

Kartläggning av omfattningen av sårskadad fisk i Hanöbukten

Redovisning av regeringsuppdrag
M2014/1349 Nm





FÖRORD

Regeringen gav i maj 2014 Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) i uppdrag att i samråd med Havs- och vattenmyndigheten (HaV) och efter samråd med Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och Statens jordbruksverk (SJV), kartlägga omfattningen av sårskadad fisk i Hanöbukten. I uppdraget ingick att utreda orsakerna till att skador uppkommer samt att redovisa en plan för vidare uppföljning av sjukdomstillståndet hos vilda fiskpopulationer. SVA har i samarbete med SLU tagit fram ett förslag på en sådan plan. Rapporten är därför indelad i två delar.

Arbetet har genomförts av bitr. statsveterinär Marlene Areskog och t.f. statsveterinär Charlotte Axén, med hjälp av bitr. statsveterinär Anna-Maria Andersson och forskare Gunnar Andersson, SVA, forskare Vidar Öresland, forskningsassistent Anna Lingman, forskare Jens Olsson, forskare Ann-Britt Florin, samtliga SLU, doktor Thomas Lang, Thünen-Institut für Fischereiökologie, Cuxhaven, Tyskland, intendent Suzanne Faxneld, Naturhistoriska riksmuseet, forskare Johanna Qvarnström, Totalförsvarets forskningsinstitut, samt utredare Fredrik Ljunghager, HaV. Lokala yrkesfiskare i Hanöbuktsområdet har bidragit med insamling av fisk.

Statens veterinärmedicinska anstalt februari 2016

A handwritten signature in purple ink, appearing to be 'JM', is written over the name Jens Mattsson.

Jens Mattsson, Generaldirektör

Innehåll

FÖRORD	2
SAMMANFATTNING	5
Del 1.....	5
Del 2.....	6
Del 1: Kartläggning av omfattningen av sårskadad fisk i Hanöbukten.....	7
INLEDNING	7
Uppdraget.....	7
Genomförande	8
BAKGRUND	9
Situationen i Hanöbukten.....	9
Om fisksjukdomar och fiskhälsa	9
Faktorer som påverkar utveckling av fisksjukdomar	10
MATERIAL OCH METODER	11
Insamling av data och material	11
Obduktion och analysmetoder	12
Kemiska analyser.....	13
RESULTAT	13
Prevalens, sårskadad fisk	13
Kondition, insamlad fisk och trålad fisk	16
Obduktionsresultat	19
Bakterier.....	19
Virus	19
Parasiter.....	20
Svamp.....	20
Histologiska undersökningar	20
Sårtyper	21
Kemiska analyser.....	22
Obduktionsbilder	23
DISKUSSION.....	32
Del 2. Uppföljning och övervakning av sjukdomstillståndet hos vilda fiskpopulationer	36
BAKGRUND	36
Sjukdomars betydelse	36
Förutsättningar för kunskapsinhämtning.....	37
DET FÖRESLAGNA PROGRAMMET	37
Syfte.....	37

Finansiering och programutveckling	38
Programmets utformning	38
Akutfond	39
Diagnostiska metoder	40
Uppstart av programmet	40
Utbildning	40
REFERENSER	42
BILAGOR	45
Bilaga 1. Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk.....	45
.....	45
Bilaga 2. Budgetplan för Uppföljning och övervakning av sjukdomstillståndet hos vilda fiskpopulationer	52

SAMMANFATTNING

DEL 1

Hanöbuktsutredningen startade år 2011 efter larmrapporter om minskade fiskbestånd, sårskadade fiskar och brunt, illaluktande vatten. Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) fick år 2014 i uppdrag att i samråd med Havs- och vattenmyndigheten (HaV) utreda omfattningen av sårskadad fisk och utreda möjliga bakomliggande orsaker till att såren uppkommer. Insamlingen av data skedde genom fiskeloggar från yrkesfiskare i Hanöbukten, provfisken vid Sveriges lantbruksuniversitet samt rapporter från andra länders provfisken i Hanöbukten och södra Östersjön. I tillägg till detta skickade yrkesfiskarna in sårskadad torsk och skrubba för obduktion och analys av sjukdomsframkallande organismer vid SVA. Vävnadsprover för analys av miljöföroreningar skickades till Naturhistoriska riksmuseet.

Omfattningen av sårskador hos torsk och skrubba från Hanöbukten var 2,8 % respektive 0,6 %, siffror som stämde väl överens med årets mätningar från andra östersjöländer. En statistiskt säkerställd skillnad i andelen sårskadade torsk var syntes mellan de kalla vintermånaderna, då över 20 % var drabbade, och övriga året då prevalensen var låg. Torskarna som skickades in till SVA hade relativt god konditionsfaktor (0,93) även om de var sårskadade. Torskarna som trålats i Hanöbukten av ett tyskt forskningsfartyg hade en lägre konditionsfaktor (0,78 - 0,81), trots att provfisket innefattade både sjuka och friska torsk.

Obduktionerna visade inte på någon samstämmighet avseende sjukdomsframkallande organismer men fiskarna kunde klassas in efter fyra olika sårtyper. Skrubborna uppvisade en typ av hudsår, framför allt på den opigmenterade sidan, som tidigare associerats med bakterien atypisk *Aeromonas salmonicida*. Bakterien trivs i sediment i bräckt vatten och har visats kunna infektera plattfiskar redan vid mycket lindrig hudirritation. I ett fall av 21 obducerade skrubbor kunde den svårisolerade bakterien påvisas.

De obducerade torskarnas sår kunde delas in i tre typer: Bitskador, rimligtvis från säl, stod för 24 % av skadorna. En speciell typ av fokala, runda, och djupa sår, ofta placerade på samma plats på torsken sågs hos nära 17 %. Denna runda sårtyp bör orsakas av samma bakomliggande faktor, men inga sjukdomsalstrande virus, parasiter, svampar eller bakterier kunde påvisas i samband med såren. Den tredje typen av sår (60 %) innefattade en generell inflammation med hudrodnader, fenröta och diffusa sår/skador. Inte heller här kunde någon samstämmighet i sjukdomsalstrande organismer påvisas mellan fiskarna. Fördelningen av sårtyper skiljde sig mellan olika lokaler i Hanöbukten, men resultatet kan inte säkerställas statistiskt då fiskarna selekterats av fiskemetoden och yrkesfiskarnas urval. Även avläkta sårskador observerades, vilket visar att såren inte måste ha dödlig utgång.

Orsaken till skadorna är sannolikt multifaktoriella. Bitskadorna har uppenbar bakgrund, medan de andra kategorierna kräver kompletterande undersökningar

i närmiljön för att utredas vidare. Sårtyper tre och skrubbarnas sår beror sannolikt på ett samspel, eller snarare en obalans, mellan levnadsmiljön, andra organismer och fisken. En kontinuerlig, regelbunden och långvarig datainsamling av olika miljöfaktorer och från standardiserade provtagningar av fisk behövs för att kunna hitta samband och orsaker till ohälsa hos akvatiska organismer.

DEL 2

Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) är den statliga myndighet som enligt sitt regleringsbrev har ansvar för sjukdomsövervakningen av djur i Sverige, såväl tama som vilda. SVA har också ett regeringsuppdrag (Näringsdepartementets dnr N2016/00266/SUN) om att medverka i genomförandet av EU:s strategi och handlingsplan för Östersjöregionen (nedan kallat Östersjöstrategin). Det är därför naturligt att SVA har ansvaret för det i denna rapport föreslagna **Svenska Programmet för Akvatiska Patogener** (Swedish Programme for Aquatic Pathogens), SPAP. SVA har redan ett motsvarande övervakningsprogram för landlevande vilda djur, inklusive fåglar, och om detta förslag accepteras kommer Sverige att få en heltäckande sjukdomsövervakning för akvatiska såväl som för landlevande djur.

