyntyneille rotanpoikasille pysyvän, lähes tolerantin eli Borna-virusantigeeneja vastaan reagoimattoman keskushermostoinfektion, johon liittyy käytösmuutoksia ja muutoksia hermoston anatomiasa, kuitenkin ilman aivotulehdusta (Narayan ym. 1983b; Hirano ym. 1983; Bautista ym. 1994, 1995; Dittrich ym. 1989; Carbone ym. 1991b) (tai katsausartikkeli Pletnikov ym. 2002a). Vastasyntyneiden rottien Borna-virusinfektio seuraamuksineen muistuttaa ihmislasten autismia (Pletnikov ym. 2001). Vastasyntyneenä infektoidua rottia onkin pidetty autismitutkimuksen mallina, ja siksi tutkittu paljon.

Aivojensisäisen infektion jälkeen virus leviää kaikkialle keskushermostossa, kuten hajukäähin, hippokampuksen eli aivoturson, aivokuoren ja pikkuaivojen alueille, sekä myöhemmin myös perifeeriseen ja autonomiseen hermostoon (Stitz ym. 1998). Hermostosolujen lisäksi virusantigeenia tai RNA:ta voidaan todeta myös gliasoluissa eli hermotukisoluihin, kuten astrozyyteissa ja perifeerisen hermoston Schwannin soluissa, sekä parenkyymisoluihin eri puolilla elimistöä (Herzog ym. 1984; Carbone ym. 1991a; Stitz ym. 1998). Vastasyntyneenä infektoidujen rottien eritteissä, kuten syljessä, kyynelneesteessä, virtsassa ja ulosteessa, voidaan todeta infektiivistä virusta tai viruksen RNA:ta (Sierra-Honigmann ym. 1993).

Vaikka vastasyntyneillä infektoiduilla rotanpoikasilla ei todetakaan vastaavaa soluvälitteisen immuunipuolustuksen aktivoitumista kuin aikuisina infektoiduilla rotilla, niillä todetaan astrozytoosia ja mikrogliaosia eli keskushermoston omien tuki- ja puolustussolujen lisääntymistä ja aktivoitumista (Bautista ym. 1995; Hornig ym. 1999; Sauder & de la Torre 1999). Astrozytit ja mikroglia-solut kykenevät tuottamaan lukuisia aineita, kuten sytokiineja ja kemokiineja, jotka voivat osallistua vastasyntyneenä infektoiduilla rotanpoikasilla havaittujen aivojen kehityshäiriöiden syntyyn (Plata-Salaman ym. 1999; Sauder & de la Torre 1999; Sauder ym. 2000). Humoraalinen eli vasta-ainevälitteinen immuunipuolustus toimii, vaikkakin suuremmalla viiveellä kuin aikuisilla (Hirano ym. 1983; Carbone ym. 1991b). Vasta-ainepitoisuudet seerumissa IFA:lla tutkittuna ovat alhaiset, serokonversion ajankohta vaihtelee yksilökohtaisesti, ja tapahtuu ainakin osalla varsin myöhään. Hiranon ja tutkimusryhmän (1983) havainnoissa vastasyntyneenä infektoidusta 35 rotasta puolella vasta-ainetitteri oli > 64 jo kahdesta kolmeen kuukautta infektoinnin jälkeen. Carbonen

ja tutkimusryhmän (1991b) tulosten mukaan kuitenkin $1-5 \times 10^4$ TCID₅₀ infektoiduilla vastasyntyneillä rotanpoikasilla vasta-aineita ei kuitenkaan havaittu vielä yhdelläkään 133 vrk p.i. tutkitulla (titteri <10; n = 5), vaan vasta 144 vrk (titteri 20; n = 2) ja 300 vrk (100; n = 4) infektoinnin jälkeen.

Vastasyntyneiden rotanpoikasten Borna-virusinfektio aiheuttaa kehityshäiriöitä aivoihin, erityisesti alueille, joilla kehitys jatkuu normaalisti vielä syntymän jälkeen (Carbone ym. 1991a,b). Degeneraatiota eli rappeutumista havaitaan erityisesti hippokampuksen ja pikkuaivojen alueella, mutta myös isoainvojen alueella (Hornig ym. 1999; Eisenman ym. 1999; Gonzalez-Dunia ym. 2000). Infektio aiheuttaa hippokampuksen pykäläpoimun (*gyrus dentatus*) granulosyyttien eli jyväsolutjen ja pikkuaivojen Purkinjen solujen tuhoutumista (Carbone ym. 1991a,b; Eisenman ym. 1999). Infektio aiheuttaa muutoksia myös synapsien tiheyteen ja plastisuuteen eli muovautuvuuteen (Gonzalez-Dunia ym. 2000) vaikuttamalla muun muassa kemiallisiin (Volmer ym. 2006) ja sähköisiin synapsitoimintoihin (Koster-Patzlaff ym. 2009).

Aivojen degeneraatiosta seuraa käyttäytymismuutoksia, kuten epänormaalin aktiivista liikkumista, heikentynyttä oppimis- ja muistamiskykyä sekä epätavallisia sosiaalisen käyttäytymisen muotoja (Bautista ym. 1994, 1995; Dittrich ym. 1989; Hornig ym. 1999; Pletnikov ym. 1999a,b; Rubin ym. 1999; Lancaster ym. 2007). Vastasyntyneenä infektoidut rotat ovat usein pienikokoisempia kuin infektoimattomat poikuetoverinsa, vaikka niiden elimistön glukoosi-, kasvuhormoni- ja IGF-1 (insuliinin kaltainen kasvutekijä 1) pitoisuudet ovat terveen rajoissa (Bautista ym. 1994). Muutokset aivoissa ja niistä johtuvat muutokset käyttäytymisessä poikkeavat hieman eri rottakannoilla (Pletnikov ym. 2002b).

4.2.2.2 Hiiri

Kaikenikäiset hiiret saadaan infektoitua Borna-viruksella, ja niillä todetaan korkeita viruspitoisuuksia keskushermostossa (Kao ym. 1984). Hiiriä pidettiin pitkään suhteellisen vastustuskykyisenä infektiolle, koska niillä ei todettu taudin oireita infektion jälkeen. Myöhemmin on kuitenkin havaittu, että taudin oireet voidaan aikaansaada hiirille adaptoimalla eli sopeuttamalla virusta useammassa hiiripasaaseissa (Rubin ym. 1993) tai infektoimalla tiettyä hiirikantaa vastasyntyneenä (Hallensleben ym.

1998). Sopeuttamissukupolvien aikana tapahtuvat mutaatiot voivat lisätä Borna-viruksen virulenssia eli taudinaiheutuskykyä (Ackermann ym. 2007; Nishino ym. 2002). Oireiden insidenssi eli ilmaantuvuus sekä vakavuus riippuvat myös hiirikannasta.

Vastasyntyneenä infektoiduille sisäsiittoisen MRL-kannan hiirille aiheutuu vakavia oireita, jotka alkavat neljän – kuuden viikon kuluttua aivojen sisäisestä infektiosta (Hallensleben ym. 1998). Oireisiin kuuluu taudin alkuvaiheessa tyypillinen takajalkojen epätavallinen asento, kyyryasento, hoitamaton turkki, vinoon kallistunut pää ja myöhemmin molempien takajalkojen paheneva halvaus (parapareesi), painon alentuminen ja kuolema. Samoin kuin aikuisilla rotilla, vakavat taudin oireet ovat yhteydessä elimistön immuunipuolustuksen aktivoitumiseen. Hiirillä on osoitettu, että CD4⁺ ja CD8⁺ -T-solujen puuttuminen elimistöstä viivästyttää taudin ilmenemistä. Immunologinen toleranssi oireettomilla hiirillä johtunee T-solujen aktivoimattomuudesta, vaikka niitä elimistössä olisikin (Hausmann ym. 1999). Hiljattain on saatu todisteita Borna-viruksen leviämisestä keskushermostosta perifeeriseen hermostoon myös hiirillä (Ackermann ym 2010).

4.2.2.3 Hamsteri

Aikuisilla kultahamstereilla (*Mesocricetus auratus*) ei ole havaittu Bornan taudin oireita, vaikka niillä voidaankin todeta pysyvä Borna-virusinfektio keskushermostossa (Anzil ym. 1973). Histologisessa tutkimuksessa hamsterien aivoista ei ole löydetty viitteitä tulehdusreaktiosta eikä niiltä myöskään ole todettu Borna-virukselle spesifisiä vasta-aineita elimistöstä. Infektoidujen hamstereiden keskushermostossa havaittiin kuitenkin Borna-virusantigeenia komplementinsitoutumiskokeella (CF-koe), ja hamstereiden aivoista eristetyllä virusmateriaalilla on pystytty infektoimaan kaneja.

4.2.2.4 Gerbiili

Vastasyntyneenä infektoidut gerbiiliin eli mongolianjirdin (*Meriones unguiculatus*) poikaset vaikuttavat olevan herkempiä kokeelliselle Borna-virusinfektioille kuin vastasyntyneenä infektoidut rotanpoikaset (Nakamura ym. 1999, Lee ym. 2003). Gerbiilipoikaset oireilevat kasvun hidastumisella ja kävelyhäiriöillä, kyyristyneellä olemuksella sekä epätavallisella hyppimisellä noin 20 – 25 vuorokautta infektion

jälkeen. Bornan tauti tappaa siihen sairastuneet gerbiilit. Borna-virus näyttäisi myös leviävän gerbiilin elimistössä nopeammin kuin vastasyntyneenä infektoidun rotan elimistössä. Borna-viruksen RNA:ta on todettu RT-PCR-menetelmällä gerbiilin hajukäämissä, isoissa aivoissa, pikkuaivoissa, hajuhermossa (*Nervus olfactorius*), lonkkahermossa (*Nervus ischiadicus*), hypofyysissä, silmässä ja veressä 20 päivää infektion jälkeen, kun taas samalla virusmäärällä infektoidulla rotalla vastaavana ajankohtana RNA:ta on todettu vain hajukäämissä ja iso- ja pikkuaivoissa. Vastasyntyneenä infektoidujen gerbiilien aivoissa ei ole havaittu anatomisia eikä immunopatologisia muutoksia infektoinnin seurauksena (Watanabe ym. 2001)

4.2.3 Tauti ihmisillä?

Bornan taudin oireena koe-eläimillä, muun muassa rotilla ja kädellisten esiasteilla tupaijoilla (*Tupaia glis*), havaitut käyttäytymismuutokset herättivät kiinnostuksen tutkia viruksen osallisuutta myös ihmisten psykiatrisissa sairauksissa (Amsterdam ym. 1985; Rott ym. 1985). Psykiatrisilla potilailla todettiin tällöin verrokkiryhmään verrattuna suurempi esiintyvyys Borna-virusspesifisiä vasta-aineita seerumissa, mikä viittaa Borna-viruksen mahdolliseen osuuteen psykiatristen sairauksien aiheuttajana. Borna-viruksen vasta-aineita on löydetty ihmisiltä myös Suomesta (Kinnunen ym. 2007). Ihmisten verinäytteistä on löydetty vasta-aineiden lisäksi myös Borna-viruksen RNA:ta ja proteiineja (Planz ym. 2002). Ihmisaivoista on osoitettu IHC- ja ISH-menetelmillä Borna-viruksen antigeenia (de la Torre ym. 1996), joten Borna-virus tarttuu ihmiseen, mutta rooli taudinaiheuttajana on edelleen epäselvä ja ristiriitainen (Carbone *et al.*, 2001; Schwemmler 2001; Planz ym. 2002; Bode & Ludwig 2003; Chalmers *et al.*, 2005; Thakur *et al.*, 2009). Havainnot vaihtelevat tutkimuksien ja käytettyjen menetelmienkin välillä.

5 BORNA-VIRUKSEN EPIDEMIOLOGIAA

Klassinen Bornan tauti tunnetaan jo vuosisatojen takaa hevosten ja lampaiden sporadisesti esiintyvänä, endeemisenä (kotoperäisenä) tautina Keski-Euroopassa, erityisesti Kaakkois-Saksassa (Durrwald & Ludwig 1997). Vaikka suurin osa raportoiduista tautitapauksista on Saksasta (Durrwald ym. 2006), endeemiseen alueeseen

kuuluu myös osa Sveitsiä ja Itävaltaa sekä Liechtenstein (Weissenbock ym. 1998b; Caplazi ym. 1999). Maantieteellisesti endeeminen alue on ollut vuosikymmenien ajan suhteellisen tarkkarajainen. Hevosten ja lampaiden lisäksi Bornan tautia on kuvattu yksittäistapauksina useilla hevoseläimillä, vuohilla, naudoilla, koirilla, kaneilla, linnuilla, hirvillä ja monilla eläintarhaeläimillä, sekä Bornan taudin kaltaista tautia myös kissoilla, strutseilla ja vastikään papukaijalinnuilla (Staeheli ym. 2000; Richt & Rott 2001; K. Ikuta ym. 2002, Kistler ym. 2008).

Klassiseen Bornan tautiin sairastuneiden vuosittainen lukumäärä endeemisen alueen hevosilla ja lampaila laski voimakkaasti 1960-luvun tienoilla (Durrwald ym. 2006). Insidenssin vähenemisen syiksi on esitetty muun muassa maatalouden koneellistumista, hevospopulaatioiden pienenemistä, hevosten siirtymistä lähinnä harrastekäyttöön, yleistä hygieniatason nousua ja tuholaiseläinten torjunnan lisääntymistä. Tauti onkin nykyään melko harvinainen (Durrwald ym. 2006; Staeheli ym. 2000). Vuosittain todetaan alle 100 sairastunutta lammasta tai hevosta koko endeemisellä alueella.

Bornan taudin esiintymisessä endeemisellä alueella on havaittu vaihtelua vuodenajasta ja vuodesta riippuen (Durrwald ym. 2006). Sairastuneita hevosia ja lampaita on enemmän keväällä ja alkukesällä, ja pidempää ajanjaksoa tarkastelemalla on havaittu sairastumispiikkejä kolmen - viiden vuoden välein.

Muista RNA-viruksista poiketen Borna-viruksen eri kantojen genomit ovat säilyneet huomattavan samankaltaisina riippumatta eristysvuodesta tai eläinlajista, josta virus on eristetty (Durrwald ym. 2006). Endeemiseltä alueelta on löydetty viisi toisistaan poikkeavaa Borna-viruksen geneettistä kantaa (Kolodziejek ym. 2005). Geneettinen samankaltaisuus on suurempi samalta maantieteelliseltä alueelta eristetyillä viruksilla. Myös laboratorio- ja rokotekannat ovat samankaltaisia alkuperäalueensa kantojen kanssa. Borna-viruksen N- ja P-proteiineja koodaavien geenien emäsjärjestys eroaa kannasta riippuen vain noin kolmen - neljän prosentin verran (Schneider ym. 1994a). Poikkeuksen muodostaa itävaltalaisesta ponista ei-endeemiseltä alueelta vuonna 2000 eristetty kanta (No/98), jonka tietyt genomien alueet poikkeavat muista kannoista jopa yli 15 prosenttia (Pleschka ym. 2001; Kolodziejek ym. 2005; Nowotny ym. 2000). Kantaa No/98 pidetäänkin omana Borna-viruksen alatyypinään. Borna-viruksen perimä säilyy poikkeuksellisen muuttumattomana myös pitkissä kasvatusjaksoissa soluviljelmissä tai koe-eläinsukupolvissa (Durrwald ym. 2006).

