

Havs- och vattenmyndigheten
Avdelningen för havs- och vattenförvaltning
Box 11 930
404 39 Göteborg
havochvatten@havochvatten.se

SÄLHÄLSA, ZONOSRISKER, SÄL- OCH TORSKMASK



Gråsäl i solen. Foto: Karin Bernodt, SVA

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sälhälsa, zoonosrisker, säl- och torskmask.....	1
Bakgrund.....	4
1. Beskrivning av sälstammens hälsa.....	5
Bakgrund.....	5
Metod	5
Resultat.....	6
Sälstammar i svenska vatten	6
Sälhälsa i Östersjön (framför allt gråsälar och vikare)	6
Sälhälsa på västkusten (framför allt knobbsälar)	8
Antibiotikaresistens	11
2. Torskmaskens utbredning och koppling till säl som huvudvärd.....	12
Bakgrund.....	12
Material och metoder.....	13
Insamling av torsk och säl	13
DNA-analys för artbestämning av nematoder	17
Resultat.....	18
Parasitbörda och kondition hos torsk	18
Parasitbörda hos säl	20
Identifiering av arter genom DNA-analys	22
Diskussion	23
Torsk	23
Säl	25
3. Risker för överföring av zoonotisk smitta från säl till människor	27
Introduktion.....	27
Metoder	27
Resultat.....	28
Brucellaodling	29
Aerob odling	29
Diskussion	29
Brucella	29
Aerob odling	30
Sammanfattning, zoonosrisker	31
4. Identifiera framtida forskningsbehov.....	32
Referenser	35

Bilaga 1. Protokoll för DNA-amplifiering och dataanalys avseende Anisakidae från maginnehåll på säl	42
Bilaga 2. Tabell 3: somatiska data och parasitfynd i muskel respektive lever hos torsk från Hanöbukten och Skåre	44

BAKGRUND

Kontinuerlig hälsoövervakning av den svenska sälstammen sker ur ett miljögiftsperspektiv och har pågått i cirka 40 år. Övervakningen sköts av Naturhistoriska Riksmuseet (NRM) på uppdrag av Naturvårdsverket (NV). SVA har ett uppdrag att följa och analysera utvecklingen av sjukdomstillstånd hos vilda djur och SVA och NRM samarbetar gällande patologi och utredningar av sjukdomar hos marina däggdjur. Hittills har ingen sammanställning över förekomst av möjliga zoonoser (smittor som överförs mellan djur och människor) hos sälstammen, gjorts. Zoonoser är en viktig aspekt i och med exempelvis den stadigt ökade jakten av säl, vilket innebär fler kontakter mellan människa och säl. misstänks att det finns en koppling mellan en ökande sälstam och en samtidigt försämrad hälsa hos torsk, med bland annat ökad parasitbörda av säl-/torskmask. Därmed finns det flera viktiga kunskapsluckor avseende sälhälsa.

I beslut från Havs- och vattenmyndigheten (HaV) 2018-05-30, dnr 1553-18, tilldelades SVA 2 000 000 kronor för projekt "Hälso- och sjukdomsövervakning fisk och säl". Av bidraget var ca 514 000 kronor budgeterat för att finansiera delprojektet "Sälhälsa, zoonoserisker, säl- och torskmask". Projektet genomfördes i samarbete med NRM.

Vid planering av projektet identifierades fyra viktiga punkter för projektet:

- 1) En beskrivning av vad vi vet om sälstammens hälsa, retrospektivt och i nuläget.
- 2) Torskmaskens utbredning i svenska vatten och koppling till säl som huvudvärd
- 3) Risker för överföring av zoonotisk smitta från säl till människor och slutligen
- 4) Identifiering av framtida forskningsbehov.

De tre första punkterna kommer att presenteras som separata delprojekt och sedan görs en syntes under punkt fyra.

1. BESKRIVNING AV SÄLSTAMMENS HÄLSA

BAKGRUND

Tre sälarter finns i Sverige: gråsäl (*Haliochoerus grypus*, **Bild 1**), vikare (*Pusa hispida*) och knubbsäl (*Phoca vitulina*). Sälar befinner sig högst upp i näringskedjan, vilket gör dem känsliga för förändringar på alla nivåer i ekosystemet. De är därför utmärkta indikatorer för hälsoläget i våra akvatiska miljöer. Sjukdomsutbrott hos sälar kan signalera förändringar i ekosystemet. Utbrott kan inträffa när förändrade miljöförhållanden ökar överföring av smittor eller sänker immunförsvaret (Harvell et al., 1999). Sälar förekommer längs våra kuster och kan användas för att övervaka kemikalier och smittämnen som har sitt ursprung på land och spolas ut till havs. Sverige har en lång historia av hälsoövervakning av sälar. Sälhälsa, särskilt hos gråsälar och vikare i Östersjön, har övervakats sedan slutet av 1970-talet (Bergman, 1999). Knubbsälar har undersökts i samband med sjukdomsutbrott och under de senaste åren har även knubbsälar skjutna under jakt undersökts. Programmet bedrivs än idag av forskare på NRM. Målet med denna del av projektet är att sammanfatta vad som är känt om sälhälsa och sjukdomar hos sälar i Sverige.



Bild 1: Gråsälar i Östersjön. Foto: Karin Bernodt, SVA

METOD

Informationen har sammanställts med hjälp av rapporter från hälsoövervakningsprogrammet vid NRM, data från undersökningar som har gjorts på SVA samt publicerade artiklar om dödlighet och sjukdomar i svenska och andra sälpopulationer. Eftersom Sveriges sälstammar ökar, diskuteras även sjukdomar som gynnas av högre säldensitet. Då flera grupper av människor, bland annat jägare, fiskare, biologer och veterinärer kommer i kontakt med sälar diskuteras även zoonoser, det vill säga sjukdomsframkallande agens som kan överföras från djur till människor, som har rapporterats hos dessa tre sälarter.

RESULTAT

Sälstammar i svenska vatten

Storleken på Sveriges sälstammar har fluktuerat dramatiskt de senaste 120 åren. Intensiv säljakt ägde rum i Östersjön och på västkusten i början av 1900-talet, vilket minskade sälstammarna dramatiskt (Hårding och Härkönen, 1999; Härkönen och Isakson, 2010; Heide- Jørgensen och Härkönen, 1988). Återhämtning av gråsäl- och vikarstammar i Östersjön förhindrades av reproduktionsstörningar i samband med höga halter av miljögifter (Hårding och Härkönen, 1999) medan knubbsälsstammar på västkusten drabbades av upprepade sjukdomsutbrott (t.ex. Bergman et al., 1990; Härkönen et al., 2006). Under senaste tiden har Sveriges sälstammar ökat stadigt (HELCOM, 2018a; Bäcklin et al., 2017). Skattad populationsstorlek år 2017 är ungefär 37 500 - 50 000 gråsäl i hela Östersjön, nästan 30 000 knubbsäl (Skagerrak, Kattegatt, södra Östersjön och Kalmarsund) och >20 000 vikare i Bottniska viken (M. Ahola och A. Carlsson, personlig kommunikation). Det finns tecken på att både gråsälspopulationen i Östersjön och knubbsäl i Kattegatt är nära bärförmågan (så kallad 'carrying capacity') (HELCOM, 2018b). Att notera är att populationsuppskattningen av vikare i Bottniska viken 2013 - 2015 var mycket avvikande på grund av milda vintrar och ovanliga isförhållanden (HELCOM, 2018a). Vidare undersökning av hur isförhållandena och klimatförändringen påverkar vikare är nödvändigt.

Sälhälsa i Östersjön (framför allt gråsäl och vikare)

Baltic Seal Disease Complex

Under de första åren av sälhälsoövervakning i Sverige beskrevs en sjukdomsbild som kallades för 'Baltic Seal Disease Complex' (BSDC) (Bergman, 2007). BSDC omfattar förändringar i reproduktionsorganen hos honor, tarmsår, förtjockning av binjurebarken, godartade tumörer i binjurebarken, arterioskleros (förkalkning och förfettnings av stora kroppspulsådern) samt förändringar i njurar (glomerulopati och proliferation av epitelceller i tubuli), skallben, klor och hud hos gråsäl och vikare (Bergman and Olsson, 1985; Bergman, 1999). De reproduktiva förändringarna innefattade sammanväxningar och förträngningar i livmodern hos båda arterna och godartade glattmuskeltumörer (leiomyom) hos gråsäl, vilket korrelerade med en mycket låg dräktighetsfrekvens. I en långtidsstudie på gråsäl sågs minskade förekomster av de flesta sjukliga förändringar och dräktighetsfrekvensen ökade i samband med minskade koncentrationer av klorerade kolväten över tid. Däremot ökade förekomsten av tarmsår under studietiden, vilket tolkades som att det fanns en annan, oidentifierad, bakomliggande faktor (Bergman, 1999). Den positiva trenden gällande reproduktionshälsa och andra sjukliga förändringar förutom prevalensen av tarmsår (se nästa stycke) har fortsatt (Bäcklin et al., 2017; Bäcklin personlig kommunikation.). Andelen gråsäl över 15 år med binjurebarksförtjockning var endast 58 % år 2015 (Bäcklin et al., 2017) jämfört med 100 % mellan 1977 och 1996 (Bergman, 1999). Livmoderssammanväxning hos gråsäl har inte observerats sedan 1993. Enstaka fynd på senare tid har varit avsaknad av ett livmoderhorn hos en vikare från 2015 och dubbelsidiga

sammanväxningar i livmodern sågs hos en vikare från säljakten 2018 (Bäcklin et al., 2017; Bäcklin, personlig kommunikation.).

Hakmask och Tarmsår

Aktuella hälsoproblem för gråsäl i Östersjön inkluderar tarmsår som uppstår vid förekomst av hakmask (Bäcklin et al., 2017), nyupptäckt och ökande förekomst av zoonotisk leverflundra (Neimanis et al., 2016.; Bäcklin et al., 2017) och minskad späcktjocklek (Bäcklin et al., 2017).

Tarmsår fortsätter att orsaka allvarlig sjukdom och död hos gråsäl. Problemet är värre i Bottniska viken, där förekomsten av både allvarliga tarmsår och kraftig hakmaskinfektion är högre än i egentliga Östersjön. Även om förekomsten av allvarliga tarmsår har minskat från >50 % i Bottniska viken och 30 % i egentliga Östersjön år 2003 (Bäcklin et al., 2017), så har frekvenserna börjat öka igen och ligger nu runt 30 % och 15 % för de två områdena 2015 – 2017 (Bäcklin, personlig kommunikation). Svåra fall av tarmsår som orsakar tarmperforation är inte ovanliga, särskilt hos äldre hanar (Bergman, 1999). Även om tarmsår är tydligt förknippade med hakmaskförekomsten hos gråsäl i Östersjön är dessa parasiter inte associerade med tarmsår i andra sälpopulationer (Bäcklin et al., 2017). En störning i immunsvaret hos gråsäl i Östersjön är därför tänkt att kunna spela en nyckelroll (Bergman, 1999) och kräver ytterligare utredning.

Leverflundror

Leverflundra (*Pseudamphistomum truncatum*) smittar ett brett spektrum av fiskätande däggdjur, inklusive människor. Sedan den första beskrivningen av parasiten hos gråsäl i Östersjön 1986 har den årliga prevalensen av smittade säl ökat dramatiskt sedan 2008 och har varierat mellan 12 % och 28 % (Neimanis et al., 2016; Bäcklin et al., 2017). Cyprinider (mörtfiskar) anses vara mellanvärd och andelen gråsäl med rester av cyprinider i magsäcken har också ökat avsevärt. Detta kan spegla förändringar i mängd och geografisk förekomst av cyprinider i Östersjön eller förändrade dietpreferenser hos säl. Medan de flesta infektioner anses vara bifynd kan svåra infektioner orsaka leversvikt och dödsfall (Neimanis et al., 2016). Människor kan infekteras av flundran genom att äta rå eller otillräckligt tillagad fisk som innehåller flundrans larvstadium. Vuxna parasiter hos säl är inte smittsamma för människor, men den ökade förekomsten hos gråsäl är en varningssignal som visar att denna parasit finns och troligtvis ökar i Östersjöns ekosystem. Larvstadier av parasiten identifierats i mör (*Rutilus rutilus*) i andra delar av Nordeuropa (t.ex. Skov et al., 2008) och nyligen har en hög förekomst (46 %) påvisats i mör från Finska viken (Näreaho et al., 2017). Vidare undersökning är önskvärt avseende både sälarnas och andra fiskätande djurs hälsa såsom hundar, katter, olika vilda djur och, inte minst, människor.

Späcktjocklek

Späcktjocklek hos gråsäl har minskat avsevärt sedan slutet av 1990-talet och är lägre hos bifångade säl än säl skjutna under jakt (Bäcklin et al., 2011; Bäcklin et al., 2017; HELCOM, 2018c). Tunnare späck hos bifångade säl kan bero på undernäring vilket ökar sälens motivation till födosök kring fiskeredskap

där det finns lättillgängligt byte (Bäcklin et al., 2011). Bakomliggande orsaker till minskningen i späcktjocklek är okända och kan spegla förändringar i bland annat kvalitet (t.ex. fettinnehållet) och kvantitet (fiskpopulationens storlek/tillgång på byte) hos de fiskarter sälarna äter, en ökad sälstam eller andra faktorer som påverkar gråsälens hälsa (HELCOM, 2018c) och fördjupade studier är önskvärda.

Zoonoser

Tre zoonotiska smittämnen; salmonella, sälkoppor (parapoxvirus) samt trikiner (*Trichinella nativa*) har dokumenterats hos gräsäl från Östersjön. *Salmonella* Dublin har påvisats på tre gråsälar. Två fall upptäcktes hos vuxna gråsälar med leverinflammation år 2004 (Bäcklin, personlig kommunikation) och i tredje fallet isolerades salmonellabakterier från tarmen hos en gråsälskut undersökt 2009 på SVA. *Salmonella* Dublin är särskilt anpassad till nötkreatur och smittkällan var därför sannolikt landlevande djur. Infektioner med *Salmonella* spp. har enstaka gånger rapporterats hos knubb- och gråsälar i Nordeuropa (Siebert et al., 2017; Foster et al., 1998). Ett fall av sälkoppor upptäcktes på SVA vid undersökning av en gräsäl som kom från en viltrehabiliterare. Parapoxvirus som orsakar sälkoppor har hittats hos gråsälar och knubbsälar i andra länder (Muller et al., 2003; Hicks and Worthy, 1987; Osterhaus et al., 1994) och sjukdom är ofta förknippad med nedsatt immunförsvar (Muller et al., 2003). Ett enda fall av trikiner (*T. nativa*) har påvisats på en gräsäl. I studien undersöktes 171 gråsälar samt 56 vikare i Finland (Isomursu and Kunnasranta, 2011). Fallet speglar troligtvis en s.k. 'spillover' från fastlandet där trikiner förekommer i högre utsträckning hos vilda djur. Ett fjärde smittämne som är en potentiell zoonos är *Brucella*-bakterier. *Brucella pinnipedialis*, arten som förekommer hos sälar, har i Finland odlats från lever från gräsäl med leverflundror (Hirvela-Koski et al., 2017), och antikroppar mot *Brucella* (okänd art) påvisades nyligen i två av tolv vikare från Bottniska viken (Sonne et al., 2018). *Brucella pinnipedialis* har rapporterats flera gånger hos knubbsäl i andra regioner (Prenger-Berninghoff et al., 2008; Siebert et al., 2017).

