

**Valkohäntäpeurojen (*Odocoileus virginianus*) ja metsäkauriiden (*Capreolus capreolus*) tiheyden vaikutus alueen puutiaisten (*Ixodes ricinus*) määrään ja puutiaisten kantamien taudinaiheuttajien esiintyvyyteen riistaruokintapaikkojen läheisyydessä ja kontrollialueilla.**

Amalia Kokkonen

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto  
Biologian laitos

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

AMALIA KOKKONEN: Valkohäntäpeurojen (*Odocoileus virginianus*) ja metsäkauriiden (*Capreolus capreolus*) tiheyden vaikutus puutiaisten (*Ixodes ricinus*) määrään ja puutiaisten kantamien taudinaiheuttajien esiintyvyyteen riistaruokintapaikkojen läheisyydessä ja kontrollialueilla.

Pro gradu -tutkielma, 37 s., 9 liites.

Biologia

Heinäkuu 2022

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisin alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

---

Puutiaiset (*Ixodes ricinus*) ja niiden kantamien taudinaiheuttajien määrät ovat runsastuneet monilla alueilla viime vuosikymmenten aikana. Puutiaisten tiedetään loisivat useilla eri isäntälajeilla, mutta tietoa siitä millainen merkitys eri isäntälajeilla on puutiaisten määrään ja niiden kantamiin taudinaiheuttajiin on vielä niukasti. Viime aikoina paljon keskustelua on herättänyt hirvieläinten tiheyden vaikutus alueen puutiaisten määrän ja puutiaisten kantamiin taudinaiheuttajiin. Hirvieläimet toimiva tärkeinä veriaterian lähteinä puutiaisille, mutta ne ovat epäkelvoja väli-isäntiä Lymen borreliosisia aiheuttaville *Borrelia burgdorferi* sensu lato -ryhmän bakteereille. Tässä tutkielmassa tarkastelin valkohäntäpeurojen (*Odocoileus virginianus*) ja metsäkauriiden (*Capreolus capreolus*) tiheyden vaikutusta puutiaisten määrään ja puutiaisten kantamiin taudinaiheuttajiin riistaruokintapaikoilla ja niiden läheisyydessä sijaitsevilla kontrollialueilla. Tutkielman aineisto kerättiin kesällä 2021 Varsinais-Suomessa.

Tutkimuksen tulosten perusteella korkeat peura- ja kauristiheydet eivät yksin aikaansaa korkeita puutiaismääriä. Vaikka peurojen ja kauriiden määrät tutkimusalueilla olivat jätösmäärien sekä riistaeläintilastojen perusteella korkeita, kaikkien tutkimusalueiden puutiaistiheydet olivat huomattavan matalia verrattuna aiempiin Varsinais-Suomen seudulla ja Saaristomerellä tehtyihin tutkimuksiin. Peurojen ja kauriiden esiintyminen oli jätösten määrän perusteella korkeampia ruokintapaikkojen kuin kontrollipaikkojen läheisyydessä, kuten myös sisämaassa rannikkoalueisiin verrattuna. Jätösten määrällä ei kuitenkaan havaittu olevan merkittävää yhteyttä puutiaisten määriin.

Matalien puutiaistiheyksien takia puutiaisnäytteiden määrä jäi hyvin pieneksi. Huomioitavaa kuitenkin on, että odotettua pienempi osuus puutiaisista kantoi *Borrelia burgdorferi* s.l. -ryhmän bakteereita. Tutkimusten tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että pelkästään peurojen ja kauriiden korkeat määrät eivät yksin riitä ylläpitämään runsasta puutiaispopulaatiota, vaan ylläpitoon vaaditaan myös runsaat kannat pienempiä isäntäeläimiä ja/tai muuten sopivat ympäristöolosuhteet. Jyrsijät ja linnut ovat pääasiallisia isäntiä *Borrelia burgdorferi* s.l. -ryhmän bakteereille, jolloin näiden isäntien vähäinen määrä alueella luultavasti näkyy paitsi matalina puutiaismäärinä, myös matalina borreliamäärinä.

Asiasanat:

Puutiaiset, *Ixodes ricinus*, puutiaisvälitteiset taudit, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, hirvieläimet, riistaruokinta, laimennusilmiö, Varsinais-Suomi

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	1
1.1. Tutkimuksen tausta .....	1
1.2. Puutiaisten morfologia ja elinkierto .....	4
1.3. Puutiaisten elinympäristö ja levinneisyys Suomessa .....	5
1.4. Puutiaisten isäntäeliöt.....	7
1.5. Puutiaisten levittämät taudit ja laimennusilmiö .....	7
1.6. Puutiaisten keruumenetelmät .....	10
2. Aineisto ja menetelmät.....	12
2.1. Tutkimuspaikat.....	12
2.2. Kontrollipaikkojen määrittäminen.....	13
2.3. Keruumenetelmä .....	14
2.4. DNA-eristys ja tautianalyysi .....	15
2.5 Tilastanalyysit .....	19
3. Tulokset.....	20
4. Tulosten tarkastelu .....	23
4.1. Peurojen ja kauriiden tiheyden vaikutus puutiaisten määrään .....	23
4.2. Taudinaiheuttajien esiintyvyys.....	25
4.3. Riistaruokintapaikkojen houkuttelevuus.....	27
5. Yhteenveto .....	28
Kiitokset .....	30
Lähteet:.....	31
Liitteet: .....	

# 1. Johdanto

## 1.1. Tutkimuksen tausta

Puutiaiset (Acari: Ixodida) ovat hämähäkkieläimiin (Arachnida) kuuluvia vertaimeviä loisia, joita tunnetaan maailmassa noin 878 lajia. Näistä noin 222 lajin on raportoitu ruokailevan ihmisessä, mutta yleisesti ihmisessä ruokailevia puutiaislajeja on kuitenkin suhteellisen vähän (Anderson & Magnarelli, 2008). Suomessa esiintyvistä puutiaisista vain kahden lajin on havaittu ruokailevan ihmisessä; kovakuoristen punkkien (Ixodidae) heimon kuuluvat puutiainen (*Ixodes ricinus*) ja taigapunkki (*Ixodes persulcatus*) (Laaksonen ym., 2017). Ihmisen lisäksi, näiden lajien on tavattu ruokailevan yli 200 eri selkärangkaisessa eläimessä (Anderson & Magnarelli, 2008; Cull ym., 2018). Ihmiset ovat yleensä epäsuotuisia isäntiä puutiaisille, sillä ihmisessä ruokailevat yksilöt pääsevät harvoin takaisin luontoon lisääntymään. Näin ollen ihmiset ovat puutiaisille niin sanottuja dead-end isäntiä.

Puutiaisia ja taigapunkkeja on havaittu liki kaikkialta Suomesta, joskin eteläisessä Suomessa tavataan käytännössä vain *Ixodes ricinus* -lajin yksilöitä (Laaksonen ym., 2017; Sormunen ym., 2020). Tutkimuspaikkamme sijaitsevat Varsinais-Suomessa, joten tässä tutkielmassa keskityn vain puutiaiseen, jota tutkimuspaikalla tavataan.

Puutiaiset toimivat vektoreina useille zoonoottisille eli eläinten välityksellä tarttuville taudeille (Kernif ym., 2016). Suomessa merkittävämpiä puutiaisten välityksellä leviäviä tauteja ovat *Borrelia burgdorferi* sensu lato -ryhmän bakteerien aiheuttama Lymen borreliososi ja puutiaisaivotulehdusviruksen (tick-borne encephalitis virus, TBEV) aiheuttama puutiaisaivotulehdus (Laaksonen ym., 2018; Terveyskirjasto, 2021). Puutiaiset ja niiden levittämät taudit ovat viime vuosina yleistyneet Suomessa ja muualla Pohjoismaissa (Jaenson ym., 2012; Sormunen ym., 2020), ja ilmaston lämpenemisen on arvioitu yhä voimistavan tätä kehitystä (Jaenson & Lindgren, 2011).

Ilmaston lämpenemisen seurauksena puutiaisten aktiivisuuskausi pidentyy, jolloin niillä on enemmän aikaa löytää itselleen isäntäeläin, josta ne saavat tarvitsemansa veriaterian kehittyäkseen seuraavalle kehitystasolle tai lisääntyäkseen (Gray ym., 2009). Lisäksi puutiaisten kehitysnopeuden on havaittu olevan suoraan verrannollinen lämpötilaan,

joten lämpötilan nousu nopeuttaa puutiaisten yksilönkehitystä (Sonenshine & Roe, 2013, ss. 9–10). Ilmaston lämpenemisestä hyötyvät myös monet puutiaiselle tärkeät isäntälajit. Leudommat talvet helpottavat muun muassa peurojen ja jänisten ruuansaintia, jolloin niiden todennäköisyys selviytyä lisääntymisikään asti kasvaa ja kanta vahvistuu (Forchhammer ym., 1998; Jaenson & Lindgren, 2011). Loisine ja isäntäeläimen etsintävasta johtuen puutiaisten määrä on riippuvainen alueen isäntäeläinten tiheydestä. Suuri isäntäeläinten tiheys alueella lisää puutiaisten todennäköisyyttä löytää veriateriointiin tarvittava isäntäeläin ja siten kehittyä seuraavalle kehitysasteelle tai lisääntyäkseen (Randolph, 2013, ss. 18–21).

Puutiaisten tiedetään loisivan useilla eri isäntälajeilla (Anderson & Magnarelli, 1993), mutta tutkimusta siitä, millainen merkitys eri isäntälajeilla on puutiaisten määriin ja niiden kantamiin taudinaiheuttajiin on vielä niukasti. Hirvieläinten on havaittu olevan epäkelpoja väli-isäntiä muun muassa *Borrelia burgdorferi* s.l. -ryhmän taudinaiheuttajille, ja onkin esitetty, että hirvieläimet voisivat toimia niin kutsuttuina laimennusisäntinä näille taudinaiheuttajille (Stanek ym., 2012). Laimennushypoteesi esittää, että kun alueen isäntäeläinlajistossa yleistyvät lajit, joissa kyseinen taudinaiheuttaja ei kykene leviämään, on odotettavissa, että taudinaiheuttajien suhteellinen määrä vastaavasti laskee alueen puutiaisissa. Laimennusisäntien runsas läsnäolo alueella voisi näin ollen vähentää taudin esiintyvyyttä alueella, jolloin tartuntariski alueella laskisi. Hirvieläimet ovat kuitenkin tärkeitä veriaterian lähteitä puutiaisille, minkä takia niiden runsastuminen alueella voi johtaa puutiaismäärän kasvuun kyseisellä alueella, ja siten lisätä myös tartuntariskiä.

Suomessa kasvillisuuden vähäisyys ja lumipeite vaikeuttavat valkohäntäpeurojen ja metsäkauriiden ruuanetsintää talvisin. Näiden riistaeläinten kantoja tuetaan ja metsästysmahdollisuuksia parannetaan talviaikaan sijoittuvilla ruokinnoilla, joka aloitetaan hyvissä ajoin ennen lumen tuloa ja jatketaan lumien sulamiseen saakka. Riistaruokintapaikat sijoitetaan ensisijaisesti paikkoihin, joihin eläimet luonnollisesti hakeutuvat. Ruokintapaikojen sijainneilla voidaan kuitenkin joissain määrin vaikuttaa eläinten käyttäytymiseen ja liikkumiseen (Matala ym., 2021, ss. 77). Tutkittua tietoa siitä, missä määrin tällaiset syksyisin ja talvisin ylläpidetyt riistaruokinnat houkuttelevat kauriita ja peuroja alueelle myös kesällä ja alkusyksystä, jolloin puutiaiset ovat aktiivisimmallaan, ei kuitenkaan ole. Mikäli ruokintapaikat eivät houkuttele eläimiä puutiaisten pääasiallisen aktiivisuuskauden aikana, ei ruokinnoilla liene suurta merkitystä alueen puutiaiskannan kehittymiseen. Toisaalta ruokinnat voivat myös houkuttaa muita puutiaisten ravinnoksi kelpaavia

isäntäeläimiä alueelle, ja sitä kautta kasvattaa alueen puutiaispopulaatiota.

Tässä Pro Gradu -tutkielmassani pyrin selvittämään, onko valkohäntäpeurojen (*Odocoileus virginianus*) ja metsäkauriiden (*Capreolus capreolus*) tiheydellä vaikutusta puutiaisten (*Ixodes ricinus*) määrään ja puutiaisten kantamiin taudinaiheuttajiin riistaruokintapaikoilla ja niiden läheisyydessä sijaitsevilla kontrollialueilla. Lisäksi tutkin houkuttelevatko ruokintapaikat hirvieläimiä myös varsinaisen ruokintakauden ulkopuolella. Tutkimuksessani riistaruokintapaikat edustavat alueita, joiden läheisyydessä peura- ja kauristiheyksien oletetaan olevan muita alueita korkeampia ainakin osan vuotta. Korkea hirvieläinten tiheys voi johtaa puutiaismäärän kasvuun alueella, mikä puolestaan voi kohottaa puutiaisten taudinaiheuttajien tarttumisriskiä esimerkiksi metsästäjiin ja muihin ruokintapaikkojen läheisyydessä liikkuviin ihmisiin. Kerätyistä puutiaisnäytteistä tarkastelen kolmea puutiaisissa yleisesti havaittua taudinaiheuttajaryhmää; bakteereita *Borrelia burgdorferi* s.l. ja *Anaplasma phagocytophilum* sekä *Babesia*-suvun alkueläimiä.

Tutkimuskysymykseni ovat 1) miten peura- ja kauriskannan tiheys vaikuttaa puutiaismääriin riistaruokinnoilla ja niiden lähialueilla, 2) havaitaanko alueilla laimennusilmiötä sekä 3) houkuttelevatko ruokintapaikat hirvieläimiä myös ruokinta-aikojen ulkopuolella. Hypoteesini on, että alueilla, joilla esiintyy runsaasti peuroja ja/tai kauriita, myös puutiaisten määrä on runsaampi kuin alueilla, joilla peuroja ja/tai kauriita esiintyy vähemmän. Toinen tutkimushypoteesini on, että korkea peura- ja/tai kauristiheys vaikuttaa negatiivisesti *B. burgdorferi* s.l. -ryhmän bakteerien, mutta ei hirvieläimissä kiertävien *A. phagocytophilum* -bakteerien ja *Babesia*-alkueläinten esiintymiseen alueen puutiaisissa. Oletuksena, että jyräjöiden ja muiden isäntälajien osuus on yhtä korkea kullakin tutkimuspaikalla. Kolmas tutkimushypoteesini on, että hirvieläinten tiheydet ovat korkeampina ruokintapaikkojen läheisyydessä myös varsinaisen ruokintakauden ulkopuolella.

Tutkielmani tavoitteena on tuoda lisää tietoa peurojen ja kauriiden tiheyden vaikutuksesta puutiaisten populaatiodynamiikkaan sekä auttamaan arvioimaan, missä määrin hirvieläinten runsas esiintyminen alueella vaikuttaa ihmisten riskiin sairastua puutiaisten levittämiin tauteihin.

## 1.2. Puutiaisten morfologia ja elinkierto

Puutiaisten (*Ixodes ricinus*) elinikä on 2–6 vuotta ja elinkierron aikana ne käyvät läpi neljä kehitysastetta: muna, toukka, nymfi ja aikuinen. Puutiaiset ovat verrattain pieniä: toukat ovat < 1 mm, nymfit 1–2 mm ja aikuiset 2–4 mm pituisia. Puutiaisen ruumis koostuu kahdesta yhteen fuusioituneesta osasta; pääosasta (*gnathosoma*) ja vartalosta (*idiosoma*), sekä vartaloon kiinnittyneistä kuusiosaisista jaloista. Toukilla on kolme raajaparia, kun taas nymfeillä ja aikuisilla on neljä raajaparia. Raajojaan puutiainen käyttää liikkumiseen, kiipeämiseen ja isäntäeliön ihoon tai karvoihin tarrautumiseen. Kaikissa kehitysasteissa puutiaisen ruumiin ylätuosaa peittää kilpi (*scutum*). Poikkeuksena aikuisilla koirailla kilpi peittää koko ruumiin yläosan. Takaruumiin nahkamainen kutikula venyy veriaterioinnin aikana, ja aikuinen naaras voi paisua jopa 25–30 mm pituiseksi.