För att möjliggöra rutinmässig provtagning och övervakning krävs samverkan med SLU, som är den enda organisation som regelbundet och långsiktigt inventerar olika bestånd i marin- och kustmiljö.

The International Council for the Exploration of the Sea (ICES) är en global organisation som verkar för hållbart nyttjande av haven. Över 350 marina institut i 20 medlemsländer deltar i arbetet. Arbetsgruppen för patologi och sjukdomar på marina organismer (ICES WGPDMO) har under lång tid rekommenderat att nationella sjukdomsprogram etableras. I arbetsgruppen rapporteras årligen sjukdomar och sjukdomstrender från flera nationer. Då Sverige inte har något eget program kan dessa internationella rapporter inte följas upp i syfte att undersöka skadeverkningar i svenska vatten. Sverige kan inte heller bidra till det nödvändiga internationella arbetet i syfte att undersöka förekomst och utbredning av sjukdomar, som ju inte känner några landgränser.

Här föreslås därför att SPAP beviljas finansiering med ca 10,9 miljoner kronor för en första 3-årsperiod då programmet skall startas och utvecklas till internationell standard. Under tiden bör programmet utvärderas av internationell expertis och deras rekommendationer beaktas när en ny 3-årsplan formuleras och ny finansiering söks.

Del 1: Kartläggning av omfattningen av sårskadad fisk i Hanöbukten

INLEDNING

UPPDRAGET

En utredning om tillståndet i Hanöbukten startade 2011, ledd av en projektgrupp där länsstyrelsen i Skåne och Blekinge tillsammans med kommuner, Region Skåne, Sportfiskarna och lokala fiskare ingick. Detta efter signaler om att beståndet av den kustnära fisken kraftigt minskat, en ökad frekvens av sårskador på fisk och döda fåglar, samt förekomst av brunt, illaluktande vatten i Hanöbukten. I december 2012 beslutade Regeringen att uppdra åt Havs- och vattenmyndigheten (HaV) att vidare utreda bakgrunden och orsakerna till problematiken i Hanöbukten. Uppdraget (dnr M2012/3402s) löd: "Havs- och vattenmyndigheten ska efter samråd med berörda myndigheter, institut och organisationer analysera vilka möjliga orsaker som kan ligga bakom de miljöproblem som redovisas i skrivelse från Länsstyrelsen i Skåne län och Region Skåne" (Underrättelse angående allvarliga problem i Hanöbuktens ekosystem, Regeringskansliet dnr 2012/1741/Nm). Myndigheten redovisade den 31 oktober 2013 analysen till Regeringskansliet (dnr M2013/2680/Nm) tillsammans med en plan för hur myndigheten avsåg att arbeta vidare med frågan inom relevanta åtgärdsprogram.

Utredningen visade att det är svårt att fastställa orsakerna och orsakssambanden kring de upplevda miljöproblemen i Hanöbukten. Man fastslog också att det saknades en strukturerad provtagning av fisksjukdomar och sårskador hos vilda fiskpopulationer. Yrkesfisket har idag ingen skyldighet att rapportera sjukdomstecken och sårskador på fiskar och det finns inte program för att ta emot misstänkta sjukdomsfall av fisk på motsvarande sätt som det gör för landlevande djur. HaV menade i sin rapport att nödvändig information om sjukdomar, parasitangrepp och sårskador behöver omfatta både kvalitativa och kvantitativa parametrar. Den kvalitativa informationen bör bestå av beskrivningar av symptom och diagnoser. Den kvantitativa informationen bör bestå i rapportering av omfattning och geografisk utbredning av sjuka fiskar. Myndigheten föreslog att det systematiska provfisket som idag finns för beståndsuppskattning av fisk i Östersjön och västerhavet skulle kunna kompletteras med en sjukdomsdel. Härigenom skulle då en nationell havsprovtagning av fisksjukdomar möjliggöras. En sådan vetenskapligt standardiserad provtagning kan sedan kompletteras med möjlighet för allmänheten att rapportera observationer av sjuk fisk liknande den som finns för landlevande djur. Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) är den svenska myndighet som hanterar djurhälsa på nationellt plan. SVA har det operativa ansvaret för hanteringen av sjukdomar som uppträder på vilda landbaserade djur (viltsjukdomsövervakningsprogram, SVA/Naturvårdsverket). Myndigheten har också ansvar för övervakning av fisksjukdomar hos odlad

fisk, fallbaserade utredningar av sjukdom hos vild fisk samt i samarbete med Naturhistoriska riksmuseet undersökning av marina däggdjur.

HaV föreslog i sin rapport att SVA skulle ges uppdraget att i samråd med HaV och Statens jordbruksverk (SJV) ge förslag på ett provtagnings- och analysprogram för uppföljning av sjukdomstillståndet hos vilda fiskpopulationer, inklusive ett provtagningsprogram för sårskadad fisk. Regeringen beslutade i maj 2014 (dnr M2014/139/Nm) att i enlighet med HaV:s förslag uppdra åt SVA utreda omfattningen av samt orsakerna till att skador på fisk uppkommer, samt redovisa en plan för vidare uppföljning och övervakning av sjukdomstillståndet hos vild fisk. Uppdraget skulle redovisas till Regeringskansliet 31 oktober 2015.

GENOMFÖRANDE

SVA har planerat och genomfört uppdraget i samråd och samarbete med HaV, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Länsstyrelsen Skåne, Länsstyrelsen Blekinge län, Naturhistoriska riksmuseet (NRM), Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Göteborgs Universitet (GU) och Naturvårdsverket (NV). Efter förslag från Länsstyrelsen Skåne, samarbetade SVA med fem lokala fiskare i kustområdet som vid fångst av skadade och sjuka fiskar skulle skicka in exemplaren för undersökning.

Uppdraget fortlöpte under 2014 och 2015 med start av insamlingen i oktober 2014. Målsättningen var att respektive kontrakterad fiskare skulle skicka in fem sårskadade/sjuka fiskar av arten torsk (*Gadus morhua*) eller skrubbskädda (*Platichthys flesus*) per månad, samt även slumpvis utvalda till synes friska kontrollfiskar av samma arter. Fiskarna obducerades förutsättningslöst vid ankomst till SVA och undersöktes avseende virus, bakteriella sjukdomar och parasiter. Vävnadsprover togs ut för histologisk undersökning samt analyser av miljöföroreningar. De senare skickades till Naturhistoriska riksmuseet samt Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI).

Det visade sig vara svårare än väntat att få tillgång till material. Skälen varierade med säsong. Under senhösten 2014 var vädret ogynnsamt och höststormar bidrog till att yrkesfiskarna inte kunde lägga nät eller fiska på annat sätt. Senare under vintern/våren angavs en kraftigt minskad tillgång på fisk och därmed heller inga fynd av sjuka individer. Periodvis sågs heller ingen sårig fisk bland den friska. Skador på båtar och personskador var andra faktorer som försvårade insamlingen. Att hitta fler hjälpsamma aktiva yrkesfiskare som kunde/ville bidra till projektet visade sig problematiskt och innebar bland annat långdragna förseningar med förfarande kring dispensansökan, som sedermera avslogs, hos Länsstyrelsen i Blekinge län. Under vårmånaderna 2015 hade därför mindre än hälften av det underlag som bedömdes rimligt för att göra en rättvis analys av situationen inkommit.

Kustlaboratoriet vid SLU planerade att under höstmånaderna oktober och november 2015 genomföra provfiske i Hanöbukten och gav klartecken för att samnyttja det material som skulle samlas in. Detta var ett viktigt komplement

till det knappa underlaget och därför äskades om förlängning av redovisningstiden till våren 2016.

BAKGRUND

SITUATIONEN I HANÖBUKTEN

Yrkesfiskare och sportfiskare i Hanöbuktsområdet rapporterade under 2010 och 2011 en fiskflykt från kustnära vatten, ökad frekvens av sårskador och dålig fångst (Länsstyrelsen i Skåne Län, rapport 2012). Hanöbukten har länge varit ett omdebatterat område gällande havsmiljön med pappersmasseindustri, militärt skjutområde och närhet till dumpningsplatser för kemiska stridsmedel, bl. a. senapsgas (Hanöbuktsutredningen, rapport 2013). I Öresundsområdet rapporterade man redan på 1970-talet om sårskador och tumörliknande utväxter på fisk av den typen vi ser idag.