Sälhälsa på västkusten (framför allt knubbsälar)

Utbrott av infektionssjukdomar

Sälpest

Knubbsälar på västkusten (**Bild 2**) har varit utsatta för upprepade sjukdomsutbrott och dödlighet som drabbat stora delar av populationen. Två omfattande utbrott av sälpest (Phocine Distemper Virus, PDV) 1988 och 2002 dödade nära 50 % av bestånden (Härkönen et al., 2006). Sälpest leder till nedsatt immunförsvar och sekundära bakteriella infektioner var också vanliga (Siebert et al., 2017). Vid det första utbrottet dog också ett mindre antal gråsälar (Bergman et al., 1990; Heide-Jørgensen et al., 1992). Utbrotten skedde efter en ökning av sälpopulationerna och inför utbrottet 2002 var andelen knubbsälar med immunitet mot viruset mycket låg (Jensen et al., 2002). I en senare studie publicerad 2013 hade endast 11% av de sälarna som undersöktes i

Nederländerna immunitet mot PDV och forskare varnar för ett nytt omfattande utbrott (Bodewes et al., 2013).

Influensa

Ett utbrott av aviär influensa A, subtyp H10N7, startade i Sverige 2014 och spred sig sedan genom sälpopulationerna i norra Europa (Zohari et al., 2014). Detta var första gången Influensa A förknippades med dödlighet hos sälar i Europa och första gången subtyp H10 rapporterades hos sälar. Totalt rapporterades 444 döda sälar i Sverige under 2014 (Neimanis et al., 2015), vilket sannolikt är en underskattning av det totala antalet sälar som dog. En stor andel av de knubbsälar som undersöktes under och strax efter utbrottet hade bildat antikroppar, vilket tyder på att en mycket stor del av sälpopulationen hade exponerats för viruset, och att merparten överlevde denna smitta (Neimanis et al., 2015). Dödlighet var ofta kopplat till sekundär bakteriell lunginflammation (Zohari et al., 2014; Bodewes et al., 2015). Mikroskopiskt kunde virus påvisas i skadade slemkörtlar i luftvägarna. Slemproduktion är ett viktigt försvar mot bakteriella infektioner i lungorna och skador på dessa körtelceller förklarar varför bakteriell lunginflammation var ett vanligt fynd hos döda sälar och varför vissa sälar dog medan andra överlevde. Viruset härrör troligen ursprungligen från vilda fåglar, och cirkulerade sedan i knubbsälspopulationen i minst 10 månader. Molekylära analyser visar att viruset förändrades med tiden och blev mer anpassat till däggdjur (Bodewes et al., 2016). I motsats till PDV som inte smittar människor kan vissa stammar av aviär influensa, däribland vissa H10-stammar, också infektera människor. Den zoonotiska potentialen hos detta H10N7-virus har inte fastställts än.

Massdöd 2007

Förutom de ovannämnda virussjukdomarna har en mystisk sjukdom med sannolik infektiös etiologi förekommit. År 2007 inträffade ett sjukdomsutbrott hos knubbsälar på västkusten (Härkönen et al., 2008). Sammanlagt hittades 285 döda knubbsälar längst Kattegatts kuster i Sverige och Danmark. Beräkningar som gjordes efter utbrottet talar för en dödlighet på närmare 2000 djur. Även ett mindre antal döda tumlare (n=28) påträffades. Vid obduktion sågs förändringar typiska för sälpest i lungorna, men samtliga sälar var negativa för PDV. Efter influensautbrottet 2014 undersöktes frysta lungprover från utbrottet 2007 för influensavirus men alla prover var negativa. Orsaken till massdöden är fortfarande okänd. Nu när nya metoder som helgenomsekvensering är mer tillgängliga kan framtida forskning förhoppningsvis lösa gåtan avseende detta utbrott och därmed definiera detta potentiella hot mot marina däggdjur. SVA har god erfarenhet av helgenomsekvensering och identifierade med metoden till exempel ett tidigare okänt virus som orsakade massdöd hos tånglake sommaren 2014 (Axén et al., 2017).



Bild 2: Frisk knubbsäl. Knubbsälarna på västkusten har varit utsatta för flera omfattande sjukdomsutbrott de senaste 30 åren. Foto: Karin Bernodt, SVA

PDV och aviär influensa orsakar omfattande sjukdomsutbrott (så kallade epizootier) och kräver närbkontakt för smittspridning. Ökad täthet av knubbsälspopulationer, deras sociala beteende och minskat antal lämpliga hållar där de kan samlas leder till större och tätare grupper på land. Detta resulterar i explosiva utbrott när en smitta drabbar populationen. Hos kaspisk säl (*Pusa hispida*) och Baikalsäl (*P. sibirica*), var ett närbesläktat hundvirus (valpsjukevirus, canine distemper virus, CDV) orsaken till sjukdomsutbrott i stället för PDV (Osterhaus et al., 1989; Kuiken et al., 2006). Vid dessa utbrott misstänktes eller bekräftades överföring av virus från ett landlevande rovdjur. Att notera är att utbrottet hos kaspiska sälar, som är närbesläktade med vikare, inträffades under en exceptionellt mild vinter när större grupper av sälar samlades på land då isen försvann tidigt. Under räkning av vikare i Bottniska viken 2013 - 2015 var isförhållanden onormala på grund av de milda vintrarna och många fler vikare än vanligt samlades i stora grupper (HELCOM, 2018b). Om brist på is tvingar dem att spendera mer tid nära och på land ökar risken för CDV-”spillover” från landlevande rovdjur. Flera omfattande utbrott av CDV hos vilda rovdjur har skett i Danmark och centrala Europa de senaste åren. Spillover av CDV tillsammans med dålig immunitet i populationen kan medföra ett stort sjukdomsutbrott. Med tanke på de senaste fyra dokumenterade sjukdomsutbrotten som har skett hos knubbsälar i svenska vatten under de senaste 30 åren är frågan inte om nya sjukdomsutbrott kommer att inträffas, utan snarare när. Det är därför av största vikt att planera och förbereda sig för nästa utbrott innan det händer.

Andra sjukdomar

Ett antal fall av tarmvred har dokumenterats hos knubbsälar och gråsälar som hittats döda och blivit undersökta på NRM och SVA. I en retrospektiv studie om dödsorsaker hos strandade knubbsälar i Nederländerna dog 7 % av tarmvred

(Osinga et al, 2012). Detta tyder på att sälar på något sätt är predisponerade för tarmvred, men några riskfaktorer för detta har ännu inte identifierats.

Zoonoser i andra populationer

Förutom de redan nämnda zoonotiska smittämnen som påvisats hos sälar i Östersjön har ett antal zoonotiska smittämnen isolerats eller antikroppar har påvisats hos knubbsälar, gråsälar och/eller vikare i andra regioner i världen. Dessa smittämnen inkluderar bakterier och parasiter som anges nedan. Deras förekomst hos sälar i svenska vatten har ännu inte undersökts och eventuell förekomst här är därför okänd.

- *Erysipelothrix rhusiopathiae* (rödsjuka, även en orsak till sälfinger)
- *Mycoplasma phocicerebrale* (har orsakat sälfinger)
- *Bisgaardia hudsonensis* (har orsakat sälfinger)
- *Leptospira interrogans* (kan orsaka njursvikt)
- *Giardia duodenalis* (orsakar tarmbesvär)
- *Toxoplasma gondii* (kan skada foster och orsakar allvarlig sjukdom hos personer med nedsatt immunförsvar)

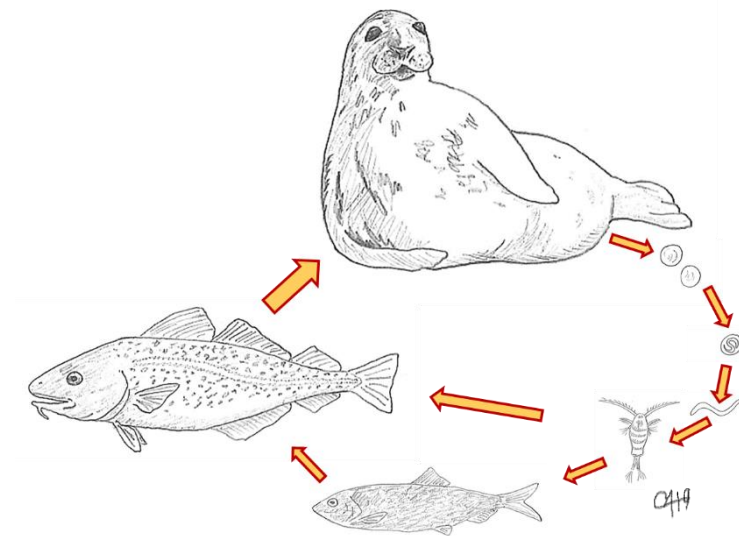
Antibiotikaresistens

Avslutningsvis har sälar också använts som indikatorer för antibiotikaresistenta bakterier som finns i kustmiljöer. Resistenta bakterier har hittats i olika sälar (t.ex. Stoddard et al., 2008; Santestevan et al., 2015), bland annat hos knubbsäl i England (Duff et al., 2016), och i andra delar av världen. Ett pilotstudie för att upptäcka antibiotikaresistens hos indikatorbakterier (*E. coli* och enterokocker) i tarminnehåll från gråsäl och knubbsäl från Sverige utfördes i ett samarbetsprojekt mellan SVA och NRM 2009. Inga bevis på antibiotikaresistens hittades då. Ett uppföljningsstudie för att undersöka om det gynnsamma läget fortfarande kvarstår nu 10 år senare har precis inletts.

2. TORSKMASKENS UTREDNING OCH KOPPLING TILL SÄL SOM HUVUDVÄRD

BAKGRUND

Anisakidae är en familj parasitära nematoder (rundmaskar). Livscykeln är indirekt och inkluderar flera mellanvärdar som små kräftdjur och fiskar. Slutvärderna är marina däggdjur, och människor kan infekteras vid intag av rå eller undemåligt tillagad fisk. Hos torsk talar vi ofta om torskmask, men en korrekt benämning snarare är sälmask eftersom sälen är huvudvärd för parasiterna. Sälmasken inkluderar två genera: *Pseudoterranova* sp., och *Contracaecum* sp. En tredje anisakid nematod i svenska vatten är *Anisakis simplex* eller spiralmask, som har tumlare som huvudvärd. I huvudvärden lever nematoderna i mag-tarmsystemet, medan larvstadierna i mellanvärden kapslar in sig i olika organ som lever (*Contracaecum* sp.) eller muskel (*Pseudoterranova* sp.). *Anisakis simplex* ses som små "kanelbullar" på inre organ och bukhinnor hos till exempel makrill.



Figur 1: Livscykel hos Anisakidae. Ägg frisätts i vattnet via däggdjurets avföring och utvecklar larver som kläcks och infekterar kräftdjur som copepoder. Större kräftdjur och flera olika fiskarter kan ingå i livscykeln.

Contracaecum sp. är väldokumenterad från torsk i södra Östersjön. Redan på 50 - 70-talet observerades förekomst av parasiten (Nadolna & Podolska, 2014). Nadolna & Podolska (2014) hittade Anisakida nematoder i 10,4% – 22,5% av undersökt torsk från ICES delområde 25, och 95 % av nematoderna var *Contracaecum* sp. I en senare studie var 90 - 100 % av den undersökta torsken från Bornholmsbassängen till vattnen söder om Gotland infekterad. Förekomsten sjönk västerut till 72 % av torsken i Arkonabassängen (söder om

Skåne), 51 % i Öresund, runt 30 % i Kattegatt och Skagerack och så lågt som nollförekomst i Kiel-bukten (Sokolova et al., 2018).

Förekomst av *Pseudoterranova* sp. i Östersjötorskar har historiskt varit mycket låg till obefintlig. Under 2000-talet började det komma in klagomål från fiskare i delområde 25 om att säl störde fisket. Det fanns även misstanke om att torsken infekterats med *Pseudoterranova* sp. Buchmann & Kania (2012) undersökte förekomsten i muskel på 20 torskar från området och fann *Pseudoterranova* sp. i 2 % av individerna och 4 larver per individ i medeltal. I en senare studie av Mehrdana et al. (2014) undersöktes muskel på 188 torskar från samma delområde. Genomsnittlig andel infekterade torskar under studieperioden var 46 %. Förekomsten var högst i torsk >50 cm infångade under hösten (55 %) och som lägst i torsk <50 cm infångade under våren (12%) (Mehrdana et al., 2014).

Det finns ett fåtal studier som undersökt förekomst av nematoder hos gråsäl och knubbsäl. Lunneryd et al. (2015a) undersökte gråsäl i Östersjön och fann *P. decipiens* i 6 (7 %) av 87 sälar. *Contracoecum osculatum* hittades också men hur vanlig infektionen var rapporterades inte. I södra Östersjön gjordes en studie på nio sälar (fem gråsäl, tre knubbsäl och en vikare) där både *P. decipiens* och *C. osculatum* identifierades i alla sälar (Skrzypczak et al. 2014). I sälar från Bottenviken har *C. osculatum* rapporterats, medan vikare verkar vara infekterade av nematoder bara i sällsynta fall (Valtonen 1988).

I Vadehavet i Nordsjön undersöktes knubbsäl och *P. decipiens* fanns i 66 % av sälarna (n=71) men inte *C. osculatum* (Lehnert et al., 2007). I Skagerack och Kattegatt har dock *C. osculatum* hittats hos knubbsäl (Lunneryd 1991). *Pseudoterranova decipiens* har även hittats i knubbsäl från södra Oslofjorden (Aspholm et al., 1994). *Anisakis simplex* har identifierats i knubbsäl på västkusten (Lunneryd, 1991) och gråsäl från Öregrund, men inte i gråsäl skjutna i egentliga Östersjön (Lunneryd et al., 2015a).

Denna studie utfördes i syfte att titta på utbredning av sälmask, främst *C. osculatum*, hos torsk och säl, samt att jämföra förekomsten av parasiterna hos torsk på olika lokaler och säl från olika delar av de svenska kustvattnen. Därmed strukturerades studien upp i två delprojekt som utfördes separat men vars resultat vävs samman här. SVA har genomfört det första delprojektet – att samla in torsk och undersöka parasitbörda av Anisakidae. NRM har genomfört det andra delprojektet, vilket motsvarar SVA:s undersökningar men på säl som obducerats i NRM:s regi.

MATERIAL OCH METODER

Insamling av torsk och säl

Torsk

SVA har ingen kontinuerlig vildfiskövervakning motsvarande övervakningen som sker på vilda landlevande djur (patologi) samt säl (hälsa ur miljögiftsperspektiv). Under 2018 genomfördes dock ett pilotprojekt för vildfiskövervakning (SVA Dnr 2018/279) med utgångspunkt i SLU:s provfisken och

därigenom skulle 50 torskar samlas in för detta projekt. Därmed skulle säkerställas att torsk togs in från fyra olika lokaler (Kvädöfjärden, Hanöbukten, Barsebäck och Fjällbacka) längs den svenska sydkusten så att flera populationer representerades. Artbestämning och kvantifiering av Anisakida nematoder gjordes manuellt.

