

Undersökningar av anisakida nematoder hos knubbsäl och gråsäl

Sara Persson och Martina Kadin

Rapport nr 4:2020

Dnr 4.1-758-2019

Naturhistoriska Riksmuseet
Enheten för miljöforskning och övervakning
Box 50 007
104 05 Stockholm



Innehåll

Bakgrund	3
Material och metoder	3
Undersökningar vid obduktion.....	4
DNA-analys av vätska från magsäcken.....	4
Spatial uppdelning - obduktionsdata	5
Figur 1. Länskarta över Sverige	5
Spatial uppdelning - DNA-analyser av magvätska.....	5
Figur 2. Karta över Östersjön med de områden som studerades med avseende på spatiala skillnader avseende nematoder hos gråsäl	6
Statistisk analys av DNA-data	6
Resultat.....	7
Undersökningar vid obduktion.....	7
Tabell 1. Antal gråsäl med grad av infektion av nematoder i magsäcken (ej artbestämda) klassad som ingen eller lindrig-kraftig.....	7
Tabell 2. Antal knubbsäl med grad av infektion av nematoder i magsäcken (ej artbestämda) klassad som ingen eller lindrig-kraftig.....	7
Figur 3. Andel gråsäl med lindrig-kraftig infektion av nematoder	8
Figur 4. Andel gråsäl med lindrig-kraftig infektion av nematoder	8
Figur 5. Andelen gråsäl klassificerade på uppskattat antal stora nematoder	9
DNA-analys av vätska från magsäcken.....	9
Figur 6. Förekomst av parasit-DNA i prover från gråsäl och knubbsäl längs svenska kusten	10
Figur 7. Förekomst av parasit-DNA uppdelat på knubbsäl (n = 37) och gråsäl (n = 180).....	10
Figur 8. Förekomst av parasit-DNA hos knubbsäl, uppdelat på populationerna från västkusten och Kalmarsund.....	11
Figur 9. Andelar av parasit-DNA hos knubbsäl, uppdelat på populationerna från västkusten och Kalmarsund.....	11
Figur 10. Förekomst av parasit-DNA hos gråsäl, uppdelat på sälar från fem havsområden.....	12
Figur 11. Andelar av parasit-DNA hos gråsäl, uppdelat på gråsäl från fem havsområden	12
Figur 12. Förekomst av <i>C. osculatum</i> och <i>Pseudoterranova</i> sp. hos gråsäl i Bornholmsbassängen respektive centrala Östersjön under två tidsperioder	13
Diskussion.....	13
Begränsningar med de valda metoderna	13
Undersökningar vid obduktion.....	14
DNA-analys av vätska från magsäcken.....	14
Framtida studier	15
Referenser	15

Bakgrund

Under 2018 undersökte Naturhistoriska riksmuseet på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten förekomst av de parasitära nematoderna *Pseudoterranova decipiens*, *Contraceacum osculatum* och *Anisakis simplex* hos vikare, gråsäl och knobbsäl (rapporterat i SVA/NRM 2019). Livscykeln för dessa parasiter inkluderar flera mellanvärdar så som kräftdjur och olika fiskarter. Huvudvärden för *P. decipiens* och *C.osculatum* är säl, det vill säga parasiternas reproduktion sker i säl, mer specifikt i sälens magsäck. Där 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. Det är de fullvuxna nematoderna som reproducerar sig och ägg utsöndras via sälens avföring. De två arterna går inte att särskilja makroskopiskt vid obduktion. De orsakar sällan allvarliga problem för säl, men ofta observeras lindriga erosioner och rester av nematodernas infästningar i magsäckslemhinnan. Båda nematoderna kan infektera torsk, där *Contraceacum* lägger sig i levern och *Pseudoterranova* lägger sig i muskelvävnad. *A. simplex* har troligtvis tumlare som huvudvärd i svenska vatten, men har påträffats i även sälars magsäckar även om ingen reproduktion av arten har rapporterats i säl. Hos torsk lägger sig denna art utanpå inre organ men ibland även i muskel.

Resultatet av undersökningen 2018 visade att vikare vanligtvis inte har dessa nematoder men enstaka maskar kan ibland ses i magsäcken. Därför inkluderades inte vikare i den här studien. För att på ett fungerande sätt övervaka parasiterna inom miljöövervakningen som sker på sälhälsa togs klassificeringar på infektionsgrad fram. Antalet nematoder som förmodat befinner sig i L5-stadiet togs också fram som ett mycket ungefärligt mått på vilken förmodad äggproduktion varje säl har. Det finns dock många faktorer som kan påverka fekunditeten hos nematoderna, såsom könsfördelningen av L5 hos varje säl, sälens immunförsvar och ålder (Macrogliese 1997, Johansen et al. 2010). Hur stor andel av äggen som sedan infekterar kräftdjur och därefter sprider sig till torsk är okänt, liksom vilka mellanvärdar som viktiga i Östersjön.

Målet med att fortsätta undersökningarna var att undersöka fler sälar än i den tidigare undersökningen för att få en fördjupad kunskap om spatiala och temporala skillnader i utbredningen av nematodarter i magsäcken samt infektionsgraden hos knobbsäl och gråsäl. Obduktionsdata avseende mängden parasiter och antalet förmodat reproduktiva parasiter sammanställdes från sälar med fyndår 2016-2019. DNA-analyser av vätska från sälarnas magsäckar genomfördes på sälar med fyndår 2008-2017 för att studera förekomst och mängd.

Material och metoder

Naturhistoriska riksmuseet samlar på uppdrag av Naturvårdsverket årligen in prover från jakten på gråsäl och knobbsäl. Gråsäl från jakten samlas in under augusti-december. Organpaket från skjutna knobbsäl samlas in under oktober-mars. Även bifångade sälar och sälar funna döda på stränder samlas in året runt. Sälarnas koordinater noteras.

Eftersom bedömningar av mängden parasiter i magsäcken hos sälar startades först 2018 finns inga historiska data att jämföra med. Däremot har DNA-prover tagits från magsäcken hos sälar sedan 2008. Detta resulterade därför i två dataset i den här studien (ett från obduktionsdata och ett från DNA-analyser) som beskrivs och redovisas separat.