Pääosassa sijaitsee suuosa, joka koostuu kahdesta pedipalpista ja niiden välissä sijaitsevasta imukärsästä (*chelicera*). Imukärsän kärjessä lateraalisesti sijaitsevien kahden leikkusormen (*cutting digits*) avulla puutiainen tekee viillon isäntäeliön ihoon veriaterioinnin alkuvaiheessa. Imukärsän ventraalipuolella sijaitsee ruokakanava ja dorsaalipuolella harppuunan mallinen hypostomi. Hypostomin avulla puutiainen ankkuroi itsensä isäntäeliön ihoon kiinni veriaterioinnin ajaksi. Lisäksi puutiaiset erittävät sementtimäistä ainetta haavan sisälle työnnetyn imukärsän ympärille lujittaakseen kiinnittymistä. Veriaterioinnin aikana pedipalpit eivät painu sisälle haavaan, vaan ne toimivat tukena ihon ulkopinnalla (Anderson & Magnarelli, 2008).

Puutiaiset tarvitsevat veriaterian siirtyäkseen kehitysasteelta toiselle ja aikuisena lisääntyäkseen. Minimoidakseen ruokaluun liittyvän kuolleisuusriskin, puutiaiset ruokailevat vain kerran kussakin kehitysasteessa ja ottavat kerralla suurimman mahdollisen veriaterian, jonka turvin ne pystyvät selviytymään ja kehittymään seuraavalle kehitysasteelle tai lisääntymään (Randolph, 2013, ss. 4–6). Veriateriointi kestää toukilla ja nymfeillä keskimäärin 3–8 päivää ja aikuisilla keskimäärin 5–12 päivää (Anderson & Magnarelli, 2008; Needham & Teel, 1991). Suhteellisen hitaasta ruokailuprosessista huolimatta puutiaiset viettävät suurimman osan elämästään irti isäntäeliöstä (Needham & Teel, 1991). Veriaterian päätteeksi ne irrottautuvat isäntäeliöstä ja pudottautuvat maahan karikkeeseen sekaan, jossa ne kehittyvät seuraavalle kehitysasteelle tai lisääntyvät (Anderson & Magnarelli, 2008).

Yhden kehitysasteen (toukka, nymfi ja aikuinen) on arvioitu kestävän noin vuoden verran, jolloin sukupolvenvaihdos tapahtuu keskimäärin kolmen vuoden välein. Kehitykseen vaikuttaa huomattavasti elinympäristön lämpötila, päivänpituus ja isäntäeläinten saataavuus, ja epäsuotuisissa olosuhteissa puutiaisen elinkierto voi viedä jopa 6 vuotta (Anderson & Magnarelli, 2008; Randolph, 2013, ss. 9–14). Koska puutiaiset ruokailevat vain kerran jokaisessa kehitysasteessa, on niiden selvittävä pitkiä ajanjaksoja ilman ravintoa. Selviytymisen kannalta oleellista on vesitasapainon ylläpitäminen ja energian kulutuksen säättely (Needham & Teel, 1991; Randolph, 2013, ss. 4–6). Puutiaiset saavat tarvitsemansa veden veriaterioinnista ja absorboimalla vettä kosteasta ilmasta. Suotuisissa olosuhteissa puutiaiset voivat odottaa useita päiviä kasvillisuuden seassa ohikulkevaa isäntäeläintä, mutta määrääjoin niiden on palattava kostean karikkeen tai maannoksen sekaan absorboidakseen vettä kosteasta ilmasta (Randolph, 2013, ss. 4–6).

### 1.3. Puutiaisten elinympäristö ja levinneisyys Suomessa

Elinkierrostaan johtuen puutiaiset (Acari: Ixodidae) ovat riippuvaisia elinympäristönsä kosteudesta ja isäntäeläinten populaatiotiheydestä. Puutiaiset elävät suurimman osan elämästään lähellä maanpintaa, kostean karikkeen ja kasvillisuuden seassa, jossa ruumiin sopivan vesitasapainon ylläpitäminen on mahdollista. Isäntäeläimen löytääkseen ne kapuavat aluskasvillisuuden, kuten heinien ja varpujen, varsille, ja odottavat ohi kulkevaa isäntäeläintä, johon tarrautua. Kuumalla, kuivalla ja tuulisella säällä puutiaiset laskeutuvat alas kasvien lehdiltä ja varsilta, ja kaivautuvat kostean karikkeen sekaan, maaperään tai kivien koloon. Puutiaiset eivät juurikaan liiku maanpinnan suuntaisesti, vaan ne kulkeutuvat uusille paikoille pääasiassa isäntäeläinten mukana. Pudottauduttuaan isäntäeläimestään, niiden tulee sopeutua silloiseen elinympäristöönsä siksi aikaa, kunnes ovat kehittyneet seuraavalle kehitysasteelle ja löytävät uuden isäntäeliön seuraavan veriaterian lähteeksi (Randolph, 2013, ss. 6–8).

Puutiaiset ovat levinneet laajalle alueelle ympäri Euraasiaa ja niitä on havaittu Euroopan eteläosista (39 ° N) aina Pohjoismaihin ja Venäjän pohjoisosiin asti (65° N), missä niiden levinneisyysalue kohtaa pohjoisella alueella esiintyvän taigapunkin (Anderson & Magnarelli, 2008; Bugmyrin ym., 2013; Jaenson ym., 2012; Laaksonen ym., 2017). Puutiaisen levinneisyyden kannalta Suomi, Ruotsi, Viro, Latvia ja Venäjä ovat maantieteellisesti kiinnostavassa asemassa, sillä niiden alueella näiden kahden lajin – puutiaisen ja



taigapunkin – levinneisyysalueet kohtaavat (Bugmyrin ym., 2013; Jaenson ym., 2016; Katargina ym., 2011; Laaksonen ym., 2017; Namina ym., 2019). Laaksonen ym. (2017) kansalaiskeräysaineistoon pohjautuvassa tutkimuksessa havaittiin puutiaisen ja taigapunkin levinneen liki kaikkialle Suomeen, lukuun ottamatta aivan pohjoisimpia alueita. Puutiaisia löytyi eniten Etelä- ja Itä-Suomesta sekä Varsinais-Suomen sekä Uudenmaan rannikolta. Taigapunkkihavainnot keskittyivät Keski-Suomen ja Pohjanlahden seudulle, mutta lajia ei ole havaittu aivan eteläisessä Suomessa. Verrattuna aikaisempaan, lähes 60 vuotta vanhempaan tutkimusaineistoon, lajien levinneisyysalueiden on havaittu siirtyneen pohjoisemmaksi ja populaatioiden levittäytyneen uusille alueille (Laaksonen ym., 2017). Vastaavanlaisia havaintoja on tehty muun muassa myös Ruotsissa ja Venäjän Karjalassa (Bugmyrin ym., 2013; Jaenson ym., 2012). Jaenson ym. (2012) arvioivat yhdeksi puutiaisten runsastumista ja levinneisyyttä selittäväksi tekijäksi tärkeiden isäntäeläinten, kuten esimerkiksi hirvieläinten, populaatioiden kasvun. Toisena tärkeänä tekijänä Jaenson ym. pitävät ilmaston lämpenemistä. Leudommat talvet ja pitkittynyt kasvukausi mahdollistavat puutiaisten ja sen isäntäeläinten paremman selviämisen ja nopean leviämisen uusille alueille (Jaenson ym., 2012).

Puutiaisen ja taigapunkin aktiivisuudessa on havaittavissa kausittaista vaihtelua, joskin ne poikkeavat hieman lajien kesken toisistaan. Suomessa molempien lajien aktiivinen kausi sijoittuu touko-syyskuuhun, mutta leutoina vuosina niitä voidaan havaita myös aikaisemmin keväällä ja myöhemmin syksyllä (Laaksonen ym., 2017; Sormunen ym., 2020). Puutiaisilla nymfien aktiivisuudessa havaitaan korkeampi huippu syyskuussa ja aikuisilla yksilöillä heinä-elokuussa. Sen sijaan taigapunkin osalta aikuisten yksilöiden aktiivisuuskauden huippu sijoittuu touko-heinäkuuhun (Sormunen ym., 2020). Taigapunkin toukat ja nymfit eivät juuri tartu tutkimuslakanaan, joten niiden aktiivisuuden kausittaisesta vaihtelusta ei ole tarkkaa näkemystä (Sormunen ym., 2020; Uspensky, 2016). Sormusen ym. (2020) tulos poikkeaa hieman Cayol ym. (2017) tutkimuksesta, jossa puutiaisen nymfien korkeamman aktiivisuushuipun havaittiin olevan toukokuussa, ja toisen, vähän pienemmän huipun syyskuussa. Vastaavasti aikuisten puutiaisten aktiivisimman kauden havaittiin olevan elo-syyskuussa (Cayol ym., 2017). Kuten lähes poikkeuksetta kaikkien hämähäkkieläinten, myös puutiaisten aktiivisuuteen vaikuttavat elinympäristön olosuhteet. Schulz ym. (2014) havaitsivat puutiaisen saalistusaktiivisuuden olevan riippuvainen maanpinnan tason lämpötilasta, sadannasta, päivän pituudesta ja ilmankosteudesta. Aikuisten yksilöiden aktiivisuuden havaittiin korreloivan positiivisesti päivän pituuden kanssa, kun taas nymfeillä tätä yhteyttä ei havaittu (Schulz ym., 2014).

## 1.4. Puutiaisten isäntäeliöt

Puutiaiset ovat vertaimeviä loisia, jotka tarvitsevat jokaisessa kehitysasteessaan yhden veriaterian. Veriaterian ne saavat loisimalla selkärankaisessa isäntäeläimessä. Puutiaisella ja taigapunkilla on munavaiheen lisäksi kolme eri kehitysastetta – toukka, nymfi ja aikuinen – joten elämänsä aikana naaraat ruokailevat kolmessa ja koiraat kahdessa eri isäntäeläimessä (Anderson & Magnarelli, 2008).

Puutiaisen ja taigapunkin tiedetään loisivan useilla eri selkärankaisilla lajeilla, ja niitä pidetäänkin suhteellisen generalisteina isäntäeläimen suhteen (Anderson & Magnarelli, 1993). Koska kaikki puutiaisten kehitysasteet ovat parasiittisia, ovat ne riippuvaisia isäntäeläinten populaatiotiheydestä ja levinneisyydestä. Generalistisuudestaan huolimatta tärkeiden isäntäeläinten, kuten hirvieläinten ja jyrsijöiden, populaatiotiheydellä on esitetty olevan vaikutusta puutiaisten populaatiodynamiikkaan (Jaenson ym., 2012; Krawczyk ym., 2020). Krawczyk ym. (2020) muun muassa havaitsivat vahvan yhteyden alueen *I. ricinus* -lajin nymfiin tiheyden ja jyrsijätiheyden kanssa (Krawczyk ym., 2020). Myös Ruotsissa on havaittu runsaita puutiaispopulaatioita saarilla, joissa metsäjänikset ovat ainoita selkärankaisia, jotka pystyvät toimimaan isäntäeläimenä kaikille puutiaisten kehitysasteille (Jaenson & Tälleklint, 1996). Generalistisuus isäntäeläimen suhteen kuitenkin takaa paremman selviytymisen, nopeamman elinkierron ja levittäytymisen uusille alueille, koska tällöin potentiaalisia isäntiä on enemmän tarjolla (Anderson & Magnarelli, 2008; Randolph, 2013, ss. 27–29). Vaikka puutiainen ja taigapunkki eivät ole spesifejä isäntäeläimensä suhteen, on havaittu, että toukat ja nymfit loisivat yleisimmin pienillä selkärankaisilla, kuten myyrillä, linnuilla ja matelijoilla, kun taas aikuiset yksilöt suosivat suuria ja keskisuuria nisäkkäitä (Anderson & Magnarelli, 1993; Jaenson ym., 1994). Yhtenä selittävä tekijänä tähän on eri kehitysasteiden erilainen käyttäytyminen isäntäeläintä etsiessä. Aikuiset yksilöt kiipeävät kasvin, kuten heinän tai varvun, yläosiin, kun taas toukat ja nymfit jäävät verrattain alemmaksi väijymään ohikulkevaa isäntäeläintä (Anderson & Magnarelli, 2008; Randolph, 2013, ss. 6–8).

## 1.5. Puutiaisten levittämät taudit ja laimennusilmiö

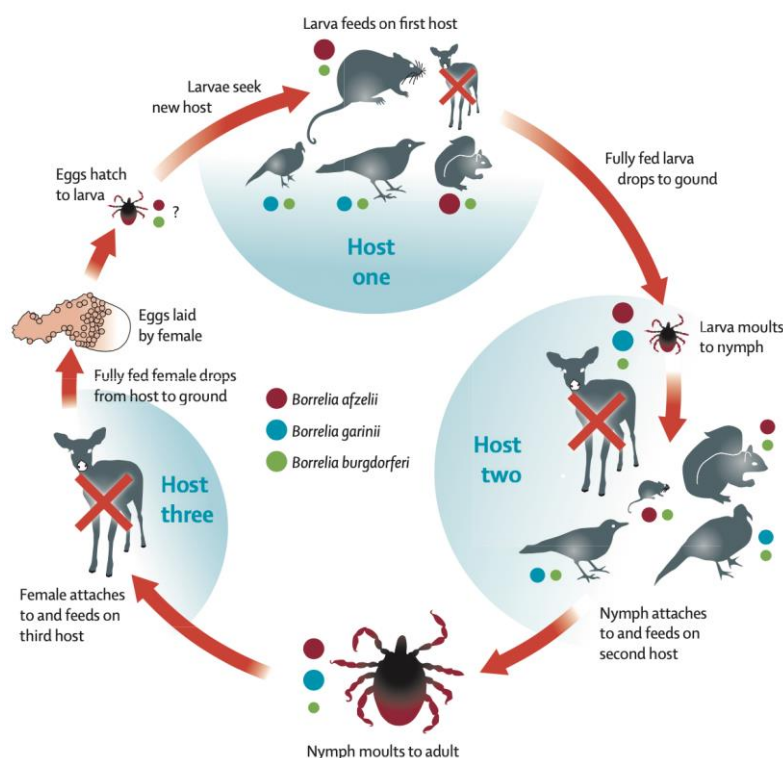
Puutiaiset toimivat monien zoonoottisten tautien vektoreina ympäri maailmaan. Merkittävämpiä puutiaisten levittämiä tauteja Suomessa ovat *Borrelia burgdorferi* sensu lato -

bakteeriryhmän aiheuttama Lymen borrelioosi ja puutiaisaiivotulehdusviruksen (TBEV) aiheuttama puutiaisaiivotulehdus (Laaksonen ym., 2018; Terveyskirjasto, 2021). Laaksonen ym. (2018) havaitsivat kansalaiskeräystutkimuksessaan, että puutiaisen ja taigapunkin yksilöistä jopa 30 % kantoi vähintään yhtä taudinaiheuttajaa ja 2 % vähintään kahta taudinaiheuttajaa. Yleisimmät tutkimuksessa havaitut taudinaiheuttajaryhmät olivat *B. burgdorferi* s.l. (17 %) ja *Rickettsia* spp. (10.8 %). Taudinaiheuttajien lajikirjon havaittiin olevan korkeampi puutiaisilla kuin taigapunkteilla (Laaksonen ym., 2018).