Säl

Naturhistoriska riksmuseet samlar på uppdrag av Naturvårdsverket årligen in hela sälar och/eller prover från jakten på vikare, gråsäl och knobbsäl. Hela vikaresälar och organpaket (alla organ från tunga till anus utplockade) från gråsäl samlas in under augusti-december. Organpaket från knobbsäl samlas in under oktober-mars. Även bifångade sälar och sälar funna döda på stränder samlas in. Sedan 1970-talet obduceras sälarna för att undersöka sälhälsan. Studien omfattar totalt 41 hela vikare insamlade under jakten 2015 – 2017, 60 gråsälar (hela bifångade gråsälar under 2018 eller organpaket från jakten 2017) och 55 organpaket från knobbsäl från jakten under hösten 2017 och våren 2018. Allt insamlat material förvarades fryst i -20°C tills upptining och obduktion. Artbestämning och kvantifiering av andelen Anisakida nematodarter gjordes genom DNA-analys av vätska från magsäcken.

Torsk

Totalt samlades 50 torskar in. På basis av minimimått för yrkesfisket, samt att unga torskar kan antas ha låg parasitbörda, togs inga individer <35 cm med. Vid SLU:s provfiskeri i Barsebäck och Kvädöfjärden fanns ingen torsk i fångsten, och i Fjällbacka var alla torskar <35 cm och hade ingen parasitbörda. Under fisket i Hanöbukten (ICES delområde 25) 6 – 7 november landades 14 torskar. Nordiska Kustöversiktsnät användes som fångstmetod. All fisk dog under fångst eller hantering i samband med vittjande av redskapen. Torsken obducerades på plats för provuttag för vildfiskprojektet, men lever sparades undan och kropparna transporterades till SVA för vidare analys avseende Anisakida nematoder. För att fylla upp kvoten på 50 torskar beställdes 36 torskar från en yrkesfiskare i Skåne. Torskarna fiskades den 25 november med 110 mm maskors-nät. Fisket skedde på 8 - 12 m djup utanför Skånes sydkust (ICES delområde 24) och landades i Skåre. Torsken sändes omgående till SVA där provuttag gjordes.

Kön, längd och vikt noterades för alla torskar. Utifrån längd och vikt räknades Fultonfaktorn ($\text{vikt(g)} \times 100 / \text{längd(cm)}^3$), ett mått på fiskens kondition, ut. Fultonfaktorn användes för att undersöka om det fanns någon korrelation mellan parasitbörda och fiskens kondition.

Torsken förvarades kyld och undersöktes avseende parasiter i muskulatur och lever cirka tre dagar efter fångstillfället. Samma person utförde samtliga genomsökningar.

För genomsökning av muskulatur avlägsnades huvud, innanmäte och skinn. Kroppen delades därefter i 4 - 6 delar. Varje del genomsöktes på ljusbord. Genomlysningen var god upp till en tjocklek på cirka 0,5 cm. Tjockare partier delades upp ytterligare med skalpell. Tidsåtgången per hel fisk var i genomsnitt 20 min, med något varierande tidsåtgång beroende på fiskens storlek.

Eventuella larver plockades ut med pincett. Larverna låg generellt inkapslade (**Bild 3**). För att frigöra larverna från den omkringliggande vävnaden lades de i bägare med varm digestionsvätska (16 mL saltsyra och 10 g pepsin i 2 L ~45°C kranvatten, (European Union Reference Laboratory for parasites)). Larverna började omedelbart aktiveras och kläcktes ur sina kapslar.

Levrarna undersöktes inte på ljusbord utan lades direkt i digestionsvätska. Metoden (European Union Reference Laboratory for parasites) är framtagen för isolering av Anisakida larver i sönderdelad fiskmuskulatur, och anpassades genom bland annat en utökad inkubationstid. Levrarna lades hela i glasflaskor, en lever per flaska. Flaskorna fylldes upp med varm digestionsvätska och inkubades vid 45°C över natt (10+ timmar). Efter inkubering var levrarna mestadels upplösta. Flaskorna skakades för att lösa upp kvarvarande bitar. Den fettrika levervävnaden flyter till ytan, med en tydlig separering som följd, medan larverna sjunker (**Bild 4**). Detta medför att den övre fasen kan avlägsnas utan att förlora larverna. Leverfasen avlägsnades med två olika metoder; genom pipettering eller genom separering i byrett. Den senare metoden var mer tidseffektiv. Den kvarvarande vätskefasen silades genom finmaskig sil i syntet eller stål. Den plana stålsilen var bättre lämpad för ändamålet. Larverna plockades från silen med pincett.

De frigjorda larverna från muskulatur och lever lades i så kallade mjölkrör till hälften fyllda med en blandning av glycerol och 70 % etanol i proportionerna 1:4.

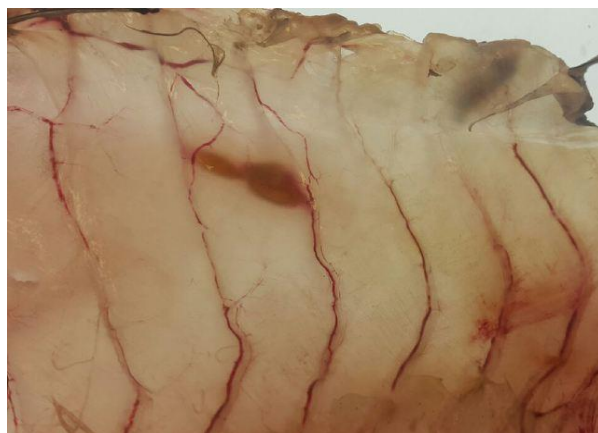


Bild 3: Larv i torskmuskel, tydligt avtecknad mot ljusbordet.

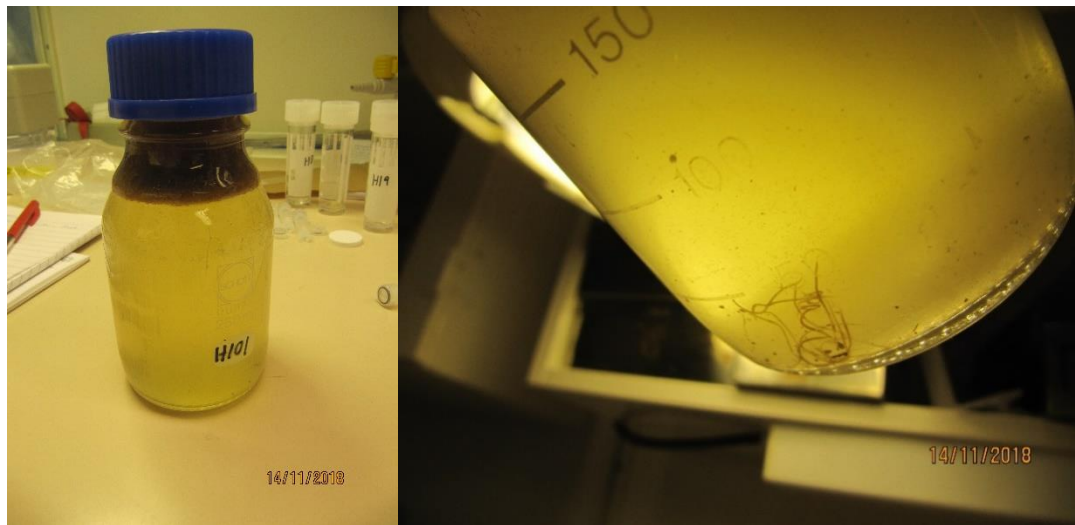


Bild 4: Digererad lever. Levervävnaden flyter, medan larverna sjunker i vätskan.

Digestionssmetoden användes även på bitar av torskmuskel för att undersöka möjligheten att digenera fram larver på detta sätt, men utan tillfredställande resultat. Vävnaden löstes inte upp tillräckligt (**Bild 5**).



Bild 5: Torskmuskel i stort sett intakt efter behandling med pepsin/saltsyralösning och värme.

För artbestämning studerades larverna en och en i ljusmikroskop efter att kutikulan (motsvarande hud) gjorts mer transparent med glycerol. Artbestämningen baserades på yttre och inre morfologi enligt Fagerholm (1982), kompletterat med bilder och information från andra källor.

Statistisk analys utfördes med Rstudio Version 1.0.153 – © 2009-2017. (RStudio, Inc.). Resultaten från de båda lokalerna jämfördes med hjälp av

Wilcoxsons rangsummetest (WR) för kontinuerliga data, samt χ^2 -test (χ^2) för kategoriserade variabler.

Säl

Magsäcksinnehållet från en säl hälldes ner i en metallsil under rinnande vatten och sköljdes sedan i kallt vatten för att hitta nematoder. Nematoderna plockades manuellt och vägdes innan de lades i 75 % etanol. Om antalet nematoder var <5 räknades de istället för att vägas. I magsäckar med mycket innehåll av föda var det svårt att plocka ut alla parasiter, vilket då noterades och vikten användes inte i beräkningar. Skador i magsäckens slemhinna noterades.

För att bedöma infektionsgrad/mängden parasiter utformades ett score-system för knubbsäl och ett för gråsäl. För knubbsäl definierades lindrig infektion som ≤ 5 st, måttlig infektion som ca 5 - 25 st och kraftig infektion som >30 st. För gråsäl definierades lindrig infektion som en volym upp till ca 30 ml och kraftig infektion som över ca 2 dl. Mängder däremellan klassificerades som måttlig infektion. Antalet stora nematoder (ca 60 mm långa och >1.5-2 mm tjocka) uppskattades på parasitprover sparade i etanol, för knubbsäl klassificerat i: 0 st, 1-10 st, 11-20 st, 21-50 st, och för gråsäl klassificerat i: 0 st, 1-10 st, 11-50 st, 51-100 st och >100 st.

Även på säl gjordes nematoderna mer transparenta inför artbestämning. Tidigare publicerade protokoll för uppkläring av de största nematoderna använde laktofenol. Laktofenol är dock toxiskt och inte önskvärt att arbeta med rutinmässigt. Försök att klarna upp nematoderna med glycerol och alkohol utfördes. Enligt rekommendationer från Maria Ovegård, SLU och Paul Eric Aspholm, Norsk Institutt for Bioøkonomi erhöles bättre resultat om de största nematoderna först lades i ättiksyra ($\geq 90\%$) i några minuter för att dehydrera dem och samtidigt göra kropparna mjuka och lätthanterliga. Nematoderna lades sedan i glycerol i några minuter. Beredning och uppkläring i respektive ättiksyra och glycerol bör göras med försiktighet då nematoderna kan krympa och stelna. Tid i respektive vätskor är ungefärlig och är beroende av nematodens tjocklek. Efter glycerinbadet kan nematoderna läggas under mikroskop för identifiering. Frysning och upptining av dessa nematoder tycks inte skada vävnaden och artbestämning kan göras förutsatt att nematodens kropp är intakt och slät. Differentiering mellan *P. decipiens* och *C. osculatum* görs genom att observera skillnader i den första delen av nematodernas mag-tarmkanal. I sälens magsäck kan nematoderna befinna sig i tre olika mognadsfaser där L3 är ett larvstadium, L4 ett subadult stadium och L5 ett fullvuxet stadium med fullt utvecklade reproduktionsorgan. Identifiering kan göras för att särskilja de olika stadierna och könsbestämning kan göras av L5-nematoder. Man observerar då förekomst av ägg respektive spiculae (hanliga genitalia).

DNA-analys för artbestämning av nematoder

Vid obduktion provtogs vätska från magsäcken för DNA-analys. Prover tagna på magvätska från 51 knubbsälar, 57 gråsälar och en vikare användes för DNA-analys, men resultaten blev bara tillförlitliga för sammanlagt 45 sälar. Det fanns inte tid inom det här projektet att köra om dem (med en modifiering av förarbetet). För 12 av sälarna kördes parallella prover tagna från spriten där de

urplockade nematoderna förvarades. Tio av dessa hade tillförlitliga resultat, men två av dem uppvisade ett mönster som indikerade att de kunde ha blivit ihopblandade. Eftersom tid inte fanns till att köra om dem exkluderades de ur resultatdelen.

Fullständigt beskrivet protokoll för DNA-analyserna finns i **Bilaga 1**. Kortfattat genomfördes analysen enligt följande:

PCR-primrar designades för att uppföröka ett ca 110 baspar (bp) variabelt fragment av den mitokondriella genen 23S. Åtta varianter av varje primer syntetiserades genom att ett åtta bp långt unikt index lades till på 5'-ändan. Primrarna användes i olika kombinationer för att kunna köra upp till 64 prover i samma DNA-bibliotek.

Magvätska blandades och förvarades i en stabiliserande buffert (Stool stabilising buffer, Stratec, Birkenfeld, Germany). DNA extraherades från 250 µl per prov med hjälp av QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) enligt medföljande protokoll.

PCR-reaktionerna utfördes enligt punkten "DNA-amplifiering" i **Bilaga 1**. Sekvensbibliotek preparerades för grupper av upp till 64 PCR-produkter. Biblioteken kontrollerades på 2 % agarosgel. Band av förväntad storlek (adaptersekvenser) skars ut från gelen och renades. Koncentrationen av varje bibliotek mättes, varefter de normaliserades och poolades. Den totala poolen av bibliotek koncentrerades till en volym av 50 µl. DNA-biblioteken sekvenserades på ett Illumina MiSeq-instrument med v2 kit 2x150 bp vid Science for Life Laboratory, Sverige (www.scilifelab.se).

Adaptersekvenser filtrerades och de två sekvenser som erhållits för vardera DNA-fragment (pair-end reads) sammanfogades. Därefter analyserades de sammanfogade sekvenserna. I processen filtrerades primrarna bort, sekvenserna sorterades, antalet kopior av varje unik sekvens räknades och alla sekvenser som hittas färre än tio gånger togs bort. PCR-inducerade fel och sekvensfel identifierades och filtrerades bort. Därefter räknades hur många gånger kvarvarande sekvenser hittas i vardera prov. Sekvenserna matchades till potentiella arter genom jämförelse mot sekvenser i en referensdatabasen EMBL nucleotide collection (Bellemain et al. 2010, Ficetola et al. 2010).

RESULTAT

Parasitbörda och kondition hos torsk

Totalt hittades 401 larver i muskel och lever. I Skåre var 35 av 36 (97 %) torskar infekterade, och 0 - 62 (median 4,5) parasiter per torsk identifierades. I muskel sågs 0 - 9 (median 3) parasiter och i lever 0 - 61 (median 2) parasiter. I Hanöbukten var 11 av 14 (79 %) torskar infekterade, och 0 - 33 (median 4) parasiter per torsk identifierades. I muskel sågs 0 - 4 (median 0) parasiter och i lever 0 - 33 (median 2) parasiter.