OM FISKSJUKDOMAR OCH FISKHÄLSA

Sedan mitten av 1970-talet har man i olika perioder undersökt förekomsten av fisksjukdomar i nordliga vatten. I Danmark initierades detta bl.a. av iakttagelser av sjukdomsförekomst i kustområden med stora utsläpp av spillvatten. Under 1982 inledde Naturvårdsverket ett forskningsprojekt i samarbete med Fiskeristyrelsen som syftade till att registrera och kartlägga förekomsten av olika sjukdomar hos ekonomiskt betydelsefulla fiskarter i södra Sveriges kustvatten. Det var den första undersökningen i sitt slag och pågick under sex år. Tre av dessa år fokuserades undersökningarna till områden med industriutsläpp. Av utredningen framgick att det normalt förekommer ett mycket brett sjukdomsspektrum och rik parasitfauna hos fisken i svenska kustvatten. Samband mellan föroreningar och sjukdom påvisades, framför allt fluktuationer i parasiteringsgrad hos fisk i skogsindustrirecipienter, gasblåsesjuka hos fisk utanför kärnkraftverk samt käk- och gällocksdeformation och fenerosioner utanför pappersmasseindustrier. Utifrån dessa resultat rekommenderade man att förekomsten av sjukdomar ständigt borde utredas i fiskeribiologiska undersökningar.

En standardiserad och regelbunden provtagning är nödvändig för att få bakgrundsdata och kännedom om sjukdomar och fluktuationer i dess symptom och normal förekomst. Detsamma gäller olika typer av skador. Ett sådant arbete är också en förutsättning för att kunna tolka resultat i riktade undersökningar, men någon sådan övervakning förekommer inte i Sverige idag.

The International Council for the Exploration of the Sea (ICES) är en global organisation som verkar för hållbart nyttjande av haven. Över 350 marina institut från 20 medlemsländer deltar i arbetet. Arbetsgruppen för patologi och sjukdomar på marina organismer (ICES WGPDMO) rapporterar årligen sjukdomar och sjukdomstrender från flera nationer och av extra intresse för Östersjöns fiskhälsa är rapporter från Danmark, Tyskland, Polen, Ryssland och Finland. Några av dessa länder undersöker regelbundet förekomsten av sår och

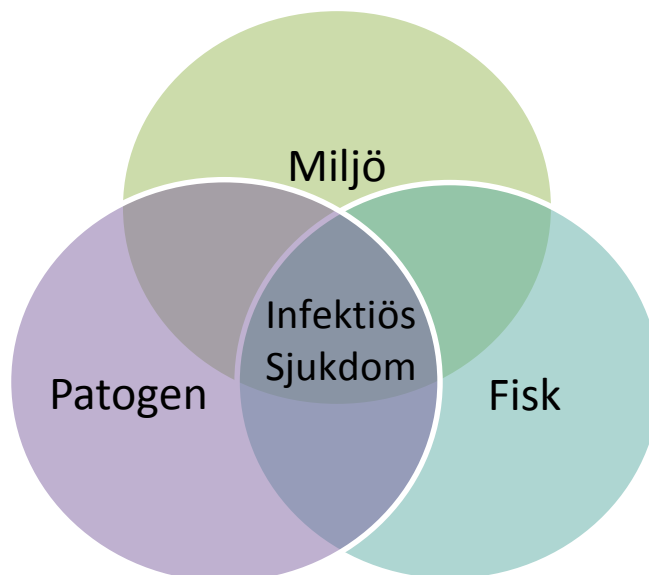
parasiter hos t.ex. torsk och plattfisk och deras rapporter är en viktig pusselbit i kartläggningen av fisksjukdomar lokalt. Studier från Polen har försökt att utreda bakgrunden till sår hos torsk men ej lyckats hitta något som förklarar fenomenet (Stachnik och Nadolna-Altyn 2015).

År 2013 undersökte SVA fem såriga torsk infångade i Hanöbukten i månadsskiftet oktober-november. Provtagningen visade skador på yttre och inre organ samt förekomst av olika parasitära smittämnen (spordjur och hakmask). Två av fiskarna var kraftigt undernärda. Dock fanns ingen samstämmighet mellan fynden hos fiskarna och parasiterna torde ej ha varit grundorsaken till fiskarnas lidande.

FAKTORER SOM PÅVERKAR UTVECKLING AV FISKSJUKDOMAR

Sjukdom definieras ofta som en avvikelse från fiskens normala fysiologi och allmäntillstånd och leder till funktionsnedsättning.

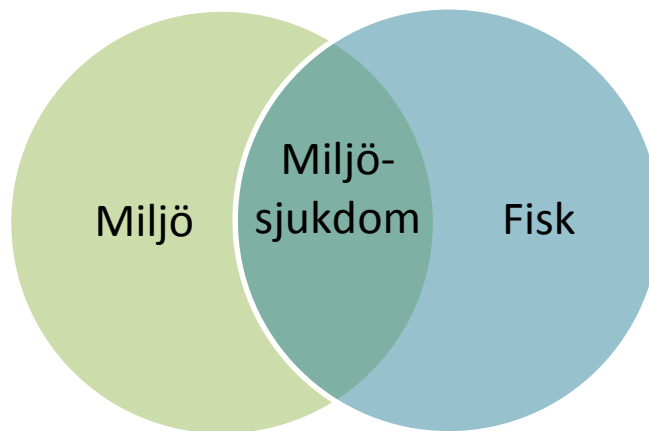
För att en infektion skall bryta ut hos fisk, krävs närvaro av sjukdomsframkallande organismer såsom bakterier, virus eller parasiter. Gemensamt benämns de patogener. De flesta fiskpatogener är fakultativa, d.v.s. de är organismer som under vissa betingelser framkallar symptom. Många av dessa lever normalt i fiskens livsmiljö och framkallar sjukdom om fisken är nedsatt av olika omständigheter eller om organismerna förekommer i ett onormalt högt antal. Fiskens motståndskraft mot dessa patogener kan sättas ner av olika stressframkallande faktorer i miljön. Exempel på sådana faktorer kan vara förändringar i salthalt, temperatur och syrgashalt. Alltför täta bestånd, näringsbrist och ålder är andra exempel på naturligt förekommande förändringar som kan ge upphov till stress.



Figur 1, Faktorer av betydelse för utbrott av infektionssjukdom enligt Sniezko (1974)

Det krävs alltså oftast ett samspel mellan fisk, patogener och miljö för att en sjukdom skall bryta ut (Fig. 1). Vissa sjukdomssymptom kan också uppträda vid

avsaknad av patogener, d.v.s. förändringar av icke infektiös natur. Exempel på sådana är tumörbildningar och skelettdeformationer (Fig. 2).



Figur 2, Faktorer av betydelse för miljösjukdom

Vissa fakultativt patogena organismer som t.ex. bakterier av släktena *Vibrio* och *Aeromonas* kan i högre grad orsaka sjukdom vid föroreningar med organiskt material som utgör näringsämne och tillväxtmedium för bakterierna. Virus kan förekomma hos fisk utan att den visar några symptom, men vid exempelvis stress kan de orsaka sår eller tumörliknande utväxter.

Mekaniska skador eller föroreningar av kemisk karaktär kan skada fiskens slemskikt och epitelcellslager och därmed öppna porten för opportunistiska organismer. Skador som fenröta och sår utan förekomst av s.k. primärpatogener kan vara exempel på detta.