Taudinaiheuttajat siirtyvät puutiaisten keskuudessa horisontaalisesti, eli isäntäeläimen välityksellä puutiaiselta toiselle, tai vertikaalisesti naaraalta tämän munille. Horisontaalinen siirtymisen mekanismi voidaan karkeasti jakaa vielä kahteen mekanismiin; samanaikaiseen ateriointiin (co-feeding) ja systeemiseen siirtoon (systemic transmission). Samanaikaisessa aterioinnissa infektoitunut ja ei-infektoitunut puutiainen ruokailevat samanaikaisesti ja lähekkäin toisiaan isäntäeläimen iholla, jolloin taudinaiheuttaja pääsee siirtymään puutiaisesta toiseen infektoituneen isäntäeläimen ihon välityksellä. Mekanismi perustuu paikalliseen ja väliaikaiseen infektiin isäntäeläimen iholla, eikä vaadi taudinaiheuttajan leviämistä muualle isäntäeläimen elimistöön (Voordouw, 2015). Systeemisen siirron -mekanismi vastaavasti perustuu yhtämittaiseen infektiin isäntäeläimessä, joka voi olla paikallista (kuten ihossa) tai systeemitasoista (kuten verenkierrossa). Systeemisessä siirrossa isäntäeläin saa taudinaiheuttajan infektoituneelta puutiaiselta loisinnan aikana, jonka jälkeen taudinaiheuttaja leviää uusiin puutiaisiin näiden ruokaillessa infektoituneessa isäntäeläimessä. Taudinaiheuttajan leviäminen uusiin puutiaisyksilöihin ei systeemisen siirron kautta vaadi infektoituneen ja ei-infektoituneen puutiaisen samanaikaista ja lähekkäistä ruokailua isäntäeläimessä (Voordouw, 2015). Toinen, selvästi harvinaisempi, taudinaiheuttajien leviämistapa puutiaisten keskuudessa on vertikaalinen infektioreitti, jossa taudinaiheuttaja siirtyy suoraan sukupolvelta toiselle. Muun muassa Han työryhmineen (2019) ovat havainneet *Borrelia miyamotoi* -bakteerin siirtyvän vertikaalisesti infektoituneelta *Ixodes scapularis* -lajin naaraalta tämän munille (Han ym., 2019).

Koska puutiaiset ovat riippuvaisia isäntäeläimistään ja niiden kantojen tiheyksistä, on esitetty, että tiettyjen isäntälajien kantojen koolla olisi vaikutusta puutiaisten populaatiodynamiikkaan ja puutiaisten kantamiin taudinaiheuttajiin. Krawczyk ym. (2020) muun muassa havaitsivat alueen jyrsijätiheyden olevan yhteydessä *I. ricinus* -lajin nymfien tiheyteen ja nymfien kantamiin taudinaiheuttajiin, kuten *Borrelia afzelii* ja *Neohhrlichia mikurensis* -bakteerien esiintyvyyteen nymfikannassa. *Borrelia miyamotoi* ja *Rickettsia*

*helvetica* -infektioiden esiintyvyydet nymfeissä olivat kuitenkin riippumattomia jyrksijätiheydestä (Krawczyk ym., 2020). Tutkijat ovat esittäneet, että joidenkin taudinaiheuttajien, kuten esimerkiksi Lymen borrelioosia aiheuttavien *Borrelia*-bakteerien, kohdalla puutiaisen isäntälajit, jotka eivät voi kantaa kyseistä tautia, voisivat toimia niin kutsutuin laimennusisäntinä (Levi ym., 2016; Ogden & Tsao, 2009). Laimennusilmiossa näiden taudille epäkelvollisen väli-isäntälajin runsas esiintyminen alueella vähentäisi taudinaiheuttajien runsautta ja esiintyvyyttä alueella.



Kuva 1. *Borrelia burgdorferi sensu lato* -bakteeriryhmän infektiokierto. Värillisten pallojen koko osoittaa eri selkärankaisten suhteellisen osuuden eri bakteerien väli-isäntinä. Punainen risti osoittaa epäkelvon isäntälajin. Alkuperäinen kuva on artikkelista (Stanek ym., 2012). Kuvan tekstit on suomentanut Amalia Kokkonen.

Hirvieläinten on muun muassa havaittu olevan epäkelvoja väli-isäntiä *Borrelia* -bakteereille, jolloin niiden runsas läsnäolo alueella voisi vähentää taudinaiheuttajan esiintymistä puutiaisissa ja siten riskiä sairastua Lymen borrelioosiin (Stanek ym., 2012). Laimennusilmioiteoria on kuitenkin kohdannut myös kritiikkiä, sillä isäntäeläinten runsastuessa alueella ne tarjoavat myös enemmän mahdollisia veriaterian lähteitä puutiaisille. Ravinnon lisääntyessä puutiaismäärät voivat nousta, jolloin mahdollisesti myös riski sairastua

tautiin alueella kasvaa (Randolph & Dobson, 2012). Koska tutkimusta aiheesta on tehty vielä verrattain vähän, tiedeyhteisössä ei ole selvää käsitystä laimennusisäntien ja tautiriskin välisestä vaikutuksesta.

Puutiaiset ja niiden kantamat taudit ovat kasvava ongelma Suomessa, jota ilmaston lämpeneminen tulee todennäköisesti vauhdittamaan. Jotta tautiriskiä voitaisiin pienentää ja mahdollisesti puutiaisten runsastumista hillitsemään, tarvitaan lisää tutkimusta puutiaisten ja isäntälajien välisestä dynamiikasta. Laaja ymmärrys laimennusilmioista ja sen vaikutuksista voi tarjota meille uuden työkalun puutiaismäärien ja tautiriskien ennustettavuudessa ja hallinnassa.

## 1.6. Puutiaisten keruumenetelmät

Puutiaisten elinkierrosta ja metsästyskäyttäytymisestä johtuen yleisimmät hyönteisten pyydystykseen käytetyt menetelmät, kuten haavinta ja loukkupyödykset, eivät ole tehokkaasti sovellettavissa puutiaisten pyydystämiseen. Koska puutiaiset ovat aktiivisimmillaan vain etsiessään isäntäeläintä, tehokkain tapa niiden keräämiseen on jäljitellä isäntäeläimen aikaansaamaa ärsykettä tai kerätä puutiaiset isäntäeläimistä. Keruumenetelmän valintaa vaikuttaa tutkimuskysymys ja käytettävissä olevat resurssit.

Yleisin puutiaisten keruumenetelmä on niin kutsuttu lakananvetomenetelmä. Menetelmässä 1 m x 1 m kokoista lakanaa vedetään kenttäkasvillisuuden päällä ennalta määritellyn matkan tai ajan verran, jonka jälkeen lakana käännetään ja lakanan alapinnalle tarttuneet puutiaisyksilöt lasketaan (Salomon ym., 2020). Lakanan vedosta aiheutunut kasvillisuuden värähtely saa aikaan ärsykkeen, jonka seurauksena kasvin varrella isäntäeläintä väijyvä puutiainen tarrautuu lakanaa. Laajasta käytöstään huolimatta menetelmän tuottamia arvioita puutiaiskannasta ei voida kuitenkaan pitää täysin paikkansa pitävinä. Jotta puutiaiset tarttuisivat keruulakanaan, tulee niiden olla aktiivisia. Liian kuivalla, kuumalla ja tuulisella säällä sekä onnistuneen veriaterioinnin jälkeen puutiaiset kaivautuvat suojaan maaperään ja karikkeeseen sekaan, eivätkä tartu keruulakanaan. Näin ollen keruuhetken sääolosuhteet vaikuttavat saatuihin tuloksiin. Lisäksi korkeassa kasvillisuudessa lakana ei pääse maaperän lähelle, jolloin matalammalla viihtyviä toukkia ja nymfejä voi tarttua lakanaan vähemmän kuin esimerkiksi lehtikarikkeessa lakanaa vetäessä.

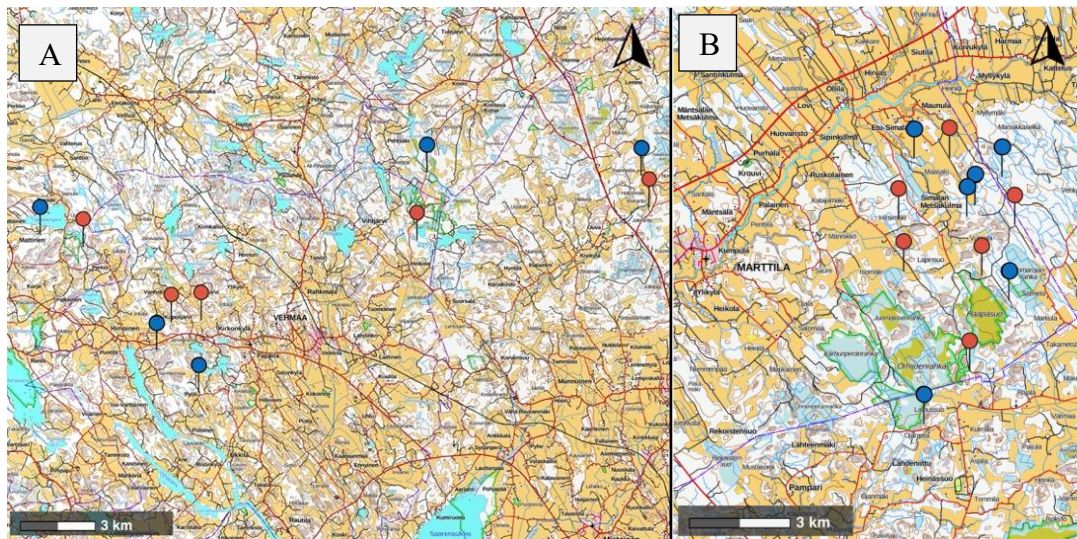
Lisäksi, vaikka keruolosuhteet olisivat suotuisat ja kasvillisuus sopivan matalaa, ei lakananvetomenetelmän tehokkuus ole välttämättä riittävän suuri kuvastamaan alueen todellista puutiaipopulaation kokoa. Nyrhilä et al. (2020) havaitsivat tutkimuksessaan, että lakananvetomenetelmän keruutehokkuus oli suhteellisen alhainen. Yksittäisen lakananvedon otanta oli aina vähemmän kuin 12 % odotetusta aktiivisten nymfien populaatiosta (Nyrhilä ym., 2020). Tästä johtuen alueilla, joissa puutiaistiheys on matala, menetelmä ei välttämättä ole riittävän herkkä puutiaisten pyydystämiseen. Näillä alueilla voidaankin tarvita pidempiä vetopituuksia puutiaisten havaitsemiseen (Sormunen ym., 2020). Vaikka lakananvetomenetelmällä kerätyn otannan ei voida olettaa täysin kuvastavan alueen puutiaispopulaatiokokoa, heijastaa se kuitenkin puutiaisten suhteellista esiintyvyyttä alueella.

Toinen tapa puutiaisten keräämiseen ja levinneisyyden kartoittamiseen on kerätä ne isäntäeläimestä (Mierzejewska ym., 2015; Namina ym., 2019). Loisittujen isäntäeläinten kartoitus vaatii usein isäntäeläimen pyydystämisen, minkä takia kattavan aineiston kerääminen on suhteellisen haastavaa. Lisäksi menetelmän spatiaalinen tarkkuus riippuu tutkittavan isäntäeläimen elinpiirin koosta. Esimerkiksi laajalla alueella liikkuvasta tai muuttavasta isäntäeläimestä kerättyjen puutiaisten määrä ei välttämättä kuvasta todenmukaisesti isäntäeläimen pyydystyspaikan puutiaismäärää. Toisaalta lakananvetomenetelmään verrattuna, loisittujen isäntäeläinten kartoittamisella voidaan saada maantieteellisesti laajempi katsaus puutiaisten määrästä ja levinneisyydestä sekä saada lisää ymmärrystä siitä, mitkä lajit toimivat puutiaisille tärkeinä isäntäeläiminä. Vastaavanlaista keruumenetelmää on hyödynnetty esimerkiksi Suomessa. Turun yliopiston tutkijat Laaksonen ym. (2017) toteuttivat vuonna 2015 kampanjan, jonka aikana kansalaiset saivat lähettää löytämiään puutiaisia tutkijoille. Kansalaisten keräämistä puutiaisista kertyi kattava, lähes 20 000 yksilön aineisto. Saadun aineiston avulla tutkijat selvittävät muun muassa puutiaisen ja taigapungin levinneisyyttä Suomessa (Laaksonen ym., 2017) ja puutiaisvälitteisten tautien esiintyvyyttä (Laaksonen ym., 2018).

## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1. Tutkimuspaikat

Tutkimusaineisto kerättiin Varsinais-Suomen alueelta 11 riistanruokintapaikalta sekä 11 kontrollipaikalta (Kuva 2), joiden koordinaatit löytyvät tutkielman liitteenä (Liite 1). Keräys tehtiin kahtena ajankohtana kullakin tutkimuspisteellä, tarkastellaksemme tapahtuuko puutiaisten ja taudinaiheuttajien määrissä muutosta kesän aikana. Ensimmäinen keräys tehtiin alkukesästä ajanjaksolla 15.6.–1.7.2021 ja toinen keräys loppukesästä ajanjaksolla 12.8.–1.9.2021. Jotta rannikkoalueilla yleisesti havaittujen korkeampien puutiaismäärien vaikutus tuloksiin voidaan sulkea pois, kummastakin ryhmästä – ruokintapaikka ja kontrolli – 6 tutkimuspaikkaa sijaitsi sisämaassa Marttilan alueella ja 5 tutkimuspaikkaa rannikon tuntumassa Vehmaan ja Mynämäen alueella.



Kuva 2. A. Rannikon tutkimuspisteet ja B. Sisämaan tutkimuspisteet. Riistanruokintapaikat on merkitty karttaan punaisilla merkeillä ja kontrollipaikat on merkitty sinisillä merkeillä. Pohjakartta 2022 AccelBit Oy.

Riistanruokintapaikkojen sijainnit saatiin Suomen riistakeskukselta ja alueen riistanhoitoyhdistyksiltä. Jotta tutkimusalueiden rajaaminen ja kontrollipaikkojen määrittäminen onnistuisi, saaduista riistanruokintapaikoista tutkimukseen valikoituivat pistemäiset ruokintapaikat, joissa ruokintaan käytetään ruokinta-automaatilla tai -katosta (Kuva 3). Ruokinnan tuli olla lisäksi kohtalaisen aktiivista ja jatkuvaa syksyn ja talven aikana.

Ruokinnan aktiivisuutta arvioitiin aikaisempien vuosien peurojen ja kauriiden kaatotilastojen avulla sekä tiedustelemalla asiasta ruokinnasta vastaavilta tahoilta. Lisäksi ruokintapaikan tuli sijaita suojaisan metsän läheisyydessä, johon peurat ja kauriit voivat hakeutua suojaan.



Kuva 3. Loukasjärven, Kaikurannan ja Lepistön riistaruokintapaikat. © Amalia Kokkonen

## 2.2. Kontrollipaikkojen määrittäminen

Kontrollipaikkojen määrittäminen tehtiin paikkatietojärjestelmäavusteisesti R-ohjelmointikielellä (Liite 2). Kullekin riistaruokintapaikalle määriteltiin sitä vastaava kontrollipaikka, jotta ympäristöolosuhteiden vaikutus saataisiin minimoitua tutkimuksessa. Näin ollen aina yksi riistaruokintapaikka ja sille määritetty kontrollipiste muodostavat tarkasteluparin. Kontrollipaikoiksi pyrittiin valitsemaan paikat, joiden kasvillisuuspeite ja alueen maankäyttö vastaavat mahdollisimman hyvin kunkin ruokintapaikan olosuhteita, ja jotka sijaitsevat 1–3 kilometrin päässä verrokkiruokintapaikasta. Tutkimuksen kannalta tärkeitä muuttujia olivat: kasvillisuustyyppi; lähellä sijaitsevat vesistöt (meri, järvet, suuret lammet, joet, suuremmat purot); pellon, rakennetun ympäristön ja suon osuus 1 kilometrin säteellä; sekä tiestö. Lisäksi tutkimuspaikkojen tuli sijaita vähintään 1 kilometrin päässä muista, tiedossa olevista, ruokintapaikoista.