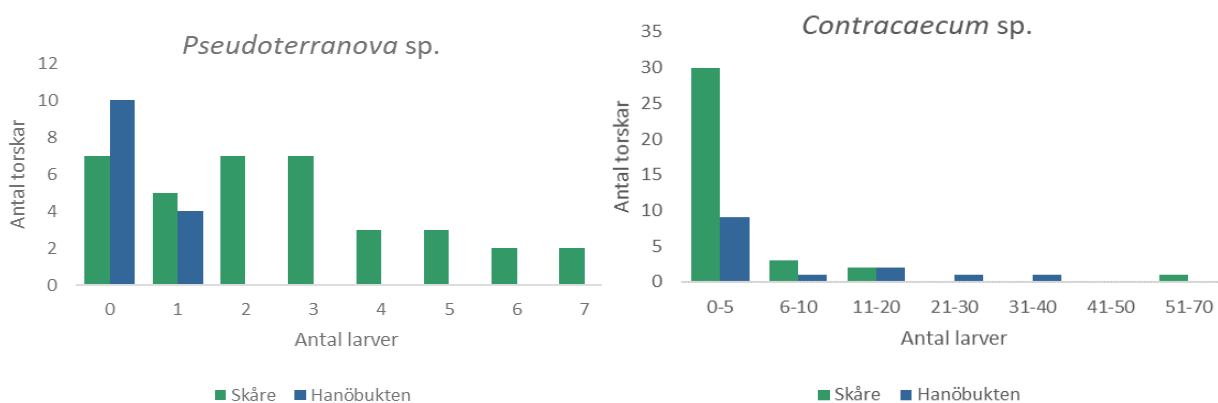
Flest antal larver tillhörde släktena *Contracaecum* sp. (n=242) och *Pseudoterranova* sp. (n=98). *Pseudoterranova* sp. hittades främst i muskel och

Contracaecum sp. hittades endast i lever. Vidare noterades 49 nematoder som okända, nio som hakmask (*Corynosoma* sp.) och tre som *Anisakis* sp.

Förekomsten av *Pseudoterranova* sp. hos infekterade torskar var låg (**Figur 1**). I Skåre hade 28 av 36 (78 %) torskar en till sex *Pseudoterranova* sp. i muskulaturen och åtta torskar hade även enstaka *Pseudoterranova* sp. i levern (median 2 st *Pseudoterranova* sp. per torsk). Fyra av 14 (29 %) torskar från Hanöbukten hade *Pseudoterranova* sp. i muskulaturen, men endast en parasit återfanns i vardera av dessa fyra fiskar (median 0 st *Pseudoterranova* sp. per torsk på lokalen). Inga fynd av parasiten gjordes i lever. Andelen infekterade torskar var signifikant högre i Skåre än i Hanöbukten (χ^2 , $p < 0,001$), och parasitbördan skiljde sig också signifikant (WR, $p < 0,001$) med en högre parasitbörda i Skåre.

Liksom för *Pseudoterranova* sp. hade merparten av torskar infekterade med *Contracaecum* sp. en låg parasitbörda (**Figur 1**). I Båda lokalerna var 50 % av individerna infekterade, dvs. i Skåre 18 av 36 och i Hanöbukten 7 av 14 torskar. Maxnoteringen var 61 *Contracaecum* sp. (median 0,5) i Skåre och 33 *Contracaecum* sp (median 1) i Hanöbukten. Det fanns ingen signifikant skillnad i parasitbörda (WR, $p > 0,05$).

Figur 1: Fördelning av totalt antal larver av *Pseudoterranova* sp. och *Contracaecum* sp. i torsk från Skåre respektive Hanöbukten. Notera att Y-axlarna i de två diagrammen har olika skalor.



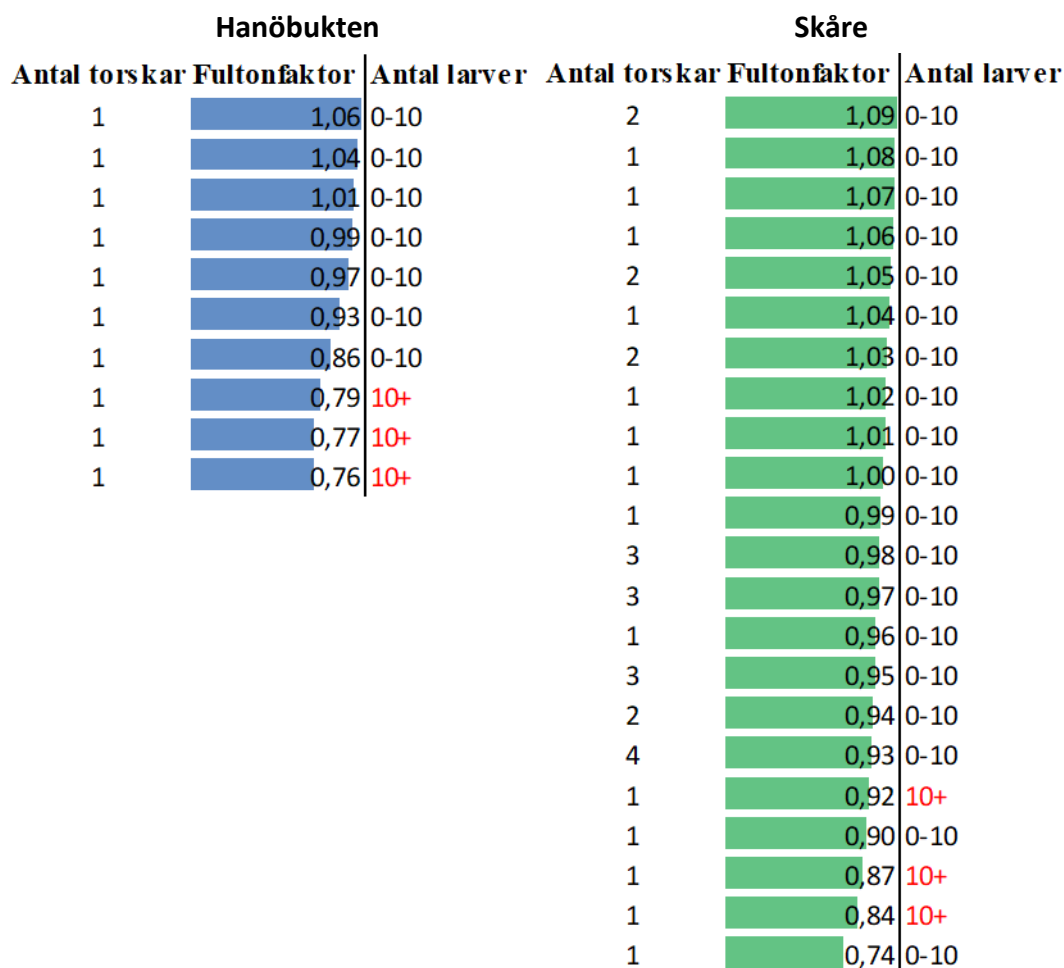
Somatiska data för torsken samt en fullständig notering avseende parasiter som hittades i muskel och lever finns bifogat som bilaga (**Bilaga 2**).

Torsken från Hanöbukten hade en medellängd på 41,5 cm och medelvikt på 610,7 g, med spridning 35,5 cm – 49 cm (n=10) respektive 390 g – 894 g (n=14). Fultonfaktorn var i genomsnitt 0,92 (0,76 - 1,06). Torsken från Skåre hade en medellängd på 49,4 cm och medelvikt på 984,2 g, med spridning 40,5 cm – 55 cm respektive 720 g – 1 621 g. Fultonfaktorn var i genomsnitt 0,97 (0,78 - 1,09).

När Fultonfaktorn och antal identifierade nematodlarver i lever jämfördes grafiskt sågs ett samband mellan låg Fultonfaktor och hög parasitbörda (>10

parasiter/torsk) i både Hanöbukten och Skåre (**Figur 2**). Vid statistisk jämförelse bekräftades sambandet. Fultonfaktorn hos torsk med >10 nematoder var signifikant lägre (WR, $p < 0.001$) än Fultonfaktorn hos torsk med ≤ 10 nematoder i levern.

Figur 2: Fultonfaktor hos torsk fångad i Hanöbukten respektive Skåre i förhållande till antal larver funna i levern. Torsk med samma Fultonfaktor och parasitbörda (2-4 st, Skåre) är sammanslagna till gemensamma staplar.

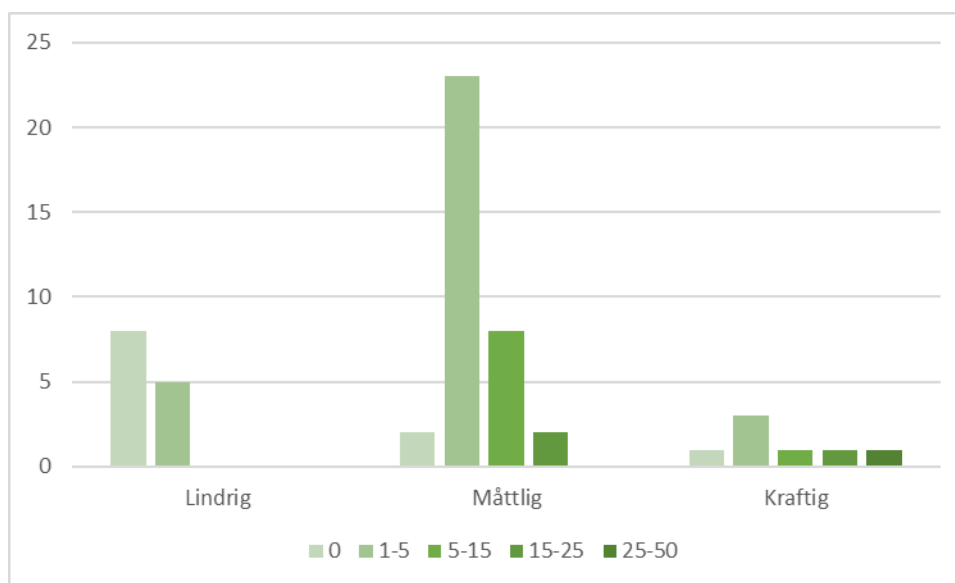


Parasitbörda hos säl

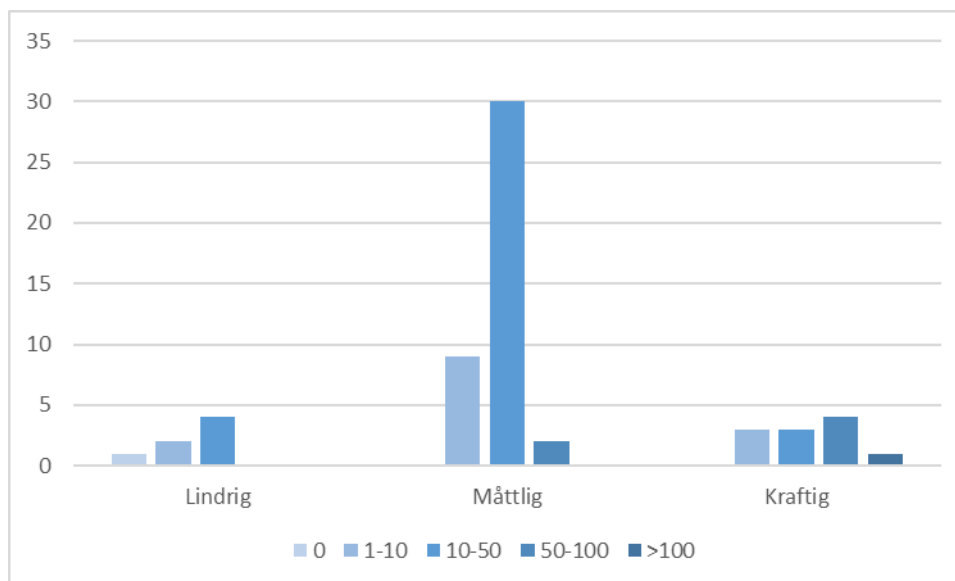
Endast 2 av 41 obducerade vikare hade nematoder i magsäcken. Däremot var alla gråsäl och alla utom en knobbsäl infekterade. Generellt sett hade gråsäl en kraftigare infektion än knobbsäl med omkring 20 gånger så mycket nematoder mätt i gram (**Tabell 1**). Andelen nematoder av större typ (>1,5 - 2 mm tjocka, förmodat reproduktiva nematoder) varierade kraftigt i både knobbsäl och gråsäl (0 - 100 %). På grund av detta bedömdes vikten på nematoderna vara av begränsat värde för jämförelser mellan sälar och en jämförelse med DNA-analysen överflödig. På grund av detta och även problemen med uppkläring av L5 så artbestämdes inga nematoder manuellt. För att möjliggöra fortsatt övervakning den totala mängden nematoder hos sälar togs en

kategorisering (score) fram, separat för knubbsäl och gråsäl för okulär bedömning vid obduktion, baserat på de prover som samlats in. Andelen och antalet stora nematoder bedömdes också. Hos knubbsäl var det vanligt att hitta 0 - 5 st (**Figur 3**). Hos gråsälarna hade majoriteten 10 - 50 stora nematoder men antalet kunde variera stort (**Figur 4**). Bland gråsälarna med en kraftig infektion varierade antalet stora nematoder från noll till över 100 stycken.

Figur 3: Antal stora nematoder (>1,5 - 2 mm tjocka och ca 60 mm långa) hos knubbsälar (n=55) med lindrig-kraftig nematodinfektion i magsäcken



Figur 4: Antal stora nematoder (>1,5 - 2 mm tjocka och ca 60 mm långa) hos gråsälar (n=60) med lindrig-kraftig infektion av nematoder i magsäcken.



En del av sälarna hade fokala skador i magsäckens slemhinna i magsäckens fundusdel: upp till 2 mm i diameter stora erosioner och rester av nematodernas infästningar samt förtjockningar av slemhinnan observerades i dessa områden (**Tabell 1**).

Tabell 1: Genomsnittlig mängd nematoder och proportion infekterade säl med skador i magsäcken

Lokal	Parasitmängd (gram)		Parasitskador i slemhinnan	
	Antal undersökta säl	Medel (max-min)	Antal undersökta säl	Andel av undersökta säl
Bottenviken				
Vikare	1	0,1	1	0
Gråsäl	2	20,9 (17 - 24)	3	66 %
Bottenhavet				
Gråsäl	11	18,9 (7,4 - 39,0)	11	82 %
Egentliga Östersjön				
Gråsäl	15	28,5 (4,1 - 95,6)	17	53 %
Knubbsäl	2	0,65 (0,5 - 0,8)	2	0 %
Västerhavet				
Knubbsäl	14	1,85 (0,24 - 12,6)	20	50 %

Identifiering av arter genom DNA-analys

Vissa prover identifierades enbart till genusnivå då den amplifierade DNA-sekvensen matchade två närbesläktade arter i referensdatabasen.

Pseudoterranova decipiens, *P. cattani* och *P. krabbei* är nästan identiska i det amplifierade segmentet av 23S-genen och programmet identifierade dem enbart som *Pseudoterranova* sp. Därför rapporteras de här som *P. decipiens*, *sensu lato*. *Pseudoterranova krabbei* och *P. decipiens* finns båda i Nordostatlanten (Paggi et al., 2000, McClelland 2002), medan *P. cattani* endast påträffats i östra Stilla havet (McClelland 2002). Sekvenser identifierade som *P. krabbei* och *P. cattani* fanns endast i knubbsäl. *Pseudoterranova cattani* utgjorde 0 - 0,4 % och *P. krabbei* utgjorde 0 - 26 % av den totala mängden sekvenser.