Ständiga retningar från kemiska ämnen kan också ge upphov till förtjockade hudpartier och tumörutveckling i de fall ämnena är karcinogena. Vissa kemiska ämnen kan också påverka fiskens immunförsvar så att den blir mer sårbar för patogener än normalt. Slutligen kan också föroreningar påverka fiskens förmåga att föröka sig genom att skada arvsanlag eller celler i ynglens olika utvecklingsstadier och ge upphov till ökad dödlighet eller missbildningar.

Sjukdomsutbrott är alltså vanligen orsakade av flera samverkande faktorer och det är därför svårt att förutspå samt förstå hur och varför en sjukdom bryter ut. Vilda fiskbestånd är därutöver ofta migrerande mellan olika miljöer, vilket ytterligare komplicerar sambandsanalyserna (Thulin, Höglund, & Lindesjö 1989).

MATERIAL OCH METODER

INSAMLING AV DATA OCH MATERIAL

Lokala yrkesfiskare i Hanöbuktsområdet ombads att en gång per månad, från oktober 2014 till december 2015, skicka in fem färska hela fiskar med sårskador

eller yttre tecken på sjukdom. Fångstmetoderna för de insända fiskarna var i huvudsak garn (78 %) eller trål (19 %) och några enstaka (3 %) fångades med homma. I de fall inga eller få sjuka fiskar fångades ombads yrkesfiskarna att skicka in frisk fisk som referensmaterial. Fiskarna skickades i kylboxar till SVA för obduktion. I tillägg till detta deltog SVA vid SLU:s provfisken i Hanöbukten under oktober 2015, samt fick fisk insänd från ytterligare provfisken i november.

Yrkesfiskarna uppmanades också att i en särskild mall föra logg över alla sina fisken i Hanöbukten under mätperioden och anteckna fångstplats, djup, redskap, totalt antal fiskar samt antal fiskar med ett eller flera sår. I tillägg till detta erhöles tråldata från doktor Thomas Lang, Thünen-Institut für Fischereiökologie, Cuxhaven Tyskland, som under fyra år genomfört trålningsexpeditioner på forskningsfartyget Walther Herwig III i Östersjön, inklusive Hanöbukten. Undersökningarna har framför allt fokuserat på östersjötorskens hälsostatus relaterad till platser för dumpning av kemiska stridsmedel. Aktiviteterna genomfördes inom CHEMSEA- och MODUM-projekten, finansierade av EU respektive NATO.

Ytterligare data har inhämtats från danska, ryska och polska rapporter till ICES Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms, WGPDMO, 2015.

OBDUKTION OCH ANALYSMETODER

Samtliga fiskar som ankom till SVA journalfördes med individuella ID-nummer. Vid obduktion vägdes och mättes fiskarna, hull klassades och gonader och lever vägdes separat. Yttre/inre skador och andra fynd inklusive parasiter fotograferades och dokumenterades.

Parasiter arttypades i förekommande fall. Prover för analys av bakterier togs från hudsår samt njurar och odlades på hästblodagar, cysteinagar, TYES-agar, marinagar samt saltblodagar för att fånga upp de flesta tänkbara marina sjukdomsframkallande bakterierna i salt, sött och bräckt vatten. Bakterierproverna inkuberades i minst sju dagar vid 20°C och i vissa fall även vid 15°C. Svampodling sattes från hudsår och odlades på speciellt svampmedium, PG1-agar. Prover för virusundersökning samlades från njure, hjärta, mjälte och hjärna. Organproverna odlades på två olika cellinjer (BF-2 och FHM) i tre veckor. I de fall intressanta fynd gjordes vid provtagningar och kultiveringar utreddes dessa vidare för artbestämning genom biokemiska tester och molekylära metoder som Maldi-Tof, PCR och sekvensering.

Vävnadsbitar för histologisk undersökning i mikroskop samlades från njure, lever, hjärta och hudsår, inklusive frisk angränsande vävnad, och fixerades i formalin för senare snittning, färgning (hematoxylin-eosin-färgning samt periodic acid-Schiff) och bedömning.

Samtliga provtagningar och mikrobiologiska undersökningar gjordes i enlighet med SVA:s ackrediterade metoder som för virus följer OIE:s Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals samt 2001/183/EC, och för

bakterier/svamp olika vetenskapliga referenser (Austin & Austin 2012, Colquhoun, & Duodu 2011).

Kemiska analyser

Vävnadsprover (≥ 2 g) för analys av metaller, klorerade och bromerade substanser, perfluorerade ämnen samt dioxiner plockades ut med keramiska instrument, märktes och frystes individuellt. Prover sändes för analys på externa laboratorier via Naturhistoriska riksmuseet. Inledningsvis skickades vävnad från 10 sjuka och fem friska torskar för analys.

Prover från muskulatur och sår hos tre av de skrubbor som uppvisade typiska sårskador på buksidan togs ut och frystes för analys av senapsgasmetaboliten tiodiglykol som kan vara en stark indikation för att fisk utsatts för senapsgas. Tre vävnadsprover från fiskar utan synliga skador analyserades som kontrollgrupp. Även arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen som Clark, arsinolja och adamsit undersöktes. Analyserna utfördes vid FOI.

RESULTAT

PREVALENS, SÅRSKADAD FISK

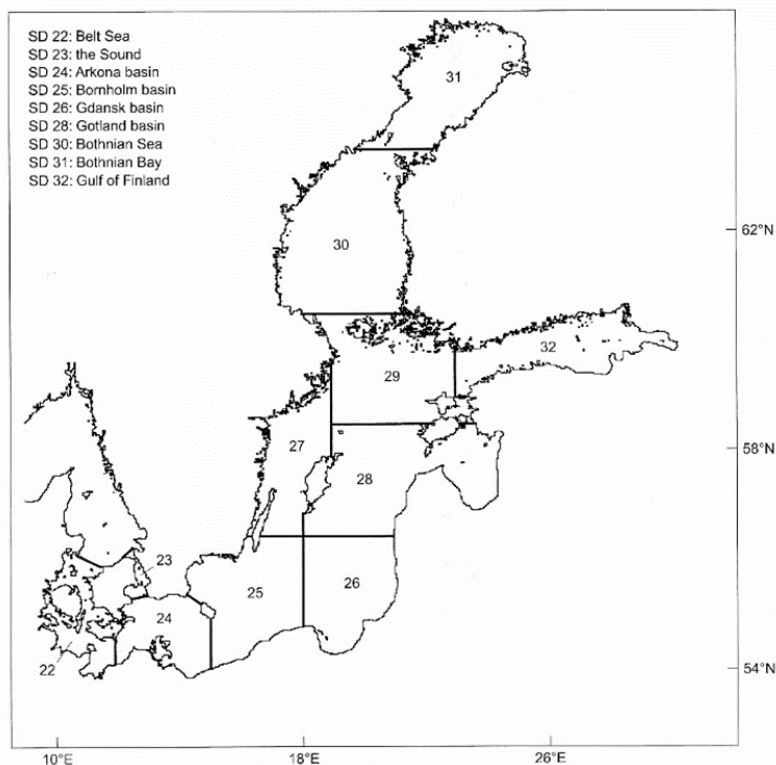
Kartläggningen av andelen sårskadad fisk i Hanöbukten (ICES distrikt 25, se Karta 1) baseras på loggad data från lokala yrkesfiskare samt provfisken inom SLU:s verksamhet vid Kustlaboratoriet och omfattar 3940 torskar och 4895 skrubbor under perioden oktober 2014 - december 2015. Därtill kommer 2542 torskar trålade av det tyska forskningsfartyget Walther Herwig III och doktor Thomas Lang, Thünen-Institut für Fischereiökologie. De tyska trålningarna genomfördes i tre omgångar: september 2014 och 2015 samt december 2015.

I den svenska loggdatan är samtliga fiskar fångade med garn på djup mellan 3 och 26 meter. Andelen (prevalensen) sårskadade torskar i dessa fisken var 2,8 % (n=3940) och andelen sårskadade skrubbor var 0,6 % (n=4895) över hela perioden totalt. I de tyska trålningarna av torsk (n=2542) i Hanöbuktsområdet sågs en sårprevalens mellan 0,9 % och 2,5 % vid de tre olika trålningarna.