Undersökningar vid obduktion

Sälar skjutna eller bifångade mellan år 2016 och 2019 undersöktes för mängden nematoder i magsäcken. Om sälen har digererad mat i magsäcken är det mycket svårt (och mycket tidskrävande) att göra en bedömning av antalet nematoder och därför har dessa sälar inte undersökts. För att bedöma infektionsgraden utarbetades ett scoresystem (beskrivet i en tidigare rapport (SVA/NRM 2019)). För knobbsäl 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, för knobbsäl 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.

DNA-analys av vätska från magsäcken

Artbestämning och kvantifiering av Anisakida nematodararter gjordes genom DNA-analys. Vid obduktioner av sälar har magsaft provtagits i buffert (Stool stabilising buffer, Stratec, Birkenfeld, Germany) direkt vid obduktion, eller så provtogs magsäcksinnehåll som sparats -20 grader. I den här studien inkluderades prover från biobanken från gråsäl och knobbsäl med så stor spatial och temporal utbredning som möjligt.

DNA extraherades från 250 μ l buffert per prov med Mag-Bind Universal Pathogen 96 Kit (Omega Bio-tek Inc, Norcross, USA). PCR-primrar designades för att amplifiera ett ca 110 baspar (bp) variabelt fragment av den mitokondriella genen 16S. 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.

Sex sekvensbibliotek preparerades för grupper av upp till 64 PCR-produkter och kontrollerades på en agarosgel (2%). Band av förväntad storlek (PCR-produkter med ligerade adaptersekvenser) skars ut från gelen och renades. Koncentrationen av varje bibliotek mättes, varefter de normaliserades och poolades i ekvimolära förhållanden. Den totala poolen av bibliotek uppgick till en volym av 30 μ l med en koncentration på 10 nM. DNA-biblioteken sekvenserades på ett Illumina MiSeq-instrument med v3 kit 2x300 bp inställning 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 filterades 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).

I denna studie analyserades de sekvenser som motsvarar *Contraecum osculatum*, *Pseudoterranova* sp. och *Anisakis simplex*.

Spatial uppdelning - obduktionsdata



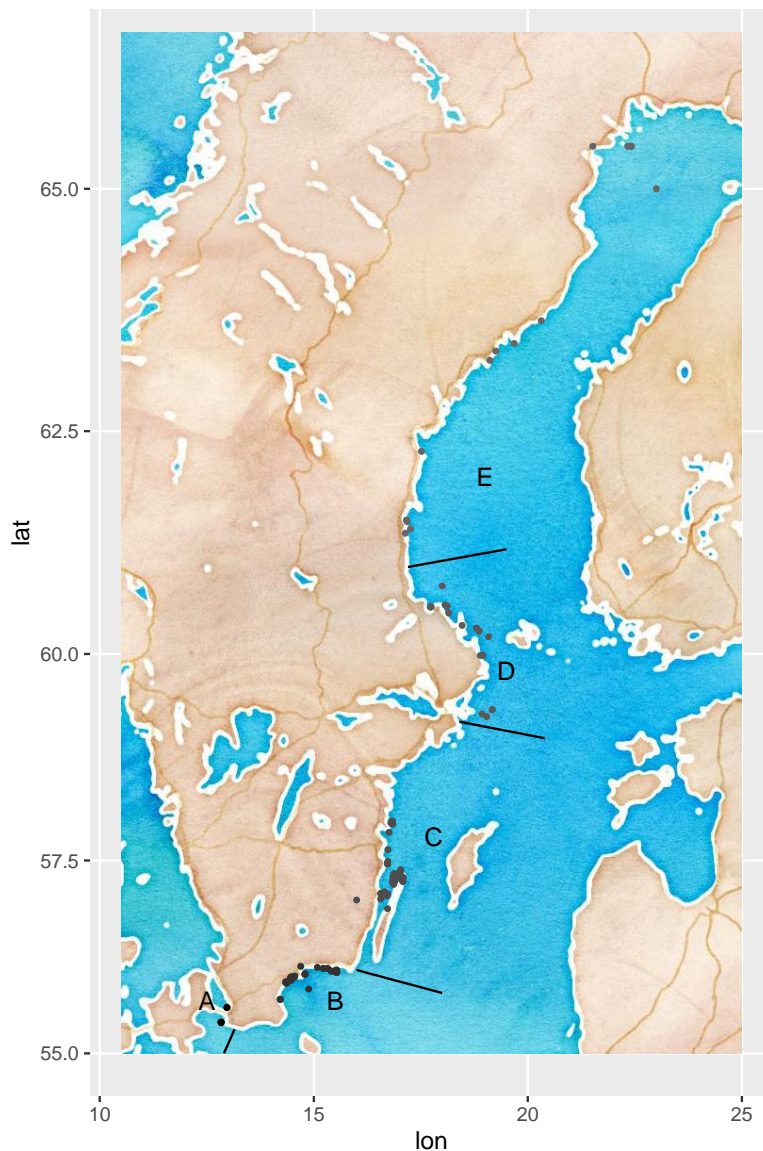
För studien på obduktionsdata delades sälarna in i geografiska områden baserat på länsgränser enligt figur 1. Bottniska viken motsvarar BD och AC län. Bottenhavet motsvarar Y, X och C län. Egentliga Östersjön motsvarar AB, D, E, H, I, K, och M län, dock inte norr om Måkläppen i M län. För att åskådliggöra data delades gråsälarna även in i norra (BD, AC, Y och X län), mellersta (C, AB och E län) och södra Sverige (H, K, M och I län).

Figur 1. Länskarta över Sverige

Spatial uppdelning - DNA-analyser av magvätska

Sälarna som ingick i DNA-analyser delades upp utifrån ekologi. Uppdelningen av gråsäl gjordes utifrån havsområden motsvarande A. Västra Östersjön och Kattegatt, B. Bornholmsbassängen, C. Centrala Östersjön, D. Ålands hav och E. Bottenhavet och Bottenviken (Figur 2).