Andelen sekvenser identifierade som *C. osculatum* och *Contracaecum* sp, *P. decipiens sensu lato* och oidentifierade Anisakidae, Ascaridida och Chromadorea redovisas i **Tabell 2**. Nästan hundra procent av sekvenserna identifierades som *C. osculatum* hos de flesta gråsäl och hos knubbsäl blev majoriteten identifierade som *P. decipiens*. Två gråsäl skjutna i egentliga Östersjön och fyra knubbsäl skjutna i Västerhavet hade en uttalat blandad infektion (>1 % av båda parasitarterna), resten av sälarna hade ofta spår av båda

arter (<1 %). *Anisakis simplex* identifierades inte, men det är möjligt att de har hamnat i kategorin oidentifierade Anisakidae.

De parallella proverna från vätska i magsäcken respektive etanol som nematoderna förvarats i visade små skillnader (0 – 4 procentenheters differens) i andel sekvenser.

Tabell 2. Genomsnittlig fördelning av parasitarter i magsäcken hos sälar från olika havsområden. Minsta och högsta andel av respektive parasit-art anges inom parentes.

	<i>Antal säl</i>	<i>Ålder (år)</i>	<i>Contracaecum sp.</i>	<i>Pseudoterranova decipiens sensu lato</i>	<i>Oidentifierade Anisakidae, Ascaridida och Chromadorea</i>
Bottenviken					
Vikare	1	18	99 %	0,002 %	0,002 %
Gråsäl	3	0 - 5	100 % (99,9 - 100 %)	0,003 % (0 - 0,008 %)	0,004 % (0 - 0,01 %)
Bottenhavet					
Gråsäl	11	0 - 25	99,6 % (97,5 - 100 %)	0,2% (0,001 - 2,5 %)	0,1 % (0,001 - 0,05 %)
Egentliga Östersjön					
Gråsäl	22	0 - 24	97,1 % (38,6 - 100 %)	2,9% (0 - 61,4)	0,003 % (0 - 0,013 %)
Knubbsäl	2	d s*	0,07 % (0,005 - 0,02 %)	93,9% (87,9 - 99,9)	6,1 % (0 - 12,1 %)
Västerhavet					
Knubbsäl	20	d s*	7,7 % (0 - 94,4 %)	88,0 % (1,9 - 100 %)	2,5 % (0 - 23,3 %)

*d s: data saknas

DISKUSSION

Torsk

Det sågs en tydlig skillnad i andel torskar infekterade med *Pseudoterranova* sp. mellan de två provtagna lokalerna, där andelen infekterade torskar var högre i Skåre. Liknande resultat, men med lägre andel infekterade individer i båda ICES delområden, redovisas i Lunneryd et al. (2015b), där totalt 1516 torskar från nio områden undersöktes under 2012 - 2013. Liksom i denna studie noterades i Lunneryd et al. (2015b) att merparten av de infekterade torskarna hade ett fåtal nematoder i köttet. Däremot var den maximala parasitbörda av *Pseudoterranova* sp. som uppmättes högre, 32 nematoder (delområde 24) respektive 15 nematoder (delområde 25) i Lunneryd et al. (2015b) än i denna studie. Det förefaller alltså som att förekomsten av torsk med *Pseudoterranova* sp. ökat i de två områdena de senaste åren, men att parasitbördan i infekterade torskar är mindre. Det går dock inte att dra några egentliga slutsatser då provstorleken i denna studie är alldeles för liten för detta. Då andra studier (Nadolna & Podolska 2014; Horbowy et al. 2016; Gay et al. 2018) påvisat ett positivt

samband mellan torskens storlek och parasitbörda skulle detta kunna vara en faktor som påverkar förekomsten av infekterad torsk i vår studie. Medellängden som rapporteras i Lunneryd et al. (2015b) är dock jämförbar med längden på torsken i denna studie. En ytterligare svårighet avseende jämförelse av resultaten ligger i skillnader på fångstmetoder, vilket skulle kunna påverka utfallet. I den här studien fångades dessutom all fisk med nät, medan torsken i den andra studien fångades med olika metoder (trål, nät, burar, ryssjor) (Lunneryd et al., 2015b). Det framgår inte i Lunneryd et al. (2015b) om man sett någon skillnad i andel infekterade torskars respektive parasitbörda hos torskars fångade med olika metoder, men det kan inte uteslutas. Studien av Lunneryd et al. (2015b) inkluderar ett stort antal fiskar, och det lilla provmaterial som ingår i denna studie tillför inte särskilt mycket information avseende *Pseudoterranova* sp. Lunneryd et al. (2015b) såg ingen tydlig koppling mellan Fultonfaktor och parasitbörda. I vår studie sågs däremot en negativ korrelation mellan Fultonfaktor och parasitbörda i lever. Skillnaden mellan studierna kan ligga i att vi korrelerat Fultonfaktorn till parasitbörda i just lever, där *Contracaecum* sp. var den dominerande arten. Levern har inte över huvud taget undersökts avseende parasiter i Lunneryd et al.'s (2015b) studie, även om man noterat att parasiter i levern var vanligt i södra Östersjön, utan där är Fultonfaktorn korrelerad gentemot parasitbörda i muskulatur. Andra studier har visat negativ korrelation mellan fiskens kondition och parasitbörda avseende *Contracaecum* sp. (Horbowy et al., 2016; Sokolova et al., 2018; Mehrdana et al., 2014 (svagt samband)) respektive *Pseudoterranova* sp. (Mehrdana et al., 2014).

Möjligen påverkar en måttlig till stor parasitbörda i levern, som deltar i ämnesomsättningen, mer än en lika stor parasitbörda i muskulaturen. Parasiter i muskulaturen skulle kunna påverka fiskens förmåga till rörelse och därmed jaktkapaciteten, medan parasiter i levern potentiellt påverkar metabolismen och sänker fiskens allmänna kondition genom minskat näringsupptag. Energibrist orsakar då en försämrad jaktförmåga.

På grund av liten provstorlek på torsk i detta projekt, samt att enbart torsk från södra Östersjön undersökts samtidigt som säl från spridda lokaler i Östersjön och västkusten undersökts, går det inte att dra några slutsatser om kopplingen mellan parasitbördan i säl och torsk utifrån projektets resultat. Eftersom torsk agerar mellanvärd och säl huvudvärd för *C. osculatum* och *P. decipiens* kan en ökande sälstam förväntas påverka bördan av dessa parasiter i torsk. Lunneryd et al. (2015b) såg ett tydligt samband mellan hög parasitbörda i torsk i södra Östersjön och närhet till sälkolonier, medan sambandet var mer komplicerat i andra undersökta områden. Även Sokolova et al. (2018) ser en koppling mellan sälthet och parasitbörda i torsken. Däremot finns det motstridiga bevis för att minskande sälpopulationer (på grund av jakt eller sjukdomsutbrott) skulle leda till en minskad infektion hos fisk (se review av McClelland 2002), så frågan är komplex. Kopplingen sälthet - sälmaskbörda i säl - sälmaskbörda i torsk och torskens kondition har antagligen inte heller ett linjärt samband, bland annat eftersom sälmasken har fler mellanvärdar än torsk. Sokolova et al. (2018) påpekar också att sambandet till infektionsintensitet i torsk sannolikt inte bara kan korreleras till säl, utan att faktorer som salthalt och diet bidrar till

situationen (Sokolova et al., 2018). Torskens diet påverkas av vilka bytesdjur som finns i närheten och torskens kondition. Om dieten i huvudsak består av fisk/skaldjur som är infekterade med sälmask blir exponeringen självklart högre. Likaså kanske torsk i dålig kondition har lättare att fånga bytesdjur som är (kraftigt) infekterade med sälmasklarver och nedsätta av infektionen. För att ge en fullständig bild bör därför undersökningar av bland annat torskens diet inkluderas i framtida studier.

En större studie bör genomföras avseende både *Pseudoterranova* sp. och *Contracaecum* sp. i torsk från ett antal lokaler längs den svenska kusten. Detta för att kunna göra en ordentlig utvärdering av sambandet mellan parasitbörda i torsk och säl, tillsammans med dietstudier för att klarlägga samband mellan torskens diet och des parasitbörda. Studien bör göras parallellt med fortsatt övervakning av sälmask i säl. SVA kommer under 2019 - 2020 att medverka i projektet "Parasites in cod and cod condition" (PARACOD, BalticSea2020) genom att hälsoinventera torsken i projektet. Detta relateras sedan till parasitbörda. Detta projekt kan dock inte ersätta en större, longitudinell studie som kan relateras till säl och torskens diet.

Genomsökning på ljusbord är en beprövad och fungerande metod för att hitta larver i torskmuskel. Den tar dock relativt mycket tid i anspråk och små eller ljusa larver riskerar att missas. Om en stor mängd individer ska genomsökas lämpar sig metoden bäst för att göra en snabb, approximativ bedömning. Muskeldigestion för att frigöra parasiter fungerade inte med det protokoll som användes, utan metoden behöver utvecklas om den ska kunna användas rutinmässigt. Däremot var protokollet effektivt för separation av nematodlarver från lever. Med tanke på det stora antal larver som torsk kan hysa, är artbestämning baserat på morfologi en tidsödande metod. För att förbättra både effektiviteten och tillförlitligheten bör därför en visuell bedömning kompletteras med molekylära metoder, särskilt om en större studie eller kontinuerlig övervakning ska genomföras.

Säl

När det gäller säl var variationen i infektionsgrad och antalet nematoder som bedömdes som förmodat reproduktiva hos både gråsäl och knubbsäl påtaglig. Detta kan tyda på skillnader i motståndskraft hos sälen och skillnader i "fitness" hos parasiterna. Fekunditeten hos parasiterna kan påverkas av många faktorer såsom sälens immunförsvar, ålder, diet och hur många parasiter som sälen kontinuerligt exponeras för (McClelland, 2002, Johansen et al., 2010). Variationen kan också vara ett uttryck av att materialet är en samling av "ögonblicksbilder", eftersom åtminstone *P. decipiens* är relativt kortlivade i sälen (i gråsäl 2 - 3 veckor, max 6 veckor) (McClelland, 1980). En potentiell framtida studie skulle därför vara att undersöka andelen parasithonor med ägg för att få ett mått på fekunditeten, vilket i sin tur kan ses som ett mått på spridningsförmåga hos nematoderna i en individuell säl. Skillnader i fekunditet kan sedan studeras i förhållande till exempelvis årstid och sälens ålder och hälsotillstånd (Marcogliese, 1997).

Manuell artbestämning är nödvändig i samband med att nematodernas fekunditet bedöms, särskilt i de fall där blandinfektioner förekommer, men DNA-analys bedöms vara den mest lämpliga metoden för artbestämning vid övervakning av nematoder hos säl. Mängden prover blev i denna studie begränsad men med DNA-analys kan många fler sälar undersökas framledes och retrospektivt så långt tillbaka som ca 2009 eftersom NRM rutinmässigt provtar vätska från sälarnas magsäckar till Miljöprovbanken. Det behövs också en studie för att konfirmera förekomsten av *P. krabbei*.

Resultaten från DNA-analysen visar ett tydligt mönster där *Contracaecum* sp. tycks infektera främst gråsäl och *P. decipiens* sl infektera framför allt knubbsäl. Fler prover bör undersökas för att se om detta håller även i ett större urval av sälar. Vikare skiljde ut sig genom att de väldigt sällan hade nematoder, men däremot lindrigt med cestoder (bandmask), något som inte observerades hos gråsäl och knubbsäl. Förklaringen till de här skillnaderna som är närmast till hands är olikheter i bytesdjur, vilka i sin tur kan vara olika mycket infekterade beroende på exempelvis vilka mellanvärdar som finns tillgängliga i olika områden och vattnets salthalt (Sokolova et al. 2018). Hur sälarna migrerar har då också betydelse. Vad sälarna har ätit kan analyseras med samma typ av metod och på samma prov som nematoderna analyseras på (Tverin et al., 2019). I den här studien kom knubbsälarna från egentliga Östersjön långt västerut ifrån och hörde troligtvis till västkustpopulationen och inte knubbsälspopulationen kring Kalmarsund. Att inkludera de sistnämnda i en studie kan eventuellt ge fler ledtrådar till orsaken till mönstret i resultatet från DNA-analyserna.

De små skillnaderna i resultat mellan parallella prover på vätska från magsäcken och sprit innebär att historiska prover i etanol skulle kunna användas för att gå tillbaka i tiden och undersöka artsammansättning. Eventuellt skulle man också kunna använda sparade prover från grannländer som jämförelse. Det finns dock alltid en risk för viss kontaminering via material (exempelvis en sil) som använts för att plocka ur nematoderna ur magsäcken.

3. RISKER FÖR ÖVERFÖRING AV ZOONOTISK SMITTA FRÅN SÄL TILL MÄNNISKOR

INTRODUKTION

Brucella-bakterier kan orsaka sjukdom (brucellos) hos tama och vilda djur och vissa *Brucella*-arter och stammar kan även smitta människor (så kallad zoonos). Människor kan smittas genom hantering eller konsumtion av infekterade djur. Två nya *Brucella*-arter har upptäckts hos marina däggdjur de senaste 25 åren: *Brucella pinnipedialis* (hos sälar) och *Brucella ceti* (hos valdjur) (Nymo et al., 2011). Nyligen har *Brucella pinnipedialis* för första gången påvisats hos tre gråsälar i Finland (Hirvelä-Koski et al., 2017), d.v.s. i samma gråsälspopulation som även finns i svenska vatten. Bakterier hittades i lever från sälar där det samtidigt fanns inflammatoriska förändringar orsakade av leverflundra, och förekomsten av leverflundra är numera vanlig hos gråsälar i Östersjön (se 1., s 5 - 11). Så vitt vi vet har *Brucella* aldrig påvisats hos svenska marina däggdjur men rutinmässig bakteriologisk undersökning fångar inte upp *Brucella*, då speciella odlingsmedium eller andra särskilda analysmetoder krävs.

Utöver *Brucella* finns det även andra bakterier som kan smitta människor (t.ex. *Salmonella* sp. och *Erysipelothrix rhusiopathiae*, se 1., s 5 - 11) beskrivna hos sälar. Vissa är sjukdomsframkallande även för sälar och andra har hittats inom bakteriologiska undersökningar hos till synes friska sälar. Det finns fortfarande stora kunskapsluckor avseende de bakterier som sälar bär på och betydelsen dessa har för sälens hälsa. En pilotstudie utfördes därför för att undersöka bakterier som förekommer i inflammatoriska förändringar (bland annat bölder) hos sälar för att undersöka förekomsten av *Brucella*-bakterier samt andra bakterier som har betydelsen för människor och/eller sälhälsa.

METODER

Detta projekt genomfördes i samarbete med NRM. Sälpatologen på NRM tar emot kroppar och prover från sälar inom Riksmuseets övervakning av sälhälsa på uppdrag av Naturvårdsverket. De flesta sälar och prover från sälar skjutna under jakt samlas in och sparas i -20 °C tills undersökning och provtagning sker. Provinsamling för denna studie påbörjades i maj 2018 och underlaget var nio gråsälar, fem knubbsälar och tio vikare som antingen hade skjutits under jakt (n=18), strandat (n=5) eller drunknat i fiskeredskap (n=1) (Tabell 4). Två av knubbsälarna skickades direkt till SVA för obduktion och provtagning.