Tuloksena jokaista ruokintapaikkaa kohden ohjelma määrittäi paremmuusjärjestykseen korkeintaan kymmenen vaihtoehtoista kontrollipistettä. Paremmuus on tässä määritelty siten, miten hyvin ehdotetun kontrollipisteen maankäyttöluokat vastaavat verrokkina



olevaa ruokintapaikkaa. Vaihtoehtoisia kontrollipisteitä verrattiin vielä silmämääräisesti alueen ilmakuviin, joiden avulla kullekin verrokkiruokintapaikalle valittiin vaihtoehtoisista kontrollipisteistä sopivin. Kontrollipisteen lopullinen tarkka sijainti määriteltiin vielä maastossa, jotta kunkin kontrollipisteen ympäristöolosuhteet vastaisivat mahdollisimman hyvin verrokkina olevan ruokintapaikan ympäristöolosuhteita.

### 2.3. Keruumenetelmä

Puutiaisten keruu toteutettiin yleisesti käytetyllä lakananvetomenetelmällä (Salomon ym., 2020; Sormunen ym., 2020), jossa 1 x 1 metrin kokoista valkoista lakanaa vedetään kenttäkasvillisuuden päällä 10 metrin osioissa noin 500 metrin verran kussakin tutkimuspaikassa. Tutkimuksessa olimme myös kiinnostuneita riistaruokintapaikkojen houkuttelevuudesta, minkä takia ruokintapaikoilla lakanan veto tehtiin kahdella eri etäisyydellä ruokinta-automaatista: 0–50 metrin etäisyydellä ja 50–100 metrin etäisyydellä. Molemmissa vyöhykkeissä lakanaa vedettiin noin 250 metriä. Koska tilastollisin menetelmin vyöhykkeiden välillä ei havaittu eroa peurojen/ kauriiden jätösten määrissä eikä puutiaismäärissä, ei vyöhykkeitä enää huomioitu tutkimuksen tulosten tarkastelussa.

Jokaisen 10 metrin lakanan vedon jälkeen lakana käännettiin ja lakanan alapinnalle kiinnittyneet puutiaiset laskettiin ja määrät kirjattiin ylös kehitysasteittain. Nymfit ja aikuiset yksilöt kerättiin lakanalta talteen 70 % etanolia sisältäviin Falcon-putkiin. Säilytystä ja myöhempiä tautianalyyseja varten kukin yksilö siirrettiin laboratorioissa etanolista omaan tyhjään 1,5 ml Eppendorf-putkeen. Näyteputket numeroitiin tunnistamista varten ja säilöttiin -80°C pakastimeen. Toukat laskettiin, mutta niitä ei sisällytetty taudinaiheuttaja-analyysiin, koska todennäköisyys sille, että ne kantaisivat tutkittuja taudinaiheuttajia, on hyvin alhainen (Sormunen ym., 2016a). Toukkahavaintoja ei myöskään sisällytetty tilastoanalyysiin, sillä havaitut toukat esiintyivät muutamana suurempana ryppäänä ja luovat täten virhettä tilastoanalyysiin. Lakanan vetämistä maassa olevien paksujen keppien ja kaatuneiden puiden yli pyrittiin välttämään, jotta lakanassa jo kiinni olevat puutiaiset eivät tippuisi pois voimakkaan hankauksen vaikutuksesta. Tämän takia joillakin tutkimuspaikoilla 10 m lakanan vetoja jouduttiin toteuttamaan useammassa lyhyemmässä osiossa.

Puutiaisten laskennan ja keruun lisäksi molempina tutkimusajankohtina suoritettiin valkohäntäpeurojen ja metsäkauriiden jätöskasojen laskenta. Jätöskasojen lukumäärälaskenta on vakiintunut menetelmä hirvieläinten populaatiotiheyden arvioinnissa sen suhteellisen hyvän tarkkuuden vuoksi (Huapeng ym., 1997; Härkönen & Heikkilä, 1999). Jätöslaskenta mahdollistaa tarkemman arvioin alueen peura- ja kauristiheyksistä kuin pelkästään valtakunnallisia riistatilastoja tarkastelemalla.

Tässä tutkimuksessa jätösten laskenta suoritettiin jokaisen lakanan vedon yhteydessä. Lakanaa perässä vedettäessä laskettiin samalla jätökset vetäjän molemmilta puolilta 1 metrin etäisyydeltä, jolloin syntyi noin 2 metrin levyinen vyöhyke, jolta jätökset laskettiin. Jätösten määrä kirjattiin ylös kullekin 10 metrin lakanan veto-osiolle. Havaitulla kauriiden ja peurojen jätösten määrällä pyritään arvioimaan niiden tiheyttä alueella. Tässä tutkimuksessa kauriiden ja peurojen jätöksiä ei eritelty toisistaan, sillä molemmat lajit toimivat tärkeinä isäntäeläiminä puutiaisille. Koska tutkimusajankohdat ovat ajallisesti suhteellisen lähellä toisiaan, on todennäköistä, että osa alkukesän jätöksistä ei ole kerennyt maatumaan keräysajankohtien välillä, vaan ne ovat säilyneet myös loppukesän laskentaa. Täten on odottavissa, että papanoiden määrä on loppukesän laskennassa hieman alkukesän määrä korkeampi.

Puutiaisten laskenta ja keräys sekä lakanan vedon yhteydessä tehty peurojen ja kauriiden papanalaskenta toteutettiin kullakin ruokintapaikalla ja sille määritellyllä kontrollipaikalla joko samana tai peräkkäisenä päivänä, jotta sääolosuhteiden vaikutus puutiaisten aktiivisuuteen, ja siten myös aineiston virhelähteisteisiin, saatiin minimoitua. Alkukesän tutkimusjakson aikana lämpötila oli verrattain korkea, ja koska kuumalla, kuivalla ja tuulisella säällä puutiaiset eivät ole kovin aktiivisia, pyrittiin puutiaisten keruu toteuttamaan päivinä, jolloin lämpötila ei olisi kovin korkea (alin lämpötila 17°C – ylin lämpötila 26°C). Vastaavasti loppukesän keruupäivien valintaan vaikuttivat sateet. Tutkimuslakanan kastuessa puutiaiset eivät enää tahdo tarttua siihen, vaikka olisivatkin aktiivisia, minkä takia keruuta sateisina päivinä ja maan ollessa vielä märkä pyrittiin välttämään.

## 2.4. DNA-eristys ja tautianalyysi

Kerätyistä nymfeistä ja aikuisista puutiaisista tutkittiin kahden taudinaiheuttajabakteerin/bakteeriryhmän (*B. burgdorferi* s.l. ja *A. phagocytophilum*) sekä yhden

taudinaiheuttaja-alkueläinryhmän (*Babesia* spp.) esiintymistä. Näistä valkohäntäpeurojen ja metsäkauriiden on osoitettu olevan epäkelvoja isäntiä *B. burgdorferi* s.l. -ryhmän bakteereille, kun taas tietyt *A. phagocytophilum* -lajin kannat sekä *Babesia*-lajit kiertävät pääsääntöisesti hirvieläimissä. Tässä tutkimuksessa kerättyjä puutiaisia ei erikseen määritetty lajitasolle asti. Lukuisissa Varsinais-Suomen alueelle sijoittuneissa puutiaistutkimuksissa ei kuitenkaan aiemmin ole havaittu lainkaan taigapunkkeja, joten nytkin kerätyt yksilöt ovat hyvin todennäköisesti puutiaisia. Lisäksi taudinaiheuttajien oletetaan käyttäytyvän samalla tavalla puutiais- ja taigapunkkipopulaatioissa, joten lajilla ei liene suurta merkitystä laimenemisvaikutusta tutkiessa.

Ennen tautianalyysia, jäätyneet puutiaisnäytteet hajotettiin ja niistä eristettiin DNA ja RNA. Tämän tutkimuksen tautianalyysiin käytettiin vain DNA-näytteitä, mutta kaikille puutiaisnäytteille tehtiin myös rutiininomaisesti RNA-eristys mahdollisia muita tutkimuksia varten.

Näytteiden hajotusta ja DNA-eristystä varten kuhunkin, yhden puutiaisyksilön sisältävään 1,5 ml Eppendorf-putkeen lisättiin 3 mm kokoinen metallikuula ja pipetoitiin 300 µl hajotusliuosta. Hajotus suoritettiin TissueLyserilla (TissueLyser II, QIAGEN) nopeudella 30 1/s, kahdessa 30 sekunnin osiossa. Osioden välissä adapterit käännettiin, jotta hajotus tapahtuisi tasaisesti kaikissa näyteputkissa. Hajotuksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin ja siirrettiin yksittäisputkista 96-kuoppalevyille (MN Square-well block).

DNA-eristys tehtiin NucleoSpin® RNA-kitillä ja DNA:n eristämisen mahdollistavalla DNA buffer -kitillä, kittien protokollia noudattaen (Macherey-Nagel, Saksa). Eristys suoritettiin QIAcube HT -robotilla ja samannimisellä ohjelmistolla. Huomiona kuitenkin, että eristysohjelman aikana tapahtuneesta virheestä johtuen toisen näytelevyn DNA Elute -liuos pipetoitiin näytteisiin käsin ja ajettiin filterin läpi sentrifugilla. Eristyksen jälkeen DNA-näytelevystä pipetoitiin 50 µl jokaista näytettä toiselle 96-levylle taudinaiheuttaja-analyysien tekemistä varten, minkä jälkeen alkuperäinen levy säilöttiin -20°C pakastimeen. DNA-eristyksen onnistumisen varmistamiseksi näytteiden DNA-konsentraatio mitattiin NanoDrop mikrolitraspektrofotometrin avulla. Kustakin näytelevystä mitattiin sarakkeiden 1, 6, 7 ja 12 näytteiden DNA-pitoisuudet. Mittaus suoritettiin näytteille kahteen kertaan ja saaduista arvoista laskettiin keskiarvo. Jatkomäärittysten välillä eristettyjä DNA-näytteitä säilytettiin -20°C pakastimessa.

Tutkimuksen tautianalyysit tehtiin kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla (qPCR). Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio toimii kuten normaali polymeerasiketjureaktio (PCR), mutta siinä monistuvan DNA:n määrää voidaan mitata reaaliaikaisesti fluoresoivilla merkkiaineilla, suunnitteleamalla monistetun DNA-alueen sisään sitoutuva, merkkiaineella varustettu koetin. Sitoutuessaan DNA-pätkään, koettimeen kiinnitetty merkkiaine alkaa fluoresoida. Kun kohteena olevan DNA-pätkän määrät alkavat nopeasti kasvaa polymeerasiketjureaktion edetessä, myös yhä useampi koetin löytää sitoutumispaikan ja näytteestä mitattava fluoresenssi kasvaa. Usein kohde-DNA:n määrä kasvaa niin suureksi, että käytännössä kaikki koettimet löytävät kohteensa – tästä muodostuu hyvälle qPCR-reaktiolle tyypillinen ulkonäkö, jossa n. 20–35 syklin jälkeen alkaa eksponentiaalisen kasvun vaihe fluoresenssissa, joka päättyy tasaisen korkeaan fluoresenssitasoon viimeisten syklien ajaksi (ns. ”plateau”). Käyttämällä eri aallonpituuksilla fluoresoivia merkkiaineita koettimissa, voidaan tutkia samanaikaisesti useamman kohteen esiintymistä näytteissä (ns. multiplexing). Koska qPCR:n monistamia geenialueita ei tarvitse erikseen sekvensoida, voidaan alukkeet suunnitella monistamaan lyhyempää DNA-pätkää kuin perinteisessä PCR:ssä, parantaen menetelmän tarkkuutta. Tässä tutkimuksessa kullekin taudinaiheuttajalle käytetyt alukkeet, koettimet ja merkkiaineet 5’ päästä 3’ päähän kirjoitettuna löytyivät alla olevasta taulukosta (Taulukko 1).

*Taulukko 1 Taudinaiheuttajien seulontaan käytetyt alukkeet.*

Taudinaiheuttaja	Aluke/ koetin	Geenialue	5' → 3'	Lähde
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Forward	<i>Msp2</i>	ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT	(Courtney ym., 2004)
	Reverse		TTGGTCTGAAGCGCTCGTA	
	Koetin		CY5-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-BBQ650	
<i>Babesia</i> spp.	Forward	18S rRNA	CAG CTT GAC GGT AGG GTA TTG G	(Radzijevska ym., 2008)
	Reverse		TCG AAC CCT AAT TCC CCG TTA	
	Koetin		HEX-CGAGGCAGCAACGG-BHQ1	
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	Forward	23S rRNA	CGAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT	(Courtney ym., 2004)
	Reverse		GCTTCAGCCTGGCCATAAATAG	
	Koetin		FAM-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGTG-BHQ1	

Jokaiselta näytelevyltä tutkittiin samanaikaisesti kaikkia kolmea taudinaiheuttajaa. Analysoitavan näytelevyn valmistus aloitettiin pipetoimalla 348-näytelevyn kuoppiin 7 µl

PCR-reaktioseosta, joka sisälsi MQ-veden (1 µl) ja SensiFAST Lo-Rox -reagenssin (4 µl) lisäksi tutkittavien taudinaiheuttajien alukkeet ja koettimet. Taudinaiheuttajien alukkeiden määrät (5 µM konsentraatio) olivat seuraavat: borrelia 0,32 µl, babesia 0,64 µl ja anaplasma 0,64 µl. Koettimien määrät (10 µM konsentraatio) vastaavasti olivat: borrelia 0,08 µl, babesia 0,16 µl ja anaplasma 0,16 µl. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 1 µl DNA-näytettä, jolloin näytteen reaktiivilavuus oli 8 µl (Taulukko 2).

*Taulukko 2. PCR-reaktioseoksen reagenssit ja niiden määrät yhtä näytettä kohden.*

<b>Reagenssi</b>	<b>µl</b>
MQ-H2O	1
SensiFAST Lo-Rox (2X)	4
Bb F+R MIX (5 µM)	0,32
Babe F+R MIX (5 µM)	0,64
Ana F+R MIX (5 µM)	0,64
Bb Probe (10 µM)	0,08
Babe Probe (10 µM)	0,16
Ana Probe (10 µM)	0,16
DNA	1,0
<b>Kokonaismäärä</b>	<b>8</b>

Kutakin tutkimuksen DNA-näytettä pipetoitiin kahteen vierekkäiseen kuoppaan tulosten varmentamiseksi. Tulosten luotettavuuden arviointia varten kullekin tutkittavalle 384-näytelevylle lisättiin kaksi puhdasta vesinäytettä negatiivisiksi kontrolleiksi, ilmaisemaan mahdolliset reagenssikontaminaatiot. Lisäksi näytelevyille lisättiin positiivisiksi kontrolleiksi näytteet, jotka oli aikaisemmin todettu positiiviseksi tutkituille taudinaiheuttajalle. Positiivisten kontrollien tarkoituksena on vahvistaa qPCR-ajon onnistuminen ja ilmaista mahdolliset virheet reaktioasetelmassa.

Valmiin näytelevyn ajamisesta vastasi Turun biotekniikan tutkimuskeskuksen (BTK) Taqman-palvelu, joka käyttää analyyseissaan QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System -järjestelmää (Thermo Fisher Scientific). Tautianalyyseissä käytetty lämpösykli-profiili oli seuraavanlainen: ensin alkudenaturaatio, jossa näytteen lämpötila kohotetaan 95°C:seen 5:00 minuutin ajaksi. Alkudenaturaation jälkeen seuraa 50 syklin sarja, jossa toistuvat vuoron perään denaturaatiovaihe (vaihe 1) (95°C lämpötila 00:10 minuutin ajan)

sekä yhdistetty alukkeiden kiinnittymisen ja monistumisen vaihe (vaihe 2) (60°C 00:30 minuutin ajan) (Taulukko 3).