Det finns två svenska populationer av knobbsäl, en på västkusten och en i Kalmarsund. Resultaten illustreras för de två populationerna, men slutsatser om skillnader mellan populationerna kan inte dras då det fanns för få individer tillgängliga från Kalmarsund.



Figur 2. Karta över Östersjön med de områden som studerades med avseende på spatiala skillnader avseende nematoder hos gråsäl: A. Västra Östersjön och Kattegatt, B. Bornholmsbassängen, C. Centrala Östersjön, D. Ålands hav och E. Bottenhavet och Bottenviken. Prickar i gråskala motsvarar de lokaler som gråsälarna i studien är funna vid (samma punkt kan motsvara mer än en säl).

Statistisk analys av DNA-data

DNA-data för de tre nematodtyperna analyserades som förekomst (Ja eller Nej) och som andelar av all DNA för de tre typerna. När andelen av en parasitart var < 0.2 % i ett prov fanns en risk att enstaka frekvenser kopierats av slumpen istället för att denna DNA-sekvens verkligen fanns med. I dessa fall exkluderades analysresultatet för den arten och förekomsten klassades som Nej. Förekomst av nematoderna totalt analyserades för 228 individer. Skillnader mellan gråsäl (n = 180) och knubbsäl (n = 37) analyserades med χ^2 -test med Yates korrektion eller Fisher-test (när de förväntade frekvenserna var låga). Slutsatser om spatiala skillnader kunde endast dras för gråsäl.

Resultat

Undersökningar vid obduktion

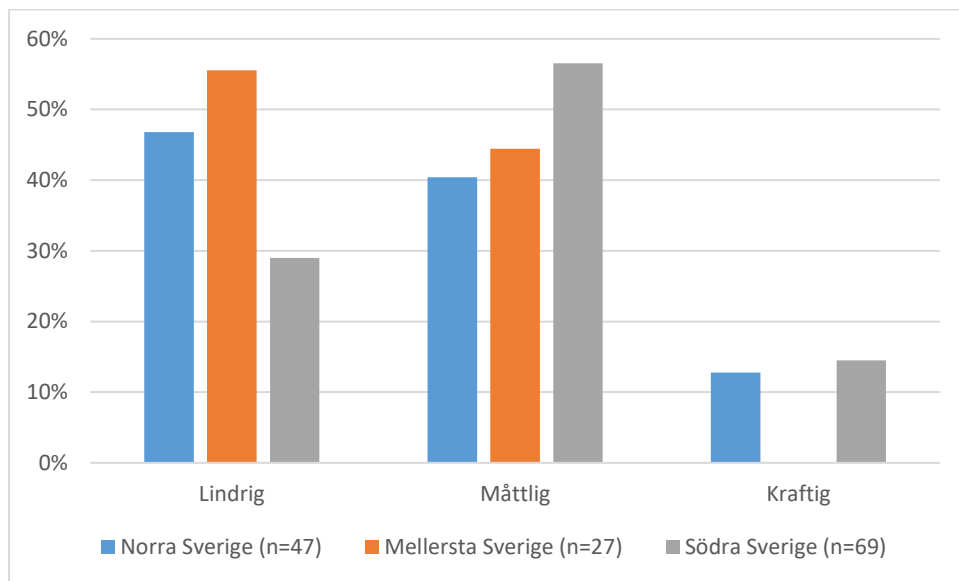
Alla gråsälar med fyndår 2016-2019 undersökta för nematodförekomst hade nematoder i olika mängd, förutom en femårig hane från H län där inga nematoder hittades. Fördelningen av sälar från olika län beskrivs i tabell 1. Tre av totalt 83 (4 %) undersökta knobbsälar var också fria från nematoder (från K, M och O län). Av dessa tre var två årsungar (den tredje var ej åldersbestämd än). Lindrig förekomst av nematoder fanns hos 32 % av knobbsälarna, 54% hade måttlig och 10% hade kraftig infektion. Det fanns för få knobbsälarna från K, M och N län för att kunna undersöka geografiska skillnader (Tabell 2). Observera att gråsäl och knobbsäl är bedömda utifrån olika skalor (se material och metoder, samt SVA/NRM 2019), då infektionsgraden skiljer sig mellan arterna. Gråsäl har generellt större volym parasiter i magsäcken än knobbsäl. Mängden parasiter klassat som lindrig-kraftig infektion hos gråsäl redovisas för olika geografiska områden i figur 3 och 4. Antalet stora nematoder (ca 60 mm långa och >1.5-2 mm tjocka) hos gråsäl redovisas i figur 5. Dessa förekom hos alla gråsälar, men hos knobbsäl sågs infektioner utan stora parasiter i 11 % av fallen (n=64). De flesta gråsälar hade mellan 10-50 st förmodat reproduktiva parasiter, medan det i knobbsäl var vanligast att det fanns upp till 10 st (74 % av 64 knobbsälarna). Ingen knobbsäl hade mer än 50 st stora nematoder, något som däremot sågs hos gråsäl.

Tabell 1. Antal gråsälar med grad av infektion av nematoder i magsäcken (ej artbestämda) klassad som ingen eller lindrig-kraftig

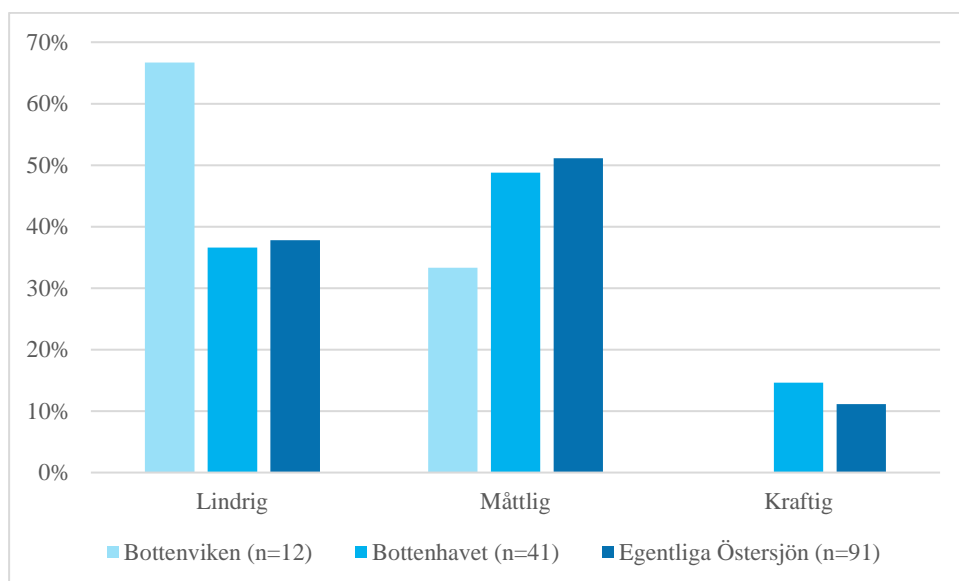
Län	Ingen	Lindrig	Måttlig	Kraftig
BD		3	2	
AC		4	1	
Y		1	0	
X		14	15	6
C		1	5	
AB		7	5	
D				
E		7	2	
H	1	7	8	2
I		11	26	5
K			1	
M		2	4	3