För att maximera chansen att hitta bakterier togs prover endast från inflammatoriska förändringar som hittades vid obduktion (n=25 prover från 24 sälar). Svabbar från förändringarna undersöktes genom rutinmässig aerob odling och *Brucella*-inriktad odling på hästblodagar, blåagar, TSA-agar och på Farrell-medium vid Avdelningen för mikrobiologi, SVA. Identifiering av bakteriearter skedde med hjälp av MaldiToF (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of flight) analys. För att utesluta att bakterier förekom i proverna men av någon anledning inte kunde odlas fram, utfördes

molekylär analys för *Brucella* spp. med så kallad PCR (polymerase chain reaction) på tre prover (**Tabell 4**). Analysen utfördes av avdelningen för mikrobiologi, SVA.

RESULTAT

Resultat från bakterieodling och PCR för *Brucella* spp. presenteras nedan i **Tabell 4**.

Tabell 4: Bakteriologiska undersökningar av inflammatoriska förändringar hos sälar

SVA ID	Sälart	Ålder	Organ	<i>Brucella</i> odling	<i>Brucella</i> PCR	Aerob odling
18-VLT001223	vikare	adult	lunga	negativ	.	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT001224	gråsäl	adult	sköldkörtel	negativ	.	<i>Escherichia coli</i>
18-VLT001268	vikare	adult	livmoder	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001287	knubbsäl	adult	tunga	negativ	.	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT001302	gråsäl	adult	lever	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001303	knubbsäl	okänd	tunga	negativ	.	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT001304	gråsäl	juvenil	lever	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001320	vikare	adult	späck	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001334	knubbsäl	juvenil	tonsill	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001341	knubbsäl	adult	magsäck	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001364	gråsäl	adult	sköldkörtel	negativ	.	<i>Streptococcus pyogenes</i>
18-VLT001365	gråsäl	juvenil	lever	negativ	.	<i>Carnobacterium divergens</i>
18-VLT001366	gråsäl	adult	lever	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001374	gråsäl	adult	lever	negativ	.	<i>Lelliottia amnigena</i>
18-VLT001375	knubbsäl	juvenil	lunga	negativ	.	Koagulasnegativ stafylokokker
18-VLT001414	gråsäl	adult	gallgång	negativ	.	Betahemolyserande streptokocker
18-VLT001433	knubbsäl	juvenil	lunga	negativ	.	Ospecifik blandflora
18-VLT001452	gråsäl	juvenil	lunga	negativ	.	Betahemolyserande streptokocker
18-VLT002072	vikare	juvenil	lever	negativ	.	Betahemolyserande streptokocker
18-VLT002088	knubbsäl	juvenil	tonsill	negativ	negativ	<i>Streptococcus phocae</i>
18-VLT002108	vikare	adult	livmoder	negativ	.	<i>Streptococcus</i> sp.
18-VLT002271	knubbsäl	adult	lymfknuta	negativ	.	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT002289	knubbsäl	juvenil	lever	negativ	.	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT002509	knubbsäl	juvenil	penis	negativ	negativ	<i>Aeromonas</i> sp.
18-VLT002509	knubbsäl	juvenil	lunga	negativ	positiv	<i>Aeromonas</i> sp.

Brucellaodling

Brucella-bakterier kunde inte odlas från något av de 25 organproverna, men DNA från *Brucella* spp. påvisades med PCR-teknik i ett av tre prover som undersöktes med PCR. Analysen genomfördes två gånger för att bekräfta resultaten. Det positiva provet kom från en böld i lungan hos en juvenil knubbsälshane som fastnat och drunknat i fiskeredskap i Östersjön. Efter de positiva PCR-resultaten utfördes ny odling för *Brucella* från den ursprungliga provsvabben och en bit lungvävnad (båda lagrade frysta vid -20°C). Återigen var odlingsresultatet negativt. Ett prov av inflammatoriskt exsudat från penis hos samma knubbsäl var negativt för *Brucella* med både odling och PCR.

Aerob odling

Av de 25 analyserade proven odlades bakterier av potentiell betydelse fram från 17 prover. För de återstående åtta proverna bestod odlingar endast av ospecifik blandflora som inte ansågs vara relevant. De vanligaste sjukdomsframkallande bakterierna som odlades fram var *Aeromonas* sp. (n=7) och streptokocker (n=6). Av streptokockerna identifierades ett isolat som *S. phocae*, ett som *S. pyogenes*, tre som beta-hemolyserande streptokocker (möjligen *S. dysgalactiae*) och det slutliga isolatet kunde inte identifieras mer specifikt än *Streptococcus* sp. MaldiTof- resultatet indikerade *S. marimammalium* men det värde (score) avseende likhet med en bakterieart man får ut vid analysen var inte tillräckligt högt för att säkerställa resultatet. Andra bakterier som identifierades var ett isolat vadera av *E. coli*, koagulasnegativa stafylokocker, *Carnobacterium divergens* och *Lelliottia amnigena*.

DISKUSSION

Brucella

Eftersom *Brucella*-bakterier tidigare har hittats hos gråsäl i Östersjön (Hirvela-Koski et al., 2017) och knubbsäl och en gräsäl i Nordsjön (Prenger-Berninghoff et al., 2008; Siebert et al., 2017), förväntade vi oss att hitta *Brucella* även i svenska sälar. Trots att inga *Brucella*-bakterier kunde odlas från de 25 proverna i denna studie var ett av tre prover som testades med PCR positivt. PCR-analysen är bred och skiljer inte mellan olika arter av *Brucella*, men detta positiva fynd representerar förmodligen *B. pinnipedialis*. Detta är det första beviset på *Brucella*-bakterier hos knubbsäl i Sverige. Finska forskare påvisade *Brucella* i gråsäl från Östersjön (Hirvela-Koski et al., 2017), och även om *Brucella*-bakterier aldrig har påvisats hos vikare i Östersjön påvisade forskare nyligen antikroppar mot *Brucella* i två vikare i Bottniska viken, vilket visar på exponering för *Brucella* (Sonne et al., 2018). Sammanfattningsvis har vi nu bevis för att alla tre sälarter i Sverige är mottagliga för och har smittats med *Brucella*. Ingen av dessa studier ger dock information om förekomsten eller betydelse av infektionen för sälar i svenska vatten och vidare forskning behövs. *Brucella pinnipedialis* anses allmänt inte vara sjukdoms-framkallande för sälar. Forskare tror att det kan finnas en annan reservoar för *B. pinnipedialis*, t.ex. fisk, och att sälar blir smittade, troligen genom sin kost, i en tidig ålder men utvecklar

antikroppar och blir av med infektionen (Nymo et al., 2018). Till stöd för detta har The Scottish Marine Animal Stranding Scheme (SMASS) bara påvisat *Brucella*-infektion hos juvenila sälar, förutom en enda vuxen säl (Nick Davison, personlig kommunikation). Vårt enda positiva prov kom från en juvenil knubbsäl och de två vikarna med antikroppar mot *Brucella* var båda juvenila (Sonne et al., 2018). Däremot kan det skilja sig för gråsälar i Östersjön, då två av de tre djur som var infekterade med *B. pinnipedialis* var vuxna (Hirvela-Koski et al., 2017). Forskare misstänker att immunförsvaret hos gråsälar i Östersjön är försvagat (se 1., s 5 - 11) och i så fall är det möjligt att dessa sälar kan vara mer mottagliga för *Brucella*-orsakad sjukdom. Miljögifter och andra antropogena stressorer kan påverka immunfunktionen och kan bidra till ett försvagat immunförsvaret hos gråsälar i Östersjön. Fördjupade studier, inklusive histopatologisk undersökning, behövs för att bedöma förekomsten och betydelsen av *Brucella* hos sälar i svenska vatten. Den zoonotiska potentialen hos marina *Brucella*-stammar varierar (Nymo et al., 2011) och en undersökning av zoonotiska risker avseende *Brucella* som finns i svenska sälbestånd är önskvärd.

Det är oklart varför *Brucella* inte kunde odlas fram i denna studie. Möjliga förklaringar inkluderar det låga antal prover som undersöktes, låg prevalens av *Brucella* hos svenska sälar, suboptimal provkvalitet eller problem med odlingsmetodiken. Majoriteten av proverna kom från djur som hade varit frysta vid -20°C , ofta i nästan ett år, innan de tinades och prover togs. I dialog med Scottish Marine Animal Stranding Scheme (SMASS) anses att den långa lagringstid vid -20°C var den mest sannolika orsaken till falskt negativa odlingar (Nick Davison, personlig kommunikation). Dålig provkvalitet skulle också förklara varför *Brucella*-arvsmassa kunde påvisades med PCR, även om bakterier inte kunde odlas fram eftersom de var avdödade.

Aerob odling

Våra bakteriologiska fynd från inflammatoriska förändringar överensstämmer med en annan studie (Siebert et al., 2017) av bakteriella infektioner hos sälar. Betahemolyserande streptokocker är en av de vanligaste bakterierna som hittas i samband med inflammatoriska förändringar hos sälar och av dessa påvisas oftast *S. phocae* och *S. dysgalactiae* (Vossen et al., 2004). Vi hade ett bekräftat fall av *S. phocae* i vår studie och även om tre streptokockisolat inte kunde artbestämmas definitivt, så stödde Maldi-Tof- analysen att de var *S. dysgalactiae*. Ett annat streptokock-isolat identifierades potentiellt som *S. marimammalium* av Maldi-Tof och det är en nyligen beskriven bakterie som hittats hos sälar (Lawson et al., 2005). Precis som i vår studie har *Aeromonas* sp. också tidigare rapporterats i samband med bakteriella infektioner hos sälar (Bergman et al., 2007). Medan *E. coli* och stafylokocker som påvisades hos två sälar är kända för att vara sjukdomsframkallande hos sälar och andra djur, är betydelsen av *Carnobacterium divergens* och *Lelliottia amnigena* som odlades från två andra prover okänd. Det finns ingen rapport om *Carnobacterium*-förknippade infektion hos människor men bakterien kan orsaka sjukdom hos fisk. Det finns inga rapporter om *Lelliottia* som sjukdomsframkallande.

Vissa bakterier som påvisades har även orsakat sjukdomar hos fisk. *Streptococcus phocae* har till exempel orsakat sjukdomsutbrott i fiskodlingar (Romalde et al., 2008). Trots att samma bakterieart hittats hos sälar och fisk har molekylära analyser för att ytterligare definiera bakterierna visat att sälar och fiskar har egna underarter av *S. phocae* (Avedaño-Herrera et al., 2014). Nya smittämnen upptäcks kontinuerligt och molekylär epidemiologi är därför ett nyckelverktyg för utredning av smittämnesflöden i den marina miljön.

Sammanfattning, zoonosrisker

Provet med *Brucella* spp. hos en knubbsäl var enbart positivt på PCR, vilket innebär att vi påvisat bakteriens arvs massa men inte hittat levande bakterier genom odling. Inga zoonotiska bakterier har odlats fram i denna pilotstudie, men antalet prover var litet. För vissa zoonotiska bakterier som *Mycoplasma* och *Leptospira* krävs speciella medier och odlingsförhållanden. Undersökning av dessa patogener i framtiden kräver andra metoder och analyser. Dessutom påvisades blandflora i 8 av 25 prover (32 %) vilket kan tyda på dålig provkvalitet (se *Brucella*-diskussion ovan).

4. IDENTIFIERA FRAMTIDA FORSKNINGSBEHOV

Redan när projektet om sälhälsa och säl-/torskmask planerades hade flera punkter avseende framtida forskningsbehov identifierats, delvis beroende på att projektet inte kunde innefatta "allt". De förslag som radades upp var:

1. Finansiering av insamling, obduktioner och analyser samt rapportering/kommunicering av resultat vid akuta sjukdomsutbrott
2. Screening för andra zoonoser än de som inkluderades i denna studie inklusive metodvalidering för serologi då blod inte kan användas.
3. Screening för andra smittämnen (utöver de som skulle kontrolleras i projektet) som påverkar sälhälsa och som gynnas av en ökad sälstam, till exempel morbillivirus (båda sälpest och valpsjuka) och influensa.
4. Undersökning av hälsoläget och väsentliga smittämnen hos andra marina däggdjur, till exempel tumlare.
5. Att kombinera säl-dietstudier med DNA-prov på nematoder för att få ledtrådar till hur nematoderna sprids.

Det projekt som nu genomförts ger en del svar, men även frågetecken som kräver ytterligare studier för att rätas ut, och listan över önskvärda framtida insatser kan göras lång.

När det gäller sälhälsa generellt har vi nu en utförlig beskrivning av vad som hittills har identifierats inom hälsoövervakningen och vid utbrott. Vi bedömer dock att följande upplägg är av vikt för en bättre förståelse av sälhälsan:

- Fördjupade studier om bakomliggande faktorer för aktuella hälsoproblem hos gråsäl (t.ex. tarmsår, leverflundra och minskande späcktjocklek).
- Utöver vidare undersökningar som är inriktad på varje hälsoproblem för sig bedöms det att forskning avseende immunkompetens och immunförsvar hos gräsäl i Östersjön är av största vikt. Ett påverkat immunförsvar skulle kunna ligga bakom flera olika hälsoproblem, och skulle göra gråsäl mer mottagliga för nya sjukdomar.
- Fördjupade studier om påverkan av klimatförändringar på vikare i Bottniska viken. Detta inkluderar både påverkan på stammens tillväxt samt risker för smittsamma sjukdomar och andra faktorer som påverkar sälhälsan negativt.
- Fördjupade studier om påverkan av klimatförändringar på andra sälarter, fram för allt gräsäl i Östersjön (se även Jüssi et al, 2008), är önskvärt.
- Screening för smittämnen som påverkar sälhälsa och som gynnas av en ökad sälstam, till exempel morbillivirus (båda sälpest och valpsjuka) och influensa. Vissa parasiter, t.ex. de med direkt livscykel gynnas av tätare och större salsamlingar och är av intresse att undersöka.
- Med nya analysmetoder som helgenomsekvensering kan även sjukdomsutbrottet 2007 utredas vidare vid SVA i en retrospektiv studie för att definiera detta potentiella hot mot marina däggdjur.
- Undersökning av hälsoläget och väsentliga smittämnen även hos andra marina däggdjur, till exempel tumlare

Vi anser också att det behöver avsättas medel för att planera och förbereda inför nästa sjukdomsutbrott hos marina däggdjur, det vill säga inte bara när det gäller säl utan även till exempel tumlare. Detta inkluderar planering för koordinering av insamling och hantering av kadaver, utförandet av obduktioner och analyser samt rapportering och kommunicering av resultat och eventuella risker för människor och andra djur. Ansvar för alla delar inklusive finansiering behövs tydliggöras.