Viimeisten kahden vuosikymmenen aikana serologisia tai molekyylibiologisia viitteitä Bornan taudista on löydetty neurologisesti oireilevilta, mutta myös oireettomilta eläimiltä ja ihmisiltä runsaasti myös perinteisen endemisen alueen ulkopuolelta Euroopasta ja ympäri maailmaa (Durrwald ym. 2006, Lipkin & Briese 2007). Viitteitä on saatu useilla menetelmillä, tosin menetelmien luotettavuudessa, ja tulosten varmistamisessa esiintyy ristiriitaisuuksia (Staheli ym. 2000, Bode ym. 2001, 2008; Sauder ym. 2002; Durrwald ym. 2006). Hevosia ja lampaita voidaan luotettavimmin pitää Borna-viruksen luonnollisina isäntäeläiminä, koska niiden Borna-virusinfektioita on varmistettu useaan kertaan toisistaan riippumattomilla menetelmillä. Borna-viruspesifisiä vasta-aineita on löydetty myös suomalaisista hevosista, kissoista, koirasta ja myyristä (lapinmyyrä ja kaksi metsämyyrää) otetuista verinäytteistä (Kinnunen ym. 2007).

Vastikään on löydetty uudella nykyaikaisella mikrosiruihin pohjautuvalla hybridisaatiotekniikalla vakavaan ylemmän ruuansulatuskanavan hermostolliseen sairauteen (proventricular dilatation disease, PDD) sairastuneilta papukaijalinnuilta (*Psittaciformes*) uudentyyppinen avibornavirus (Avian Borna virus, ABV) (Kistler ym. 2008). Avibornaviruskanta poikkeaa sekä pitkään tunnetusta endemisen alueen hevosesta lähtöisin olevasta Borna-viruksen V-kannasta (Briese ym. 1994) että No/98-kannasta nukleotiditasolla yli 30 prosenttia ja aminohappotasolla yli 20 prosenttia (Honkavuori ym. 2008). Infektioita on sittemmin todettu ympäri maailmaa papukaijoista ja kanarianlinnuista (Staheli ym. 2010). Myös strutseilla todettu Bornan taudin kaltainen tauti (Malkinson ym. 1995) saattaa siis ollakin avibornavirus-infektion aiheuttama.

Juuri julkaistussa artikkelissa esitetään, että Borna-viruksen N-geenin kaltaisia geenialueita on löydetty integroituneena eri nisäkkäiden, muun muassa kädellisten, muutaman jyräjälajin ja päästäisen, genomiin eli Borna-viruksen genomien DNA-kopiota vaikuttaa olleen miljoonia vuosia endogeenisena (Horie & Honda ym. 2010). Integraatiota osoitettiin myös tapahtuvan edelleen sekä solulinjan soluissa että infektoitujen hiirien aivoissa alkaen noin 30 vuorokautta p.i. Löydös vaikuttanee aikaisemmin julkaistujen Borna-viruksen N-proteiinin havaitsemiseen perustuvien (Saunders ym. 2002) tulosten tulkittamiseen, ja myös koko epidemiologian alueeseen.

5.1 Leviäminen ja tartunta

Borna-virus on erityisen mieltynyt keskushermoston limbisen järjestelmän, tyvitumakkeen ja väliaivojen hermosoluihin, mutta leviää suoraan solusta toiseen koko keskushermostossa ja soluviljelmissä tavalla, jota ei vielä täysin tunneta (Morales ym. 1988; Clemente & de la Torre 2007). Hermosolusta toiseen leviämistä pidetään ensisijaisena viruksen leviämistapana elimistön sisällä. Silmä-, sierain- tai vatsaonteloinfektion jälkeen virusproteiineja ja nukleiinihappoja voidaan havaita keskushermostoa lähimpänä olevista, synapsirakojen jälkeisistä neuroneista (Morales ym. 1988; Carbone ym. 1987). Viruksen inokulaatiokohdan etäisyys keskushermostosta ja infektiannon suuruus vaikuttavat oireiden alkamisajankohtaan. Keskushermostoinokulaation jälkeen rotilla ja hiirillä on osoitettu, että Borna-virus leviää hermosoluissa myös perifeeriseen hermostoon, keskushermostosta pois päin (Morales ym. 1988; Stitz ym. 1998; Herzog ym. 1984; Ackermann ym. 2010). Perifeeristen hermojen kautta virus pääsee mahdollisesti leviämään erittäviin elimiin, kuten munuaisiin.

Persistoivasti infektointeiden vastasyntyneiden rotanpoikasten syljessä, kyynelnesteessä ja virtsassa voidaan todeta viruspartikkeleita ja taudinaiheutuskykyisiä viruksia (Morales ym. 1988; Sauder & Staeheli 2003). Aikuiset terveet rotat voivat saada tartunnan, kun niitä pidetään samassa häkissä vastasyntyneenä infektoidun rotan kanssa tai omien vastasyntyneinä infektoidujen poikasten kanssa. Rotilla likaisten purujen välityksellä tapahtuvaa tartuntaa ei ole pystytty osoittamaan, vaan tartunta naitiin rottaan vaatii infektointeiden rotan läsnäolon (Sauder & Staeheli 2003). Myös oireettomilla luonnollisilla isäntäeläimillä on todettu viitteitä Borna-virusinfektiosta, koonnut Staeheli ym. (2000). Viruksen RNA:ta on todettu infektointeiden hevosten (Richt ym. 1993) ja lampaiden (Vahlenkamp ym. 2002) sieraineritteissä, syljessä ja kyynelnesteessä, joten isäntäeläimistä toiseen tapahtuvaa tartuntaa on pidetty mahdollisena leviämisreitteinä (Staeheli ym. 2000). Eritteiden tartutuskykyä ei kuitenkaan ole kiistattomasti osoitettu, ja lisäksi epidemiologiset seikat kyseenalaistavat tartunnan leviämisen ainoastaan isäntäeläimestä toiseen (Staeheli ym. 2000). Lampaasta toiseen tapahtuvaa tartuntaa ei ole todettu. Hevosilla ja laboratoriojyrsijöillä on todettu tapahtuvan vertikaalista tartuntaa (Hagiwara ym. 2000; Okamoto ym. 2003). Borna-

virus on mahdollisesti zoonoottinen, mutta tartuntareittiä eläimistä ihmisiin ei tunneta (Planz ym. 2002).

Hajuepiteelin kautta hajuermoa (*Nervus olfactorius*) pitkin tapahtuvaa tartuntaa pidetään ensisijaisena tartuntareittinä, koska viruksen oletetaan leviävän eritteiden mukana, ja kokeellinen sieraimensisäinen infektio aiheuttaa taudin ainakin lampaille, hevosille, rotille ja hiirille (Richt ym. 1993; Morales ym. 1988; Sauder & Staeheli 2003, koonnut Staeheli ym. (2000) ja Richt & Rott (2001)). Luonnollisesti infektoituneilla hevosilla hajukäämien alueella voidaan todeta tulehdusmuutoksia ja turvotusta jo taudin varhaisissa vaiheissa (Lipkin & Briese 2007). Kuuden päivän kuluttua sieraimensisäisestä infektiosta rotilla on havaittu infektiivistä virusta sierainten limakalvoilla ja hajukäämissä, josta virus on edelleen levinnyt kohti keskushermostoa (Morales ym. 1988). Nenämahaletkulla mahalaukkuun tehty tai suonensisäinen infektio ei aiheuta tautia rotilla (Carbone ym. 1987).

5.2 Reservoari

Borna-virustutkijoista suurin osa pitää reservoaarin olemassaoloa välttämättömänä Bornan taudin epidemiologiassa (Staeheli 2000; Durrwald 2006), mutta osa on sitä mieltä, että reservoaaria ei tarvita lainkaan (Bode 2008).

Kotieläimestä toiseen tapahtuvaa tartuntaa ei pidetä taudin pääasiallisena leviämistapana, vaikka pysyvästi infektoituneiden kotieläinten eritteistä voidaankin eristää viruspartikkeleita (Staeheli ym. 2000). Sairastuneet eläimet kuolevat yleensä nopeasti ja tautitapaukset ovat usein sporadisia etenkin hevosilla. Erilaiset kilpailut ja eläinten kuljettaminen ympäri maailmaa eivät ole lisänneet taudin leviämistä. Bornan tautia esiintyy enemmän tiloilla, joiden hygienia- taso on alhainen, ja joilla eri eläinlajit pääsevät kosketuksiin toistensa kanssa, kuin nykyaikaisemmilla korkeamman hygienian tiloilla, joilla eläimet ovat erillään ja tuholaiseläimiä torjutaan.

Eläinkokeisiin perustuen jyrsijöitä (*Rodentia*) on esitetty mahdolliseksi Borna-viruksen reservoariksi (Staeheli ym. 2000; Durrwald ym. 2006), koska ne voivat infektoitua pysyvästi ja erittää virusta ilman oireita (Morales ym. 1988; Narayan 1983b; Sauder & Staeheli 2003). Jyrsijäreservoarin olemassaoloa puoltavat epidemiologiset seikat, kuten taudinpurkaukset tietyillä alueilla ja erityisesti huonon hygienian tiloilla 3 - 5 vuoden

välein, viruksen geneettinen säilyvyys ja kantojen maantieteellinen jakautuminen (Staehele ym. 2000; Kolodziejek ym. 2005). Tosin jyrsijöiden laaja levinneisyys ja runsas lukumäärä ei korreloi kovin hyvin taudin rajoittuneen esiintymisalueen kanssa (Durrwald ym. 2006). Tautitapausten esiintyminen erityisesti keväällä ja alkukesällä ei myöskään aukottomasti puolla jyrsijäreservoarin olemassaoloa, koska jyrsijäkannat ovat korkeimmillaan loppukesällä ja syksyllä.

Kissoilla tavataan Bornan tautia muistuttavan neurologisen sairauden (staggering disease) yhteydessä viitteitä Borna-viruksen tai sen kaltaisen viruksen infektiosta (Lungren ym. 1993, 1995; Ikuta ym. 2002). Infektoituneiden kissojen aivomateriaalilla ei saada suoraan infektoitua aikuisia Wistar-rottia. Kuitenkin, sopeuttamalla virusta ensin vastasyntyneenä infektoitujen rottien aivokudoksessa, saadaan aiheutettua Bornan tautia muistuttava tauti myös aikuisille Wistar-rotille, joiden aivoista voidaan todeta Borna-virus-RNA:ta (RT-PCR) ja antigeenia (IHC ja ELISA). Ruotsalaisilla, ulkona liikkuvilla, jyrsijöitä pyytävillä uroskissoilla todetaan enemmän Borna-virusinfektion kaltaisia infektoita kuin muilla kissoilla (Berg ym. 1998), mikä puoltaa jyrsijäreservoarin olemassaoloa. Myös ruotsalaiselta ilvekseltä (*Lynx lynx*) on löydetty aivoista viitteitä Borna-virusinfektiosta ISH-, IHC- ja RT-PCR-menetelmillä (Degiorgis ym. 2000).

Endeemisen alueen jyrsijöiltä ei ainakaan toistaiseksi ole löydetty viitteitä Borna-viruksesta (Vahlenkamp ym. 2002; Hilbe ym. 2006; Puorger ym. 2010), koonnut Durrwald ym. (2006). Endeemisen alueen lisäksi viitteitä Borna-virusinfektiosta jyrsijöillä on etsitty myös sen ulkopuolella. Japanilaisista rotista (*Rattus norvegicus*) ei löydetty Borna-virusspesifisiä vasta-aineita seerumista (Tsujimura ym. 1999). Sen sijaan suomalaisten jyrsijälahkoon kuuluvien metsämyyrien (*Myodes glareolus*) ja yhden lapinmyyrän (*Microtus oeconomus*) seerumista löydettiin hiljattain Borna-virusspesifisiä vasta-aineita (Kinnunen ym. 2007). Tulokset varmistettiin usealla menetelmällä, muun muassa P-proteiinia antigeeninä käyttäen, joten ne eivät voi johtua endogeenisen Borna-viruksen N-proteiinin (Horie & Honda ym. 2010) mahdollisesta ilmenemisestä.

Kahdelta endeemiseen alueeseen kuuluvalla alueella Sveitsistä on vastikään löydetty Borna-virusantigeenia ja RNA:ta hyönteissyöjien lahkoon (*Insectivores*) kuuluvilta

kenttäsupiaisilta (*Crocidura leucodon*) (Hilbe ym. 2006; Puorger ym. 2010). Kenttäsupiaisen levinneisyysalueeseen Sveitsissä kuuluu Bornan taudin endeeminen alue ja niiden elämäntavatkin sopivat mahdolliselle reservoaarieläinlajille. Lisäksi kenttäsupiaisten elimistöstä on löydetty viitteitä Borna-viruksen leviämisestä eri elimiin ja kudoksiin; virusantigeenia ja nukleinihappoja on todettu muun muassa virtsarakosta, sylkirauhasista ja hengitysteiden epiteeliltä (Puorger ym. 2010). On mahdollista, että taudinkuva kenttäsupiaisilla on samankaltainen kuin vastasyntyneinä infektoiduilla rotanpoikasilla eli huolimatta persistoivasta viruskuormasta keskushermostossa enkefaliittia oireineen ei todeta (katso 3.2.2.1. Rotta). Kenttäsupiaisten levinneisyysalue ei kuitenkaan kata koko aluetta, jolta Borna-virusinfektioita on havaittu ja raportoitu.

Hyönteisten, lintujen, lepakoiden ja jopa kasvien toimimista reservoaareina tai vektoreina (välittäjinä) on pohdittu (Durrwald ym. 2006). Ruotsalaisten sinisorsien (*Anas platyrhynchos*) ja naakkojen (*Corvus monedula*) ulosteista on saatu monistettua Borna-viruksen RNA:ta (Berg ym. 2001). Muuttolintujen reservoaarina toimimista vastaan on kuitenkin se seikka, että niiden talvehtimisalueilla (muun muassa Afrikasta) ei ole raportoitu vahvistettuja Borna-virustapauksia (Durrwald ym. 2006). Hyönteisvektoria on epäilty, koska tautitapaukset ovat usein sporadisia ja niitä esiintyy runsaammin keväällä ja alkukesällä, jolloin myös hyönteisiä on eniten (Ikuta ym. 2002). Niveljalkaisten pääjaksoon kuuluvia punkkeja on esitetty välittäjäeläimeksi Lähi-idässä, tosin tutkimustuloksia ei ole saatu vahvistettua (Lipkin & Briese 2007). Bornan taudin yhteydessä ei myöskään todeta niveljalkaisten välittämille taudeille tyypillistä voimakasta viremiaa infektion jälkeen (Durrwald ym. 2006).

Borna-viruksen epidemiologinen tutkimuskenttä on laaja, ja siinä on vielä paljon selvitettävää, liittyen muun muassa taudin leviämistapaan, levinneisyyteen ja mahdollisen reservoaari- tai vektorieläimen olemassaoloon (Staeheli ym. 2000, 2010; Berg ym. 2001; C. Sauder & Staeheli 2003; Durrwald ym. 2006; Hilbe ym. 2006, Bode 2008, Horie & Honda 2010). Toistaiseksi ei ole löydetty kiistattomia todisteita Borna-viruksen leviämistavasta, eikä reservoaarieläinlajeja (tai -lajeja), josta kaikki havaitut Borna-virusinfektoituneet olisivat saaneet tartunnan. Kenttäsupiaisista saadut tutkimustulokset (Hilbe ym. 2006; Puorger ym. 2010) kuitenkin puoltavat pikkunisäkkäiden roolia viruksen kantajana ja levittäjänä.