*Taulukko 3 Tutkimuksessa käytetty qPCR ajo-ohjelma.*

	<b>Lämpötila</b>	<b>Aika</b>	<b>Vaihe</b>
aloitus:	95°C	05:00	alkudenaturaatio
syklit (50):	95°C	00:10	denaturaatio
	60°C	00:30	alukkeiden kiinnittymisen ja monistuminen
kokonaisaika		0:38:30	
ajoaika		30 min	

## 2.5 Tilastanalyysit

Tilastanalyysit tehtiin SAS Enterprise Guide 8.3 -käyttöliittymällä. Koska monet aineiston muuttujista olivat luokkamuuttujia, käytin analysointiin yleistettyjä lineaarisia sekamalleja (Generalized Linear Mixed Models), joita käsiteltiin GLIMMIX-proseduurilla. Tutkimuksen selitettävät muuttujat (puutiaisten määrä ja jätösten määrä) ovat lukumääräaineistoa, jotka saavat arvoja nolla tai nollaa suurempia positiivisia kokonaislukuja. Aineisto sisältää huomattavan määrän nollihavaintoja, koska suurimmalla osalla lakananvedoista ei havaittu puutiaisia tai jätöksiä. Aineistot noudattavat siten parhaiten negatiivista binomijakaumaa. Linkkifunktiona käytin log-linkkiä, joka tekee aineistolle logaritmuunnoksen analysointia varten. Tulosten tarkasteluun muunsin linkkifunktion vaikutuksen takaisin ilink-optiolla.

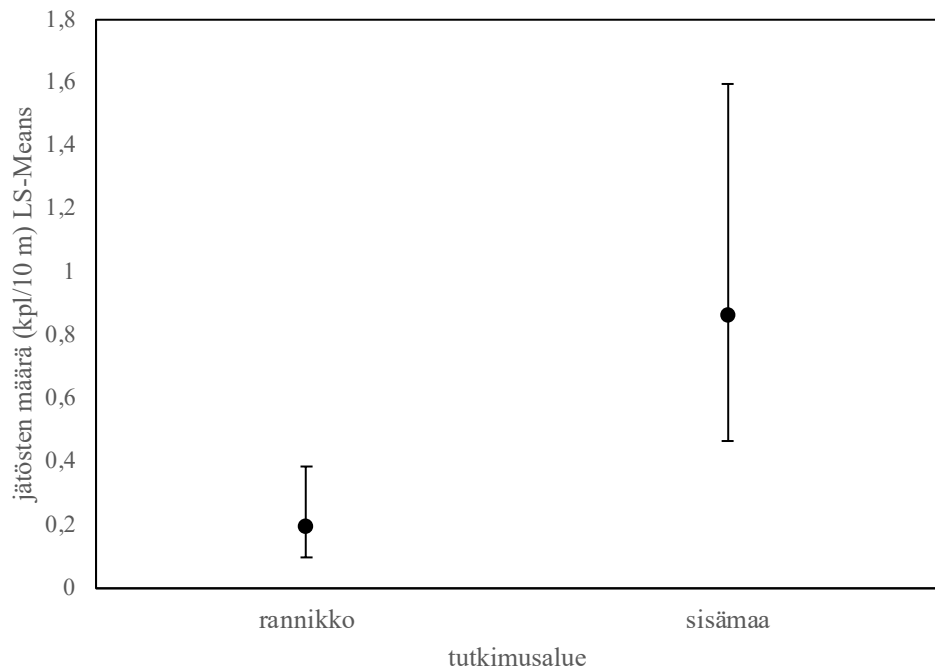
Puutiaisanalyyseissä selitettävänä muuttujana toimi puutiaisten määrä (kpl/10 m<sup>2</sup>) ja selittävinä muuttujina jätösten määrä (kpl/10 m) sekä luokkamuuttujat käsittely (ruokinta/kontrolli), ajankohta (alkukesä/loppukesä), sijainti (sisämaa/rannikko) ja sijainnin

ja käsittelyn yhdysvaikutus. Jätösanalyseissä selitettävän muuttujana toimi jätösten määrä (kpl/10 m) ja selittävinä muuttujina luokkamuuttujat käsittely (ruokinta/kontrolli), ajankohta (alkukesä/loppukesä), sijainti (sisämaa/rannikko) ja sijainnin ja käsittelyn yhdysvaikutus. Tutkimuspaikka toimi kaikissa malleissa satunnaismuuttujana.

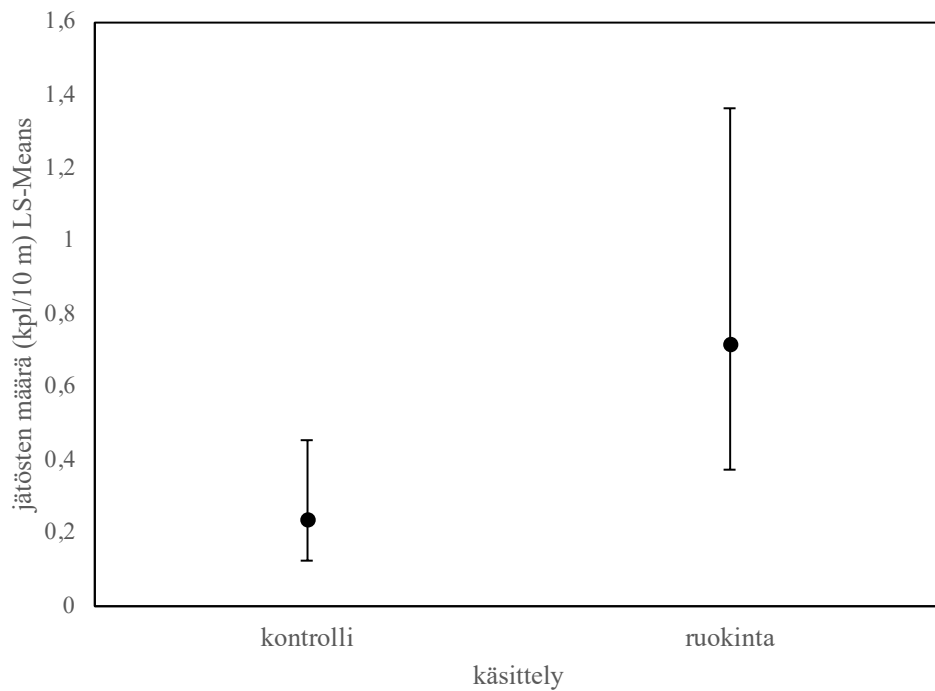
Analysoitu puutiaisaineisto sisältää ainoastaan havaitut aikuiset ja nymfit. Toukkahavainnot ei sisällytetty tilastoanalyysiin, koska toukkia havaittiin ainoastaan muutamana isona ryppäänä. Yksittäiset suuret toukkahavainnot aineistossa aiheuttaisivat vääristymää tuloksiin, minkä takia ne jätettiin pois aineiston analysoinnista. Tilastoanalyysien SAS-mallikoodi löytyy tutkielman liitteenä (Liite 3).

### 3. Tulokset

Peurojen ja kauriiden jätösten määrissä havaittiin eroja sisämaan ja rannikon tutkimuspaikkojen välillä (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 17,98}=11,55$ ,  $p=0,003$ ). Jätöksiä löytyi enemmän sisämaan tutkimuspaikoilta kuin rannikon tutkimuspaikoilta (Kuva 4), mutta jätösten määrissä oli suurta vaihtelua tutkimuspaikkojen välillä. Jätösten määrissä oli myös merkittäviä eroja ruokintapaikkojen ja kontrollipaikkojen välillä (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 17,98}=6,38$ ,  $p=0,021$ ). Jätöksiä löytyi enemmän ruokintapaikoilta kuin kontrollipaikoilta (Kuva 5). Sijainnin (rannikko/sisämaa) ja käsittelyn (ruokinta/kontrolli) yhteisvaikutuksella ei ollut merkittävää vaikutusta jätösten määrään (GLMM,  $n=2275$ ,  $F_{1, 17,98}=0,00$ ,  $p=0,951$ ).



Kuva 4. Peurojen ja kauriiden jätösten määrä rannikon ja sisämaan tutkimuspaikoilla. Jätösten määrissä oli alueiden välillä tilastollisesti merkitsevä ero ( $p=0,003$ ). Jätöksiä löytyi enemmän sisämaan tutkimuspaikoilta kuin rannikon tutkimuspaikoilta.

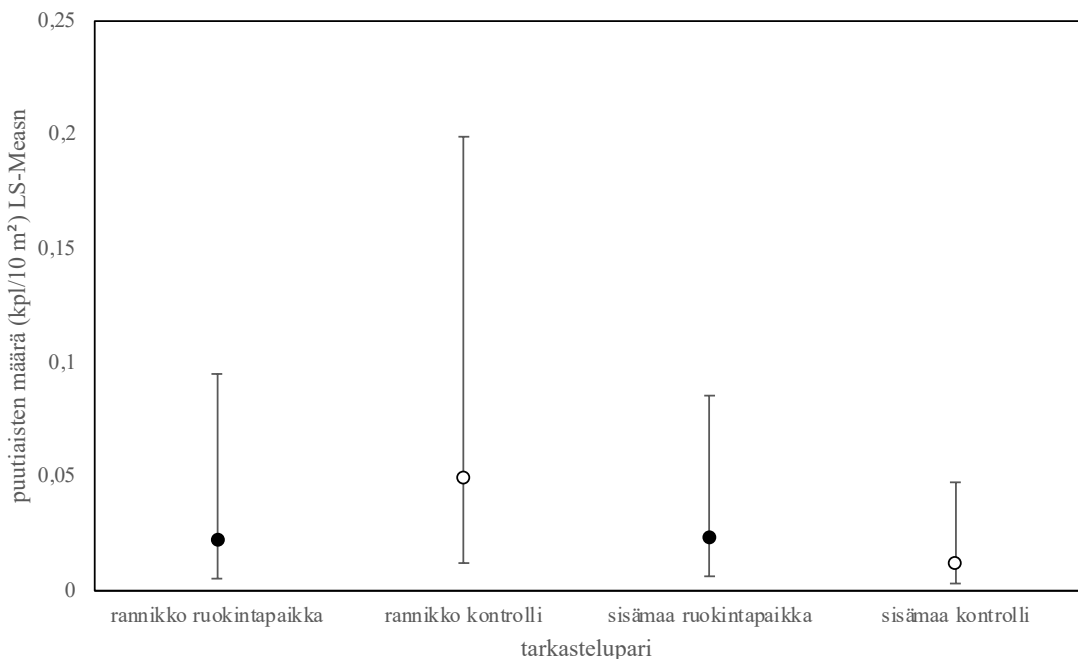


Kuva 5. Peurojen ja kauriiden jätösten määrä kontrolli- ja riistaruoointapaikoilla. Jätösten määrissä oli ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevä ero ( $p=0,021$ ). Jätöksiä löytyi enemmän ruokintapaikoilta kuin kontrollipaikoilta.



Peurojen ja kauriiden jätösten määrät ( $n=1958$ ) eivät eronneet alku- ja loppukesän keräyskertojen välillä (GLMM,  $n=2275$ ,  $F_{1, 1696}=1,03$ ,  $p=0,311$ ). Myöskään puutiaisten määrät ( $n=110$ ) eivät eronneet keräyskertojen välillä (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 945,8}=0,41$ ,  $p=0,522$ ).

Löytyneistä puutiaisista ( $n=110$ ) rannikon tutkimuspaikoilta löytyi 79 yksilöä ja sisämaan tutkimuspaikoilta 31 yksilöä. Puutiaisten määrät rannikon ja sisämaan tutkimuspaikkojen välillä eivät kuitenkaan eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 16,52}=1,07$ ,  $p=0,316$ ), luultavasti pienten kokonaismäärien ja suurten nollihavaintomäärien seurauksena. Puutiaisten määrät eivät myöskään eronneet merkittävästi kontrollipaikkojen ( $n=64$ ) ja ruokintapaikkojen ( $n=46$ ) välillä (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 16,32}=0,01$ ,  $p=0,922$ ). Lisäksi tarkastelin sijainnin (rannikko/sisämaa) ja käsittelyn (ruokinta/kontrolli) yhteisvaikutusta puutiaisten määrään. Sijainnin ja käsittelyn yhteisvaikutuksella puutiaisten määrään ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta puutiaisten määrään (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 16,08}=1,29$ ,  $p=0,273$ ) (Kuva 6).



Kuva 6. Sijainnin (rannikko tai sisämaa) ja käsittelyn (kontrolli tai riistaruoikinta) yhteisvaikutus puutiaisten määrään. Sijainnin ja käsittelyn yhteisvaikutuksella puutiaisten määrään ei ollut tilastollista merkitsevyyttä ( $p=0,273$ ). Rannikon ja sisämaan ruokintapaikat on esitetty mustilla palloilla ja kontrollipaikat valkoisilla palloilla.

Peurojen/ kauriiden jätösten määrän ja puutiaisten määrän väliltä ei löytynyt merkittävää yhteyttä (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 2250}=1,44$ ,  $p=0,230$ ). Kuitenkin mallin ennuste antaa pienen positiivisen kulmakertoimen jätösten määrän ja puutiaisten määrän välille. Jätösten määrän kasvaessa, myös puutiaisten määrä kasvaa hieman. Ennusteen p-arvo jäi kuitenkin verrattain suureksi (GLMM,  $n=2257$ ,  $F_{1, 2255}=1,03$ ,  $p=0,310$ ), joten tämän aineiston perusteella jätösten määrällä ei voida selittää puutiaisten määrää.

Kerätyistä puutiaisista ( $n=110$ ) vain kahdeksan yksilön havaittiin kantavan jotain tutkittua taudinaiheuttajaa (Taulukko 4). Ruokintapaikoilta kerätyissä puutiaisissa ( $n=68$ ) kahden [ $2.9 \pm 4\%$  (95 % luottamusväli)] yksilön havaittiin kantavan *Borrela burgdorferi* s.l.-ryhmän bakteereita ja yhden ( $1.5 \pm 2.9\%$ ) yksilön *Babesia*-suvun alkueläimiä. Kontrollipaikoilta kerätyissä puutiaisissa ( $n=42$ ) neljän ( $9.5 \pm 8.9\%$ ) yksilön havaittiin kantavan *Borrelia*-bakteereja ja yhden ( $2.5 \pm 4.6\%$ ) yksilön *Anaplasma phagocytophilum* -bakteeria. Anaplasmaa ei havaittu ruokintapaikoilta kerätyistä puutiaisista, eikä babesiaa havaittu kontrollipaikoilta kerätyistä puutiaisista. Yksikään tutkituista yksilöistä ei kantanut useampaa tutkittua taudinaiheuttajaa.

Taulukko 4. Tutkituille taudinaiheuttajalle positiiviset nymfit ja aikuiset yksilöt (suluissa esiintyvyyys alueen puutiaisissa 95 % luottamusväleinen).

	<i>Borrela burgdorferi</i> s.l.	<i>Babesia</i> spp.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
ruokintapaikat	2 ( $2,9 \pm 4\%$ )	1 ( $1,5 \pm 2,9\%$ )	
kontrollipaikat	4 ( $9,5 \pm 8,9\%$ )		1 ( $2,5 \pm 4,6\%$ )

## 4. Tulosten tarkastelu

### 4.1. Peurojen ja kauriiden tiheyden vaikutus puutiaisten määrään

Tutkielmani hypoteesi oli, että alueilla, joilla esiintyy runsaasti peuroja ja/tai kauriita myös puutiaisten määrä on runsaampi kuin alueilla, joilla peuroja ja/tai kauriita esiintyy vähemmän. Tässä tutkimuksessa havaitsin, että peurojen ja kauriiden jätöksiä löytyi

enemmän sisämaan tutkimuspaikoilta kuin rannikon tutkimuspaikoilta. Havaintoani tukevat myös aikaisemmat riistaeläintilastot, joiden mukaan valkohäntäpeurojen tiheys on korkeampi sisämaan tutkimuspaikkojemme kohdalla kuin rannikon tuntumassa (Aikio & Pusenius, 2022). Joskin tilastojen mukaan metsäkauriita on paikoitellen runsaammin rannikolla (Suomen riistakeskus, 2021).