Tabell 2. Antal knobbsälar med grad av infektion av nematoder i magsäcken (ej artbestämda) klassad som ingen eller lindrig-kraftig

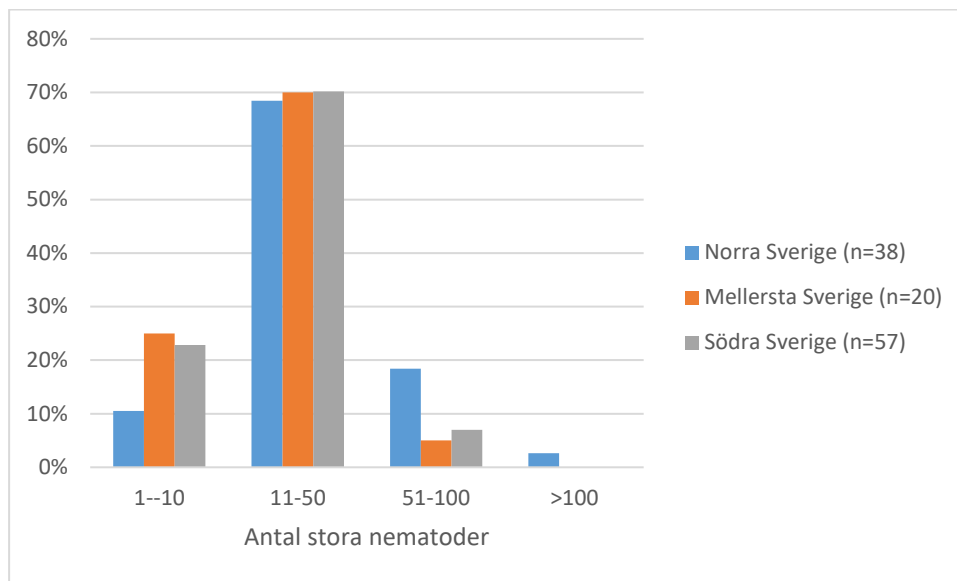
Län	Ingen	Lindrig	Måttlig	Kraftig
K	1	1		
M	1	1		
N		3	6	1
O	1	21	38	7



Figur 3. Andel gräsälar med lindrig-kraftig infektion av nematoder (ej artbestämda) från norra (BD, AC, Y och X län), mellersta (C, AB och E län) och södra Sverige (H, K, M och I län)



Figur 4. Andel gräsälar med lindrig-kraftig infektion av nematoder (ej artbestämda) från olika havsbassänger



Figur 5. Andelen gråsälar klassificerade på uppskattat antal stora nematoder (förmodat reproduktiva, ej artbestämda) från norra (BD, AC, Y och X län), mellersta (C, AB, D och E län) och södra Sverige (H, K, M och I län)

DNA-analys av vätska från magsäcken

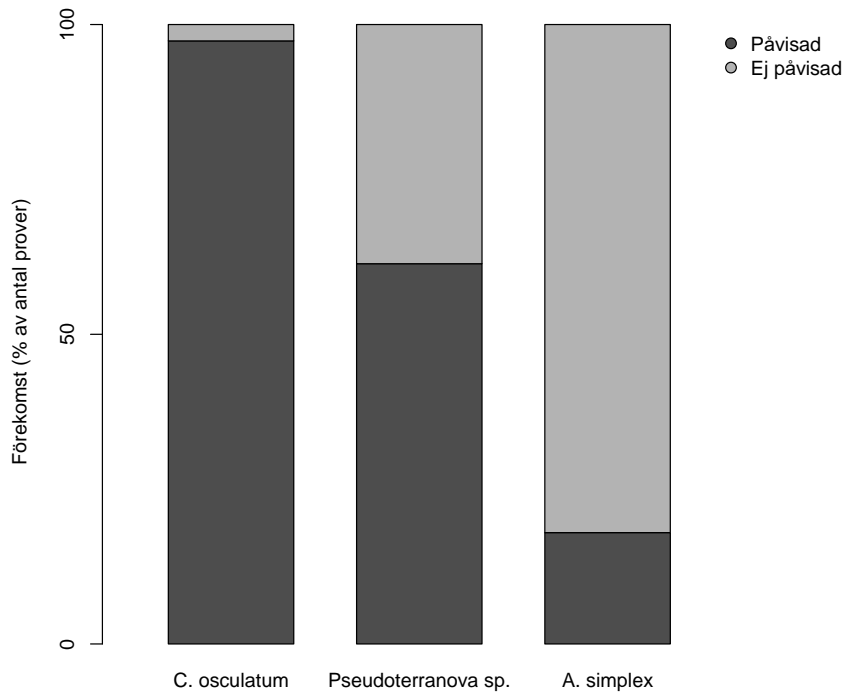
Parasiten *C. osculatum* förekom hos nästan alla undersökta sälar (97,4 %), medan *Pseudoterranova* sp. hittades i 61,4 % av proverna (Figur 6). Nematoden *A. simplex* förekom också i 18,0 % av sälarna.