6 BORNA-VIRUKSEN DIAGNOSOINTI- JA TUTKIMUSMENETELMIÄ

Bornan tautia ei voi diagnosoida pelkkien oireiden perusteella, koska oirekuva voi vaihdella eri yksilöillä ja muutkin keskushermoston infektiot voivat aiheuttaa samankaltaisia oireita (Richt & Rott 2001; Sauder ym. 2002). Elävältä eläimeltä tautia ei saada lopullisesti varmistettua, mutta viitteitä infektiosta voidaan saada serologisilla ja molekyylibiologisilla menetelmillä. Menetelmät ovat tarpeellisia myös mahdollisten oireettomien kantajien löytämiseen.

Verinäytteiden hematologiset ja kemialliset analysointitulokset sopivat yleensä viitearvojen sisään (Richt & Rott 2001). Taulukossa 1 esitellään erilaisia tutkimusmenetelmiä, joita Borna-viruksen tutkimuksessa on käytetty. Serologisista menetelmistä epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää (IFA) pidetään luotettavimpana, vaikkakin suhteellisen epäherkkänä (Sauder ym. 2002). Western blot- ja immunohistokemiamenetelmillä osoitettua Borna-virusantigeenia aivoista pidetään luotettavimpana kuoleman jälkeen saatavana todisteena Borna-virusinfektiosta.

Viruksen eristys on luotettavimpia tapoja osoittaa virusinfektio elimistössä (Sauder ym. 2002). Borna-viruksen infektiivisyyden osoittamista varten on kehitetty sekä soluviljelmissä että elävissä eläimissä tehtäviä koejärjestelyjä. Infektiivistä virusta ei kuitenkaan aina saada osoitettua edes luonnollisesti infektioituneista aivoista, joista viitteitä Borna-virusinfektiosta voidaan todeta antigeenin ja/tai RNA:n osoitusmenetelmillä.

Eläviltä eläimiltä ja ihmisiltä elimistön puolustusvasteen tuottamia spesifisiä vasta-aineita voidaan etsiä seerumista tai aivo-selkäydinnesteestä (Ludwig & Thein 1977; Ludwig ym. 1977) ja viruksen genomia veren mononukleaarisolusta (Sierra-Honigmann ym. 1993; C. Sauder & de la Torre 1998) ja eritteistä, kuten syljestä, sierainlimasta tai kyynelneesteestä (Richt ym. 1993). Lopulliseen diagnoosiin pääseminen vaatii kuoleman jälkeen tapahtuvaa histopatologista, immunohistologista ja virologista tutkimusta (Sauder ym. 2002). Borna-viruksen genomia ja proteiineja voidaan usein osoittaa infektioituneen yksilön aivoista, ja joskus muistakin kudoksista. Aivoistakaan tutkittavaksi ei aina osu juuri se alue, jossa Borna-virusinfektio olisi

osoitettavissa, mikä mahdollistaa väärän negatiivisen tuloksen saamisen myös kuoleman jälkeen tehtävillä tutkimuksilla.

Taulukko 1.

Tutkimusmenetelmiä, joita on käytetty elävien tai kuolleiden eläinten (tai ihmisten) elimistön eri materiaalien tutkimiseen Borna-viruksen spesifisten vasta-aineiden, antigeenin tai RNA:n varalta (Sauder ym. 2002; Schindler ym. 2007).

Tutkimusmenetelmä	Vasta- aine	Antigeeni	Virus- RNA	Tutkittava materiaali	Elävältä (E) / kuolleelta (K)
IFA	x			seerumi, plasma, aivo-selkäydinneste	E
Immuunisaostus (IP)	x			seerumi	E
ECLIA	x			seerumi	E
ELISA-menetelmät	x	x (capture ELISA)		seerumi (, aivot ja muut elimet)	E
Western blot –analyysi (WBA)		x		seerumi, aivot ja muut elimet, eritteet	E, K
Immunohistokemia (IHC)		x		aivot ja muut elimet	K
Northern -hybridisaatio			x	solut ja kudokset	(E) K
Erilaiset RT-PCR- menetelmät,			x	kudokset, veri ja eritteet	E, K
<i>In situ</i> -hybridisaatio (ISH)			x	kudokset	K

Borna-virusinfektioiden tutkimustulokset ovat ristiriitaisia, koska maailmanlaajuinen, standardoitu riittävän sensitiivinen ja spesifinen menetelmä taudin tutkimiseen puuttuu, ja menetelmät vaihtelevat laboratorio- ja tutkimuskohtaisesti (Sauder ym. 2002; Staeheli ym. 2000). Kaikkia raportoituja tutkimustuloksia ei ole pystytty toistamaan muissa laboratorioissa, ja osa tuloksista on virheellisiä, johtuen esimerkiksi laboratorioissa tapahtuneesta näytteen kontaminaatiosta (Durrwald ym 2006). Tulosten tulkintaan jatkossa vaikuttanee myös mahdollisen endogeenisen Borna-N:n ilmentyminen (Horie & Honda 2010), ja sen nostamat vasta-aineet.

Kappaleissa 6.1. ja 6.2. esitellään tarkemmin tässä tutkimuksessa käytössä olleet PCR- ja IFA-menetelmät.

6.1 Käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktiomenetelmällä (PCR-menetelmä) voidaan monistaa eksponentiaalisesti tiettyä DNA:n pätkää (Hayden 2004). Monistamiseen tarvitaan viruksen genomien mukaan suunnitellut alukkeet monistettavan kohdan reunoille ja DNA-polymeraasientsyymi kopioimaan aluetta. Yleisimmin käytetty entsyymi on *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasientsyymi. PCR-laitteessa reaktiokierroksia eli syklejä toistetaan yleensä 30 - 50 kertaa ja edellisen syklin DNA-tuotteet toimivat uuden syklin mallijuosteina. Jokainen sykli koostuu kolmesta vaiheesta: 1) denaturaatiosta eli kuumentamisesta, jolloin kaksoisjuosteisen DNA:n juosteet avautuvat, 2) jäähdytysvaiheessa tapahtuvasta alukkeiden ja polymeraasientsyymien kiinnitysvaiheesta (annealing) ja 3) pidennysvaiheesta (ekstensio), jolloin polymeraasientsyymi tekee alukkeiden välisestä alueesta uuden kopion. Perinteisellä menetelmällä PCR:ssa monistuneet tuotteet erotellaan agarosigeelielektroforeesijolla ja havaitaan esimerkiksi etidiumbromidiväriä avulla.

Käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktio (RT-PCR) on polymeraasiketjureaktion muoto, jossa näytteen RNA käänteiskopioidaan ensin DNA-vastinkappaleeseen käänteiskopiointientsyymien avulla. Näin tuotettu komplementaarinen DNA toimii sitten templaattina eli mallijuosteena kuten tavallisessa PCR:ssä. Menetelmää käytetään etenkin RNA-virusten etsimiseen. Nested-PCR-menetelmässä käytetään kahta paria alukkeita. Ensimmäinen alukepari monistaa pidempää aluetta. Toista paria käytetään monistamaan ensimmäisen tuotteen sisältä pienempää aluetta, joka voi olla esimerkiksi tunnusomainen tietylle lajille tai kannalle. Menetelmä sopii näytteille, joissa templaatti-DNA:ta oletetaan olevan hyvin pieniä määriä.

PCR-menetelmä on herkkä ja sillä pystytään havaitsemaan pienikin määrä näytteessä ollutta Borna-viruksen genomia (Sauder ym. 2002). Toisaalta menetelmän herkkyyks on myös ongelmallista, koska näytteet kontaminoituvat helposti samassa laboratoriossa käsiteltyjen infektoitujen solujen RNA:lla tai plasmidi-DNA:lla, ja siten saadaan vääriä positiivisia tuloksia. Nested-PCR on vielä tavallistakin alttiimpi kontaminaatioille. PCR-menetelmässä käytetyt alukkeet määrittävät monistuvan alueen (Sauder ym. 2002). Siten alukkeiden suunnitteluun käytetystä kannasta vähänkin poikkeavat viruskannat saattavat jäädä löytymättä, vaikka virusta olisi näytteessä. Esimerkiksi

No/98 – Borna-viruskanta (Nowotny ym. 2000), joka poikkeaa muista kannoista yli 15 prosenttia, oli hankala löytää perinteisillä RT-PCR ja RT-nested-PCR- menetelmillä.

6.2 Immunofluoresenssimenetelmä

Immunofluoresenssimenetelmällä (IFA) voidaan kuoppalevyille kiinnitetyistä soluista tai kudokseteistä osoittaa proteiineja tai antigeeneja käyttämällä vasta-aineita, joihin on liitetty fluoresoiva merkkiaine, esimerkiksi fluoreskeiini-isotiosyanaatti (FITC) (Prescott ym. 1996). Tulosten lukemiseen tarvitaan mikroskooppi, jossa on erityinen valonlähde, yleensä UV-valo, jolla nähdään merkkiaineen emittoima valo. Immunofluoresenssivärjäys voidaan tehdä suoralla tai epäsuoralla menetelmällä.

Suoraa menetelmää käytettäessä objektilasin kaivon kiinnitetyn näytteen päälle lisätään tutkitulle mikro-organismille spesifistä vasta-ainetta, joka on konjugoitu merkkiaineeseen. Inkubaatioajan jälkeen näyte pestään, jotta sitoutumaton vasta-aine huuhtoutuu pois. Näytteeseen sitoutuneet vasta-aineet voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla. Fluoresenssin jakautuminen osoittaa antigeenin sijainnin näytteessä.

Epäsuoraa menetelmää käytetään tietyille mikro-organismille elimistössä muodostuneiden vasta-aineiden etsimiseen tutkittavasta seeruminäytteestä. Tunnettu antigeeni on kiinnitetty objektilasille, jolloin tutkittavan seerumin sisältämä vasta-aine muodostaa kompleksin antigeenin kanssa. Kompleksit voidaan havaita lisäämällä fluoreskeiinimerkattua anti-immunoglobuliinia tutkimuslasille. Inkubaatioajan ja pesujen jälkeen objektilasi tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla, jolloin voidaan havaita näytteessä olleet vasta-aineet ja niiden sijainti.

Epäsuora immunofluoresenssimenetelmä on yleisin menetelmä elimistön puolustusvasteen tuottamien Borna-virusspesifisten vasta-aineiden etsimiseen eläimiltä ja ihmisiltä (Sauder ym. 2002). Seropositiivisessa näytteessä Borna-virusspesifiset vasta-aineet nähdään tyypillisinä pistemäisinä fluoresoivina alueina infektoiduneiden solujen tumissa. Borna-viruksen antigeenilähteenä käytetään tunnettuja pysyvästi infektoidujen solulinjojen soluja, esimerkiksi Borna-viruskannalla He80-infektoiduja rotan astrozyttisoluja (Kinnunen ym. 2007). IFA:n käyttöä puoltavat sen nopeus,

edullisuus ja suhteellisen korkea spesifisyys (Sauder ym. 2002). IFA-tulosten lukeminen ja tulkinta on kuitenkin subjektiivista, ja vaatii lukijalta kokemusta tumansisäisten pilkkujen oikeassa tulkinnassa. Usein tutkittavan seerumin vasta-ainepitoisuus on niin matala, että joudutaan käyttämään vahvoja laimennoksia (1:5 tai 1:10), jolloin saattaa aiheutua epäspesifiä vasta-aineiden sitoutumista eli vasta-aineet sitoutuvat muuhun kuin niitä alun perin aiheuttaneeseen valkuaisaineeseen. Matalasta vasta-ainepitoisuudesta johtuen myöskään negatiivinen IFA-tulos ei täysin poissulje Bornan taudin mahdollisuutta. Bornan tautiin muilla menetelmillä varmistetusti kuolleilla hevosilla Borna-virusspesifisiä vasta-aineita havaitaan IFA:lla seerumista 41 prosentilla (12/29 tutkitusta) ja likvorista eli aivo-selkäydinnesteestä 61 prosentilla (17/28 tutkitulla) (Grabner & Fischer 1991).

Borna-viruksen vasta-aineita on löydetty myös oireettomilta eläimiltä ja ihmisiltä ympäri maailmaa (Sauder ym. 2002; Staeheli ym. 2000, Bode 2008). Löydös voi kertoa oireettomasta taudinkantajasta tai aikaisemmin sairastetusta taudista. Kyseessä voi olla myös tulosten tulkintavirhe epäspesifin reaktion seurauksena tai muu väärä positiivinen tulos, esimerkiksi uuden tutkimuksen (Horie & Honda 2010) valossa mahdollisen endogeenisen N:n aiheuttamien vasta-aineiden seurauksena. Negatiivikontrollien, etenkin infektoimattomien solujen tutkimus samalla seeruminäytteellä, merkitys korostuu epäspesifisten reaktioiden poissulkemisessa.

7 AINEISTO JA MENETELMÄT

7.1 Myyrät

Kokeeseen otettiin 15 paritettua 1-2-vuotiasta metsämyyrää (*Myodes glareolus*) Jyväskylän yliopiston koe-eläinyksiköstä. Myyrät tuotiin Helsinkiin Eläinlääketieteellisen tiedekunnan Biosafety Level 3-turvalaboratorioon (BSL3), jossa ne asuivat jyrtsijäkaapissa omissa yksittäisilmastoiduissa häkeissään (Isocage Unit, Tecniplast, Italia) (Kuva 2.).



Kuva 2. Myyriä häkeissään jyrtsijäkaapissa (Julkaistu P. Kinnusen luvalla).

Myyrien retro-orbitaalisinuksesta otettiin kapillaariverinäyte (75 μ l) ennen kun ne siirrettiin turvalaboratorioon. Verinäytteet tutkittiin IFA:lla arena-, Puumala-, orthopox- ja Borna-virusvasta-aineiden varalta (kpl 3.1.6). Kahta myyrää lukuun ottamatta kaikilta löytyi vasta-aineita Puumala-virusta vastaan, muttei muita viruksia vastaan.

Kokeella oli Helsingin yliopiston koe-eläintoimikunnan myöntämä koe-eläinlupa. Eläinten vointi ja jyrtsijäkaapin toiminta tarkastettiin joka päivä. Laboratoriojyrtsijöille tarkoitettua ruokaa ja vettä oli tarjolla jatkuvasti. Lisäksi myyrille annettiin perunaa virikkeeksi ja turvaamaan eläinten nesteensaanti sen varalta, että ne eivät heti kokeen alussa osaisi juoda vesipullosta. Vesi ja perunat vaihdettiin joka toinen päivä. Kuivikkeina häkeissä käytettiin kutterin- ja leppäpurua, ja virikkeenä tyhjiä vessapaperirullan hylsyjä. Kerran viikossa myyrät siirrettiin puhtaisiin häkkeihin tai niiden häkit siivottiin perusteellisesti. Kuivikkeita vaihdettiin tarvittaessa useammin.

Kaksi myyristä ei saanut poikasia lainkaan. Muut myyrät (13 emoa) synnyttivät kahdesta kuuteen poikasta. Yhteensä syntyi 52 poikasta (Liite 1). Poikaset vierotettiin siirtämällä emot omiin häkkeihinsä, kun poikaset olivat noin neljän viikon ikäisiä.

7.2 Infektointi

Myyränpoikaset infektoitiin aivoihin vuorokauden sisällä syntymästä. Tutkimuksessa käytettiin Borna-viruskannan He/80 4. rottapasaasia (Staeheli P., Freiburgin yliopisto). Viruslaimennosta tehtiin laimennokset 10^2 , 10^3 ja 10^4 ffu fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS). Laimennoksia säilytettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ja ne lämmitettiin huoneenlämpöiseksi ennen infektoimista.