Resultaten är i enlighet med polska studier av östersjötorsk (n=17 748) i ICES distrikt 24, 25 och 26 (Karta 1), där man under 2015 såg en sårprevalens på 2,5 %. Detta var en minskning efter de senaste 15 årens toppnotering på 6,9 % år 2013. Betydligt högre prevalenser sågs i enbart ICES distrikt 24 i december år 1998 och 1999 (30 % resp. 14 %).

Hos skrubba (n=6996) sågs i de polska studierna år 2015 en sårprevalens på 0,9 %, en minskning sedan toppnoteringen år 2012 (1,7 %).

I ryska undersökningar i ICES distrikt 26 uppgavs prevalensen sårskador hos östersjötorsk (n=945) vara högre, 3,3 % under 2015, medan inga sårskador observerades hos skrubbor (n=39).



Karta 1. Östersjön indelad i ICES distrikt

För att kunna analysera data vidare delades Hanöbukten in i fyra zoner (Tab. 1, Karta 2). All data från yrkesfiskarnas loggar samt SLU:s provfisker kommer från zonerna 1-3.

Zon 1	Karlskrona och Pukaviksbukten, inklusive utloppet från Mörrumsån
Zon 2	Sölvesborg, Åhus och Yngsjö inklusive utloppet från Helge å
Zon 3	Kivik och Vitemölla
Zon 4	Simrishamn och söderut

Tab. 1. Fyndplatser för insänd fisk indelade i zon 1-4



Karta 2. Zonindelning fiskeområden för fiskeloggar samt insända fiskar till SVA

Ett noterbart fynd i undersökningen var fluktuationen över året gällande sårfrekvensen hos torsk (Fig. 3). Under de kalla vintermånaderna januari och februari, då vattentemperaturen varierade mellan 2,7°C och 5°C, ökade andelen sår till 20,5 % respektive 7,4 % (totalantal loggade torskar n=39 respektive n=162). Skillnaden i årstid är statistiskt signifikant ($p=0,006$) trots det låga antalet fiskade torskar i januari. Detta innebär enligt analysen att det under vintermånaderna är högre sannolikhet att notera en större andel sårskadade torskar och skillnaden är högst jämfört med sommaren (ordered logistic regression, Odds Ratio=17).

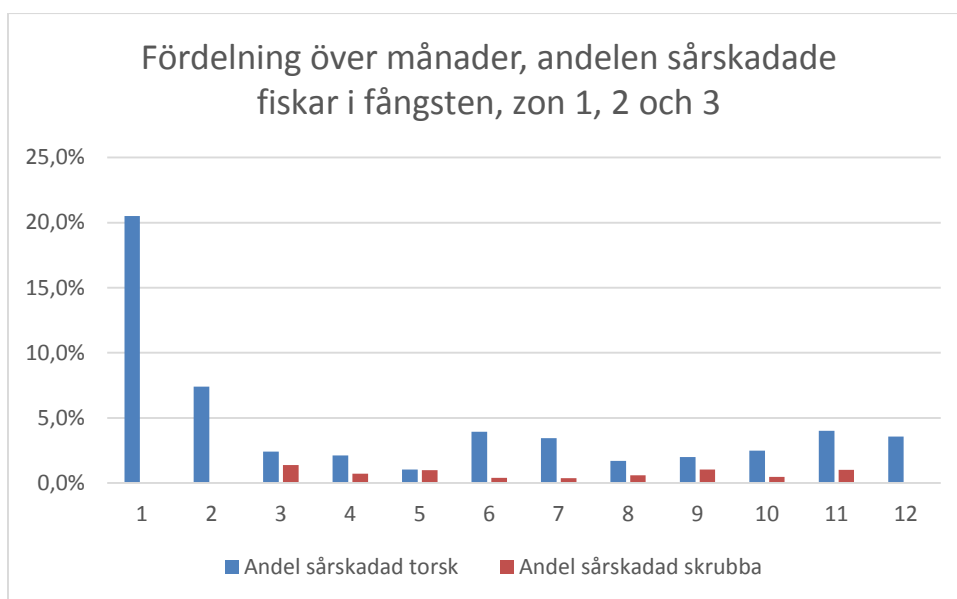
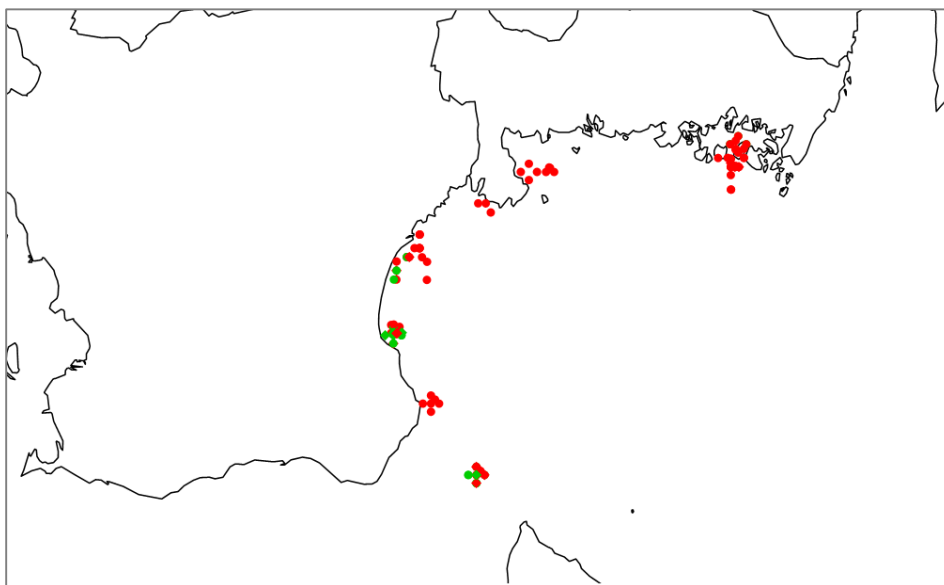


Fig. 3. Fördelning av andel sårskadad torsk respektive skrubba över årets månader 1-12.

KONDITION, INSAMLAD FISK OCH TRÄLAD FISK

Fiskarna som skickades till SVA för obduktion var i huvudsak torsk (n=89). Antalet skrubbor var lägre (n=21), vilket troligtvis förklaras av den lägre förekomsten av sår. Fiskarna samlades in av yrkesfiskare under ordinarie fisken vid lokaler från norra till södra Hanöbukten (Karta 3).



Karta. 3 Fyndplatser (GPS-koordinater) för insända undersökta fiskar. Röda punkter visar sjuka fiskar och gröna punkter visar friska kontrollfiskar.

Skrubborna mätte i genomsnitt 29 cm (min 26, max 37) och vägde 262 g (min 142, max 456). Generellt var de i normalt hull och spridningen normalfördelad. Fördelningen hanar – honor var 62 % resp. 38 %

Torskarna mätte i genomsnitt 41 cm (min 27, max 57) (Fig. 4a) med en genomsnittlig vikt på 707 g (min 170, max 1750) (Fig. 4b) och hade normalfördelad spridning i hull. Fördelningen hanar – honor var 29 % resp. 61 %.