Avseende säl-/torsksäl finns också luckor som behöver täppas igen och för det behövs både utökade studier i tidsserier på populationsnivå och metodutveckling. De viktigaste punkterna vi ser som framtida forskningsbehov i nuläget är följande:

- Optimering av DNA-analys och analys för de specifika nematodarterna (att kunna skilja ut *P. krabbei* och *A. simplex*), följt av fördjupade studier av parasitförekomst i sälar från framför allt södra Östersjön, för att säkerställa kartläggning av var arterna funnits retrospektivt och i nuläget. Detta för att kunna kartlägga och följa framtida spridning av *P. decipiens* och *C. osculatum* på ett korrekt sätt.
- Undersöka fekunditeten hos nematoderna som ett mått på parasiternas spridningsförmåga i en individuell säl. Skillnader i fekunditet kan sedan studeras i förhållande till interna och externa faktorer såsom årstid, havsområde, diet, sälens ålder och hälsotillstånd för att ta reda på faktorer som kan driva på spridning av parasiterna.
- Studier av parasitförekomst och diet hos knubbsälar på östkusten för att jämföra med knubbsälar på västkusten och gråsälar kan ge ledtrådar till vilka byten som är viktiga för spridning av nematoderna till säl i svenska vatten.
- Övervakning av abundans av gråsäl på västkusten skulle ge information som sammanlagt med övervakning av *C. osculatum* kan ge svar på om en ökning av gråsälspopulationen ger en förändrad incidens av *C. osculatum* i fisk och knubbsäl.
- En longitudinell studie av torsk i flera områden längs kustlinjen, där både parasitbörda och diet undersöks. Parasitbördan bör avse både *Contracaecum* sp. och *Pseudoterranova* sp. då regionala skillnader kan förväntas och för att upptäcka förändringar över tid. En sådan studie kan eventuellt samordnas med en långsiktig vildfiskövervakning om sådan genomförs och torsk är en mållart

När det gäller säl och zoonotiska smittor har vi nu visat att *Brucella* finns i det svenska sälbeståndet, men det är oklart i vilken omfattning och hur det påverkar våra sälar. Risken för zoonotisk överföring är också oklar. Vi anser därför att följande behövs:

- Fördjupade studier om *Brucella*-förekomst hos svenska sälstammar och betydelsen av *Brucella*-förekomst för sälar samt människor som hanterar sälar. Detta inkluderar riktad provtagning och odling av prover som är av hög kvalitet, tillämpning av molekylära metoder för att båda screena för

Brucella och undersöka den molekylära epidemiologin, samt användning av histopatologi för att utforska betydelsen av infektion för sälarna.

- Screening för andra zoonoser, till exempel toxoplasma, influensa, leptospira och trikinförekomst inklusive utveckling och validering av metoder för serologiska undersökningar då blod från kadaver inte kan användas på ett tillförlitligt sätt.
- Fördjupande studier om vilka fiskarter som agerar mellanvärd för zoonotiska leverflundran i svenska fiskbestånd för att identifiera smittrisker till fiskätande djur inklusive människor.

Rapporten har sammanställts av: t.f. statsveterinär Charlotte Axén, biolog Johan Lundgren och laboratorietekniker Sara Johansson, SVA Fisk, sektionschef Aleksija Neimane SVA Patologi och vilt samt intendent Sara Persson, Naturhistoriska riksmuseet. Författarna vill rikta ett stort tack till all övrig inblandad personal vid SVA och NRM som gjort genomförandet av projektet möjligt.

REFERENSER

- Aspholm, P. E., Ugland, K. I., Jødestøl, K. A., Berland, B. (1995). Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in common seals (*Phoca vitulina*) and potential intermediate fish hosts from the outer Oslofjord. *Int J Parasitol* 25(3), 367-373.
- Avendano-Herrera, R., Balboa, S., Castro, N., Gonzalez-Contreras, A., Magarinos, B., Fernandez, J., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (2014). Comparative polyphasic characterization of *Streptococcus phocae* strains with different host origin and description of the subspecies *Streptococcus phocae* subsp. salmonis subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1775-1781.
- Axén, C., Hakhverdyan, M., Boutrup, T.S., Blomkvist, E., Ljunghager, F., Alfjorden, A., Hagström, Å., Olesen, N.J., Juremalm, M., Leijon, M., Valarcher, J.F. (2017). Emergence of a new rhabdovirus associated with mass mortalities in eelpout (*Zoarces viviparus*) in the Baltic Sea. *J Fish Dis* 40(2), 219-229.
- Baumgartner, W., Osterhaus, A.D. (2015). Avian Influenza A(H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals. *Emerg Infect Dis* 21, 720-722.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology* 10(1), 189.
- Bergman, A. (1999). Health condition of the Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*) during two decades. Gynaecological health improvement but increased prevalence of colonic ulcers. *APMIS* 107, 270-282.
- Bergman, A. (2007). Pathological changes in seals in Swedish waters: the relation to environmental pollution: tendencies during a 25-year period. Uppsala: Dept. of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Bergman, A., Järplid, B., Svensson, B.M. (1990). Pathological findings indicative of distemper in European seals. *Vet Microbiol* 23, 331-341.
- Bergman, A., Olsson, M. (1985). Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: Is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finnish Game Res* 44, 47-62.
- Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., Willerslev, E. (2007). The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PloS one* 2(2), e197.

- Bodewes, R., Bestebroer, T.M., van der Vries, E., Verhagen, J.H., Herfst, S., Koopmans, M.P., Fouchier, R.A., Pfankuche, V.M., Wohlsein, P., Siebert, U., Bodewes, R., Morick, D., van de Bildt, M.W., Osinga, N., Rubio García, A., Sánchez Contreras, G.J., Smits, S.L., Reperant, L.A., Kuiken, T., Osterhaus, A.D. (2013). Prevalence of phocine distemper virus specific antibodies: bracing for the next seal epizootic in north-western Europe. *Emerging Microbes Infect* 2, e3-e3.
- Bodewes, R., Zohari, S., Krog, J.S., Hall, M.D., Harder, T.C., Bestebroer, T.M., van de Bildt, M.W., Spronken, M.I., Larsen, L.E., Siebert, U., Wohlsein, P., Puff, C., Seehusen, F., Baumgartner, W., Harkonen, T., Smits, S.L., Herfst, S., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Koopmans, M.P., Kuiken, T. (2016). Spatiotemporal analysis of the genetic diversity of seal influenza A(H10N7) virus, Northwestern Europe. *J Virol* 90(9), 4269-4277
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., Coissac, E. (2016). obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Eco Resour* 16(1) 176-182.
- Buchmann, K., Kania, P. (2012). Emerging *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) problems in Baltic cod, *Gadus morhua* L., associated with grey seal colonization of spawning grounds. *J Fish Dis* 35, 861–866.
- Bäcklin, B.-M., Moraeus, C., Roos, A., Eklöf, E., Lind, Y. (2011). Health and age and sex distributions of Baltic grey seals (*Halichoerus grypus*) collected from bycatch and hunt in the Gulf of Bothnia. *ICES J Mar Sci* 68, 183-188.
- Bäcklin, B.-M., Strömberg, A., Moraeus, C., Härkönen, T., Karlsson, O. (2017). Undersökning av sälar insamlade 2015. Rapport nr 6:2017. Naturhistoriska Riksmuseet. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1136468/FULLTEXT01.pdf>
- Duff, J.P., Bidewell, C.A., Williamson, S.M., Teale, C.J., Stidworthy, M.F., Bexton, S., AbuOun, M., Randall, L., Rogers, J.P. (2016). *Klebsiella pneumoniae* of suspected human origin from free-living common seals on the east coast of England. *Vet Rec* 179, 652.
- European Union Reference Laboratory for Parasites. Artificial digestion of fish fillets for the isolation of Anisakidae and Opisthorchidae larval stages. Standard operation procedure (SOP). Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Unit of Gastroenteric and Tissue Parasitic Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Italien. http://old.iss.it/binary/crlp/cont/SOP_Artificial_digestion_of_fish_fillet.pdf
- Fagerholm, H-P. (1982). Parasites of fish in Finland. VI. Nematodes. *Acta Academiae Aboensis*, Ser. B. 42 (6), 1–128.
- Ficetola, G. F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., Taberlet T., Pompanon, F. (2010). An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC genomics* 11(1), 434.
- Foster, G., Ross, H.M., Patterson, I.A., Reid, R.J., Munro, D.S. (1998). *Salmonella typhimurium* DT104 in a grey seal. *Vet Rec* 142, 615.

- Gay, M., Bao, M., MacKenzie, K., Pascual, S., Buchmann, K., Bourgau, O., Couvreur, C., Mattiucci, S., Paoletti, M., Hastie, L.C., Levsen, A., Pierce, G.J. (2018). Infection levels and species diversity of ascaridoid nematodes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, are correlated with geographic area and fish size. *Fish Res* 202, 90–102.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R. (1999). Emerging Marine Diseases--Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science* 285, 1505-1510.
- Heide-Jørgensen, M.-P., Härkönen, T.J. (1988). Rebuilding seal stocks in the Kattegat-Skagerrak. *Mar Mamm Sci* 4, 231-246.
- Heide-Jørgensen, M.P., Härkönen, T., Dietz, R., Thompson, P. (1992). Retrospective of the 1988 European seal epizootic. *Dis Aquat Org* 13, 37–62
- HELCOM, 2018a. Population trends and abundance of seals. HELCOM core indicator report. <http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/indicators/population-trends-and-abundance-of-seals/>
- HELCOM, 2018b. State of the Baltic Sea – Second HELCOM holistic assessment 2011-2016. *Baltic Sea Environment Proceedings* 155. <http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/holistic-assessments/state-of-the-baltic-sea-2018/reports-and-materials/>
- HELCOM, 2018c. Nutritional status of marine mammals. HELCOM core indicator report. <http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/indicators/nutritional-status-of-seals/>
- Hicks, B.D., Worthy, G.A. (1987). Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers. *J Wildl Dis* 23, 1-6.
- Hirvela-Koski, V., Nylund, M., Skrzypczak, T., Heikkinen, P., Kauhala, K., Jay, M., Isomursu, M. (2017). Isolation of *Brucella pinnipedialis* from Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea. *J Wildl Dis* 53, 850-853.
- Horbowy, J., Podolska, M., Nadolna-Altyn, K. (2016). Increasing occurrence of anisakid nematodes in the liver of cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea: Does infection affect the condition and mortality of fish? *Fish Res* 179, 98-103
- Hårding, K.C., Härkönen, T.J. (1999). Development in the Baltic Grey Seal (*Halichoerus grypus*) and Ringed Seal (*Phoca hispida*) Populations during the 20th Century. *Ambio* 28, 619-627.
- Härkönen, T., Bäcklin, B.M., Barrett, T., Bergman, A., Corteyn, M., Dietz, R., Hårding, K.C., Malmsten, J., Roos, A., Teilmann, J. (2008). Mass mortality in harbour seals and harbour porpoises caused by an unknown pathogen. *Vet Rec* 162, 555-556.
- Härkönen, T., Dietz, R., Reijnders, P., Teilmann, J., Hårding, K., Hall, A., Basseur, S., Siebert, U., Goodman, S.J., Jepson, P.D., Dau Rasmussen, T., Thompson, P. (2006). The 1988 and 2002 phocine distemper virus epidemics in European harbour seals. *Dis Aquat Organ* 68, 115-130.

Härkönen, T., Isakson, E. (2010). Status of harbour seals (*Phoca vitulina*) in the Baltic proper. 2010 NAMMCO Scientific Publications 8, 71-76.

Isomursu, M., Kunnasranta, M. (2011). *Trichinella nativa* in grey seal *Halichoerus grypus*: spill-over from a highly endemic terrestrial ecosystem. J Parasitol 97, 735-736.

Jensen, T., van de Bildt, M., Dietz, H.H., Andersen, T.H., Hammer, A.S., Kuiken, T., Osterhaus, A. (2002). Another phocine distemper outbreak in Europe. Science 297, 209.

Johansen C., Lydersen C., Aspholm P.E., Haug T., & M. Kovacs K.M. (2010) Helminth Parasites in Ringed Seals (*Pusa hispida*) From Svalbard, Norway with Special Emphasis on Nematodes: Variation with Age, Sex, Diet, and Location of Host. J Parasitol 96 (5), 946-953.

Jüssi, M., Härkönen, T., Helle, E., Jüssi, I. (2008). Decreasing ice coverage will reduce the breeding success of Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*) females. Ambio 37, 80-85.

Kuiken, T., Kennedy, S., Barrett, T., Van de Bildt, M.W., Borgsteede, F.H., Brew, S.D., Codd, G.A., Duck, C., Deaville, R., Eybatov, T., Forsyth, M.A., Foster, G., Jepson, P.D., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Ward, C.J., Wilson, S., Osterhaus, A.D. (2006). The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors. Vet Pathol 43, 321-338.

Lawson, P.A., Foster, G., Falsen, E., Collins, M.D. (2005). *Streptococcus marimammalium* sp. nov., isolated from seals. Int J Syst Evol Microbiol 55, 271-274.

Lehnert, K., Raga, J. A., Siebert, U. (2007). Parasites in harbour seals (*Phoca vitulina*) from the German Wadden Sea between two Phocine Distemper Virus epidemics. Helgoland Marine Research 61(4), 239.

Lunneryd, S.G. (1991). Anisakid nematodes in the harbour seal *Phoca vitulina* from the Kattegat-Skagerrak and the Baltic, Ophelia 34(2), 105-115, DOI: 10.1080/00785326.1991.10429699

Lunneryd, S. G., Boström, M. K., Aspholm, P. E. (2015a). Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in grey seals (*Halichoerus grypus*), cod (*Gadus morhua*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) in the Baltic Sea. Parasitol Res 114(1), 257-264.

Lunneryd, S. G., Ljungberg, P., Ovegård, M., Bernt, K., Boström, M. (2015b). Sälmask och spiralmask i torsk och rötsimpa i svenska kustvatten. Aqua reports 2015:1, Sveriges lantbruksuniversitet.

Marcogliese, D. J. (1997). Fecundity of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infecting grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada: lack of density-dependent effects. Int J Parasitol 27(11), 1401-1409.

McClelland, G. (2002). The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, *Nematoda*): a review. Parasitol 124(7), 183-203.

Mehrdana, F., Bahloul, Q.Z., Skov, J., Marana, M.H., Sindberg, D., Mundeling, M., Overgaard, B.C., Korbut, R., Strøm, S.B., Kania, P.W., Buchmann, K. (2014). Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Vet Parasitol* 205(3-4), 581-587.

Muller, G., Groters, S., Siebert, U., Rosenberger, T., Driver, J., König, M., Becher, P., Hetzel, U., Baumgartner, W. (2003). Parapoxvirus infection in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German North Sea. *Vet Pathol* 40, 445-454.

Nadolna K, Podolska M. 2014. Anisakid larvae in the liver of cod (*Gadus morhua*) L. from the southern Baltic Sea. *J Helminthol* 88, 237–246.

Neimanis, A., Härkönen, T., Moraeus, C., Valarcher, J.F., Strömberg, A., Stenström, M., Bergman, A. Bäcklin, B-M., Bröjer, C. and Zohari, S. (2015). Emergence of avian influenza A (H10N7) in harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden associated with a mass mortality event. Conference abstract 64th Wildlife Disease Association annual meeting, Queensland, Australia.