Taulukko 2. Syntyneiden poikasten lukumäärä/emo ja infektioannos

Myyräemo nro	Poikasten lukumäärä ja infektioannos			
	PBS	10^2	10^3	10^4
2			2	
3				4
4				4
5		4		
6	5			
7				2
8			4	
9				3
10				
11	4			
12				
13			6	
14		4		
15				6*
16			4	
Yhteensä	9	8	16	18

*vain viisi poikasta infektoitu

Poikasille injektointiin 25 G -ruiskulla aivoihin, n. 0,5 cm otsasta kaudaalisesti, n. 5 μl viruslaimennosta tai PBS:ää verrokiksi suunnitelman mukaisesti (Taulukko 2). Myyräemo 15 oli synnyttänyt kuudennen poikasen, kun muut poikaset oli jo infektoitu, joten yksi poikanen jäi infektoimatta.

Kaksi myyräemoista ei saanut poikasia. Niille ruiskutettiin n. 5 μl viruslaimennosta oikeaan sieraimen sisältäen virusta $2,5 \times 10^2$ ffu.

7.3 Lopetus ja näytteenotto

Myyränpoikaset lopetettiin noin kahden, neljän, kuuden tai kahdeksan viikon kuluttua infektoinnista (Taulukko 3).

Taulukko 3.

Poikasten seurannan kesto emo- ja poikuekohtaisesti / viikkoa infektion jälkeen (p.i.)

Emon numero ja infektioannos	Poikasia/ emo	Poikaset numeroituna ja lopetusajankohta			
		2 viikkoa p.i.	4 viikkoa p.i.	6 viikkoa p.i.	8 viikkoa p.i.
PBS					
6	5	6.1 + 6.2	6.3.	6.4. + 6.5.	0
11	4	11.1.	11.2. + 11.3.	11.4.	0
<i>Poikasia yht.</i>	9	3	3	3	0
10² ffu					
5	4	5.1.	5.2.	5.3 + 5.4.	0
14	4	14.1.	14.2. + 14.3.	14.4.	0
<i>Poikasia yht.</i>	8	2	3	3	0
10³ ffu					
2	2	0	0	2.1.	2.2.
8	4	8.1.	8.2.	8.3. + 8.4.	0
13	6	13.1. + 13.2.	13.3. + 13.4.	13.5. + 13.6.	0
16	4	16.1.	16.2. + 16.3.	16.4.	0
<i>Poikasia yht.</i>	16	4	5	6	1
10⁴ ffu					
3	4	3.1.	3.2.*	3.3.	3.4.
4	4	4.1.	4.2. + 4.3.	4.4.	0
7	2	7.1.	0	7.2.	0
9	3	9.1.	9.2.	9.3.**	0
15	6	15.1. + 15.2.	15.3. + 15.4.	15.5. + 15.6.	0
<i>Poikasia yht.</i>	19	6	6	6	1
<i>Poikasia ryhmässä</i>					
<i>yhteensä</i>		15	17	18	2

*Poikasen 3.2 lopetettiin 23 vuorokautta infektoinnin jälkeen hermosto-oireiden takia eläinsuojelullisista syistä. **Poikasen 9.3 löytyi häkistä itsestään kuolleena 36 vuorokautta infektoinnin jälkeen.

Suurin osa myyräemoista lopetettiin noin 40 vuorokautta (md 40; vaihteluväli 39-58 vrk) poikasten infektoinnin jälkeen (*post infection*, p.i.). Toinen sieraimen infektoiduista aikuisista myyristä (#12) kuoli itsekseen häkin väärästä asennuksesta johtuneeseen hapenpuutteeseen. Toinen sieraimen infektoiduista (#10) lopetettiin 36 vrk p.i.

Ennen myyrien nukutusta niitä pidettiin noin 10 minuutin ajan pienessä verkkokantisessa ritiläpohjaisessa astiassa, jotta mahdollisimman paljon virtsaa saataisiin talteen. Myyrät nukutettiin isofluraanilla (IsoFlo vet inhalaatiohöyry, neste, Abbott Laboratories UK Ltd, UK). Myyriltä otettiin verinäyte kapillaariin (50 tai 75 µl) retro-orbitaalisiinuksesta heti nukuttamisen jälkeen. Poikasista 3.1, 9.1 ja 11.1 ei saatu otettua verinäytettä. Nukutetut myyrät lopetettiin niskamurrolla.

Taulukko 4.

Näytteenottosuunnitelma myyrien elimistä ja eritteistä.

Elin	RNA-eristys	Formaliini	Cellstar-putki
Aivot	x	x	x
Sylkirauhaset	x	x	x
Sydän	x	x	
Keuhkot	x	x	
Maksa	x	x	
Perna	x	x	
Munuainen	x	x	x
Virtsarakko	x	x	
Peräsuoli (+ ulostetta)	x		
Sukupuolielimet	x	x	
Reisilihas	x	x	
Virtsa	x		
Veri rintaontelosta	x		x

Myyrät preparoitiin välittömästi lopetuksen jälkeen turvalaboratoriossa. Preparointivälineet vaihdettiin, ja alusta desinfioitiin alkoholilla myyrien välillä. Näytteitä säilöttiin 100 µl tai 50 - 100 mg pakasteeseen -80 °C:een RNA-eristystä varten, formaliiniin immunovärjäyksiä varten ja erikseen Cellstar-kryoputkiin -80 °C:een mahdollisia transmissiotutkimuksia varten suunnitelman mukaisesti (Taulukko 4). Aivokudosta 50 - 100 mg pakastettiin suoraan RNA-eristyksessä käytettävään 1 ml:aan lyysauspuskuria (TriPure Isolation Reagent, Roche Molecular Biochemicals

Cat.No. 1667 157). Preparoinnin yhteydessä havaitut verihyytymät kerättiin rintaontelosta. Virtsa otettiin talteen myös preparoinnin yhteydessä, suoraan rakosta steriilillä 25 G neulalla ja ruiskulla, jos sitä siellä oli. Virtsanäytettä ei saatu kuudesta poikasesta (#11.1, 9.1, 8.1, 13.2, 6.4, 5.3).

7.4 Kudosten homogenointi ja RNA-eristys

Näytteeksi otetut kudokset homogenoitiin niissä olevan RNA:n vapauttamista ja eristämistä varten. Kierrekorkilliseen putkeen laitettiin enintään 100 mg kudosta, 1 ml Tripure-liuosta, yksi steriili lasikuula (\varnothing 5 mm) ja hiukan steriiliä hiekkaa. Kudokset homogenoitiin MagnaLyser-laitteella (Roche). Aivot homogenoitiin nopeudella 5000 rpm 45 s ajan. Näytteet jäähdytettiin laitteeseen kuuluvalla jäähdytysalustalla vähintään 45 s ajan. Jäähdytyksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin +4 °C:ssa nopeudella 3000 g 5 min ajan (Eppendorf, Centrifuge 5810R). Pohjasakan päälle kertynyt neste (supernatantti) kerättiin talteen ja, jos eristystä ei jatkettu välittömästi, neste pakastettiin – 20 °C enintään neljäksi viikoksi.

RNA-eristykseen käytettiin fenoli-kloroformipohjaista TriPure Isolation Reagent – reagenssia valmistajan ohjeiden mukaan (Roche Molecular Biochemicals Cat.No. 1667 157). Valmis RNA-pelletti liuotettiin 20 μ l:aan ribonukleaasitonta vettä, josta jatkettiin suoraan käänteiskopiointiin. Ellei käänteiskopiointia voitu jatkaa heti, RNA tallennettiin –20 °C:seen saostuksen jälkeen 75 % EtOH:ssa enintään yhdeksi viikoksi.

7.5 Genomin etsiminen

Näytekudoksesta eristetty RNA, mahdollisine Borna-viruksen RNA-genomeineen ja lähetti-RNA-molekyyleineen, muutettiin käänteiskopiointientsyymien avulla komplementaariseksi DNA:ksi, jonka jälkeen mahdollisesti muodostunutta Borna-viruksen N-proteiinia koodaavaa DNA-jaksoa monistettiin PCR-menetelmällä.

Ennen käänteiskopiointia RNA-liuos alkudenaturoitiin 95 °C:ssa 5 min ajan (Heating Block Grant QBD2). Käänteiskopiointiin (RT-reaktio) tehtiin 15 μ l reaktioseos, joka koostui seuraavista: M-MuLV RT-puskuri, 250 μ M dNTP-seos (deoksinukleotiditriposfaattiseos), 35 u Ribonukleaasi-inhibiittori, 2,5 μ M p40OF-aluke,

2,5 μ M p40OR-aluke, 5 μ M Oligo dT18 (18 tymidiinin ketjut, jotka tarttuivat lähetti-RNA:n poly-A-hänttiin), 40 u M-MuLV- Reverse Transcriptase -entsyymi (Fermentas, #EP0351). Alukkeiden sekvenssit olivat seuraavat: p40OF (kiinnittyy He/80 verrokkikannan nukleotideihin 210-227) ATCTAGGCAGAACGCAGTG ja p40OR (nukleotidit 585-606) GTAGTGTAGCAGTCTCACCATG. Seokseen lisättiin 5 μ l eristettyä RNA:ta, ja seosta inkuboitii 1,5 tunnin ajan 37 °C:ssa (Queue-lämpökaappi). Positiiviverrokkina käytettiin samalla viruskannalla kokeellisesti infektoidun Wistar-rotan aivonäytettä. Negatiiviverrokkina käytettiin ribonukleaasitonta vettä.

PCR-reaktioseosta tehtiin 95 μ l. Reaktioseoksen koostumus oli: Taq-puskuri, jossa mukana $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 μ M dNTP-seos, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 μ M aluke p40OF, 0,5 μ M aluke p40OR, 2,5 u Taq DNA Polymeerasi – entsyymi (Fermentas #EP0402). Reaktioseos säilöttiin pakasteessa -20 °C:ssa enintään 3 viikkoa, jos sitä ei käytetty heti. Ennen PCR-ajoa seokseen lisättiin templaatiksi 5 μ l käänteiskopioinnin tuotetta, komplementaarista DNA:ta. Ohjelman aikana DNA:ta monistettiin alkudenaturaation (95 °C:ssa 3 min) jälkeen 35 sykliä, joissa toistuivat DNA:n denaturaatio minuutin ajan 95 °C:ssa, alukkeiden kiinnittyminen minuutin ajan 52 °C:ssa ja pidennysreaktio minuutin ajan 72 °C:ssa. Loppupidennysreaktio tapahtui 72 °C:ssa 10 min ajan. Ohjelman loputtua laite säilytti näytteet + 4 °C:ssa. PCR ajettiin Haartman-instituutissa (PTC-200, Peltier Thermal Cycler).

Monistustuotteet todettiin agarosigeelielektroforeesilla (Electrophoresis Power Supply), jota varten valmistettiin 1,5% agarosigeeli TAE (tris-asetatti-EDTA) -puskuriin (SeaKem (Canbrex)). Geelin kaivoon pipetoitiin 10 μ l seosta, jossa oli PCR-tuotetta 10 μ l ja 2,5 μ l 5x Loading Buffer -painopuskuria (60% glyseroli, 10 mM EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), 0,3 % BPB (bromifenolisinen)). Käytetty molekyylipainomerkkiaine oli pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23, (Fermentas #SM0223). Ajoaika TAE-puskurissa oli noin 40 min 100 V:lla, minkä jälkeen geeli värjättiin etidumbromidilla (10 μ g/ml) (Amresco) heiluttajalla (FinePCR, SH3OL, Reciprocating Shaker) n. 15 min ajan ja huuhdeltiin vedellä n. 30 min ajan vaihtaen vettä 4 min välein. Geelistä etsittiin 396 bp kokoista monistustuotetta, ja se kuvattiin UV- valossa (Gel Doc 2000, ohjelma Quantity One, Bio Rad).

7.6 Vasta-aineiden etsiminen

Myyrien verinäytteistä etsittiin vasta-aineita Borna-virusta vastaan käyttämällä epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää. Verinäytteet laimennettiin PBS-liuokseen 1:10 laimennokseksi, joka vastaa karkeasti seerumlaimennosta 1:20. Positiiviverrokkina käytettiin BDV-infektoidun Lewis-rotan seerumia laimennoksena 1:100 (Sibylle Herzog, Giessen).

Antigeenina objektilasin kaivoissa oli Borna-viruksen He/80 -kannalla infektoituja, asetonilla kiinnitettyjä ja permeabilisoituja C6-soluja (rotan astrosyyttisoluja) (Kinnunen ym. 2007). Kussakin kaivossa oli noin 40 000 astrosyyttiä, joista 1/3 oli infektoituja ja 2/3 infektoimattomia. Kaivoihin lisättiin 25 µl näytettä. Laseja inkuboitiiin 37 °C:ssa (Queue-lämpökaappi) 30 min, jonka jälkeen niitä pestiin PBS:llä (3 x 5 min) ja tislattulla vedellä 5 min. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin FITC-konjugoitua), kanissa tuotettua, anti-mouse IgG:tä (DAKO, F0261), jota lisättiin kaivoihin 25 µl. Laseja inkuboitiiin 37 °C:ssa 30 min, jonka jälkeen ne pestiin PBS:llä (3 x 5 min) ja tislattulla vedellä 5 min. Negatiiviverrokkina käytettiin pelkkää PBS-liuosta. Valmiit lasit tutkittiin mikroskoopilla UV-valossa (Olympus U-RFL-T). Positiiviseksi tulkittiin näytteet, joita sisältävien kaivojen soluissa todettiin fluoresoivia pilkkuja joka kolmannessa tumassa. Jos pilkkuja oli vähemmän, näyte tulkittiin rajatapauksena negatiiviseksi.

Aikuisten myyrien verinäytteistä etsittiin vasta-aineita ortopox-, Puumala- ja arena-virusia vastaan samalla menetelmällä kuin Borna-viruksen vasta-aineita. Antigeenina käytettiin suomalaisia Puumala- ja lehmärokko (ortopoxvirukset)- sekä LCMV:n ulkomaista Armstrong (arenavirukset) -viruskantaa, jolla oli infektoitu n. 10 % kaivoihin kiinnitetyistä Vero-E6-soluista loppujen 90 %:n toimiessa negatiivikontrolleina.

8 TULOKSET

8.1 Myyrätulokset

Myyränpoikasten käyttäytymistä, virkeyttä ja ulkoisia merkkejä sairastumisesta seurattiin päivittäin vertaamalla infektoituja verrokkipoikasiin. Poikasten ylimääräistä käsittelyä ja hermostuttamista vältettiin, joten niiden alettua liikkua pesästä seuranta tapahtui pääsääntöisesti tarkkailemalla häkin ulkopuolelta.

Poikanen 3.2 (infektoitu laimennoksella 10^4 ffu) lopetettiin 23 vrk infektion jälkeen (p.i.), koska se kiersi pakonomaisesti pientä ympyrää häkissään. Poikanen 9.3 (infektoitu 10^4 -laimennoksella) löytyi häkistään kuolleena 36 vrk p.i.. Poikanen oli ollut erittäin rauhaton edellisenä päivänä. Poikanen 13.5 (infektoitu 10^3 -laimennoksella) lopetettiin 42 vrk p.i.. Aikaisemmin poikanen oli ollut vilkas, mutta lopetuspäivänä se oli rauhallinen, tärisevä, ataktinen, pienikokoinen ja laiha, eikä se ollut hoitanut turkkiaan. Yhden poikasen (5.3 tai 5.4¹, infektoitu 10^2 -laimennoksella) oli havaittu tärisevän hieman häkissään 41 vrk p.i.. Seuraavana päivänä, kun poikanen lopetettiin suunnitelman mukaisesti, ei oireita enää havaittu. Yhteensä siis neljällä poikasella 42 infektoidusta (9,5 prosenttia) esiintyi vakavia oireita. Yhdelläkään yhdeksästä verrokkipoikasesta ei esiintynyt vastaavanlaisia oireita.