Vaikka peuroja/ kauriita esiintyi sisämaassa runsaasti, ei puutiaismäärissä havaittu eroa sisämaan ja rannikon välillä. Saatu tulos ei näin ollen tue hypoteesiani. Aikaisempien tutkimusten mukaan puutiaisten määrän on havaittu itseasiassa olevan korkeampi rannikolla ja isojen vesistöjen läheisyydessä kuin sisämaassa (Laaksonen ym., 2017; Sormunen ym., 2020), jossa peurojen ja kauriin tiheys on korkeampi.

Yleisesti rannikolla ja vesistöjen läheisyydessä ilmankosteus on suurempi kuin sisämaassa. Puutiaisilla on suhteellisen kapea ilmankosteuden- ja lämpötilan sietokyky, minkä takia puutiaisia esiintyy enemmän rannikoiden ja vesistöjen läheisyydessä. Lisäksi osalla sisämaan tutkimuspaikoista pohjakasvillisuus oli kuivempaa ja karumpaa rannikon tutkimuspaikkojen pohjakasvillisuuteen verrattuna. Kesän 2021 haastavat sääolosuhteet selittävät osaltaan myös tutkimuksen matalaa puutiaismäärää. Alkukesän tutkimusjakson aikana lämpötila oli pitkiä jaksoja verrattain korkea, millä oli todennäköisesti vaikutusta puutiaisten aktiivisuuteen. Kesäkuun keskilämpötila Turun havaintoasemalla oli 18,6°C (poikkeama vuosien 1991-2020 keskiarvosta +3,9°C) (Ilmatieteenlaitos, 2022), ja päiväsaikaan lämpötila kohosi useana päivänä yli 25°C. Toteutuneiden keruupäivien alin lämpötila oli 17°C ja ylin lämpötila oli 26°C. Kuumalla, kuivalla ja tuulisella säällä puutiaiset eivät kapua kasvien varsille väijymään vaan laskeutuvat alas kasvien lehdiltä ja varsilta, ja kaivautuvat kostean karikkeen sekaan, maaperään tai kivien koloon. Vastaavasti loppukesän tutkimusjakson sää oli sateinen, mikä hankaloitti puutiaisten keruuta. Elokuun sadanta Turun havaintoasemalla oli 138,8 mm (poikkeama vuosien 1991–2020 keskiarvosta 188 %) (Ilmatieteenlaitos, 2022). Sateen aikana ja maan ollessa märkä tutkimuslana kastuu, jolloin puutiaiset eivät enää tahdo tarttua siihen, vaikka olisivatkin aktiivisia.

Ruokinta- ja kontrollipaikkojen keskinäinen tarkastelu ei myöskään tukenut tutkielmani hypoteesia. Peurojen ja kauriiden jätöksiä löytyi enemmän ruokintapaikoilta kuin kontrollipaikoilta, mutta puutiaismäärissä ei ollut havaittavaa vastaavaa eroa ruokinta- ja kontrollipaikkojen välillä. Myöskään sijainnin (rannikko/sisämaa) ja käsittelyn (ruokinta/kontrolli) yhteisvaikutuksella ei ollut vaikutusta puutiaisten määrään.

Ruokintapaikkojen puutiaisten määrään saattaa osaltaan vaikuttaa epäsuotuisat ympäristöolosuhteet. Monet ruokintapaikat sijaitsivat keskellä peltoa, jolloin iso osa ruokintapaikkojen tutkimuspinta-alasta oli peltohabitaattia. Avonainen pelto ei välttämättä ole puutiaisille suotuisin elinympäristö, sillä pintakasvillisuutta saattaa olla hyvin vähän ja kesäisin pellolla lämpötila saattaa nousta korkealle myös lähellä maanpintaa. Myös ilmankosteus voi olla suhteellisen alhainen avonaisella peltohabitaatilla, jossa kosteus pääsee helposti haihtumaan auringon lämmön sekä tuulen vaikutuksesta. Elinkierrosta johdettujen puutiaiset ovat riippuvaisia elinympäristönsä kosteudesta, koska tarvitsemansa veden ne saavat veriaterioinnista ja absorboimalla vettä kosteasta ilmasta.

Kolmas analyysi ei myöskään tukenut tutkimukseni hypoteesia. Tulosten mukaan pelkäämään peurojen ja kauriiden tiheydellä ei voida selittää eroja puutiaisten määrissä tutkimuspaikoilla. Saatujen tulosten perusteella vaikuttaisi siltä, että talvikauteen sijoittuvalla peurojen ja kauriiden ruokinnalla ei ole yksinään vaikutusta kesän puutiaisten määrään riistaruokintapaikkojen läheisyydessä. Vaikka peuroja ja kauriita ovat puutiaisille tärkeinä isäntäeläiminä, muut ympäristötekijät ja isäntäeläimet ovat myös tärkeitä tekijöitä puutiaisten runsastumisen kannalta.

Tutkimuksemme havaittujen puutiaisten määrät olivat suhteellisen alhaiset kaikilla tutkimuspaikoilla, mikä osaltaan vaikeutti tilastollisesti merkitsevien tulosten saamista puutiaisten esiintyvyyden osalta. Puutiaisten määrät vaihtelivat tutkimuspaikkojen välillä, ja osalta tutkimuspaikoista ei havaittu yhtäkään puutiaista kumpanakaan tutkimusajanjaksona. Tutkimuksemme kuitenkin viittaisi siihen, että korkeat peura- ja kauristiheydet eivät yksin pysty selittämään runsasta puutiaismäärää. Ajatusta tukee myös Sormusen ym. (2016b) tutkimus, jossa puutiaisia ei löytynyt lainkaan vuoden 2014 keräyksessä Alastalon, Matkun, Mellilän, Marttilan ja Paimion tutkimusalueilta, vaikka alueilla esiintyy riistaeläintilastojen mukaan runsaasti pieniä hirvieläimiä (Aikio & Pusenius, 2022; Sormunen ym., 2016b; Suomen riistakeskus, 2021).

## 4.2. Taudinaiheuttajien esiintyvyys

Tutkimukseni hypoteesi taudinaiheuttajien suhteen oli, että suurella peura- ja kauristiheydellä on vaikutusta tutkittujen taudinaiheuttajien määrään puutiaisissa. Erityisesti, koska

taudinaiheuttajille positiivisten yksilöiden määrä jäi tutkimuksessa verrattain alhaiseksi, ei saatujen tulosten perusteella voida täten tehdä laajempia johtopäätöksiä. Huomionarvoisia ovat kuitenkin tutkimuksen matalat puutiaistiheydet ja *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereiden matala esiintyvyys puutiaisissa. Matalien puutiaistiheyksien ja näytteiden odotettua pienemmän *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereiden kantavuuden seurauksena *p*-arvot jäivät pieniksi ja luottamusvälit kasvoivat isoiksi, mikä hankaloittaa vertailua aikaisempiin tutkimuksiin.

Taudinaiheuttaja-analyysien tuloksia tarkastellessa voimme kuitenkin todeta, että yleisin tutkimuksessa havaittu taudinaiheuttaja oli *B. burgdorferi* s.l., jolle kaikista analysoiduista puutiaisista positiivisia oli kuusi (5 %  $\pm$  4,2 %). Huomiota herättävää on, että kyseisen taudinaiheuttajaryhmän esiintyvyys on suhteellisen alhainen verrattuna aikaisempiin Varsinais-Suomessa ja Saaristomerellä tehtyihin tutkimuksiin, joissa infektoituneiden nymfien osuus on ollut lähes poikkeuksetta yli 15 % ja aikuisten yli 20 % tutkituista puutiaisista (Klemola ym., 2019; Sormunen ym., 2016a, 2016b). Myös muualla Suomessa tehdyissä tutkimuksissa *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereita kantavien puutiaisten osuus on ollut korkeampi. Muun muassa Sormunen ym. (2020) havaitsivat, että eripuolilta Suomea kerätyistä aikuisista 48,9  $\pm$  8,4 % ja nymfeistä 25.3  $\pm$  4,4 % kantoivat *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereita (Sormunen ym., 2020). *Babesia* spp. ja *Anaplasma phagocytophilum* -taudinaiheuttajien suhteelliset määrät ovat aikaisemmissä tutkimuksissa olleet *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereiden määriä selvästi alhaisemmat (Sormunen ym., 2018, 2020), joten niiden osalta tutkimukseni tulokset ovat linjassa aikaisempien tulosten kanssa.

Puutiaiset tarvitsevat kosteuden säilyttäviä suojapaikkoja elinalueillaan, joita saattaa olla vähemmän tarjolla yleisesti metsiköitä yksipuolisemmissä maatalousympäristöissä, ja etenkin avopelloilla. Puutiaistiheydet ja taudinaiheuttajia kantavien yksilöiden määrät jäivät kuitenkin mataliksi myös metsäisillä kontrollialueilla, joilla sopivia suojapaikkoja on yleisemmin tarjolla. Suojapaikkojen puuttumisen sijaan onkin mahdollista, että tutkimuspaikoilla on rajallisesti tarjolla puutiaisten kannalta tärkeitä pieniä isäntäeläimiä, kuten jyrsijöitä ja pikkulintuja. Isommat isäntäeläimet, kuten hirvieläimet, ovat hyviä veriateorian lähteitä aikuisille ja nymfeille, mutta koska toukat ja nymfit saalistavat isäntiä kasvien alaosilla, suosivat ne pienempiä isäntäeläimiä, kuten juuri jyrsijöitä.

Jyrsijät ja linnut ovat pääasiallisia isäntiä *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereille, jolloin näiden isäntien vähäinen määrä alueella luultavasti näkyisi paitsi matalina puutiaismäärinä, myös matalina *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteerien määrinä. Tämän ohella hirvieläinten laimentava vaikutus saattaa osaltaan vielä vähentää *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteerien esiintyvyyttä alueella. Koska analysoitujen ja taudinaiheuttajille positiivisten puutiaisten määrä jäi tässä tutkimuksessa verrattain alhaiseksi laajempia johtopäätöksiä varten, tarvitaan lisää tutkimusta aiheesta, jotta voidaan arvioida, missä määrin hirvieläinten runsas esiintyminen alueella selittää puutiaisten kantamien taudinaiheuttajien määrää. Lisäksi jyrsijöiden ja lintujen määrien arvioinneilla voitaisiin arvioida, ovatko näiden isäntäeläinryhmien matalat määrät mahdollisesti matalien puutiaistiheyksien ja vähäisen *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteerien esiintymisen taustalla.

### 4.3. Riistaruokintapaikkojen houkuttelevuus

Olimme lisäksi kiinnostuneita, houkuttelevatko riistaruokintapaikat peuroja ja kauriita alueelle myös kesäisin, sillä riistaruokinta keskittyy pääasiassa syksyyn ja alkutalveen. Aikaisempia tutkimuksia aiheesta ei ole, joten olimme kiinnostuneita, miten hyvin ruokintapaikat edustavat alueita, joilla peurojen ja kauriiden tiheys oletetaan olevan muuta aluetta korkeampi.

Tässä tutkimuksessa havaitsin, että peurojen ja kauriiden jätöksiä esiintyy enemmän ruokintapaikoilla kuin kontrollipaikoilla. Keräysten ajankohtien (alkukesä ja loppukesä) välillä ei ollut eroa jätösten määrässä. Tulosten perusteella voimme siis todeta, että ruokintapaikat houkuttelevat peuroja ja kauriita lähialueelle myös varsinaisen ruokintakauden ulkopuolella. Koska kaikki havaitut jätöskasat laskettiin, eikä jätösten ikää määritely (tuore–vanha), voi kuitenkin olla, että osa havaituista jätöskasoista on talven ajalta peräisin, mikä saattaa osaltaan vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin. Näin ollen on mahdollista, että todellisuudessa kesällä peurojen/kauriiden tiheuserot ovat havaittua pienemmät.

Aktiivinen, samassa paikassa vuosittain toistuvat ruokinta näyttäisi houkuttelevan peuroja ja kauriita jäämään ruokintapaikkojen läheisyyteen. Täten ruokintapaikkojen voidaan nähdä edustavat hyvin alueita, joissa peurojen/ kauriiden tiheyden oletetaan olevan korkea. Huomiona vielä, että vaikka kaikki kontrollipaikat sijaitsivat suhteellisen lähellä

ruokintapaikkoja – enintään kolmen kilometrin päässä ja vähintään kilometrin päässä ruokintapaikasta – tiheysero ruokintapaikkojen ja kontrollipaikkojen välillä oli merkittävä.

## 5. Yhteenveto

Puutiaiset ja niiden levittämät taudit ovat viime vuosina yleistyneet Suomessa. Elinkierrosta johtuen puutiaiset ovat riippuvaisia elinympäristönsä kosteudesta ja isäntäeläinten tiheydestä. Puutiaiset ovat suhteellisen generalisteja isäntäeläimiensä suhteen, mutta tärkeiden isäntäeläinten, kuten hirvieläinten ja jyrsojen, populaatiotiheydellä on esitetty olevan vaikutusta puutiaisten populaatiodynamiikkaan. Hirvieläimet toimivat tärkeinä veriaterian lähteinä varsinkin aikuisille puutiaisille ja nymfeille, minkä takia hirvieläinten suuri tiheys voi nostaa puutiaisten määrää alueella. Hirvieläimet ovat kuitenkin epäkelpoja väli-isäntiä *Borrelia burgdorferi* sensu lato -ryhmän bakteereille, ja onkin esitetty, että hirvieläimet voisivat vähentää taudin esiintyvyyttä puutiaispopulaatiossa toimimalla niin kutsuttuna laimennusisäntänä.

Tässä Pro Gradu -tutkielmassa tarkastelin, onko valkohäntäpeurojen (*Odocoileus virginianus*) ja metsäkauriiden (*Capreolus capreolus*) tiheydellä vaikutusta puutiaisten (*Ixodes ricinus*) määrään ja puutiaisten kantamiin taudinaiheuttajiin riistarukintapaikoilla ja niiden lähellä sijaitsevilla kontrollialueilla. Tutkimukseni mukaan peurojen ja kauriiden tiheys ei yksin vaikuta puutiaisten määrään tutkimuspaikoilla. Huomiota herättävää on se, että peurojen ja kauriiden korkeasta tiheydestä huolimatta puutiaismäärät jäivät hyvin mataliksi. Peurojen ja kauriiden jätösten määrät olivat korkeampia riistarukintapaikkojen kuin kontrollipaikkojen läheisyydessä, kuten myös sisämaassa rannikkoalueisiin verrattuna. Tulosten perusteella ruokintapaikat näyttäisivät houkuttelevan peuroja ja kauriita lähialueelle myös varsinaisen ruokintakauden ulkopuolella. Koska osa havaituista jätöskasoista voi olla talven ajalta peräisin, on kuitenkin mahdollista, että todellisuudessa keksällä peurojen/kauriiden tiheyserot ovat havaittua pienemmät.