Neimanis, A.S., Moraeus, C., Bergman, A., Bignert, A., Höglund, J., Lundström, K., Strömberg, A., Bäcklin, B.M. (2016). Emergence of the Zoonotic Biliary Trematode *Pseudamphistomum truncatum* in Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea. *PloS One* 11, e0164782.

Nymo, I.H., Rodven, R., Beckmen, K., Larsen, A.K., Tryland, M., Quakenbush, L., Godfroid, J. (2018). Brucella antibodies in Alaskan True Seals and Eared Seals-Two different stories. *Front Vet Sci* 5, 8.

Nymo, I.H., Tryland, M., Godfroid, J. (2011). A review of Brucella infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Vet Res* 42, 93.

Näreaho, A., Eriksson-Kallio, A.M., Heikkinen, P., Snellman, A., Sukura, A., Koski, P. (2017). High prevalence of zoonotic trematodes in roach (*Rutilus rutilus*) in the Gulf of Finland. *Acta Vet Scand* 59, 75.

Osinga, N., Shahi Ferdous, M.M., Morick, D., García Hartmann, M., Ulloa, J.A., Vedder, L., Udo de Haes, H.A., Brakefield, P.M., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T. (2012). Patterns of Stranding and Mortality in Common Seals (*Phoca vitulina*) and Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in The Netherlands between 1979 and 2008. *J Comp Pathol* 147, 550-565.

Osterhaus, A.D., Broeders, H.W., Visser, I.K., Teppema, J.S., Kuiken, T. (1994). Isolation of a parapoxvirus from pox-like lesions in grey seals. *Vet Rec* 135, 601-602.

Osterhaus, A.D.M.E., Groen, J., Uytdehaag, F.G.C.M., Visser, I.K.G., Bildt, M.W.G.V.D., Bergman, A., Klingeborn, B. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature* 338, 209-210.

Paggi, L., Mattiucci, S., Gibson, D. I., Berland, B., Nascetti, G., Cianchi, R., Bullini, L. (2000). *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda,

Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Syst Parasitol* 45(3), 185-197.

Prenger-Berninghoff, E., Siebert, U., Stede, M., König, A., Weiss, R., Baljer, G. (2008). Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German North Sea. *Dis Aquat Organ* 81, 65-71.

Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdes, I., Magarinos, B., de la Fuente, E., Martin, C.S., Avendano-Herrera, R., Toranzo, A.E. (2008). *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet Microbiol* 130, 198-207.

Santestevan, N.A., de Angelis Zvoboda, D., Prichula, J., Pereira, R.I., Wachholz, G.R., Cardoso, L.A., de Moura, T.M., Medeiros, A.W., de Amorin, D.B., Tavares, M., d'Azevedo, P.A., Franco, A.C., Frazzon, J., Frazzon, A.P. (2015). Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal). *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1935-1946.

Schubert, M., Lindgreen, S., Orlando, L. (2016). AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC research notes* 9(1), 88.

Siebert, U., Rademaker, M., Ulrich, S.A., Wohlsein, P., Ronnenberg, K., Prenger-Berninghoff, E. (2017). Bacterial Microbiota in Harbor Seals (*Phoca Vitulina*) from the North Sea of Schleswig-Holstein, Germany, around the Time of Morbillivirus and Influenza Epidemics. *J Wildl Dis* 53, 201-214.

Skov, J., Kania, P.W., Jorgensen, P.R., Buchmann, K. (2008). Molecular and morphometric study of metacercariae and adults of *Pseudoamphistomum truncatum* (Opisthorchiidae) from roach (*Rutilus rutilus*) and wild American mink. *Vet Parasitol* 155, 209-216.

Skrzypczak, M., Rokicki, J., Pawliczka, I., Najda, K., Dzido, J. (2014). Anisakids of seals found on the southern coast of Baltic Sea. *Acta Parasitol* 59(1), 165-172.

Sokolova, M., Buchmann, K., Huwer, B., Kania, P. W., Krumme, U., Galatius, A., Hemmer-Hansen, J., Behrens, J.W. (2018) Spatial patterns in infection of cod *Gadus morhua* with the seal-associated liver worm *Contracaecum osculatum* from the Skagerrak to the central Baltic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 606, 105-116.

Sonne, C., Andersen-Ranberg, E., Rajala, E.L., Agerholm, J.S., Bonefeld-Jorgensen, E., Desforjes, J.P., Eulaers, I., Jenssen, B.M., Koch, A., Rosing-Asvid, A., Siebert, U., Tryland, M., Mulvad, G., Härkönen, T., Acquarone, M., Nordoy, E.S., Dietz, R., Magnusson, U. (2018). Seroprevalence for *Brucella* spp. in Baltic ringed seals (*Phoca hispida*) and East Greenland harp (*Pagophilus groenlandicus*) and hooded (*Cystophora cristata*) seals. *Vet Immunol Immunopathol* 198, 14-18.

Stoddard, R.A., Atwill, E.R., Gulland, F.M.D., Miller, M.A., Dabritz, H.A., Paradies, D.M., Worcester, K.R., Jang, S., Lawrence, J., Byrne, B.A., Conrad, P.A. (2008). Risk Factors for Infection with Pathogenic and Antimicrobial-Resistant Fecal Bacteria in Northern Elephant Seals in California. *Public Health Rep* 123, 360-370.

- Tverin M, Esparza-Salas R, Strömberg A, Tang P, Kokkonen I, Herrero A, Kauhala K, Karlsson O, Tiilikainen R, Vetemaa M, Sinisalo T, Käkälä R, Lundström K. (2019). Complementary methods assessing short and long-term prey of a marine top predator – Application to the grey seal-fishery conflict in the Baltic Sea. PLoS ONE 14(1): e0208694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208694>
- Valtonen, E. T., Fagerholm, H. P., Helle, E. (1988). *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Anisakidae) in fish and seals in Bothnian Bay (northeastern Baltic Sea). Int J Parasitol 18(3), 365-370.
- Vossen, A., Abdulmawjood, A., Lammler, C., Weiss, R., Siebert, U. (2004). Identification and molecular characterization of beta-hemolytic streptococci isolated from harbor seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*) of the German North and Baltic Seas. J Clin Microbiol 42, 469-473.
- Zohari, S., Neimanis, A., Härkönen, T., Moraeus, C., Valarcher, J.F. (2014). Avian influenza A(H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden, March through October 2014. Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 19.

BILAGA 1. PROTOKOLL FÖR DNA-AMPLIFIERING OCH DATAANALYS AVSEENDE ANISAKIDAE FRÅN MAGINNEHÅLL PÅ SÄL

Primerdesign

PCR-primrarna Anisakidae23sF (5'-GCGTGAGGACATTAAGGTAGC-3') och Anisakidae23sR (5'-CGAAGACWTATCTTTGTTTA-3') designades för att amplifiera ett ca 110 baspar (bp) variabelt fragment av den mitokondriella genen 23S. Åtta varianter av varje primer syntetiserades genom att ett åtta bp långt unikt index lades till på 5'-ändan. Detta gjorde det möjligt att blanda PCR-produkter från olika individuella prover (Binladen et al. 2007). De indexerande primrarna användes i olika kombinationer för att kunna köra upp till 64 prover i samma DNA-bibliotek.

DNA-extraktion

Magväska blandades och förvarades i en stabiliserande buffert (Stool stabilising buffer, Stratec, Birkenfeld, Germany). DNA extraherades från 250 µl per prov med hjälp av QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) enligt protokollet Isolation of DNA from stool for human DNA analysis.

DNA-amplifiering

PCR-reaktionerna utfördes med Illustra HostStart RTG beads (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA), 20 pmol av varje primer och 2 µl DNA-extrakt i en total volym på 25 µl. PCR initierades med denaturering vid 95°C i 5 min, följt av 35 cykler med denaturering vid 94°C i 30 s, annealing vid 62°C i 30 s och extension vid 68°C i 30 s. Amplifieringen avslutades med extension vid 72°C.

Preparation av sekvensbibliotek

Sekvensbibliotek preparerades för grupper av upp till 64 PCR-produkter med TruSeq PCR-free kit (Illumina, San Diego, USA). Följande ändring i protokollet gjordes för att minimera risken för PCR-artefakter i de steg som involverar DNA-polymeraser: "end-repair"-steget uteslöts och fosforylering och adenylering av DNA-fragment utfördes i två separata steg. Fosforylering skedde i en volym av 20 µl, inklusive 2,5 µl TruSeq index adapter solution (Illumina), 1 U T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), 1 x T4 DNA Ligase Buffer och 5 % PEG 4000. Proverna inkuberades en timme vid 22°C, följt av 10 min vid 65°C för enzym-inaktivering.

DNA-biblioteken kontrollerades på 2 % agarosgel. Band av förväntad storlek (PCR-produkter plus ligerade adaptorer) skars ut från gelen och renades med QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Därefter mättes koncentrationen av varje bibliotek med Agilent High Sensitivity DNA assay i en Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, USA). Biblioteken normaliserades och poolades utifrån BioAnalyzer-resultaten. Den totala poolen av bibliotek koncentrerades till en volym av 50 µl med MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

DNA-biblioteken sekvenserades på ett Illumina MiSeq-instrument med v2 kit 2x150 bp vid Science for Life Laboratory, Sverige (www.scilifelab.se).

Dataanalys

Adaptersekvenser filtrerades med programmet AdapterRemoval (Schubert et al. 2016). Samma program användes för att kollapsa de två sekvenser som erhållits för vardera DNA-fragment (pair-end reads). De resulterande sekvenserna

analyserades vidare med programmet Obitools 1.2.9 (Boyer et al., 2016) genom att följa manualen vilket innefattar följande steg: 1) filtrera bort PCR-primers och sortera sekvenser till prover enligt adderade index, 2) kollapsa och räkna antal gånger varje unik sekvens förekommer i de filtrerade sekvenserna och ta bort alla sekvenser som totalt sett hittas färre än 10 gånger 3) identifiera och filtrera bort PCR-inducerade fel och sekvensfel 4) räkna det antal gånger kvarvarande sekvenser hittas i vardera prov och som ett mått på förekomst 5) översätta sekvenser till potentiella arter genom att matcha mot en referensdatabas (EMBL nucleotide collection, november 2018) (Bellemain et al. 2010, Ficetola et al. 2010).

**BILAGA 2. TABELL 3: SOMATISKA DATA OCH PARASITFYND I MUSKEL
RESPEKTIVE LEVER HOS TORSK FRÅN HANÖBUKTEN OCH SKÅRE**

Torsk	Kön	Längd (cm)	Vikt (g)	Fulton-faktor	Parasitfynd i muskel					Parasitfynd i lever			
Hanöbukten					<i>Pseudoterra- nova</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Contra- caecum</i> sp.	Hakmask	Okänd	<i>Pseudoterra- nova</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Contra- caecum</i> sp.	Okä
H2	Hona	44	886	1,04	0	0	0	0	0	0	0	3	2
H3	Hona	42,5	777	1,01	0	0	0	0	0	0	0	2	2
H4	Hona	39,5	611	0,99	1	0	0	2	1	0	0	0	0
H5	Hona	35,5	436	0,97	0	0	0	0	1	0	0	0	0
H6	Hona	37	470	0,93	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H7	Hane	45,5	721	0,77	1	0	0	0	0	0	0	14	0
H8	Hona	49	894	0,76	0	0	0	0	0	0	0	30	0
H9	Hona	37	434	0,86	1	0	0	0	1	0	0	0	0
H19	Hona	41,5	568	0,79	0	0	0	0	0	0	0	33	0
H20	Hona	43	842	1,06	1	0	0	0	0	0	0	8	0
H101	Hona	>35	526	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H102	Hona	>35	419	-	0	0	0	0	0	0	0	16	1
H103	Hona	>35	390	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H104	Hona	>35	576	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Skåre													
S1	Hona	48,5	1122	0,98	0	0	0	0	1	0	0	1	1
S2	Hona	47,5	1067	1,00	2	0	0	0	1	0	0	0	1
S3	Hona	48,5	1243	1,09	6	0	0	0	1	1	0	1	1
S4	Hona	47	978	0,94	3	0	0	0	1	0	0	0	0
S5	Hona	48	1127	1,02	4	0	0	0	1	0	0	3	0
S6	Hona	45,5	927	0,98	2	0	0	0	0	0	0	0	1
S7	Hona	51	1233	0,93	4	0	0	0	2	0	0	0	0
S8	Hane	48	1075	0,97	1	0	0	0	0	1	0	0	1
S9	Hona	52	1338	0,95	2	0	0	0	1	1	0	0	1
S10	Hona	49	1096	0,93	1	0	0	0	0	1	0	0	1
S11	Hona	55	1621	0,97	3	0	0	0	1	0	0	9	1
S12	Hona	51	1229	0,93	5	0	0	0	2	0	0	0	0
S13	Hona	45,5	1012	1,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S14	Hona	42	747	1,01	1	0	0	0	0	0	0	2	0
S15	Hona	47	975	0,94	2	0	0	0	0	0	0	0	0
S16	Hane	43	858	1,08	0	0	0	0	0	1	0	1	1
S17	Hona	50	1050	0,84	0	0	0	1	0	0	0	17	0
S18	Hona	46,5	936	0,93	1	0	0	0	1	0	0	0	1
S19	Hona	47	908	0,87	3	0	0	0	0	0	0	16	1
S20	Hona	48	820	0,74	1	0	0	0	0	0	0	1	0
S21	Hona	42	767	1,04	4	0	0	0	0	1	0	1	0
S22	Hane	42,5	763	0,99	0	0	0	0	1	1	0	2	0
S23	Hona	45	835	0,92	0	0	0	0	1	0	0	61	0
S24	Hona	47	1104	1,06	6	0	0	0	0	1	0	0	1

Fortsättning, Tabell 3: somatiska data och parasitfynd i muskel respektive lever hos torsk från Hanöbukten och Skåre

Torsk	Kön	Längd (cm)	Vikt (g)	Fulton-faktor	Parasitfynd i muskel					Parasitfynd i lever			
Skåre					<i>Pseudoterra- nova</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Contra- caecum</i> sp.	Hakmask	Okänd	<i>Pseudoterra- nova</i> sp.	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Contra- caecum</i> sp.	Okänd
S24	Hona	47	1104	1,06	6	0	0	0	0	1	0	0	2
S25	Hane	49,5	1148	0,95	0	0	0	0	0	0	0	1	1
S26	Hane	41,5	678	0,95	2	0	0	0	0	0	0	1	0
S27	Hona	47,5	988	0,92	0	0	0	0	0	0	0	6	2
S28	Hona	46	951	0,98	3	0	0	2	0	0	0	7	0
S29	Hona	43	760	0,96	5	0	0	0	0	0	0	0	0
S30	Hona	43	773	0,97	6	0	0	0	0	0	0	3	0
S31	Hona	42	778	1,05	3	0	0	1	0	0	0	0	0
S32	Hane	47,5	966	0,90	2	0	0	2	1	0	0	0	2
S33	Hona	45	937	1,03	3	0	0	1	1	0	0	3	0
S34	Hane	41,5	754	1,05	4	0	0	0	0	0	0	0	0
S35	Hane	48	1143	1,03	6	1	0	0	2	0	2	0	0
S36	Hona	40,5	725	1,09	1	0	0	0	0	0	0	0	1