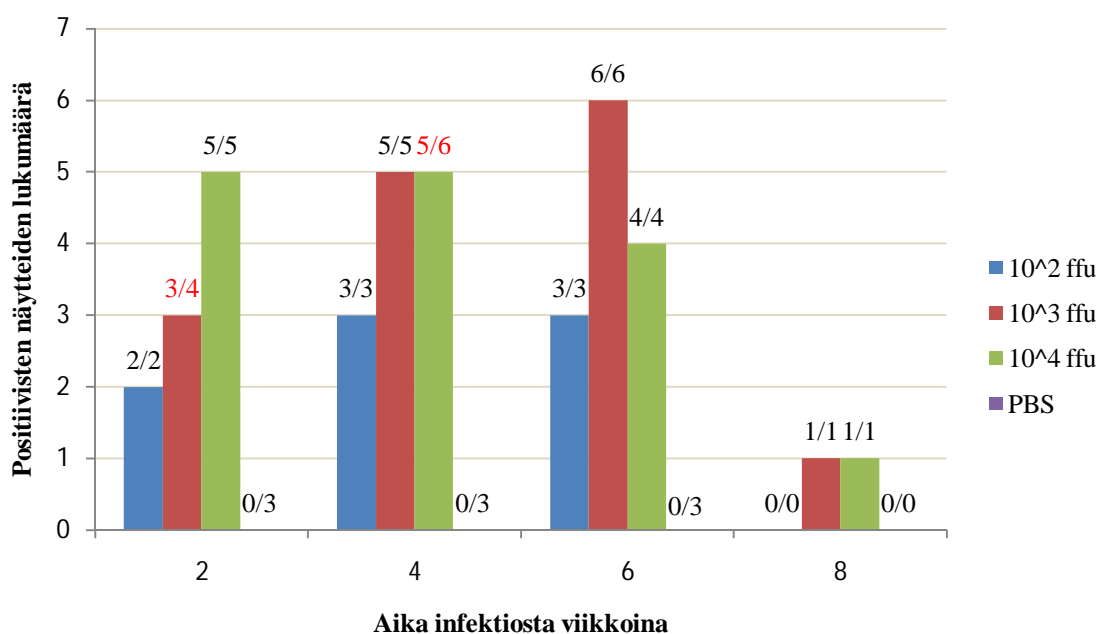
Pisimpään (vähintään 40 vrk) seuratuista 15 infektoidusta poikasesta kuusi (#3.4, 8.3, 8.4, 15.5, 15.6 ja 13.6) oli erittäin vilkasta: ne hyppivät ja juoksivat häkkien siivouksen yhteydessä, ja lopetusta varten kiinni otettaessa enemmän kuin muut. Vilkkaat poikaset oli infektoitu joko 10^3 tai 10^4 -laimennoksella. Yksikään yhtä pitkään seuratuista kolmesta verrokkipoikasesta tai pienemmällä virusmäärällä infektoidusta poikasesta ei käyttäytynyt samoin.

Yhteensä 10 poikasta 42 infektoidusta (24 prosenttia) oireili poikkeavasti yhdeksään verrokkipoikaseen verrattuna (LIITE 1). Infektoinnista aiheutuvan oieriskin eron p-arvo ei ollut tilastollisesti merkitsevä näillä infektoitujen ja verrokkimyyrien lukumäärillä ($p = 0,058$). Myyräemoilla tai sieraimiin infektoituilla aikuisilla myyrillä ei havaittu poikkeavaa käyttäytymistä verrokkipoikasten emoihin verrattuna.

¹ Poikaset numeroitiin vasta lopetuksen yhteydessä, koska tussimerkinnot eivät pysyneet niissä eikä invasiivisia menetelmiä haluttu käyttää.

8.2 Genomin osoittaminen

Kaikkien myyräpoikasten aivonäytteet tutkittiin PCR-menetelmällä Borna-viruksen N-proteiinin geenin osoittamiseksi (Liite 1). Kahta poikasta (13.2 ja 7.2) lukuun ottamatta kaikilta infektoiduilta monistui Borna-viruksen genomia (Kuva 3). Negatiiviseksi jäänyt poikanen 7.2 oli infektoitu viruslaimennoksella, joka oli ollut +4 °C:ssa yön ajan². Käytetyn viruslaimennoksen suuruudella tai poikasen elinvuorokausien lukumäärällä ei havaittu vaikutusta PCR-tuloksiin. Itsestään kuolleiden tai eläinsuojelullisista syistä lopetettujen poikasten aivoissa todettiin Borna-viruksen RNA:ta. PBS-injektoitujen verrokkipoikasten tai aikuisten myyrien, myöskään sieraimen infektoitujen, aivonäytteissä ei havaittu Borna-viruksen RNA:ta.

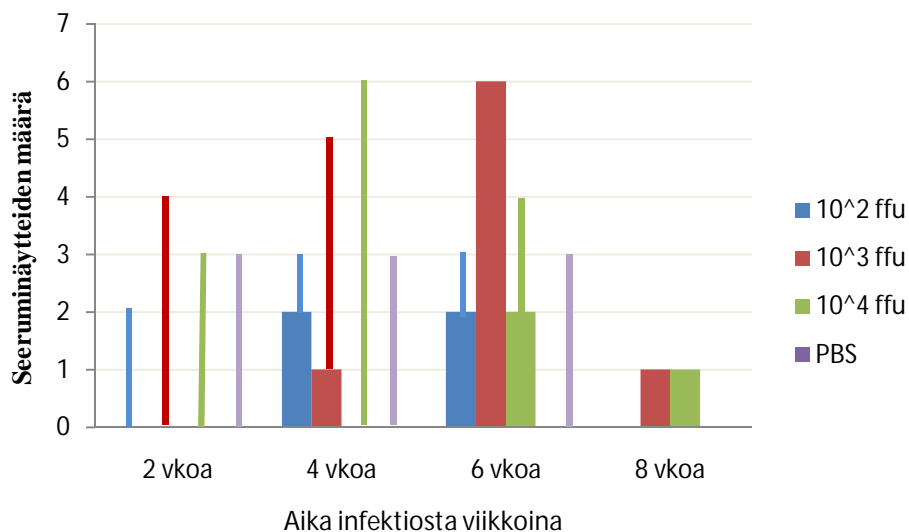


Kuva 3. Myyräpoikasten aivonäytteiden PCR-positiiviset tulokset suhteessa käytettyyn infektoannokseen ja aikaan infektiosta. Pylväiden päältä ilmenee positiivisten näytteiden osuus kaikista saman infektoannoksen näytteistä (x/x, punaisella poikkeavat tulokset).

² Poikasia syntyi oletettua enemmän, joten kahdelle poikaselle (7.1 ja 7.2) käytettiin edellisestä päivästä ”yli jäänyttä” viruslaimennosta, jota oli säilytetty jääkaapissa edellisestä päivästä.

8.3 Vasta-ainelöydökset

Myyränpoikasten verinäytteistä etsittiin epäsuoralla immunofluoresenssimenetelmällä (IFA) IgG-vasta-aineita Borna-virusta vastaan. Varhaisimmat vasta-ainelöydökset saatiin vasta neljä viikkoa infektion jälkeen lopetetuista poikasista (Kuva 4). Viruslaimennoksella 10^2 ffu infektoiduista poikasista 2/3 oli vasta-ainepositiivisia sekä neljä että kuusi viikkoa p.i.. Kaikki laimennoksella 10^3 ffu infektoidut poikaset, ja vain puolet 10^4 ffu infektoiduista olivat vasta-ainepositiivisia kuusi viikkoa p.i.. Itsestään kuolleen poikasen (9.3) verinäytteestä todettiin vasta-aineita (Liite 1). Verrokkipoikasten sekä eläinsuojelullisista syistä lopetetun poikasen (3.2) verinäytteistä ei todettu vasta-aineita. Kolmelta poikaselta (3.1, 9.1, 11.1) ei saatu verinäytettä. Aikuisilta myyriltä lopetuksen jälkeen otetuista verinäytteistä ei todettu Borna-virusvasta-aineita.



Kuva 4. Myyränpoikasten verinäytteiden vasta-ainelöydökset suhteessa infektiannonkseen ja aikaan infektiosta, IFA. Leveä pylväs = positiivinen näyte, kapea pylväs = negatiivinen näyte.

9 POHDINTA

Tässä pilottitutkimuksessa osoitettiin, että Borna-viruksella voidaan kokeellisesti infektoida vastasyntyneitä metsämyyrän poikasiasa. Viitteitä infektiosta saatiin sekä serologisesti epäsuoralla IFA:lla että molekyylibiologisesti RT-PCR-menetelmällä.

9.1. Myyränpoikaset

Myyrien käyttäytymistä seurattiin kokeen aikana päivittäin. Poikasten yksilöllinen seuranta ei onnistunut, koska poikasista ei saatu luotettavasti merkittäviä ei-invasiivisilla menetelmillä. Infektoiduista poikasista 79 prosentilla (33/42) ei esiintynyt poikkeavaa käyttäytymistä.

Kuusi poikasta (#3.4, 8.3, 8.4, 15.5, 15.6 ja 13.6) eli 12 prosenttia (6/52) kaikista poikasista oli noin viiden - kuuden viikon iässä selvästi vilkkaampia kuin toiset. Lemmikkihiirillä tunnetaan niin sanottu kirppuikäkausi, joka alkaa noin kahden viikon iässä. Silloin hiirenpoikaset ovat vaikeasti käsiteltäviä, koska ne purevat herkästi ja hyppivät silmittömästi mihin tahansa. Kausi menee ohi yleensä viimeistään neljän viikon ikäisenä ja saattaa olla yhteydessä emosta vieroitukseen. Metsämyyrillä vastaavaa ei ole havaittu. Tosin myyrätutkijan mukaan metsämyyrien käyttäytymisessä käsiteltäessä on muutenkin suuria eroja: toiset tekeytyvät kuolleiksi tai eivät reagoi lainkaan, ja toiset ovat hyvin vilkkaita (Kallio K, sähköpostikommentti 14.5.2009). Kuuden viikon iässä myyränpoikaset aikuistuvat ja hormonaaliset muutokset saattaisivat myös selittää villiä käyttäytymistä (Henttonen H. sähköpostikommentti 20.5.2009). Tosin enemmistöllä tämän ikäisiksi tai vanhemmiksi seuratuista poikasista vastaavaa käytöstä ei havaittu. Vilkkaita poikasista neljä oli naaraita ja kaksi urosta, jolloin selkeää sukupuolieroa käyttäytymisessä ei ole havaittavissa, ainakaan näin pienellä eläinmäärällä. Käyttäytymiserot voivat olla myös emosta riippuvaisia (Henttonen H. sähköpostikommentti 14.4.2010). Tässä aineistossa ei ollut selkeästi havaittavissa vilkkaiden poikasten keskittymistä tietyille emolle.

Villien myyränpoikasten lisäksi neljällä myyränpoikasella (#3.2, 9.3, 13.5 ja 5.3 tai 5.4), 9,5 prosentilla kaikista infektoiduista (4/42) poikasista, havaittiin erilaisia muita, vakaviakin oireita tutkimuksen aikana, ja yksi poikanen (#9.3) kuoli itsestään. Näiden neljän myyrän virusannokset vaihtelivat 10^2 - 10^4 ffu välillä. Yhteensä 24 prosenttia (10/42) infektoiduista myyränpoikasista oireili poikkeavasti verrokkipoikasiin verrattuna. Pienen otoskoon takia tulos ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä, sillä oireriskien erojen p-arvo on $> 0,05$. On mahdollista, että viruksen injektointi aiheutti mekaanisesti vamman tai bakteeritulehduksen aivoihin ja oireet olivat sen seurausta. Poikasella 3.2 oli vakavimmat oireet, joten erityisesti sen kohdalla ei ole poissuljettua,

että kyseessä oli injektiovamma tai bakteeritulehdus. Toisaalta verrokeille pistettiin aivoihin samalla tavalla samaa laimennusliuosta (PBS), mutta ilman virusta, eikä niillä havaittu poikkeavia oireita tai käyttäytymistä. On myös mahdollista, että oireet johtuivat Borna-virusinfektiosta. Asian varmentamiseksi tarvittaisiin enemmän ainakin verrokkimyyriä: yksi oireeton verrokkimyyrä lisää olisi tuottanut oireriskien erolle p-arvon 0,046, jolloin eroa voitaisiin pitää tilastollisesti merkitseväenä (<0,05). Toisaalta selvään eroon, eli siihen, että oireriskin luottamusvälit eivät ulottuisi toistensa alueelle, tarvittaisiin peräti 22 oireetonta verrokkia enemmän.

Vastasyntyneinä Borna-viruksella infektoiduilla rotilla on havaittu normaalista poikkeavaa käyttäytymistä, vaikka varsinaisia Bornan taudin oireita ei todetakaan (ks. kappale 3.2.2.1. Rotta). Osa vastasyntyneinä infektoiduista rotista on myös oireillut poikkeavasti, ja myös kuollut kokeiden aikana tuntemattomista syistä, esimerkiksi Sauder & de la Torre (1999). Puumalavirus (PUUV) -infektiolla on kantajametsämyyrille positiivisia vaikutuksia muun muassa maternaalisten vasta-aineiden kautta (Kallio ym. 2006), ja infektio saattaa myös muuttaa ainakin aikuisten urosten virtsaamiskäyttäytymistä ja lisätä virtsan määrää (Henttonen H. sähköpostikommentti 15.4.2010). PUUV-infektio kuitenkin heikentää metsämyyrien talven yli selviytymistä (Kallio ym. 2007). Toimiakseen reservoarina eläin ei voi sairastua liian pahoin kantamastaan patogeenista. Patogeenille olisi edullista, jos se ennemminkin edesauttaisi kantajaeläimensä selviytymistä luonnossa. Suurimmalla osalla infektoiduista myyränpokasista (33/42 infektoitua) ei havaittu poikkeavaa käyttäytymistä tai oireilua verrattuna verrokkipoikasiin (9 poikasta), eikä villin käyttäytymisen vaikutusta myyrien elämään ja selviytymiseen tutkittu tämän tutkimuksen yhteydessä.

9.2. Myyräemot

Tutkimuksessa mukana olleiden aikuisten myyrien, mukaan luettuna sieraimensisäisesti infektoidut, aivokudoksessa ei havaittu Borna-viruksen genomia eikä emoilla havaittu Bornan taudin oireita. Emot vieroitettiin pokasista noin neljä viikkoa infektoinnin jälkeen ja lopetettiin noin seitsemän viikon kuluttua infektiosta. Vastasyntyneinä infektoitujen rotanpokasten emoilla havaittiin taudin oireita kolmen – viiden kuukauden kuluttua pokasten infektoinnista (Morales ym. 1988), vaikka aikuiset naiivit

rotat saivatkin oireita jo viiden – kuuden viikon kuluttua infektoituneiden rottien kanssa samaan tilaan laittamisesta (Sauder & Staeheli 2003). Myyräemot olisivat saattaneet sairastua tautiin myöhemmin, jos koetta olisi jatkettu.