Vaikka hirvieläimet ovat tärkeitä puutiaisten isäntäeläimiä ja usein nähdään syypäinä korkeisiin puutiaismääriin, näyttäisi siltä, että niiden tiheys ei yksinomaan määritä alueen puutiaismäärää. Riistarukinnan harjoittaminen ei näin ollen vaikuta automaattisesti synnyttävän lähialueille korkeita puutiaistiheyksiä eikä kasvattavan metsästäjien ja muiden

alueella liikkuvien riskiä tulla puutiaisten loisimaksi, vaan ympäristöolojen tulee olla myös muuten puutiaisten kannalta suotuisat. Valkohäntäpeurat ja metsäkauriit toimivat hyvinä veriaterian lähteinä etenkin aikuisille puutiaisille, mutta myös puutiaisten toukkien ja nymfien täytyy löytää tarvitsemansa veriateriat alueelta. Jos pieniä isäntäeläimiä, kuten jyrtsijöitä ja pikkulintuja, on alueella vähän, toukat ja nymfit eivät löydä yhtä tehokkaasti isäntäeläintä. Näin ollen puutiaisten elinkierto pitenee ja kuolleisuus kasvaa. Toisaalta alueen kuivuus ja suojapaikkojen niukkuus voivat myös johtaa korkeaan toukkien ja nymfien kuolleisuuteen. Jos ympäristöolosuhteet ovat epäsuotuisat, eivät puutiaiset selviä, vaikka löytäisivätkin veriaterian. Tärkeää on kuitenkin muistaa, että hirvieläimet ovat tärkeitä veriaterian lähteitä aikuisille puutiaisille, joten valkohäntäpeurojen ja metsäkauriiden määrien kasvu voi kasvattaa puutiaismääriä alueilla, joilla olosuhteet ovat muutenkin puutiaisten elinkierrolle suotuisat. Hirvieläinten runsas esiintyminen alueella ei välttämättä kuitenkaan yksinään kasvata puutiaispopulaatiota, sillä jos nuorempien kehitysasteiden kuolleisuus on korkea, rajoittaa se populaation kasvua.

Tässä tutkimuksessa taudinaiheuttajille (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* ja *Babesia* spp.) positiivisten puutiaisten määrä oli suhteellisen alhainen verrattuna aikaisempiin tutkimuksiin. Varsinkin *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteerien esiintyvyys oli matalaa, mikä voisi viitata mataliin jyrtsijä- ja pikkulintukantoihin alueilla. Jyrtsijät ja linnut ovat pääasiallisia isäntiä *B. burgdorferi* s.l. -ryhmän bakteereille, jolloin näiden isäntien vähäinen määrä alueella luultavasti näkyisi paitsi matalina puutiaismäärinä, myös matalina borreliamäärinä. Hirvieläimet voivat myös osaltaan vähentää *B. burgdorferi* s. l. -ryhmän bakteereiden esiintyvyyttä, mutta tarvitsemme lisää tutkimusta selvittääksemme, missä määrin ne todellisuudessa toimivat laimennusisäntinä.

Puutiaisten tiedetään loisivan useilla eri isäntälajeilla, minkä takia yksittäisen isäntälajin vaikutusta alueen puutiaismäärään voi olla vaikea todeta. Tässä tutkimuksessa keskityin tarkastelemaan pelkästään peurojen ja kauriiden tiheyttä tutkimusalueilla, mutta kuten jo aikaisemmin totesin muiden isäntälajien, kuten esimerkiksi jyrtsijöiden, tiheyksillä on myös vaikutusta alueen puutiaisten määrään. Puutiaisten määrä ja niiden kantamien taudinaiheuttajien määrät tulevat todennäköisesti vielä jatkamaan kasvuaan tulevien vuosikymmenten aikana. Kasvua voi olla vaikea hillitä, mutta tarvitsemme lisää tutkimustietoa, jotta voimme arvioida ja ennustaa taudinaiheuttajien leviämistä ja yleistymistä sekä mahdollisesti pienentää tartuntariskiä.



## Kiitokset

Haluan kiittää Pro gradu -tutkielmani ohjaajia Jani Sormusta ja Otso Huitua kaikesta saamastani ohjauksesta, neuvoista, palautteesta ja kannustamisesta, jota olen saanut koko Pro gradu -työn aikana. Haluan kiittää myös Satu Mäkelää neuvoista ja opastuksesta laboratorioanalyyseissä, Niko Kulhaa paikkatietoanalyyseistä ja Tero Klemolaa avusta tilastoanalyyseissä. Iso kiitos myös kaikille Turun yliopiston henkilökuntaan kuuluville, jotka ovat auttaneet minua, milloin missäkin ongelmassani. Lisäksi haluan kiittää vielä perhettäni ja läheisiä, jotka ovat jaksaneet kannustaa minua koko opintojeni ja tutkielman teon ajan.

## Lähteet:

- Aikio, S., & Pusenius, J. (2022). Valkohäntäpeurakanta talvella 2021–2022: Arvio Suomen valko- häntäpeurakannan koosta ja rakenteesta sekä kuvaus kanta-arvion las- kentamenetelmistä. Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki 2022.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (1993). Epizootiology of Lyme disease-causing borre- liae. *Clinics in Dermatology*, 11(3), 339–351. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(93\)90088-T](https://doi.org/10.1016/0738-081X(93)90088-T)
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Bugmyrin, S. V., Bespyatova, L. A., Korotkov, Y. S., Burenkova, L. A., Belova, O. A., Roma- nova, L. I., Kozlovskaya, L. I., Karganova, G. G., & Ieshko, E. P. (2013). Distribu- tion of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* ticks in southern Karelia (Russia). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1–2), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.07.004>
- Cayol, C., Koskela, E., Mappes, T., Siukkola, A., & Kallio, E. R. (2017). Temporal dynamics of the tick *Ixodes ricinus* in northern Europe: Epidemiological implications. *Para- sites & Vectors*, 10(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2112-x>
- Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S., & Massung, R. F. (2004). Multiplex Real- Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3164–3168. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004>
- Cull, B., Pietzsch, M. E., Hansford, K. M., Gillingham, E. L., & Medlock, J. M. (2018). Sur- veillance of British ticks: An overview of species records, host associations, and

- new records of *Ixodes ricinus* distribution. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(3), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.011>
- Forchhammer, M. C., Stenseth, N. C., Post, E., & Landvatn, R. (1998). Population dynamics of Norwegian red deer: Density–dependence and climatic variation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1393), 341–350. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0301>
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2009/593232>
- Han, S., Lubelczyk, C., Hickling, G. J., Belperron, A. A., Bockenstedt, L. K., & Tsao, J. I. (2019). Corrigendum to “Vertical transmission rates of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes scapularis* collected from white-tailed deer” [*Ticks Tick-Borne Dis.* 10 (2019) 682–689]. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(5), 1173. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.003>
- Huapeng, C., Feng, L., Huai, W., Jianzhang, M., Xibo, J., Chunmei, L., & Kelan, X. (1997). Assessment of three methods for estimating abundance of ungulate populations. *Journal of Forestry Research*, 8(2), 111–114. <https://doi.org/10.1007/BF02864980>
- Härkönen, S., & Heikkilä, R. (1999). Use of pellet group counts in determining density and habitat use of moose *Alces alces* in Finland. *Wildlife Biology*, 5(4), 233–239. <https://doi.org/10.2981/wlb.1999.028>
- Ilmatieteenlaitos. (2022, kesäkuuta 20). Lämpötila- ja sadetilastoja vuodesta 1961. <https://www.ilmatieteenlaitos.fi/tilastoja-vuodesta-1961>
- Jaenson, Jaenson, D. G., Eisen, L., Petersson, E., & Lindgren, E. (2012). Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the

- past 30 years in Sweden. *Parasites & Vectors*, 5(1), 8.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-8>
- Jaenson, T. G. T., & Lindgren, E. (2011). The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(1), 44–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.006>
- Jaenson, T. G. T., & Tälleklint, L. (1996). Lyme Borreliosis Spirochetes in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) and the Varying Hare on Isolated Islands in the Baltic Sea. *Journal of Medical Entomology*, 33(3), 339–343.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.339>
- Jaenson, T. G. T., Tälleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J., & Mejlom, H. (1994). Geographical Distribution, Host Associations, and Vector Roles of Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *Journal of Medical Entomology*, 31(2), 240–256.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/31.2.240>
- Jaenson, T. G. T., Värnv, K., Fröjdman, I., Jääskeläinen, A., Rundgren, K., Versteirt, V., Estrada-Peña, A., Medlock, J. M., & Golovljova, I. (2016). First evidence of established populations of the taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae) in Sweden. *Parasites & Vectors*, 9(1), 377. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1658-3>
- Katargina, O., Geller, J., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., Lundkvist, Å., & Golovljova, I. (2011). Detection and Characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* Ticks in Estonia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 923–928.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0199>
- Kernif, T., Leulmi, H., Raoult, D., & Parola, P. (2016). Emerging Tick-Borne Bacterial Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0012-2016>

- Klemola, T., Sormunen, J. J., Mojzer, J., Mäkelä, S., & Vesterinen, E. J. (2019). High tick abundance and diversity of tick-borne pathogens in a Finnish city. *Urban Ecosystems*, 22(5), 817–826. <https://doi.org/10.1007/s11252-019-00854-w>
- Krawczyk, A. I., van Duijvendijk, G. L. A., Swart, A., Heylen, D., Jaarsma, R. I., Jacobs, F. H. H., Fonville, M., Sprong, H., & Takken, W. (2020). Effect of rodent density on tick and tick-borne pathogen populations: Consequences for infectious disease risk. *Parasites & Vectors*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3902-0>
- Laaksonen, M., Klemola, T., Feuth, E., Sormunen, J. J., Puisto, A., Mäkelä, S., Penttinen, R., Ruohomäki, K., Hänninen, J., Sääksjärvi, I. E., Vuorinen, I., Sprong, H., Hytönen, J., & Vesterinen, E. J. (2018). Tick-borne pathogens in Finland: Comparison of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* in sympatric and parapatric areas. *Parasites & Vectors*, 11(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3131-y>
- Laaksonen, M., Sajanti, E., Sormunen, J. J., Penttinen, R., Hänninen, J., Ruohomäki, K., Sääksjärvi, I., Vesterinen, E. J., Vuorinen, I., Hytönen, J., & Klemola, T. (2017). Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.17>
- Levi, T., Keesing, F., Holt, R. D., Barfield, M., & Ostfeld, R. S. (2016). Quantifying dilution and amplification in a community of hosts for tick-borne pathogens. *Ecological Applications*, 26(2), 484–498. <https://doi.org/10.1890/15-0122>
- Mierzejewska, E. J., Welc-Faleciak, R., Karbowski, G., Kowalec, M., Behnke, J. M., & Bajer, A. (2015). Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Experimental and Applied Acarology*, 66(1), 83–101. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9889-0>

- Namina, A., Caplīgina, V., Seleznova, M., Krūmins, R., Aleinikova, D., Kivrane, A., Akopjana, S., Lazovska, M., Berzina, I., & Ranka, R. (2019). Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 398. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2149-5>
- Needham, G. R., & Teel, P. D. (1991). *Off-Host Physiological Ecology of Ixodid Ticks*. 25.
- Nyrhilä, S., Sormunen, J. J., Mäkelä, S., Sippola, E., Vesterinen, E. J., & Klemola, T. (2020). One out of ten: Low sampling efficiency of cloth dragging challenges abundance estimates of questing ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 82(4), 571–585. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00564-5>
- Ogden, N. H., & Tsao, J. I. (2009). Biodiversity and Lyme disease: Dilution or amplification? *Epidemics*, 1(3), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2009.06.002>
- Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., & Rosef, O. (2008). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 218–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.01.008>
- Randolph, S. E. (2013). ECOLOGY OF NON-NIDICOLOUS TICKS. *D. E.*, 2, 36.
- Randolph, S. E., & Dobson, A. D. M. (2012). Pangloss revisited: A critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology*, 139(7), 847–863. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000200>
- Salomon, J., Hamer, S. A., & Swei, A. (2020). A Beginner's Guide to Collecting Questing Hard Ticks (Acari: Ixodidae): A Standardized Tick Dragging Protocol. *Journal of Insect Science*, 20(6), 11. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa073>
- Schulz, M., Mahling, M., & Pfister, K. (2014). Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011.

Journal of Vector Ecology, 39(1), 56–65. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x>

Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (2013). Biology of ticks. [http://lib-proxy.uwyo.edu/login/?url=http://www.CA.eblib.com/EBLWeb/patron/?target=patron&extendedid=P\\_1538390\\_0](http://lib-proxy.uwyo.edu/login/?url=http://www.CA.eblib.com/EBLWeb/patron/?target=patron&extendedid=P_1538390_0)

Sormunen, J. J., Andersson, T., Aspi, J., Bäck, J., Cederberg, T., Haavisto, N., Halonen, H., Hänninen, J., Inkinen, J., Kulha, N., Laaksonen, M., Loehr, J., Mäkelä, S., Mäkinen, K., Norkko, J., Paavola, R., Pajala, P., Petäjä, T., Puisto, A., ... Klemola, T. (2020). Monitoring of ticks and tick-borne pathogens through a nationwide research station network in Finland. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5), 101449. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101449>

Sormunen, J. J., Klemola, T., Hänninen, J., Mäkelä, S., Vuorinen, I., Penttinen, R., Sääksjärvi, I. E., & Vesterinen, E. J. (2018). The importance of study duration and spatial scale in pathogen detection—Evidence from a tick-infested island. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0188-9>

Sormunen, J. J., Klemola, T., Vesterinen, E. J., Vuorinen, I., Hytönen, J., Hänninen, J., Ruohomäki, K., Sääksjärvi, I. E., Tonteri, E., & Penttinen, R. (2016a). Assessing the abundance, seasonal questing activity, and *Borrelia* and tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence of *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Southwest Finland. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(1), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.011>

Sormunen, J. J., Penttinen, R., Klemola, T., Hänninen, J., Vuorinen, I., Laaksonen, M., Sääksjärvi, I. E., Ruohomäki, K., & Vesterinen, E. J. (2016b). Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland. *Parasites & Vectors*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1449-x>

- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7)
- Suomen riistakeskus. (2021). Pienten hirvieläinten kannanhoito ja metsästys harvemman kannan alueella.
- Terveyskirjasto. (2021). Puutiainen ja sen levittämät taudit. *Duodecim Terveyskirjasto*. <https://www.terveyskirjasto.fi/kpp00002>
- Uspensky, I. (2016). The Taiga Tick *Ixodes Persulcatus* (Acari: Ixodidae), the Main Vector of *Borrelia Burg-dorferi* Sensu Lato in Eurasia. Teoksessa *Lyme Disease (SMGebook, ss. 8–16)*. SM Group.
- Voordouw, M. J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(2), 290–302. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001486>



## Liitteet:

### Liite 1. Ruokintapaikkojen koordinaatit (ETRS-TM35FIN)

Nimi	Status	Ryhmä	Latitude	Lognitude
Ahlqvist	riistaruokinta	rannikko	6744737	224670
Ahlqvist ctrl	kontrolli	rannikko	6745966	224344
Aromaa	riistaruokinta	sisämaa	6724603	281091
Aromaa ctrl	kontrolli	sisämaa	6724943	283352
Hellansuora	riistaruokinta	sisämaa	6720066	283198
Hellansuora ctrl	kontrolli	sisämaa	6718503	281850
Kaikuranta	riistaruokinta	sisämaa	6722989	281258
Kaikuranta ctrl	kontrolli	sisämaa	6724624	283122
Kupusjärvi	riistaruokinta	rannikko	6740235	206917
Kupusjärvi ctrl	kontrolli	rannikko	6739048	205152
Lepistö	riistaruokinta	sisämaa	6722806	283553
Lepistö ctrl	kontrolli	sisämaa	6722124	284350
Loukasjärvi	riistaruokinta	rannikko	6743407	215452
Loukasjärvi ctrl	kontrolli	rannikko	6746103	2105855
Mustajärvi	riistaruokinta	rannikko	6743149	202238
Mustajärvi ctrl	kontrolli	rannikko	6743622	200536
Urhon peltotie	riistaruokinta	sisämaa	6726337	282601
Urhon peltotie ctrl	kontrolli	sisämaa	6726317	281561
Uusiniittu	riistaruokinta	rannikko	6740157	205736
Uusiniittu ctrl	kontrolli	rannikko	6737384	206809
Vaunu	riistaruokinta	sisämaa	6724375	284526
Vaunu ctrl	kontrolli	sisämaa	6725771	284140