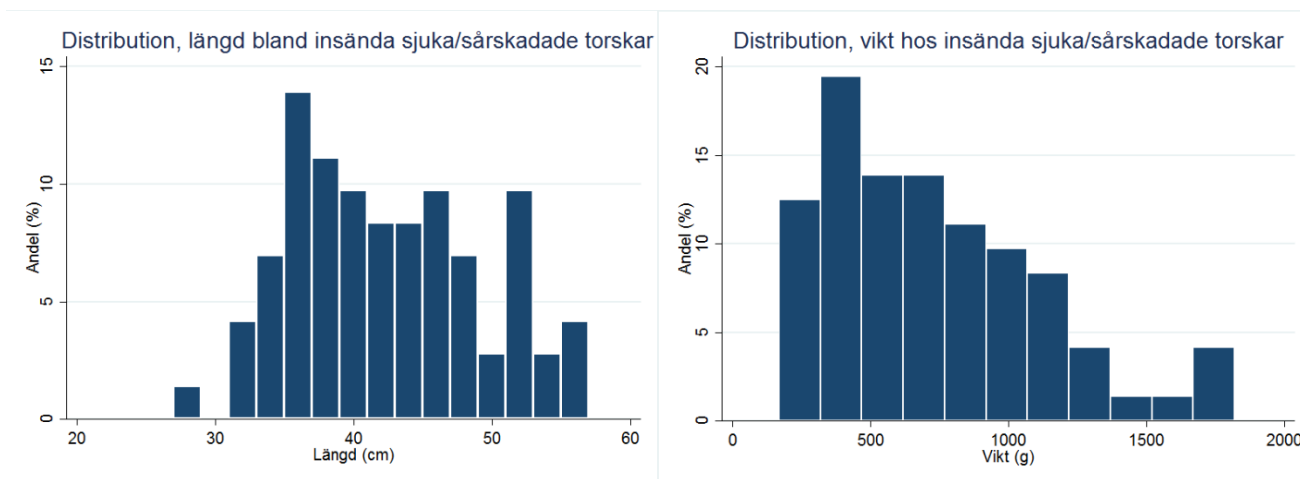


Fig. 4a och 4b, distribution av längd respektive vikt bland insända torsk till SVA.

Konditionsfaktorn ($CF = [total\ vikt/längd^3]*100$) skiljde sig inte signifikant mellan kontrolltorskarna (0,97) och de sjuka torskarna (0,93) (Fig. 5). Sjuka torsk visade inte heller några signifikanta skillnader i konditionsfaktor mellan de fyra zonerna i Hanöbukten (Fig. 6), inte heller om kontrollfiskarna inkluderades i analysen, då konditionsfaktorn var 0,94.

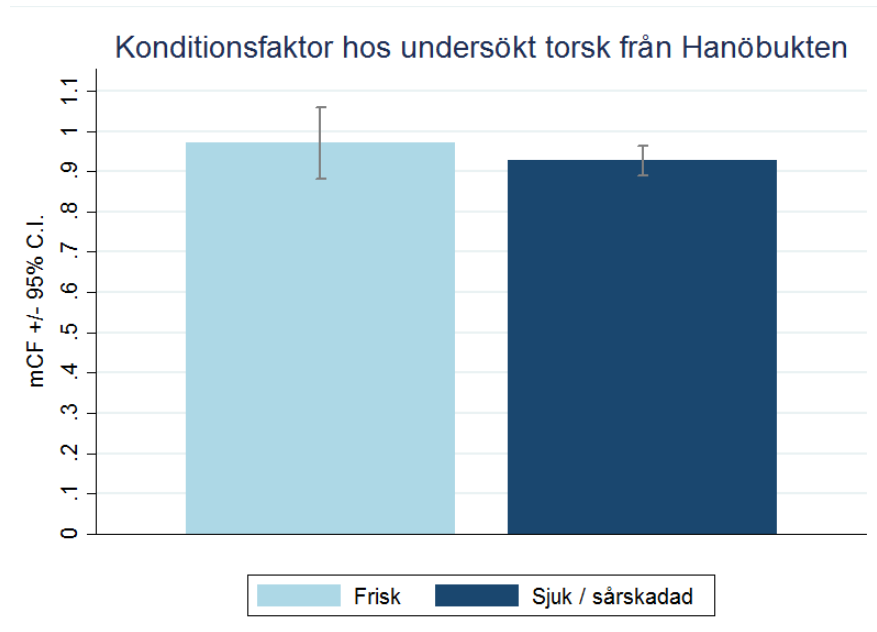


Fig. 5 Konditionsfaktor ($CF = [total\ vikt/längd^3]*100$) bland insända torsk till SVA under 2014-2015

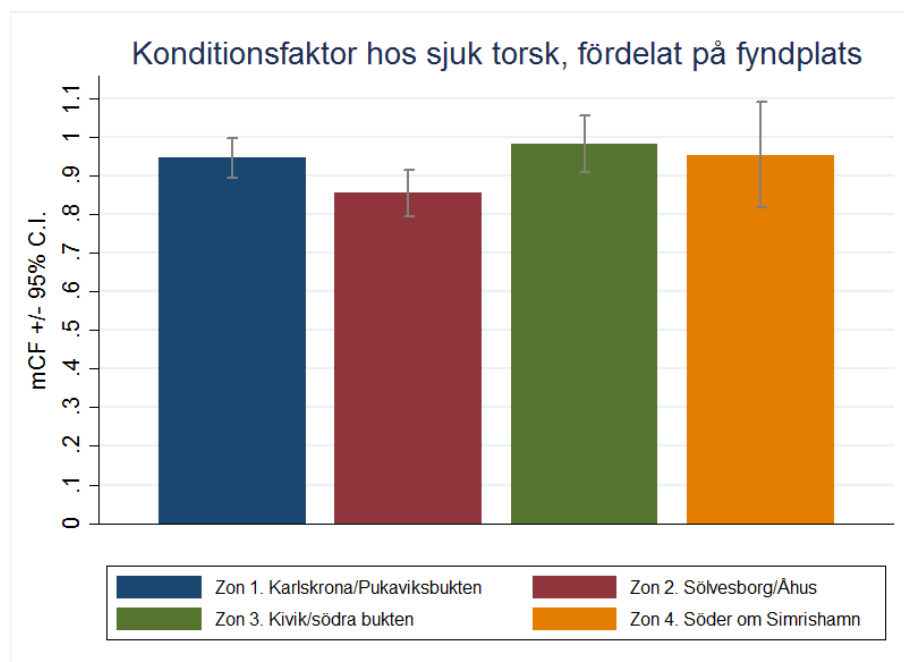
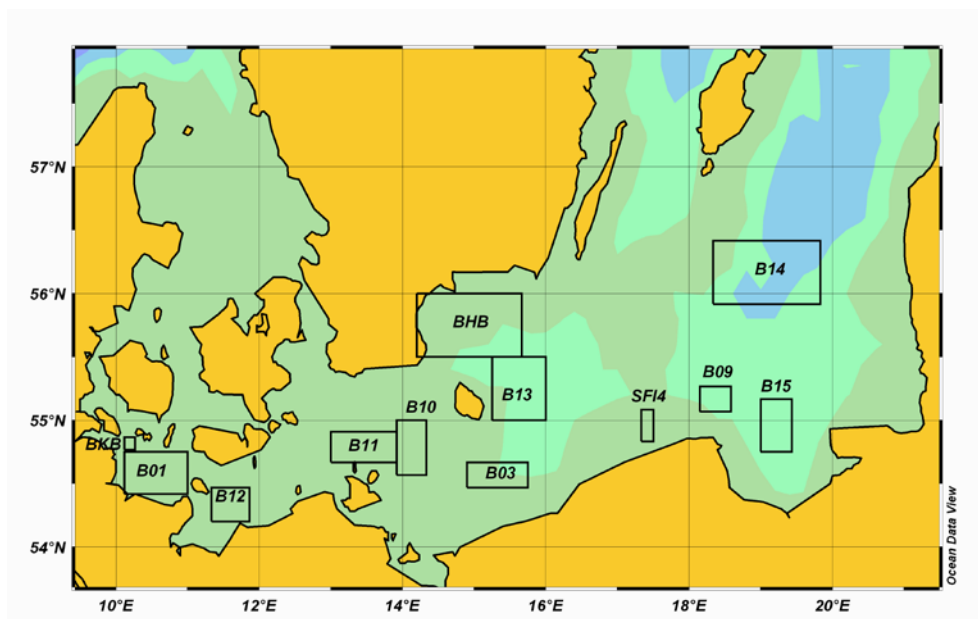


Fig. 6 Konditionsfaktor ($CF = [total\ vikt/längd^3]*100$) hos sjuk torsk insänd till SVA, jämförelse mellan zonerna 1-4.