Förekomsten av de tre parasitarterna skiljde sig mellan gråsäl och knubbsäl (Figur 7). Skillnaderna var signifikanta (*C. osculatum*: Fisher-test, $p < 0.001$; *Pseudoterranova* sp.: $\chi^2 = 15,7$ d.f. = 1, $p < 0.0001$; *A. simplex*: $\chi^2 = 26,0$ d.f. = 1, $p < 0.0001$) och därför analyserades gråsäl och knubbsäl separat.

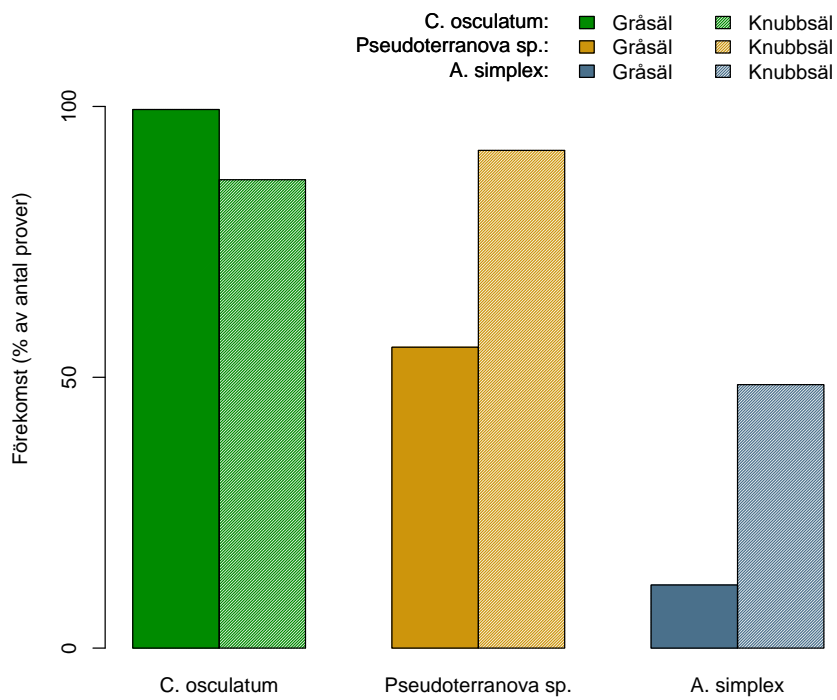
Hos knubbsäl var skillnaden i förekomst mellan de två populationerna relativt liten, sett i relation till antalet individer som provtagits från Kalmarsundspopulationen (Figur 8). Skillnaderna i parasiternas andel (av den totala mängden parasit-DNA hos varje säl) mellan de två populationerna var också små, relativt antalet provtagna (Figur 9).

Förekomsten av *C. osculatum* hos gråsäl varierade inte mellan havsområden, utan var mycket hög på alla fem platser (Figur 10). För *Pseudoterranova* sp. och i viss utsträckning *A. simplex* fanns däremot en trend där förekomsten minskade längre in i Östersjön och längre norrut (Figur 10). Sett till andelen av DNA syntes i stort samma rumsliga trend för *Pseudoterranova* sp. och *A. simplex*. Andelen *C. osculatum* visade motsatt mönster och ökade längre norrut (Figur 11).

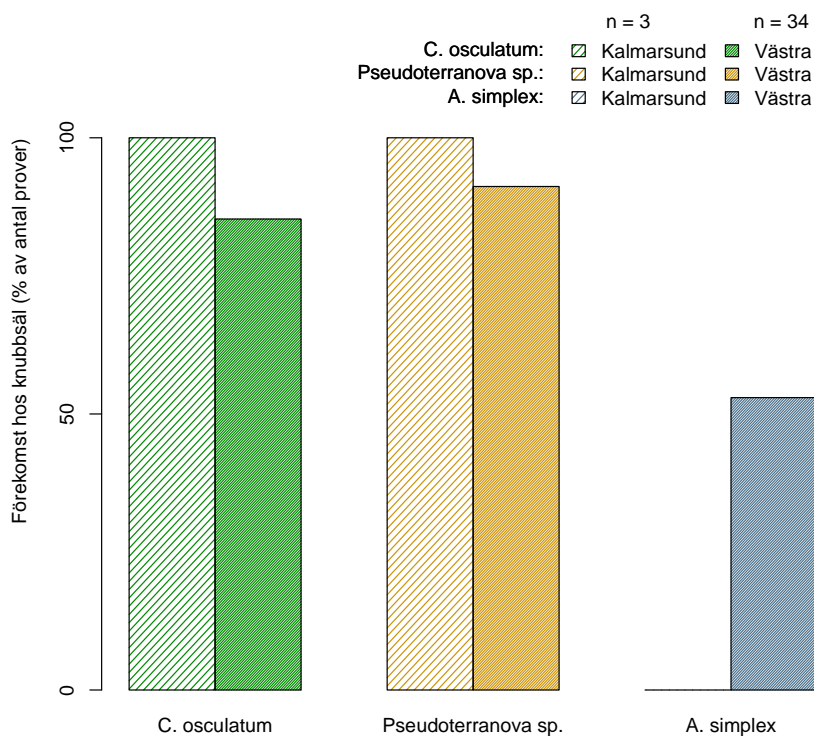
Vi fann inte några skillnader över tid i förekomsten av *C. osculatum* eller *Pseudoterranova* sp. hos gråsäl i Bornholmsbassängen (Figur 12). I centrala Östersjön fanns ingen skillnad över tid i *C. osculatum*-förekomst, men förekomsten av *Pseudoterranova* sp. var lägre 2015-2017 än tidigare studieår (Figur 12).