### Liite 2. R-scripti

```
library(sf)
```

```
library(raster)
```

```
## Luetaan aineistoja
```

```
# ruokintapaikat
```

```
ruok = read.csv("D:/aineisto_ruokintapaikka", sep = ";")
```

```
# Muutetaan spatiaaliseksi
```

```
ruok = st_as_sf(ruok, coords = c("longitude", "latitude"), crs = 3067)
```

```
# Digiroad
```

```
road = st_read("D:/aineisto_tiet")
```

```

# poistetaan ylimääräistä tietoa
road = road[,-c(1:(ncol(road)-2))]

## Corine
cor = raster("D:/aineisto_corine")
# cropataan
cor = crop(cor, extent(c(190000, 325000, 6700000, 6780000))) #xmin, xmax, ymin,
ymax
# plotataan
plot(cor)
plot(ruok$geometry, add = T, cex = 5)

## kasvupaikkaluokitus
kas = raster("D:/aineisto_kasvupaikka.tif")
# cropataan
kas = crop(kas, extent(c(190000, 325000, 6700000, 6780000))) #xmin, xmax, ymin,
ymax
# plotataan
plot(kas)
plot(ruok$geometry, add = T, cex = 5)

# valitaan oikeat luokat corinesta
pelto = cor < 23 & cor > 16
urb = cor < 17
suo = cor < 47 & cor > 40
vesi = cor > 46

# muutetaan arvot että ovat pelkkä 1
pelto[pelto > 0] = 1
urb[urb > 0] = 1

## Prosessoidaan
# erotetaan mitattavat ruokintapaikat muista
ruok.mit = subset(ruok, mitataan == 1)

# laitetaan listalle
ruok.list = list(ruok, ruok.mit)

# tehdään tyhjä lista bufferoituja pisteitä varten
ruok.buf.list.3 = list()

# bufferoidaan sekä kaikki ruokintapaikat, että kontrollipisteet 3km bufferilla
for (i in 1:length(ruok.list)) {
  ruok.buf.list.3[[i]] = st_buffer(ruok.list[[i]], dist = 3000)
}
print("1")
## tehdään 3km buffereista yksi yhtenäinen taso ja leikataan sillä digiroad
# yhdistys
union.3km.bufs = lapply(ruok.buf.list.3, FUN = st_union)
# leikkaus
road = st_zm(road) # poistetaan datassa jostain syystä mukana keikkuva Z-dimensio

```

```

road = st_crop(road, st_bbox(union.3km.bufs[[1]]))

## tehdään 1000 random-pistettä kunkin mitattavan ruokintapaikan ympärille
ruok.mit.buf.3 = ruok.buf.list.3[[2]]
# tyhjä lista pisteistä varten
rand.points = list()

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.3)) {
  temp = ruok.mit.buf.3[i,]
  rand.points[[i]] = st_sample(temp, size = 1000, type = "random")
  rm(temp)
}

# plot to see
plot(ruok.mit.buf.3[1,]$geometry)
plot(rand.points[[1]], add = T)

## remove 1km buffer area
# create 1km buffers
ruok.mit.buf.1 = st_buffer(ruok.mit, dist = 1000)

# poista
for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.1)) {
  rand.points[[i]] = st_difference(rand.points[[i]], ruok.mit.buf.1[i,])
}
print("2")
# plottaa niin näkee mitkä tapahtui
plot(ruok.mit.buf.3[1,]$geometry)
plot(rand.points[[1]], add = T)
plot(ruok.mit.buf.1[1,]$geometry, add = T)

## poistetaan sellaiset pisteet jotka ovat 1km sisällä mistä tahansa ruokintapaikasta
ruok.buf.1 = st_buffer(ruok, dist = 1000)
bck = rand.points[[1]] # otetaan vähemmän pisteitä talteen että voidaan verrata mitkä tapahtui
# poistetaan
for (i in 1:length(rand.points)) {
  temp.points = rand.points[[i]]
  for (j in 1:nrow(ruok.buf.1)) {
    temp.buf = ruok.buf.1[j,]
    temp.points = st_difference(temp.points, temp.buf)
  }
  rand.points[[i]] = temp.points
}
# plotataan niin nähdään mitkä tapahtui
plot(rand.points[[1]])
plot(bck)
#plot(road$geometry, add = T)

## poistetaan pisteet jotka eivät ole 300m etäisyydellä teistä
# ensin teille 300m bufferi
road.buf = st_buffer(road, dist = 300)
road.buf = st_union(road.buf)

```

```

test.list = list()

# poistetaan pisteet jotka on yli 300m tiest?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  sel.logi = st_intersects(rand.points[[i]], road.buf, sparse = F)
  sel.points = st_sf(rand.points[[i]], sel.logi)
  names(sel.points)[1] = c("within_road")
  sel.points = sel.points[sel.points$within_road == TRUE,]
  test.list[[i]] = sel.points
}

rand.points = test.list
print("3")
# tsekataan paljonko peltoa 1km s?teell? mitattavista ruokintapaikoista
ruok.mit.buf.1$pelto_osuus = rep(NA, nrow(ruok.mit.buf.1))

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.1)) {
  temp = unlist(extract(pelto, ruok.mit.buf.1[i,]))
  ruok.mit.buf.1$pelto_osuus[i] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100 # pellon osuus
  koko 1km bufferin pinta-alasta
  rm(temp)
}

# sama rakennetulle alueelle
ruok.mit.buf.1$rakennettu_osuus = rep(NA, nrow(ruok.mit.buf.1))

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.1)) {
  temp = unlist(extract(urb, ruok.mit.buf.1[i,]))
  ruok.mit.buf.1$rakennettu_osuus[i] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100 # pellon
  osuus koko 1km bufferin pinta-alasta
  rm(temp)
}

# sama suolle
ruok.mit.buf.1$suo_osuus = rep(NA, nrow(ruok.mit.buf.1))

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.1)) {
  temp = unlist(extract(suo, ruok.mit.buf.1[i,]))
  ruok.mit.buf.1$suo_osuus[i] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100 # pellon osuus koko
  1km bufferin pinta-alasta
  rm(temp)
}

## pudotetaan pois kontrollipisteit? sit? mukaa jos maank?ytt?ehdot eiv?t t?yty
# ensin pellon avulla
# bufferoidaan random-kontrollipisteet ja otetaan pellon osuus random pisteiss?.
rand.points.buf = list()

for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points[[i]]$id = seq(1, nrow(rand.points[[i]]), 1)
  rand.points.buf[[i]] = st_buffer(rand.points[[i]], dist = 1000)
}

```

```

rand.points.buf[[i]]$pelto_osuus = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
rand.points.buf[[i]]$id = rand.points[[i]]$id
for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
  temp = unlist(extract(pelto, rand.points.buf[[i]][j,]))
  rand.points.buf[[i]]$pelto_osuus[j] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100
  #print(j)
}
#print(i)
rm(temp)
}
print("4")
# verrataan pellon osuutta random-pisteiss? ja mittauspisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$pelto_ero = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = abs(ruok.mit.buf.1[i,]$pelto_osuus - rand.points.buf[[i]]$pelto_osuus[j])
    rand.points.buf[[i]]$pelto_ero[j] = temp
  }
}

# pudotetaan pois sellaiset random-pisteet joissa pellon osuus heitt?? yli 5
prosenttipistett? (percentage points)
for (i in 1:length(rand.points.buf)) {
  rand.points.buf[[i]] = rand.points.buf[[i]][rand.points.buf[[i]]$pelto_ero < 5,]
}

## Rakennettu alue
# lasketaan rakennetun alueen osuus random-pisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$rakennettu_osuus = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = unlist(extract(urb, rand.points.buf[[i]][j,]))
    rand.points.buf[[i]]$rakennettu_osuus[j] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100
  }
  #print(i)
}
print("5")
# verrataan rakennetun alueen osuutta random-pisteiss? ja mittauspisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$rakennettu_ero = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = abs(ruok.mit.buf.1[i,]$rakennettu_osuus -
rand.points.buf[[i]]$rakennettu_osuus[j])
    rand.points.buf[[i]]$rakennettu_ero[j] = temp
  }
}

# pudotetaan pois sellaiset random-pisteet joissa rakennetun alueen osuus heitt?? yli 5
prosenttipistett? (percentage points)
for (i in 1:length(rand.points.buf)) {
  rand.points.buf[[i]] = rand.points.buf[[i]][rand.points.buf[[i]]$rakennettu_ero < 5,]
}
print("6")

```

```

#### Suo
# verrataan suon osuutta random-pisteiss? ja mittauspisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$suo_osuus = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = unlist(extract(suo, rand.points.buf[[i]][j,]))
    rand.points.buf[[i]]$suo_osuus[j] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100
  }
  #print(i)
}

for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$suo_ero = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = abs(ruok.mit.buf.1[i,]$suo_osuus - rand.points.buf[[i]]$suo_osuus[j])
    rand.points.buf[[i]]$suo_ero[j] = temp
  }
}
# pudotetaan pois sellaiset random-pisteet joissa suon osuus heitt?? yli 5 prosenttipistett?
(percentage points)
for (i in 1:length(rand.points.buf)) {
  rand.points.buf[[i]] = rand.points.buf[[i]][rand.points.buf[[i]]$suo_ero < 5,]
}
print("7")

#### Kasvupaikka
# tsekataan paljonko kasvupaikoissa on vaihtelua mittauspisteiss?
ruok.mit.buf.1$kasvupaikkoja = rep(NA, nrow(ruok.mit.buf.1))

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.1)) {
  temp = unlist(extract(kas, ruok.mit.buf.1[i,]))
  print(table(temp))
  ruok.mit.buf.1$kasvupaikkoja[i] = var(temp, na.rm = T) # pellon osuus koko 1km
  #bufferin pinta-alasta
  rm(temp)
}

# verrataan kasvupaikkatyypin vaihtelua random-pisteiss? ja mittauspisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {
    temp = unlist(extract(kas, rand.points.buf[[i]][j,]))
    rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja[j] = var(temp, na.rm = T)
  }
  #print(i)
  rm(temp)
}

# verrataan rakennetun alueen osuutta random-pisteiss? ja mittauspisteiss?
for (i in 1:length(rand.points)) {
  rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja_ero = rep(NA, nrow(rand.points.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(rand.points.buf[[i]])) {

```

```

    temp = abs(ruok.mit.buf.1[i,]$kasvupaikkoja - rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja[j])
    rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja_ero[j] = temp
  }
  rm(temp)
}

# pudotetaan pois sellaiset random-pisteet joissa kasvupaikan varianssi on yli 0.4
for (i in 1:length(rand.points.buf)) {
  rand.points.buf[[i]] = rand.points.buf[[i]][rand.points.buf[[i]]$kasvupaikkoja_ero <
0.4,]
}

## valitaan buffereiden ID:n perusteella pisteet ja tehd??n niille 100m bufferi
vesist?tarkastelua varten
control.points = list()

for (i in 1:length(rand.points)) {
  control.points[[i]] = rand.points[[i]][rand.points[[i]]$id %in% rand.points.buf[[i]]$id,]
}
# tehd??n 100m bufferi random-pisteille
control.points.100m.buf = list()
for (i in 1:length(control.points)) {
  control.points.100m.buf[[i]] = st_buffer(control.points[[i]], dist = 100)
}
# tehd??n 100m bufferi my?s mittauspisteille
ruok.mit.buf.100m = st_buffer(ruok.mit, dist = 100)

# otetaan veden osuus 100m s?teell? mitattavista ruokintapisteist?
unlist(extract(vesi, ruok.mit.buf.100m[1,]))
ruok.mit.buf.100m$vesi_osuus = rep(NA, nrow(ruok.mit.buf.100m))

for (i in 1:nrow(ruok.mit.buf.100m)) {
  temp = unlist(extract(vesi, ruok.mit.buf.100m[i,]))
  ruok.mit.buf.100m$vesi_osuus[i] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100 # pellon osuus
koko 1km bufferin pinta-alasta
  rm(temp)
}

# tsekataan paljonko vett? 100m s?teell? random-pisteist?
for (i in 1:length(control.points.100m.buf)) {
  control.points.100m.buf[[i]]$vesi_osuus = rep(NA, nrow(control.points.100m.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(control.points.100m.buf[[i]])) {
    temp = unlist(extract(vesi, control.points.100m.buf[[i]][j,]))
    control.points.100m.buf[[i]]$vesi_osuus[j] = (400*sum(temp))/(pi*1000^2)*100
  }
  print(i)
}

for (i in 1:length(control.points.100m.buf)) {
  control.points.100m.buf[[i]]$vesi_ero = rep(NA, nrow(control.points.100m.buf[[i]]))
  for (j in 1:nrow(control.points.100m.buf[[i]])) {

```

```

temp          =          abs(ruok.mit.buf.100m[i,]$vesi_osuus          -
control.points.100m.buf[[i]]$vesi_osuus[j])
  control.points.100m.buf[[i]]$vesi_ero[j] = temp
}
}
# pudotetaan pois sellaiset random-pisteet joissa suon osuus heitt?? yli 5 prosenttipistett?
(percentage points)
for (i in 1:length(control.points.100m.buf)) {
  control.points.100m.buf[[i]]          =          =
control.points.100m.buf[[i]][control.points.100m.buf[[i]]$vesi_ero == 0,]
}

# Valitaan lopulliset kontrollipisteet
for (i in 1:length(control.points)) {
  control.points[[i]]          =          control.points[[i]][control.points[[i]]$id          %in%
control.points.100m.buf[[i]]$id,]
}

# laitetaan random-pisteet parhausj?rjestykseen
for (i in 1:length(control.points)) {
temp = rand.points.buf[[i]][rand.points.buf[[i]]$id %in% control.points[[i]]$id,]
temp$pelto_rank = as.numeric(rank(temp$pelto_ero))
temp$rakennettu_rank = as.numeric(rank(temp$rakennettu_ero))
temp$suo_rank = as.numeric(rank(temp$suo_ero))
temp$kasvupaikka_rank = as.numeric(rank(temp$kasvupaikkoja_ero))
temp$rank_sum = rep(NA, nrow(temp))
for (j in 1:nrow(temp)) {
  temp$rank_sum[j] = sum(temp$pelto_rank[j], temp$rakennettu_rank[j],
                        temp$suo_rank[j], temp$kasvupaikka_rank[j])
}
temp$final_rank = rank(temp$rank_sum)
control.points[[i]] = temp
rm(temp)
}

# valitaan 10 parasta pistett? per ruokintapaikka
for (i in 1:length(control.points)) {
temp = control.points[[i]][order(control.points[[i]]$final_rank),]
temp = temp[1:10,]
control.points[[i]] = temp
rm(temp)
}

View(control.points[[3]])

# otetaan keskipisteet
control.point.cents = list()

for (i in 1:length(control.points)) {
  control.point.cents[[i]] = st_centroid(control.points[[i]])
}

```



### Liite 3. Tilastoanalyysin SAS-mallikoodi

```
ods graphics on;
proc glimmix data=g.ix0 initglm plots=meanplot (cl ilink);
nloptions maxiter=1000;
class luokkamuuttuja(t);
model selitettävä(t) muuttuja(t) = selittävä(t) muuttuja(t)
/ dist=negbinomial cl ddfm=kenwardroger2;
lsmeans selittävä(t) muuttuja(t) / cl ilink;
random intercept / subject= muuttuja cl;
covtest 'muuttuja merkitsevyys' 0;
output out= ennuste predicted (ilink noblup) =ennustetut lcl
(ilink noblup) = alempi_cl ucl (ilink noblup) =ylempi_cl;
```