Konditionsfaktorn för de insända torskarna stämde överens med en del av de övriga provtagningsplatser i Östersjön som trålats av expeditionsfartyget Walther Herwig III (Karta 4, Fig 7), men skiljde sig från trålningsstationen i Hanöbukten år 2014 (0,81) och 2015 (0,81 och 0,78).

Torsk trälad från station B13 (Karta 4) öster om Bornholm, som också är en dumpningsstation för senapsgas, hade signifikant lägre konditionsfaktor jämfört med alla övriga trålningsstationer. Konditionsfaktorn var generellt lägre bland torsk från de östra bestånden (öster om Bornholm) än bland de västliga bestånden (väster om Bornholm) (Fig. 7).



Karta 4. Stationer provtrålade av det tyska forskningsfartyget Walther Herwig III och Dr. Thomas Lang, Thünen-Institut für Fischereiökologie i Hanöbukten i augusti-september år 2014 och augusti-september samt december år 2015

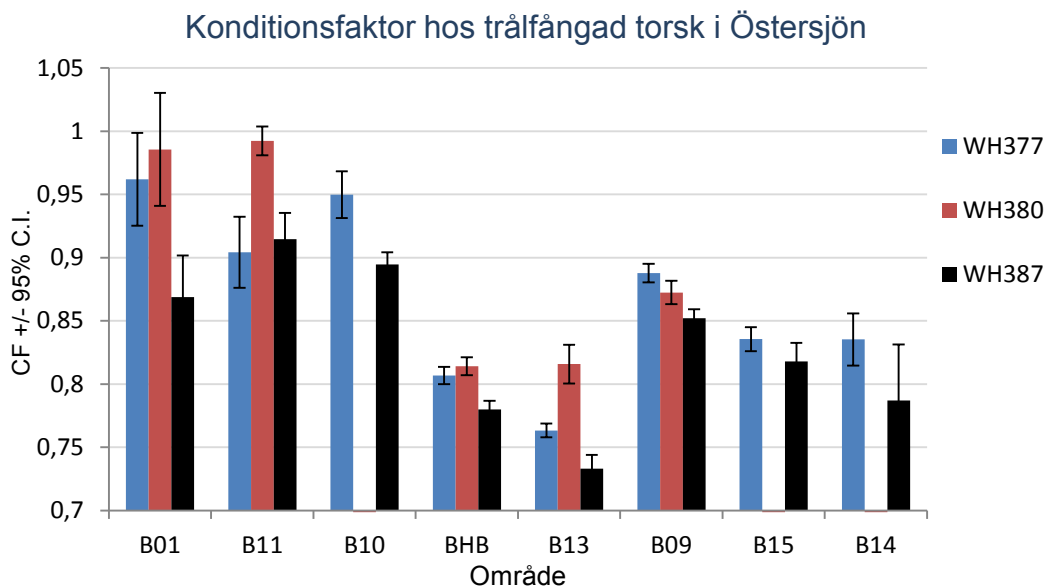


Fig. 7. Konditionsfaktor ($CF = [total\ vikt / längd^3] * 100$) bland torsk från tre provtrålningar i Hanöbukten (BHB) samt övriga stationer i Östersjön under hösten år 2014 (WH377) samt hösten 2015 (WH380 och WH387).

OBDUKTIONSRESULTAT

De obducerade fiskarna visade inga unisona resultat gällande sjukdomsframkallande organismer (s.k. patogener). Majoriteten av fiskarna var trots sår, granulom eller andra förändringar i organ samt generella tecken på inflammation vid gott hull och hade föda i magsäcken. Flera fiskar (skrubba och torsk) hade även avläkta sår (Bild 4j). Enstaka (n=3) torskar från zon 2 och 3 hade tumörliknande nybildningar i anslutning till ändtarmsöppningen (Bild 1a). I ringa omfattning (n=3) sågs skelettdeformationer hos torsk (Bild 1b).

Bakterier

I sår från en av skrubborna växte en bakterie som tidigare associerats med hudsår hos plattfisk; atypisk *Aeromonas salmonicida* (Wiklund 1994, Wiklund & Bylund 1993). Enstaka torskar visade på infektion av bakterierna *Yersinia Ruckeri* (serotyp 1), *Vibrio anguillarum* (serotyp 2 samt okänd typ) och gramnegativa stavar, samtliga kända för att orsaka sjukdom hos fisk eller andra organismer. Inga fynd gjordes av bakterien *Francisella*, vilken tidigare förknippats med sjukdom hos östersjötorsk (Alfjorden & Ruane 2015, Alfjorden *et al.* 2006), trots att specialagar för denna bakterie användes vid samtliga provtagningar.

Virus

En enda torsk visade på virusinfektion med Viral Hemorrhagic Septicaemia virus, VHSV genotyp 1b. VHS är en epizooti och fallet rapporterades därför till SJV. Bland skrubborna kunde inga virus påvisas, men enstaka visade symptom på hudsjukdomen lymfocystis, orsakad av virus.

Parasiter

Samtliga undersökta torskar härbärgerade lindriga till kraftiga infektioner av rundmasken *Contracaecum osculatum*, en levermask som tycks öka i både prevalens och infektionsgrad hos östersjötorsken, enligt undersökningar från Sverige (Lunneryd *et al.* 2015), Danmark, Polen och Ryssland. I de danska undersökningarna från ICES distrikt 25 förekom masken i 100 % av undersökta torskleverar och även mindre torsk (35-40 cm) kunde härbärgera upp till 300 parasiter per individ (n=66) (ICES WGPDMO 2016). En liknande mask, *Pseudoterranova decipiens*, även kallad torskmask, återfanns i mindre omfattning under obduktionerna eftersom den kräver riktade undersökningar av muskulaturen men även denna parasit har enligt senare undersökningar återfunnits i hög grad (60 %) i provtagningsområdet längs Skånes och Blekinges kust (Lunneryd *et al.* 2015, ICES WGPDMO 2016). Andra parasiter som återfanns i lindrig till måttlig grad var bandmask (otypad) i tunntarmarna samt hakmaskar av stammen *Acanthocephala* i tunn- och grovtarm. Inga betydande mikroskopiska parasiter återfanns i histologiska undersökningar av organ och hudsår, enbart enstaka fynd av opportunistiska organismer.

Svamp

Svampväxt erhöles från samtliga hudsår, men ingen svamp var av primärpatogen karaktär. Samtliga bedömdes som sekundär blandflora av opportunistisk och yttlig typ. Inte heller i de histologiska snitten kunde någon växt av infiltrerande patogena svamparter påvisas.

Histologiska undersökningar

Torsk

Vävnadsnitt från hjärta, njure, lever och hudsår uppvisade en stor variation med många fynd av okänd karaktär, vilket ofta är fallet när man undersöker vild fisk. I hjärtan sågs enstaka fall av kraftiga inflammatoriska processer som även kunde ses makroskopiskt. Njurproverna visade sig vara svårbedömda då de i hög grad var påverkade av den autolys som inträder omedelbart efter fiskens död då kroppsegna enzymer påbörjar nedbrytning av vävnaden. Större förändringar och främmande organismer kunde fortfarande bedömas, bl.a. förekomsten av granulom (inflammatoriskt svar, bindvävsinkapsling av kroppsfrämmande organismer eller material) i njure som var vanligt (25 %) hos både friska kontrollfiskar och sjuka fiskar. Leversnitten uppvisade varierande grad av förändringar efter kroppsfrämmande agens och fynd som granulom av okänd karaktär, möjligen avläkta skador efter migrerande levermask, var vanligt förekommande (14 %). Hudsåren var av mycket varierande karaktär, med kraftiga inflammatoriska förändringar, vävnadsdöd och granulombildningar. Inga återkommande kroppsfrämmande agens kunde ses vid jämförelse mellan de olika individerna och inga förändringar typiska för kända patogener kunde påvisas.