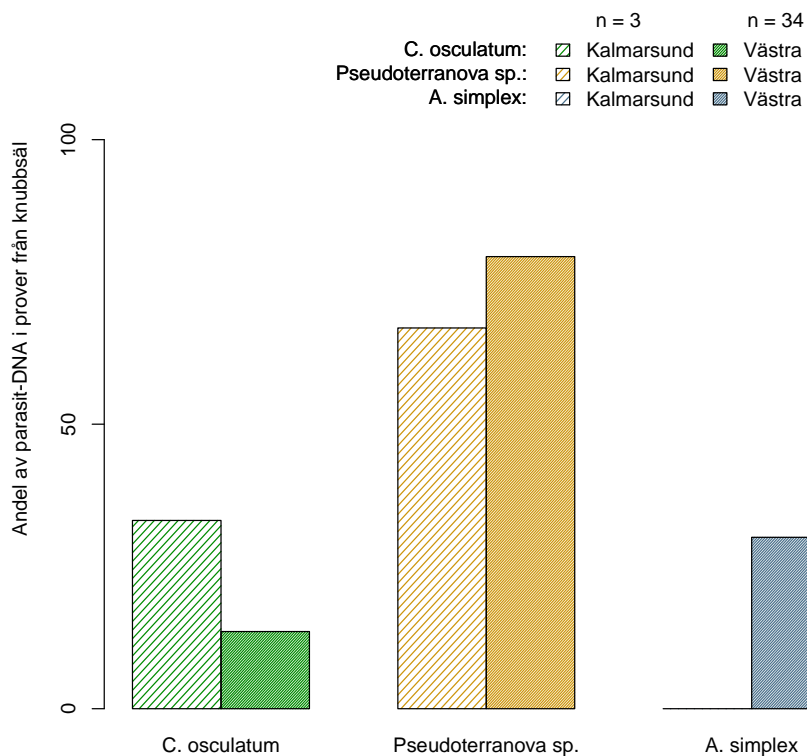
Figur 6. Förekomst av parasit-DNA i prover från gråsäl och knubbsäl längs svenska kusten (n = 228, samtliga år och fyndlokaler ingår).



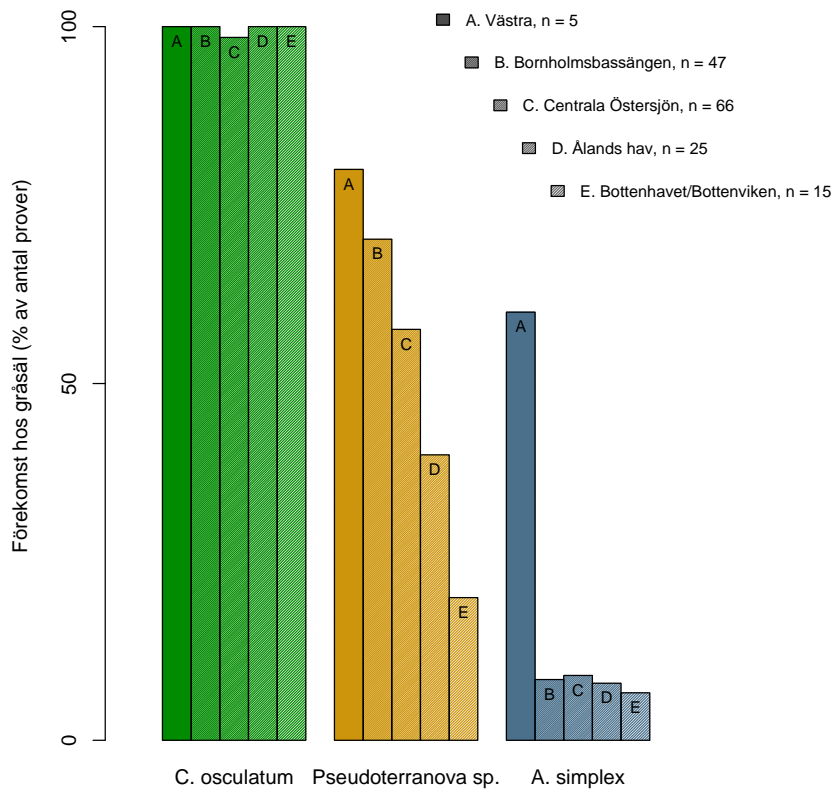
Figur 7. Förekomst av parasit-DNA uppdelat på knubbsäl (n = 37) och gråsäl (n = 180).



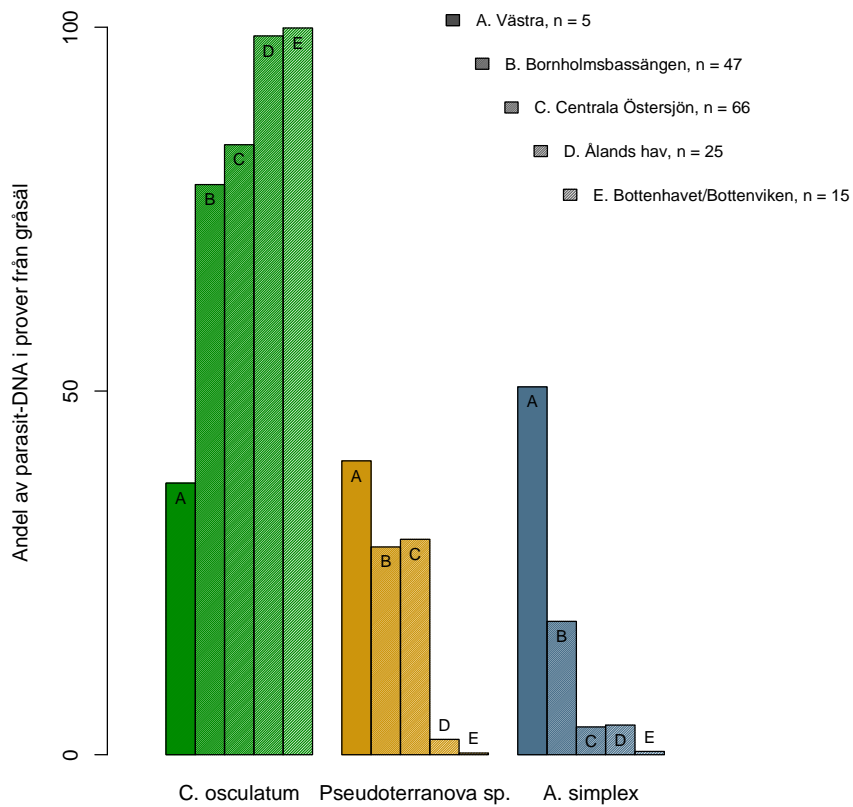
Figur 8. Förekomst av parasit-DNA hos knubbsäl, uppdelat på populationerna från västkusten och Kalmarsund. Notera det låga antalet individer från Kalmarsund.