Emojen verinäytteet tutkittiin kokeen alussa arena-, Puumala-, orthopox- ja Borna-virusvasta-aineiden varalta. Kahta lukuun ottamatta kaikilla emoilla todettiin PUUV-spesifisiä vasta-aineita. Suomen luonnosta on vaikeaa saada PUUV-negatiivisia eläimiä, koska iso osa suomalaisista myyristä kantaa ja levittää virusta. Jo pelkästään tämän takia koe suoritettiin turvalaboratoriossa, jonne menemistä varten pukeuduttiin suojaruosteisiin. Poikasten verinäytteitä ei tutkittu kokeen lopussa PUUV-spesifisten vasta-aineiden varalta. Kuitenkin tiedetään, että infektoituneet, vasta-ainepositiiiset myyrät välittävät vasta-aineita poikasilleen, jotka ovat sen seurauksena väliaikaisesti suojassa PUUV-infektiolta. Maternaalisilla vasta-aineilla on muutenkin positiivinen vaikutus myyränpoikasten alkutaipaleeseen ja kehitykseen (Kallio ym. 2006). PUUV-infektion tai maternaalisten vasta-aineiden mahdollista vaikutusta Borna-virusinfektion syntyyn ja Borna-viruksen aiheuttamaan elimistön immuunivasteeseen ei otettu huomioon tässä tutkimuksessa eikä aiheesta löytynyt tutkimustietoa.

Eri jyräjälajeilla ja saman lajin kannoillakin on havaittu poikkeavuuksia herkkyydessä sairastua oireilevaan Bornan tautiin (kappale 3.2 Taudinkulku ja oireet). Tässä tutkimuksessa ei kiinnitetty huomiota myyrien geneettisiin ominaisuuksiin ja niiden mahdollisiin vaikutuksiin tutkimustuloksiin.

Tutkimusta varten turvalaboratorioon tuotiin ryhmä kantavaksi oletettuja myyriä. Näistä kuitenkin vain kaksi (myyrät 2 ja 3) sai poikasia. Kun suuri mahojen määrä havaittiin, koetta varten astutettiin saman tien ja tuotiin parin viikon kuluttua uusi emoryhmä. Siitä vuorostaan kahta lukuun ottamatta kaikki saivat poikasia, ja osa poikueista oli odotettua isompia. Hyvä poikassaalis toisesta emoryhmästä yllätti, koska edellisessä ryhmässä oli niin monta mahoja. Ikään kuin ylimääräisinä syntyneet poikaset infektoitiin suuremmilla virusmäärillä, jotta alkuperäisoletuksen mukaan saataisiin varmemmin tuloksia (katso kappale 7). Koska kokeen pituutta ei ollut mahdollista jatkaa, vain kaksi poikasta (ensimmäisistä emoista) ehti tavoiteltuun kahdeksan viikon ikään ennen lopetusta.

9.3. PCR- tulosten pohdintaa

Kahta myyränpoikasta (#13.2 ja 7.2) lukuun ottamatta kaikkien infektoitujen poikasten (40/42) aivokudoksessa todettiin Borna-viruksen genomia riippumatta elinvuorokausien määrästä tai viruslaimennoksesta. Jos virus olisi replikoitumisen sijaan inaktivoitunut aivoissa, elimistön puolustusmekanismit (esimerkiksi makrofagit) olisivat kyenneet tuhoamaan viruksen jo ensimmäisen kahden viikon aikana. Tällöin virus-RNA:ta ei olisi enää löytynyt PCR:llä. Tämän tutkimuksen PCR-tulokset varmistettiin IHC-menetelmällä (Heikkilä 2005) myöhemmissä jatkotutkimuksissa (Kinnunen ym. 2009).

Poikanen 7.2 oli infektoitu viruslaimennoksella, joka oli ollut +4 °C:ssa yön ajan. Borna-virus säilyy infektiivisenä +4 °C:ssa yli kolmen kuukauden ajan (Danner & Mayr 1979), joten säilytyksen ei pitäisi olla syynä infektoitumattomuuteen. Poikanen 13.2. oli infektoitu viruslaimennoksella 10^3 ffu ja lopetettu kahden viikon kuluttua infektiosta. Joko poikaset eivät tuntemattomasta syystä infektoituneet tai kyseessä on virhenegatiivinen tulos. Jos tutkittavaan näytteeseen ei ole saatu niitä osia aivoista, jossa Borna-viruksen genomia olisi ollut todettavissa tai jos näytteessä on tapahtunut kuoleman jälkeistä RNA:n hajoamista, geenimonistusmenetelmillä saadaan virhenegatiivinen tulos, vaikka eläin olisikin ollut Borna-virusinfektoitunut (Sauder ym. 2002). Virhenegatiivinen tulos voi aiheutua myös PCR-inhibiittoreista, joita voi joko olla kudoksessa alun perin tai, todennäköisemmin, jäädä näytteeseen nukleiinihappoeristyksen reagensseista.

PCR-menetelmän ongelmana on sen herkkyys, joka tietenkin toisaalta on myös menetelmän etu. Tässä kokeessa positiivisina pidettiin vain niitä näytteitä, jotka olivat positiivisia yhden PCR-kierroksen jälkeen (katso 7.5 Genomin etsiminen). Kokeessa käytettiin alun perin nested-PCR-menetelmää eli kahta sisäkkäistä alukeparia. Nested todettiin liian herkäksi tähän tarkoitukseen, kun virusta oli aivoissa paljon, joten siirryttiin käyttämään vain yhtä PCR-kierrosta. Toisen kierroksen tulokset olivat hyvin ristiriitaisia (muun muassa verrokkipoikasista osa oli positiivisia) todennäköisesti jossakin kokeen vaiheessa tapahtuneen kontaminaation seurauksena. Kontaminaatio on todennäköisesti tapahtunut jo myyrien lopetuksen ja preparoinnin yhteydessä turvalaboratorion biosuojakaapissa. Myyrien preparoinnissa käytettiin samoja alustoja, jotka tosin desinfioidiin alkoholilla myyrien välissä. Virtsanäytteiden keräykseen

käytettiin myös rasioita, jotka desinfioitiin alkoholilla myyrien välillä. Ristikontaminaatio myöhemmin on epätodennäköisempää, koska eri vaiheet tehtiin eri biosuojakaapeissa ja puhtaissa laboratorioissa, eikä putkia pidetty yhtä aikaa auki.

9.4. IFA-tulosten pohdintaa

Tulosten perusteella näyttäisi, että Borna-virusspesifiset vasta-aineet kehittyvät poikasilla varsin myöhään, sillä ensimmäiset positiiviset tulokset saatiin vasta neljän viikon kuluttua infektiosta ja silloinkin vain 21 prosenttia tutkituista infektoiduista (3/14) oli positiivisia. Elimistön humoraalinen puolustusvaste ei siis reagoi heti taudinaiheuttajien saavuttua elimistöön. Aikuisena infektoitujen rottien seerumista voidaan todeta Borna-virusspesifisiä vasta-aineita jo kuuden – kahdeksan vuorokauden kuluttua aivojensisäisestä infektiosta (Lipkin & Briese 2007). Toisaalta nimenomaan vastasyntyneinä infektoiduilla rotilla humoraalinen immuunivaste on heikko verrattuna aikuisiin rottiin: Carbonen ja työryhmän (1991b) havainnoissa vastasyntyneenä suurella ($1-5 \times 10^4$ TCID₅₀) virusmäärällä infektoiduilla rotilla titteri oli 20 vasta 144 vrk eli lähes viisi kuukautta infektion jälkeen (katso 4.2.2.1 Rotta. Vastasyntynyt rotta). Tässä tutkimuksessa käytettiin verilaimennosta 1:10, joka vastaa karkeasti seerumlaimennosta 1:20. Rottatutkimuksen virusmäärää vastaavalla viruslaimennoksella 10^4 ffu infektoitujen myyränpokasten vasta-aineita havaittiin (titteri ≥ 20) kuusi viikkoa p.i. lopetetuilla poikasilla. Tällöin 50 prosentilla ryhmän poikasista (2/4) oli vasta-aineita. Rotanpoikasiin verrattuna myyränpokasilla todettiin vasta-aineita siis suhteellisen aikaisin.

Infektioannos 10^2 ffu nostatti vasta-aineet kahdella kolmesta neljän ja kuuden viikon ikäisenä lopetetuista poikasista. Neljän viikon kuluttua infektiosta lopetettujen poikasten osalta katsottuna 10^2 ffu annos oli siis tehokkain vasta-aineiden indusoija. Kuitenkin annoksella 10^3 ffu infektoiduista poikasista kaikilla todettiin vasta-aineita kuuden viikon kuluttua infektiosta. Vaikka laboratoriokokeissa nopeus on valttia rahan ja ajan säästämiseksi, lienee luonnossa, etenkin kun etsitään mahdollista reservoaaria, kuitenkin tärkeintä, että mahdollisimman moni infektoituu viruksella. Joka tapauksessa suurin virusmäärä ei ollutkaan tehokkain vasta-aineiden aiheuttajana, sillä annoksella 10^4 ffu vain puolella infektoiduista oli vasta-aineita seerumissaan ja niilläkin vasta kuusi viikkoa infektion jälkeen.

IFA:n tulosten tulkitseminen on subjektiivista. Borna-virusspesifisten vasta-ainemäärien vähäisyydestä johtuen näytteessä saattaa tapahtua vasta-aineiden epäspesifiä sitoutumista, joka ilman luotettavia negatiivikontrolleja saattaa vääristää tuloksia. Tässä tutkimuksessa epävarmat tulokset laskettiin negatiivisiksi. Epävarmat tulokset saattoivat tässäkin tutkimuksessa johtua joko epäspesifistä reaktiosta tai sitten näytteessä oli vasta juuri tapahtumassa serokonversiota, ja vasta-ainetulos oli vasta muuttumassa positiiviseksi.

9.5 Jatkotutkimuksia ja tulevaisuutta

Tämän tutkimuksen ryhmäkoot olivat niin pienet, että tilastollisesti merkitseviä tuloksia ei saatu, joten tulokset ovat vain suuntaa antavia. Kuitenkin tulokset tuovat lisävaloa luonnonjyrsijöiden vasta-ainelöydösten tulkintaan: kaikkiaan vain 38 prosenttia infektoiduista myyristä (15/40) nosti vasta-aineet IFA:lla havaittavalle tasolle (Liite 1). Varmistetuilla Bornan tautiin kuolleilla hevosilla on Borna-virusspesifisiä vasta-aineita seerumissa vain 41 prosentilla (Grabner & Fischer 1991). Luonnossa saattaakin siis olla paljon enemmän Borna-virusinfektoiduneita myyriä kuin aikaisempien vasta-ainelöydösten (Kinnunen ym. 2007) perusteella voitaisiin päätellä.

Tulokset myös rohkaisevat jatkamaan metsämyyrien tutkimista mahdollisena reservoaarilajina, sillä persistoiva virusinfektio ilman vakavia taudin oireita suurimmalla osalla populaatiosta, mahdollistaa viruksen levittämisen myös muualle elimistöön ja sen ulkopuolelle. Tutkimuksessa ei tosin selvitetty viruksen mahdollista leviämistä aivoista muualle myyräpoikasten elimistöön. Erityisen kiinnostavaa olisi tietää erittykö virusta myyräpoikasten elimistöä esimerkiksi virtsassa, koska viruseritys on edellytys reservoaarina toimimiselle. Myyrien elimet kerättiin ja säilöttiin jatkotutkimuksia varten. Myöhemmin tutkimusta on jatkettu elinten tutkimisella immunohistokemiamenetelmällä. Alustavien tulosten perusteella virus ainakin joissain tapauksissa leviää aivoista muualle elimistöön, esimerkiksi virtsarakkoon, josta on todettu Borna-virus antigeenia (Kinnunen ym. 2009).

Jatkossa voitaisiin selvittää tarttuuko Borna-virus kokeellisesti infektoiduista myyristä infektoimattomiin, esimerkiksi infektoimalla vain osa poikueen poikasista tai laittamalla naiiveja myyriä infektoitujen kanssa samaan tilaan. Lisäksi olisi tarpeen selvittää

tarttuuko virus esimerkiksi likaisten purujen välityksellä laittamalla naiiveja myyriä siivoamattomaan häkkiin, josta infektoitu eläin on siirretty pois. Rotilla likaisten purujen välityksellä tapahtuvaa tartuntaa ei ole todettu (Sauder & Staeheli 2003), mutta ne eivät välttämättä olekaan Borna-viruksen luonnollinen reservoaarilaji (Tsujimura ym. 1999). Tässä kokeessa sieraimensisäinen infektointi pienellä virusmäärällä ei aiheuttanut RT-PCR-menetelmällä todettavissa olevaa keskushermostoinfektiota kahdella aikuisella myyrällä 3,5 tai 5 viikossa infektion jälkeen, vaikka Borna-viruksen oletetaan pääsevän elimistöön todennäköisesti sierainten kautta ja rottia on saatu infektoitua sieraimensisäisesti (Sauder & Staeheli 2003). Aihe vaatisi kuitenkin lisätutkimusta eri virusmäärillä, inkubaatioajoilla ja suuremmalla myyräaineistolla.

Borna-viruksen epidemiologinen tutkimuskenttä on laaja ja siinä riittää vielä paljon selvitettävää. Luotettavaa tutkimustietoa ei ole vielä saatavilla eri puolilta maailmaa, joten lopullinen levinneisyyskartta on piirtämättä. Avibornavirustyyppin löytyminen (Kistler ym. 2008) herättää kysymyksen, onko muitakin Bornan alalajeja vielä löytämättä. Perinteisillä tutkimusmenetelmillä avibornavirusinfektio olisi saattanut jäädä huomaamatta. On mahdollista, että uudella tekniikalla saattaisi löytyä uudenlaisia Borna-virustyyppjä myös muista eläinlajeista, esimerkiksi jyrtsijöistä ja päästäisistä.

Aivan hiljattain julkaistussa artikkelissa esitetään, että Borna-viruksen genomia on integroituneena joidenkin nisäkäslajien genomiin (Horie & Honda ym. 2010). Havainto asettaa tämänkin tutkimuksen tulokset uudelleen tarkasteltavaksi. Periaatteessa tutkituilla myyrillä saattoi siis olla endogeenista Borna-viruksen N-proteiinin DNA-kopiota aivoissa, ja siksi kokeessa saatiin positiivisia PCR-tuloksia. Tämän mahdollisuuden todennäköisyyttä vähentää kuitenkin sekä se, että kaikki negatiiviverrokot ja myyräemojen aivot olivat PCR-negatiivisia tutkimuksessa käytetyn Borna-viruksen N-proteiinin genomien emäsjärjestyksen osalta, että se, että eristimme aivonäytteistä ainoastaan RNA:n ja hävitimme DNA-fraktion. Löydetyt integroituneet N-proteiinisekvenssit eroavat toisaalta niin paljon PCR-menetelmämme alukesekvensseistä, ettei mahdollinen integroitunut DNA olisi todennäköisesti edes monistunut. Tulevaisuudessa tämän tutkimuksen näytteet voisi tutkia uudestaan PCR:llä ilman käänteiskopiointia, jotta havaittaisiin mahdollinen endogeeninen Borna-virusspesifinen DNA tai infektoioon käytetyn BDV:n integraatio.

10 YHTEENVETO

Tässä tutkimuksessa osoitettiin PCR- ja IFA- menetelmillä, että suomalainen metsämyyrä saadaan infektoitua kokeellisesti Borna-viruksella, käyttämällä virusmääriä 10^2 , 10^3 ja 10^4 ffu aivoihin ruiskutettuna. Suurimmalla osalla (79 prosentilla) infektoituista poikasista ei havaittu poikkeavaa käyttäytymistä tai oireita verrokkipoikasiin verrattuna. Infektioannos 10^2 ffu nostatti vasta-aineita elimistössä nopeimmin useammalle, kun taas 10^3 ffu infektioannos nosti vasta-aineita kuuden viikon kuluttua infektiosta kaikille ryhmän myyrille. Suurin virusmäärä (10^4 ffu) nosti vasta-aineita vasta kuuden viikon kuluttua infektiosta, ja vain puolelle ryhmän myyristä. Vasta-aineita havaittiin 38 prosentilla infektoituneista myyränpokasista.

Tutkimustulokset tukevat metsämyyrän mahdollista asemaa Bornan taudin epidemiologiassa reservoaarieläinlajina ja antavat myös suuntaa luonnonjyrsijöistä saatujen vasta-ainelöydösten tulkintaan. Reservoaarina toimimisen varmistamiseksi tarvitaan kuitenkin jatkotutkimuksia, joissa selvitetään viruksen kulkeutumista elimistössä sekä tartuntareittiä myyrästä toiseen ja isäntäeläimiin.

KIITOKSET

Kiitos mielenkiintoisesta projektista työn johtaja Olli Vapalahdelle ja ohjaaja Paula Kinnuselle. Paula ansaitsee lisäksi erityiskiitoksen perusteellisesta ohjauksesta, joustavuudesta ja positiivisesta kannustamisesta kirjoittajan elämäntilanteiden muuttuessa työn aikana.

Kiitos opastuksesta ja avusta Essi Hasulle, Tytti Mannille, Leena Kostamovaaralle ja muulle avuliaalle henkilökunnalle Meilahdessa ja Viikissä, sekä myyrätietämyksen jakamisesta Heikki Henttoselle ja Eva Kalliolle.

Lämmin kiitos rakkaalle aviopuolisolleni, joka on mahdollistanut työn valmistumisen muun muassa hoitamalla ahkerasti Aadaa (s. 24.10.2009) ja Oliveria (s. 13.5.2008) sekä kotiamme.

Suurkiitos vanhemmilleni ja runsaalle joukolle muita sukulaisia ja ystäviä, jotka ovat monin eri tavoin auttaneet tässä projektissa, ja joita ilman työn valmistuminen olisi ollut haasteellisempaa.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Ackermann, A., Guelzow, T., Staeheli, P., Schneider, U. & Heimrich, B. Visualizing Viral Dissemination in the Mouse Nervous System using a Gfp-Expressing Borna Disease Virus Vector. *J Virol* 2010, julkaistu sähköisenä versiona 10.3.2010.

Ackermann, A., Staeheli, P. & Schneider, U.. Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity. *J Virol* 2007, 81: 7933-7940.

Amori, G., Hutterer, R., Kryštufek, B., Yigit, N., Mitsain, G., Muñoz, L.J.P., Henttonen, H., Vohralík, V., Zagorodnyuk, I., Juškaitis, R., Meinig, H. & Bertolino, S. 2008. *Myodes glareolus*. IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Versio 2010.1., <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/4973/0>. Haettu 31.3.2010, julkaistu Heikki Henttosen luvalla.

Amsterdam, J. D., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzalez, F., Rott, R. & Koprowski, H.. Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch Gen Psychiatry* 1985, 42: 1093-1096.

Anzil, A. P., Blinzinger, K. & Mayr, A. Persistent Borna virus infection in adult hamsters. *Arch Gesamte Virusforsch* 1973, 40: 52-57.

Bajramovic, J. J., Munter, S., Syan, S., Nehrbass, U., Brahic, M. & Gonzalez-Dunia, D. Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol* 2003, 77: 12222-12231.

Bautista, J. R., Rubin, S. A., Moran, T. H., Schwartz, G. J. & Carbone, K. M.. Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 1995, 90: 45-53.

Bautista, J. R., Schwartz, G. J., De La Torre, J. C., Moran, T. H. & Carbone, K. M. Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 1994, 34: 31-40.

Berg, M., Johansson, M., Montell, H. & Berg, A. L. Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 2001, 127: 173-178.

Berg, A-L., Reid-Smith R., Larsson M. & Bonnett B. Case control study of feline Borna disease in Sweden *Vet.rec.* 1998, 142: 715-717.

Bode, L. Human bornavirus infection-- towards a valid diagnostic system. [katsaus] *APMIS Suppl.* 2008, 124: 21-39.

Bode, L. & Ludwig, H. Borna disease virus infection, a human mental-health risk. [katsaus] *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 534-545.

Bode,L., Reckwald,P., Severus,W.E., Stoyloff,R., Ferszt,R., Dietrich,D.E., Ludwig,H. Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies--the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol. psychiatry* 2001, 6: 481-491.

Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A. J., Park, Y. S., Kim, S., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 4362-4366.

Briese, T., de la Torre, J. C., Lewis, A., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89: 11486-11489.

Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C. H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N. & Lahdevirta, J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 1980, 141: 131-134.

Caplazi, P., Melzer, K., Goetzmann, R., Rohner-Cotti, A., Bracher, V., Zlinszky, K. & Ehrensperger, F. [Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1999, 141: 521-527.

Caplazi, P., Waldvogel, A., Stitz, L., Braun, U. & Ehrensperger, F.. Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 1994, 111: 65-72.

Carbone, K. M., Rubin, S. A., Nishino, Y. & Pletnikov, M. V. Borna disease: virus-induced neurobehavioral disease pathogenesis. [katsaus] *Curr Opin Microbiol* 2001, 4: 467-475.

Carbone, K. M., Rubin, S. A., Sierra-Honigmann, A. M. & Lederman, H. M. Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 1993, 67: 1453-1460.

Carbone, K. M., Moench, T. R. & Lipkin, W. I. Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991a, 50: 205-214.

Carbone, K. M., Park, S. W., Rubin, S. A., Waltrip, R. W., 2nd & Vogelsang, G. B. Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 1991b, 65: 6154-6164.

Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. & Narayan, O. Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 1987, 61: 3431-3440.

Chalmers, R. M., Thomas, D. R. & Salmon, R. L. Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. [katsaus] *QJM* 2005, 98: 255-274.

Chase, G., Mayer, D., Hildebrand, A., Frank, R., Hayashi, Y., Tomonaga, K. & Schwemmle, M. Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 2007, 81: 743-749.

Clemente, R. & de la Torre, J. C. Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *J Virol* 2007, 81: 5968-5977.

Cros, J. F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. [katsaus] *Virus Res* 2003, 95: 3-12.

Cubitt, B. & de la Torre, J. C. Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 1994, 68: 1371-1381.

Cubitt, B., Oldstone, C. & de la Torre, J. C. Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 1994a, 68: 1382-1396.

Cubitt, B., Oldstone, C., Valcarcel, J. & Carlos de la Torre, J. RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res* 1994b, 34: 69-79.

Danner, K. & Mayr, A. In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. *Arch Virol* 1979, 61: 261-271.

Degiorgis, M.P., Berg, A.L., Hard Af Segerstad, C., Morner, T., Johansson, M. & Berg, M. Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3087-3091.

de la Torre, J.C., Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, Mallory M, Mueller-Lantsch N, Grässer FA, Hansen LA & Masliah E. Detection of borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology* 1996, 223: 272-282

de la Torre, J. C. Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. [katsaus] *J Virol* 1994, 68: 7669-7675.

Dittrich, W., Bode, L., Ludwig, H., Kao, M. & Schneider, K. Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol Psychiatry* 1989, 26: 818-828.

Durrwald, R., Kolodziejek, J., Muluneh, A., Herzog, S. & Nowotny, N. Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. [katsaus] *Microbes Infect* 2006, 8: 917-929.

Durrwald, R. & Ludwig, H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. [katsaus] Zentralbl Veterinarmed B 1997, 44: 147-184.

Eisenman, L. M., Brothers, R., Tran, M. H., Kean, R. B., Dickson, G. M., Dietzschold, B. & Hooper, D. C. Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. J Neurovirol 1999, 5: 181-189.

Gonzalez-Dunia, D., Watanabe, M., Syan, S., Mallory, M., Masliah, E. & De La Torre, J. C. Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. J Virol 2000, 74: 3441-3448.

Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B. & de la Torre, J. C. Mechanism of Borna disease virus entry into cells. J Virol 1998, 72: 783-788.

Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F. A. & de la Torre, J. C. Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. J Virol 1997a, 71: 3208-3218.

Gonzalez-Dunia, D., Sauder, C. & de la Torre, J. C. Borna disease virus and the brain. [katsaus] Brain Res Bull 1997b, 44: 647-664.

Grabner, A. & Fischer, A. [Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years]. Tierarztl. Prax. 1991, 19: 68-73.

Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. & Ikuta, K. Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. Vet Microbiol 2000, 72: 207-216.

Hallensleben, W., Schwemmler, M., Hausmann, J., Stitz, L., Volk, B., Pagenstecher, A. & Staeheli, P. Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. J Virol 1998, 72: 4379-4386.

Hansson L. & Henttonen H. Gradients in density variations of small rodents: the importance of latitude and snow cover. Oecologia (Berlin) 1985, 67: 394-402

Hatalski, C. G., Hickey, W. F. & Lipkin, W. I. Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 1998, 90: 137-142.

Hausmann, J., Hallensleben, W., de la Torre, J. C., Pagenstecher, A., Zimmermann, C., Pircher, H. & Staeheli, P. T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 9769-9774.

Hayden RT. In vitro nucleic acid amplification techniques. Teoksessa: Persing, DH, Tenover FC, Versalovic J ym. (toim.) *Molecular microbiology, Diagnostic principles and practice*. ASM Press, Washington DC, USA 2004: 43-69.

Heikkilä H. Borna-viruksen osoittaminen aivoista immunohistokemiamenetelmällä. Licensiaatin tutkielma, Eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto, 2005.

Herden, C., Herzog, S., Richt, J. A., Nessler, A., Christ, M., Failing, K. & Frese, K. Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol* 2000, 10: 39-48.

Herzog, S., Frese, K. & Rott, R. Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol* 1991, 72 (Pt 3): 535-540.

Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1984, 173: 171-177.

Herzog, S. & Rott, R. Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1980, 168: 153-158.

Hilbe, M., Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K. & Ehrensperger, F. Shrews as reservoir host of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 2006, 12, 675-677.

Hirano, N., Kao, M. & Ludwig, H.. Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 1983, 64 (Pt 7): 1521-1530.

Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S. K., Franca, M., Egholm, M., Briese, T. & Lipkin, W. I. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 2008, 14: 1883-1886.

Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jern, P., Gojobori, T., Coffin, J. M. & Tomonaga, K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 2010, 463, 84-87.

Hornig, M., Weissenbock, H., Horscroft, N. & Lipkin, W. I. An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 12102-12107.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Master Species List 2009. 4.versio. Julkaistu 20.3.2010.

<http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx>. Haettu 12.4.2010.

Ikuta, K., Hagiwara, K., Taniyama, H. & Nowotny, N. Epidemiology and infection of natural animal hosts. Teoksessa: K. M. Carbone (toim.) *Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease*. ASM Press, Washington DC, USA 2002: 87-123.

Jensen, B., Jyrsijät. Teoksessa: Lahti, S. (toim.), *Suomen ja Pohjolan nisäkkäät*. WSOY, Porvoo 1994: 96-176.

Jordan, I. & Lipkin, W. I. Borna disease virus. [katsaus] *Rev Med Virol* 2001, 11, 37-57.

Kaikusalo, A. ja Henttonen, H. Pikkunisäkkäät – pöllöjen elämän tahdittajat. Teoksessa: Saurola, P. (toim.) *Suomen pöllöt*. 1. p. Kirjayhtymä Oy, Helsinki 1995: 64-76.

Kallio, E.R., Voutilainen, L., Vapalahti O., Vaheri A., Henttonen H., Koskela E. & Mappes T. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 2007, 88: 1911-1916.

Kallio, E. R., Poikonen, A., Vaheri, A., Vapalahti, O., Henttonen, H., Koskela, E. & Mappes, T. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc Biol Sci* 2006, 273: 2771-2776.

Kallio-Kokko, H. HUSLAB ja Helsingin yliopisto. Henkilökohtainen tiedonanto 2010.

Kao, M., Ludwig, H. & Gosztonyi, G. Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Gen Virol* 1984, 65 (Pt 10): 1845-1849.

Katajisto, J (toim.) Luonnossa – Nisäkkäät. I osa. Metsämyyrä runsaimmillaan Suomen yleisin nisäkäs. WSOY, Porvoo 2008: 34.

Katz, J. B., Alstad, D., Jenny, A. L., Carbone, K. M., Rubin, S. A. & Waltrip, R. W.,2.. Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 1998, 10: 338-343.

Kinnunen P.M., InkeroinenH., Kallio E.R.K., Vapalahti O. Experimental Borna disease virus infection of bank voles [lyhennelmä]. 5th European Meeting on Viral Zoonoses; 26.-29.9.2009; St. Raphaël, Ranska.

Kinnunen, P. M., Billich, C., Ek-Kommonen, C., Henttonen, H., Kallio, E. R. K., Niemimaa, J., Palva, A., Staeheli, P., Vaheri, A. & Vapalahti, O. Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol* 2007, 38: 64-69.

Kistler, A. L., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C. Y., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., Greninger, A., Wen, C. C., Karlene, S. B., Ganem, D. & DeRisi, J. L. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol J* 2008, 5: 88.

Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K. & Ikuta, K. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* 2001 75: 3404-3412.

Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K. & Nakai, M. Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 1999, 73: 760-766.

Koivula, M., Koskela, E., Mappes, T. & Oksanen, T. A. Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. *Ecology* 2003 84, 398-405.

Kolodziejek, J., Durrwald, R., Herzog, S., Ehrensperger, F., Lussy, H. & Nowotny, N. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol* 2005, 86: 385-398.

Koster-Patzlaff, C., Hosseini, S. M. & Reuss, B. Loss of connexin36 in rat hippocampus and cerebellar cortex in persistent Borna disease virus infection. *J Chem Neuroanat* 2009, 37: 118-127.

Lancaster, K., Dietz, D. M., Moran, T. H. & Pletnikov, M. V. Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. *Behav Brain Res* 2007, 176: 141-148.

Lee,B.J., Watanabe,M., Kamitani,W., Baba,S., Yamashita,M., Kobayashi,T., Tomonaga,K., Ikuta,K. Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes infect* 2003, 5: 1195-1204.

Lipkin WI, Briese T. Bornaviridae. Teoksessa: Knipe DM, Howley PM (toim.) *Fields Virology*, volume 2. 5. p. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2007: 1829-1851.

Lipkin, W. I., Travis, G. H., Carbone, K. M. & Wilson, M. C.. Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87: 4184-4188.

Ludwig, H., Koester, V., Pauli, G. & Rott, R. The cerebrospinal fluid of rabbits infected with Borna disease virus. *Arch Virol* 1977, 55: 209-223.

Ludwig, H. & Thein, P. Demonstration of specific antibodies in the central nervous system of horses naturally infected with Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1977, 163: 215-226.

Lundgren,A.L., Zimmermann,W., Bode,L., Czech,G., Gosztonyi,G., Lindberg,R. & Ludwig,H. Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J.Gen.Virol.* 1995, 76 (Pt 9): 2215-2222.

Lungren, A-L., Gzech G., Bode L., Ludwig H. Natural Borna disease in domestic animals other than horses and sheep. *Zentralbl.Veterinarmed.B.* 1993, 40: 298-303.