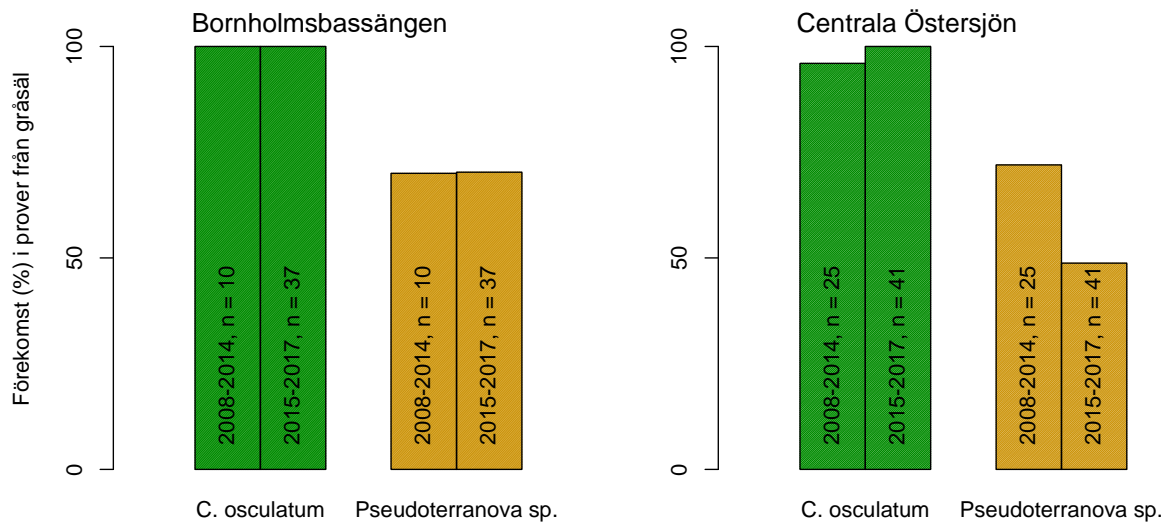
Figur 9. Andelar av parasit-DNA hos knubbsäl, uppdelat på populationerna från västkusten och Kalmarsund. Notera det låga antalet individer från Kalmarsund.



Figur 10. Förekomst av parasit-DNA hos gråsäl, uppdelat på sälar från fem havsområden (se figur 2).



Figur 11. Andelar av parasit-DNA hos gråsäl, uppdelat på gråsäl från fem havsområden (se figur 2).



Figur 12. Förekomst av *C. osculatum* och *Pseudoterranova sp.* hos gråsäl i Bornholmsbassängen respektive centrala Östersjön under två tidsperioder.

Diskussion

Begränsningar med de valda metoderna

Att bedöma mängden parasiter enligt ett score innebär en osäkerhet pga grova klassificeringar och att risken finns att bedömningen skiljer sig mellan två personer. Fördelen är dock att det går väsentligt snabbare vid obduktion och gör bedömningen genomförbar inom det pågående övervakningsprogrammet. Antalet förmodat reproduktiva parasiter är en mycket grov uppskattning som bör utvecklas vidare för att säkert kunna utvärdera varje individs spridningsförmåga (i just det ögonblicket). Sälarnas ålder, kön eller säsong kan påverka mängden parasiter (McClelland, 2002). En annan felkälla till bedömningen av mängden parasiter är att sälen kan kräkas i samband med drunkning.

Undersökning av arternas förekomst i säl med hjälp av DNA visar om parasit-DNA finns eller inte, men DNA-sekvenser kan inte översättas till mängden parasiter eller indikera hur många ägg som sprids från varje säl. Andelen parasit-DNA som sekvenseras från varje art i sälen kan ses som ett grovt mått på hur mycket DNA som fanns av varje art i provet. Det faktiska förhållandet mellan arterna i magvätskan kan dock vara annorlunda. Antalet DNA-sekvenser i slutresultatet kan till exempel påverkas av parasiternas fysiologi som avgör hur lätt DNA erhålls och de olika primrarna kan skilja i effektivitet mellan arterna. Eftersom förhållandena mellan *C. osculatum* och *Pseudoterranova sp.* är motsatta i olika individer är det dock en indikation på att metoden fångar upp den vanligaste arten och att andelar är ett relevant mått att studera.

Även parasiter med andra huvudvärdar än säl kan fångas upp i DNA-analysen. I denna studie förekom *Anisakis simplex* som har tumlare som huvudvärd. Det finns inga rapporter om att *A. simplex* reproducerar sig i säl. I stället är det sannolikt att DNA från *A. simplex* härrör från infekterad fisk som sälen konsumerat, men som nödvändigtvis inte behöver uppehålla sig en längre tid i sälens magsäck.

Undersökningar vid obduktion

Infektionsgraden av nematoder i gråsäl i olika områden sammanställdes för havsbassängerna men även baserat på länsgränser. Det gav lite olika resultat (Figur 3 och 4), men det kan uttolkas att gråsäl längre norrut oftare har en lindrig infektion och sälar längre söderut har en måttlig infektion, men även att antalet gråsäl med kraftig infektion inte verkar bero på geografiskt område. Fler sälar behöver undersökas för att få bättre geografisk täckning. Det är till exempel bara tio gråsäl från Skåne och Blekinge län som är undersökta och det behövs fler för att kunna dra några slutsatser om det området (Tabell 1). En geografisk skillnad som kan uttolkas i figur 5 är att gråsälarna från norra Sverige (BD, AC, Y och X län) oftare har en kraftigare förekomst av stora nematoder än gråsälarna från mellersta och södra Sverige. Sammantaget blir bilden att sälar i norr generellt har lindrig infektion men förekommer oftare ett större antal stora, förmodat reproduktiva nematoder. Sälarna i mellersta Sverige har ofta en lindrig till måttlig infektion medan sälarna från söder har en övervikt på måttlig infektion. Antalet stora, förmodat reproduktiva nematoder verkar inte skilja sig mellan mellersta och södra Sverige. Vanligtvis har knubbsäl färre av dessa än gråsäl, vilket kan tolkas som att knubbsäl sprider färre ägg men detta behöver undersökas närmre för att avgöra om det stämmer eftersom det finns andra faktorer som kan påverka fekunditeten. Fekunditeten hos *Pseudoterranova decipiens* har setts öka med ökande längd på de köns mogna parasiterna och korrelerar även med ökande mängd nematoder av hankön (Macrogliose 1997).