Malkinson, M., Weisman, Y., Perl, S. & Ashash, E. A Borna-like disease of ostriches in Israel. [katsaus] *Curr Top Microbiol Immunol* 1995, 190, 31-38.

Mayr, A. & Danner, K. Persistent infections caused by Borna virus. *Infection* 1974, 2: 64-69.

Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1988, 177: 51-68.

Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyama, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T. & Ikuta, K. High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 1999, 17: 480-489.

Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. & Rott, R. Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 1983a, 148: 305-315.

Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. & Rott, R. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* 1983b, 220: 1401-1403.

Neumann G., Michael A. Whitt M.A. & Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA – what have we learned? [katsaus] *J. Gen. Virol.* 2002, 83: 2635–2662.

Nishino, Y., Kobasa, D., Rubin, S. A., Pletnikov, M. V. & Carbone, K. M. Enhanced neurovirulence of borna disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L polymerase genes. *J Virol* 2002, 76: 8650-8658.

Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C. O., Suchy, A., Staeheli, P. & Schwemmler, M. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* 2000, 74: 5655-5658.

Okamoto, M., Hagiwara, K., Kamitani, W., Sako, T., Hirayama, K., Kirisawa, R., Tsuji, M., Ishihara, C., Iwai, H., Kobayashi, T., Tomonaga, K., Ikuta, K. & Taniyama, H.

Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Arch Virol* 2003; 148, 1557-1568.

Okamoto, M., Furuoka, H., Hagiwara, K., Kamitani, W., Kirisawa, R., Ikuta, K. & Taniyama, H. Borna disease in a heifer in Japan. *Vet Rec* 2002a, 150: 16-18.

Okamoto, M., Kagawa, Y., Kamitani, W., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K. & Taniyama, H. Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Pathol* 2002b, 126: 312-317.

Pauli, G. & Ludwig, H. Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Res* 1985, 2: 29-33.

Perez, M., Sanchez, A., Cubitt, B., Rosario, D. & de la Torre, J. C. A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 2003, 84: 3099-3104.

Planz, O., Bechter, K.A., Schwemmler, M. Human Borna disease virus infection. Teoksessa: K. M. Carbone (toim.) Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease. ASM Press, Washington DC, USA 2002: 179-225

Planz, O., Pleschka, S. & Wolff, T. Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. [katsaus] *Cell Microbiol* 2009, 11: 872-879.

Plata-Salaman, C. R., Ilyin, S. E., Gayle, D., Romanovitch, A. & Carbone, K. M. Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain Res Bull* 1999, 49: 441-451.

Pleschka, S., Staeheli, P., Kolodziejek, J., Richt, J. A., Nowotny, N. & Schwemmler, M. Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J Gen Virol* 2001, 82: 2681-2690.

Pletnikov, M. V., Gonzalez-Dunia, D. & Stitz, L. Experimental infection: Pathogenesis of neurobehavioral disease. Teoksessa: K. M. Carbone (toim.) Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease. ASM Press, Washington DC, USA 2002a: 125-178

Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Vogel, M. W., Moran, T. H. & Carbone, K. M. Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain Res* 2002b, 944: 97-107.

Pletnikov, M. V., Jones, M. L., Rubin, S. A., Moran, T. H. & Carbone, K. M. Rat model of autism spectrum disorders. Genetic background effects on Borna disease virus-induced developmental brain damage. [katsaus] *Ann N Y Acad Sci* 2001, 939: 318-319.

Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Schwartz, G. J., Moran, T. H., Sobotka, T. J. & Carbone, K. M. Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol Behav* 1999, 66: 823-831.

Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Vasudevan, K., Moran, T. H. & Carbone, K. M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 1999, 100: 43-50.

Poenisch, M., Unterstab, G., Wolff, T., Staeheli, P. & Schneider, U. The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol* 2004, 85: 1895-1898.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. The immune response: Antigen-antibody reactions. Teoksessa: Sievers EM (toim.) *Microbiology*. 3. p. Wm. C. Brown Publishers, USA 1996: 649-650.

Puorger, M. E., Hilbe, M., Muller, J. P., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K. & Ehrensperger, F. Distribution of Borna Disease Virus Antigen and RNA in Tissues of Naturally Infected Bicolored White-Toothed Shrews, *Crocidura leucodon*, Supporting Their Role as Reservoir Host Species. *Vet Pathol* 2010, 47: 236-44

Richt, J. A. & Rott, R. Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. [katsaus] *Vet J* 2001, 161: 24-40.

Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K. & Herzog, S. Borna disease virus infection in animals and humans. [katsaus] *Emerg Infect Dis* 1997, 3: 343-352.

Richt, J. A., Herzog, S., Haberzettl, K. & Rott, R. Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1993, 182: 293-304.

Richt, J. A., Stitz, L., Wekerle, H. & Rott, R. Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4⁺ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 1989, 170: 1045-1050.

Rott, R. & Becht, H. Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995, 190: 17-30.

Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W. & Koprowski, H. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 1985, 228: 755-756.

Rubin, S. A., Sylves, P., Vogel, M., Pletnikov, M., Moran, T. H., Schwartz, G. J. & Carbone, K. M. Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 1999, 48: 23-30.

Rubin, S. A., Waltrip, R. W., 2nd, Bautista, J. R. & Carbone, K. M. Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol* 1993, 67: 548-552.

Sauder, C., Mizutani, T. & Yamaguchi, K. Laboratory diagnosis. Teoksessa: K. M. Carbone (toim.) Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease. ASM Press, Washington DC, USA 2002: 45-85.

Sauder, C. & Staeheli, P. Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol* 2003, 77: 12886-12890.

Sauder, C., Hallensleben, W., Pagenstecher, A., Schneckenburger, S., Biro, L., Pertlik, D., Hausmann, J., Suter, M. & Staeheli, P. Chemokine gene expression in astrocytes of Borna disease virus-infected rats and mice in the absence of inflammation. *J Virol* 2000, 74: 9267-9280.

Sauder, C. & de la Torre, J. C. Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 1999, 96: 29-45.

Sauder, C. & de la Torre, J. C. Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J Virol Methods* 1998, 71: 229-245.

Schindler, A. R., Vogtlin, A., Hilbe, M., Puorger, M., Zlinszky, K., Ackermann, M. & Ehrensperger, F. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes* 2007, 21: 47-55.

Schneemann, A., Schneider, P. A., Lamb, R.A. & Lipkin, W. I. The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. [katsaus] *Virology* 1995, 210: 1-8.

Schneemann, A., Schneider, P. A., Kim, S. & Lipkin, W. I. Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 1994, 68: 6514-6522.

Schneider, P. A., Briese, T., Zimmermann, W., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol* 1994a, 68: 63-68.

Schneider, P. A., Schneemann, A. & Lipkin, W. I. RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 1994b, 68: 5007-5012.

Schneider, U., Naegele, M., Staeheli, P. & Schwemmler, M. Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 2003, 77: 11781-11789.

Schwardt, M., Mayer, D., Frank, R., Schneider, U., Eickmann, M., Planz, O., Wolff, T. & Schwemmler, M. The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 2005, 86: 3163-3169.

Schwemmler, M. Borna disease virus infection in psychiatric patients: are we on the right track? [katsaus] *Lancet Infect Dis* 2001, 1: 46-52.

Sierra-Honigmann, A. M., Rubin, S. A., Estafanous, M. G., Yolken, R. H. & Carbone, K. M. Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* 1993, 45: 31-36.

Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H. & Rott, R. Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1978, 165: 1-18.

Staheli, P., Rinder, M. & Kaspers, B. Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *J Virol* 2010, julkaistu sähköisenä versiona 10.3.2010.

Staheli, P., Sauder, C., Hausmann, J., Ehrensperger, F. & Schwemmler, M. Epidemiology of Borna disease virus. [katsaus] *J Gen Virol* 2000, 81: 2123-2135.

Stitz, L., Noske, K., Planz, O., Furrer, E., Lipkin, W. I. & Bilzer, T. A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 1998, 72: 8884-8892.

Stitz, L., Krey, H. & Ludwig, H. Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms. *J Med Virol* 1981, 6: 333-340.

Syrjänen, J., Mustonen, J., Vapalahti, O., Henttonen, H. & Vaheri, A. Jyrsijöiden levittämät sairaudet Suomessa. [katsaus] *Duodecim* 2005, 121: 295-302.

Thakur, R., Sarma, S. & Sharma, B. Role of Borna disease virus in neuropsychiatric illnesses: are we inching closer? [katsaus] *Indian J Med Microbiol* 2009, 27: 191-201.

Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. [katsaus] *Microbes Infect* 2002, 4: 491-500.

Tomonaga, K., Kobayashi, T., Lee, B. J., Watanabe, M., Kamitani, W. & Ikuta, K. Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 12788-12793.

Tsujimura, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Ogino, M., Morii, Y., Inagaki, H., Arikawa, J. & Takashima, I. A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by a capture ELISA. *J Vet Med Sci* 1999, 61: 113-117.

Vahlenkamp, T. W., Konrath, A., Weber, M. & Muller, H. Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 2002, 76: 9735-9743.

Volmer, R., Monnet, C. & Gonzalez-Dunia, D. Borna Disease Virus Blocks Potentiation of Presynaptic Activity through Inhibition of Protein Kinase C Signaling. *PLoS Pathog* 2006, 2, 3: e19.

von Sind, JB. Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt, welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der Pferde im Feld und auf der Reise wie auch einen auserlesenen Vorrath der nützlichsten und durch die Erfahrung bewährtesten Heilungsmitteln eröffnet. Heinrich Ludwig Brönner, Frankfurt ja Leipzig, 2. ja 3. painos. 1767, 1781

Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N. & Lipkin, W. I. Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 2000, 74: 4425-4428.

Watanabe, M., Lee, B. J., Kamitani, W., Kobayashi, T., Taniyama, H., Tomonaga, K. & Ikuta, K. Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally borna disease virus-infected gerbils. *Virology* 2001, 282: 65-76.

Watanabe, M., Zhong, Q., Kobayashi, T., Kamitani, W., Tomonaga, K. & Ikuta, K. Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol Immunol* 2000, 44: 765-772.

Wehner, T., Ruppert, A., Herden, C., Frese, K., Becht, H. & Richt, J. A. Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* 1997, 78 (Pt 10): 2459-2466.

Weissenbock, H., Nowotny, N., Caplazi, P., Kolodziejek, J. & Ehrensperger, F. Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 1998a, 36: 2127-2130.

Weissenbock, H., Suchy, A., Caplazi, P., Herzog, S. & Nowotny, N. Borna disease in Austrian horses. [katsaus] *Vet Rec* 1998b, 143: 21-22.

Yanai, H., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Ohtaki, N., Kobayashi, T., Nozaki, Y., Ikuta, K. & Tomonaga, K. Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal. *Microbes Infect* 2006, 8: 1522-1529.

LIITE 1. Myyrien infektiot, sukupuolet, seurannan kesto, PCR- ja IFA- tulokset sekä muita huomioita

E m o	Poika nen	Infektio annos	Suku puoli	Lopetus (vrk infektion jälkeen)	P		Muuta	
					C R	IF A		
2			naara s			-	-	
	2.1	10 ³	naara s	43	+	+		
	2.2	10 ³	uros	57	+	+		
3			naara s			-	-	
	3.1	10 ⁴	naara s	16	+	**		
	3.2	10 ⁴	naara s	23	+	-	Neurologiset oireet (ympyrän kiertäminen).Eutanasia.	
	3.3	10 ⁴	uros	43	+	+		
	3.4	10 ⁴	naara s	58	+	+	Ylivilkas	
4			naara s			-	-	
	4.1	10 ⁴	naara s	14	+	-		
	4.2	10 ⁴	uros	29	+	?-		
	4.3	10 ⁴	uros	29	+	?-		
	4.4	10 ⁴	uros	42	+	+		
5			naara s			-	-	
	5.1	10 ²	uros	13	+	-		
	5.2	10 ²	naara s	27	+	?-		
	5.3	10 ²	uros	42	+	+	5.3/5.4 Ollut tärisevä, lopetuspäivänä ei oireita	
	5.4	10 ²	uros	42	+	+	5.3/5.4 Ollut tärisevä, lopetuspäivänä ei oireita	
6			naara s			-	-	
	6.1	PBS	uros	15	-	-		
	6.2	PBS	naara s	15	-	-		
	6.3	PBS	naara s	28	-	-		
	6.4	PBS	uros	42	-	-		
	6.5	PBS	uros	42	-	-		

LIITE 1.
(jatkuu)

E m o	Poika nen	Infektio annos	Suku puoli	Lopetus (vrk infektion jälkeen)	P		Muuta
					C R	IF A	

7		naaras			-	-	
	7.1	10 ⁴ *	uros	14	+	-	
	7.2	10 ⁴ *	uros	28	-	?+ /-	
8		naaras			-	-	
	8.1	10 ³	naaras	14	+	-	
	8.2	10 ³	naaras	28	+	+	
	8.3	10 ³	uros	42	+	+	Ylivilkas
	8.4	10 ³	naaras	42	+	+	Ylivilkas
9		naaras			-	-	
	9.1	10 ⁴	uros	14	+	**	
	9.2	10 ⁴	uros	29	+	-	
	9.3	10 ⁴	naaras	36	+	-	Kuollut itsekseen, ollut edellisenä päivänä rauhaton
11		naaras			-	-	
	11.1	PBS	uros	14	-	**	
	11.2	PBS	uros	28	-	-	
	11.3	PBS	uros	28	-	-	
	11.4	PBS	?	42	-	-	
13		naaras			-	-	
	13.1	10 ³	?	14	+	-	
	13.2	10 ³	uros	15	-	-	
	13.3	10 ³	uros	28	+	-	
	13.4	10 ³	naaras	28	+	-	
	13.5	10 ³	naaras	42	+	+	Ollut vilkas, mutta lopetuspäivänä rauhallinen, tärisevä, likainen ja ataktinen
	13.6	10 ³	naaras	42	+	+	Ylivilkas

LIITE 1.
(jatkuu)

Emo	Poik anen	Infektio annos	Suku puoli	Lopetus (vrk infektion jälkeen)	P C R	IF A	Muuta
14			naara s		-	-	
	14.1	10 ²	uros	15	+	-	
	14.2	10 ²	uros	29	+	+	
	14.3	10 ²	uros	29	+	+	
	14.4	10 ²	uros	40	+	+/ -	
15			naara s		-	-	
	15.1	10 ⁴ ?	uros	14	+	?-	
	15.2	10 ⁴ ?* **	?	14	-	-	Myöhemmin myös ICH- menetelmällä negatiivinen
	15.3	10 ⁴ ?	naara s	29	+	+/ -	
	15.4	10 ⁴ ?	uros	29	+	?-	
	15.5	10 ⁴ ?	uros	42	+	?-	Ylivilkas
	15.6	10 ⁴ ?	naara s	42	+	?-	Ylivilkas
16			naara s		-	-	
	16.1	10 ³	uros	14	+	-	
	16.2	10 ³	naara s	28	+	-	
	16.3	10 ³	uros	28	+	-	
	16.4	10 ³	uros	43	+	+	
10		2,5x10 ²	naara s	24	-	-	sieraininfektio
12		2,5x10 ²	naara s	36	-	-	sieraininfektio

+ = Positiivinen
tulos
- = Negatiivinen
tulos

=
Odottamaton
tulos

?- tai = Epävarma IFA-tulos, lasketaan
?+/- negatiiviseksi
= Viruslaimennos ollut yön yli + 4
* °C:ssa ennen infektoimista
= Tulos puuttuu
** (verinäytettä ei saatu)

= Yksi myyrän numero 15 poikasista
*** infektoimatta, todennäköisesti 15.2