Eftersom det inte kommer in så många sälar till NRM från vissa områden bör undersökningarna fortsätta för att kunna ha data att jämföra med i framtiden, särskilt om man vill undersöka geografiska skillnader.

DNA-analys av vätska från magsäcken

Förekomsten av *Contracaecum osculatum* var högre hos gråsäl än knubbsäl, medan *Pseudoterranova sp.* och *A. simplex* förekom i högre utsträckning hos knubbsäl. Antalet knubbsäl i Kalmarsundspopulationen var för litet för en kvantitativ analys av skillnader mellan populationer, medan vi fann spatiala mönster hos gråsäl. Det är möjligt att skillnaderna vi ser mellan grå- och knubbsäl inte beror på hur värdspecifika parasiterna är i Östersjön, utan mönstren kan istället bero på de uttalade miljögradienterna (ex temperatur och salthalt) i området. Variation i tillgängliga mellanvärdar och sälarnas diet kan också ha betydelse (Aspholm et al., 1995).

C. osculatum var den dominerande parasiten och återfanns hos de flesta gråsäl och knubbsäl. En svag antydning till att andelen DNA från *C. osculatum* minskade ju längre söderut/västerut gråsäl befann sig kan anas (Figur 11). Förekomst av *Contracaecum sp.* hos torsk i Ålands hav, Hanöbukten och Skåre undersöktes av SVA 2018 och 2019 (SVA 2019). Man fann att torsken i Ålands hav hade fler parasiter (median 16) jämfört med Hanöbukten (median 4) och Skåre (median 2), men antalet parasiter hade även ett tydligt samband med att torskarna från Ålands hav var större. Ingen jämförelse gjordes mellan de torskarna som var lika stora.

I en studie gjord av Lunneryd m. fl. (2015) undersöktes 37 sälar funna 2001-2005 i ICES delområde 27 (motsvarande område C, centrala Östersjön i den här studien, se figur 2). I fem av dessa (13,5%) återfanns *Pseudoterranova decipiens* i magsäcken. I vår studie påträffades DNA från *Pseudoterranova sp.* i 49 % av gråsälsmagarna från 2015-2017 (n = 66, figur 12). Det verkar således som att *Pseudoterranova*-förekomsten hos gråsäl har ökat i detta område över tid. Dock är DNA-analysen sannolikt känsligare än manuell undersökning och kan plocka upp DNA från parasiter i bytet som kanske inte blir en viabel parasit som stannar i magsäcken på sälen. Därför ska resultaten från dessa

olika metoder jämföras med försiktighet. I samma område ser vi i vår studie dessutom en trolig minskning av förekomsten av *Pseudoterranova sp* från 2008-2014 till 2015-2017, vilket talar emot en generell ökning över tid. I och med att hänsyn inte har tagits till andra möjliga påverkande faktorer såsom ålder och säsong i analysen bör även detta tolkas försiktigt.

Lunneryd m. fl. (2015) undersökte också förekomsten av *Pseudoterranova decipiens* i torskmuskel och fann att andelen infekterade torskar minskade ju högre norrut de var fångade. Detta stämmer överens med resultatet i den här studien: förekomsten av *Pseudoterranova sp* hos gråsälar minskar norrut. Lunneryd m fl tillskriver det spatiala mönstret till salthalt, eller någon annan faktor som korrelerar med salthalten i vattnet. Även vattentemperaturer kan påverka då tiden det tar för larverna att kläckas har observerats bli kortare med ökande temperaturer (5, 10 och 15 grader), däremot minskar överlevnadstiden hos de kläckta larverna (Measures 1996).

Framtida studier

Det vore intressant med ytterligare upplösning av spatiala mönster. Detta för att få fördjupad kunskap om det exempelvis finns "hotspots" med hög parasitförekomst runt sälkolonier, särskilt i områden nära torskens kärnområden. Vidare vore fler knubbsälsindivider från Kalmarsundspopulationen intressanta att studera, för att kunna jämföra spatiala mönster mellan arterna och därmed kunna avgöra om utbredningen av olika slutvärdar eller miljöfaktorer har störst inflytande på parasittrycket. De tydliga gradienterna i temperatur eller salthalt kan förväntas ha stor betydelse för nematodernas överlevnad och spridning i Östersjön. Det är också tänkbart att det bräckta vattnet har medfört särskilda anpassningar hos parasiterna.

Studier av hur dessa parasiter reproducerar sig i olika sälarter vore också värdefullt för att förstå hur sälarnas utbredning påverkar torsk och andra mellanvärdar. Genom att artbestämma nematoder i reproduktiva stadier som hittas under obduktioner och undersöka äggförekomst kan detta kvantifieras.

Tack

Tack till Petter Larsson och Rodrigo Esparza-Salas för utförda DNA-analyser. Tack till Britt-Marie Bäcklin, Mariam Khammari, Neele Doose, Jannike Ring och för genomförda undersökningar på säl under 2019. Tack till Niclas Gyllenstrand och Thomas Källman för goda råd.

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.

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.

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.

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.

Lunneryd, S. G., Boström, M. K., Aspholm, P. E. (2015). 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.

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

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

Measures, L. (1996) Effect of temperature and salinity on development and survival of eggs and free-living larvae of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53(12):2804-2807

SVA/NRM (2019). Sälhälsa, zoonosrisker, säl- och torsksmask. Sveriges veterinärmedicinska anstalt och Naturhistoriska riksmuseet. Rapport 2019-02-15 Dnr 2018/278

SVA (2019). Rapport avseende undersökningar av *Contracaecum* sp. I torsk från Ålands hav. Sveriges veterinärmedicinska anstalt Rapport 2019-10-07 Dnr 2019/764