Skrubba

Generellt uppvisade skrubborna tecken på inflammatoriska processer i varierande grad i njure och lever samt nekrotiska härdar och inflammation i hudsåren. Inte heller här kunde någon återkommande kroppsfrämmande organism påvisas i proverna.

Samtliga vävnadsprover har sparats för ev. framtida undersökningar med nya molekylära metoder.

Sårtyper

Ingen gemensam faktor till såren kunde hittas. Problemet verkar med erhållna analysresultat vara multifaktoriellt. Typen av sår varierade. Dels skiljde sig såren mellan torsk och skrubba, dels fanns olika sårtyper hos torsken.

Hos skrubba sågs sår framför allt på den opigmenterade sidan ("buksidan"). Såren var runda till ovala, 0,5 – 2 cm i diameter, ofta nära mitt-/sidolinjen. I ett tidigt stadium ses såren som vita ringar omgivna av en röd ring, s.k. hemorragisk vävnad. I ett senare stadium utvecklas öppna, hudpenetrerande sår och muskulaturen blottas. (Bild 2a-b)

Hos torsken kunde såren delas in i tre olika typer:

1. Bett med uppenbara mönster av tandrader, troligtvis från säl, nya eller äldre infekterade (Bild 3a-c)
2. Fokala, ofta runda/ovala sår, 1-3 cm i diameter med nekroser och granulomatös vävnad djupt penetrerande i muskulaturen och ibland även in till bukhålan. Vanligen placerade kaudalt om (bakom) buken, ventralt om (på nedsidan), eller i anslutning till, sidolinjen Oftare på fiskens vänstra sida än på den högra (Bild 4a-j)
3. Generell inflammation/infektion med rodnader, förtjockat slemskikt och/eller fenröta samt misstanke om sekundärinfekterade mekaniska skador utan fastställd orsak (Bild 5a-c)

Sårtyp 1 fanns hos 23,6 % av alla inskickade torskar med sår. Sårtyp 2, fokala djupa sår, återfanns hos 16,7 %. Sårtyp 3, dvs. den "bredaste" typen med generell inflammation och skador utan fastställd orsak var vanligast förekommande och utgjorde 59,7 % av totala antalet.

Distributionen av sårtyper hos torsk skiljde sig mellan de fyra zonerna (Fig. 8). "Sälbett"/sårtyp 1 förekom enbart hos fiskar från zon 1 och 2, de norra delarna av Hanöbukten. I zon 3 (Kivik/Vitemölla) var sårtyp 3, dvs. generell inflammation och fenröta, vanligast förekommande. Från zon 4 sågs en större andel av de runda djupa såren (typ 2).

Det är värt att notera att urvalet av insänd fisk gjorts av lokala fiskare och därmed inte är slumpmässigt som i en fiskelogg/provfiske/trålning. Här finns därför en stor "confounding factor" i den statistiska analysen vilket gör det svårt att tolka signifikansen av skillnaderna.

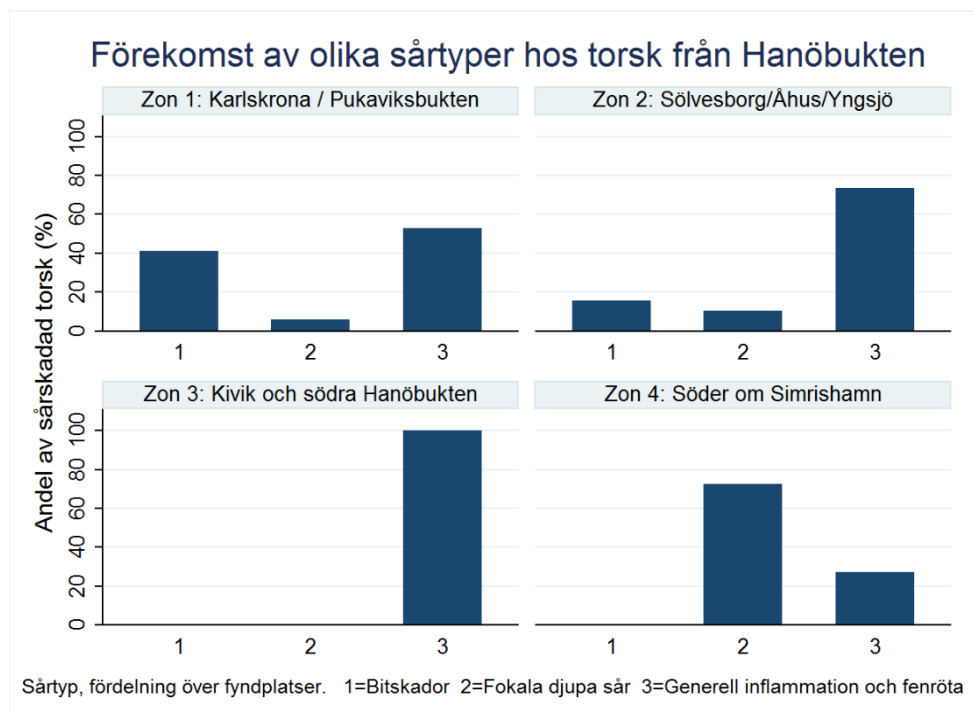


Fig. 8. Distributionen av sårtyper hos torsk mellan de fyra zonererna

Kemiska analyser

Analys avseende förekomst av kemiska stridsämnen

Senapsgasmetaboliten tioglykol och arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen kunde inte detekteras i de tre sårskadade skrubborna som undersökts (Bilaga 1).

Metallanalyser

Vid rapportens sammanställande var de externa analyserna inte färdiga men preliminära resultat från kvicksilveranalyser påvisade inte några alarmerande nivåer.

Analys av klorerade och bromerade substanser, perfluorerade ämnen och dioxiner

Vid rapportens sammanställande var de externa analyserna inte utförda.

Obduktionsbilder



Bild 1a. Tumör vid analöppning hos torsk

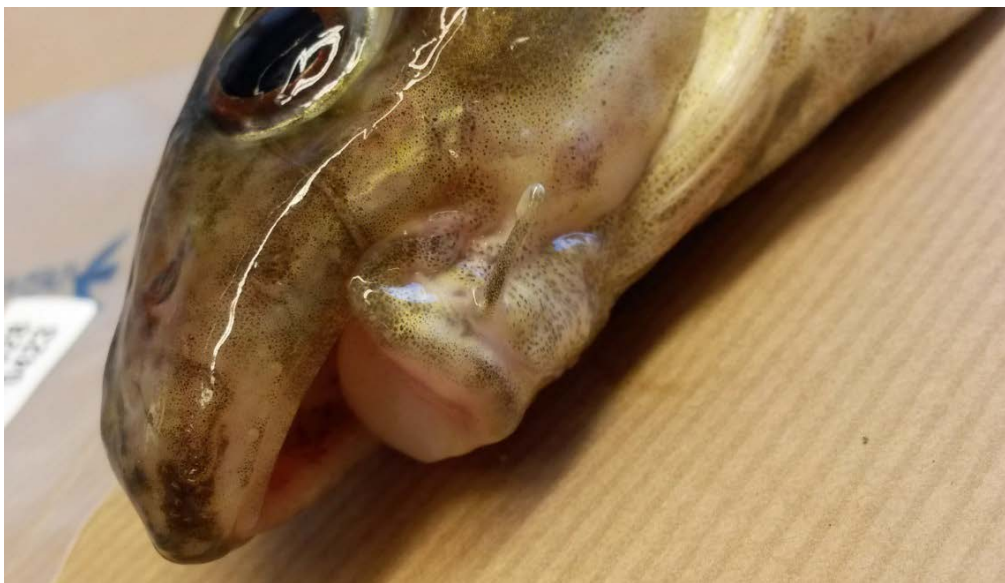


Bild 1b. Skelettdeformation hos torsk



Bild 2a. Skrubba med hudsår

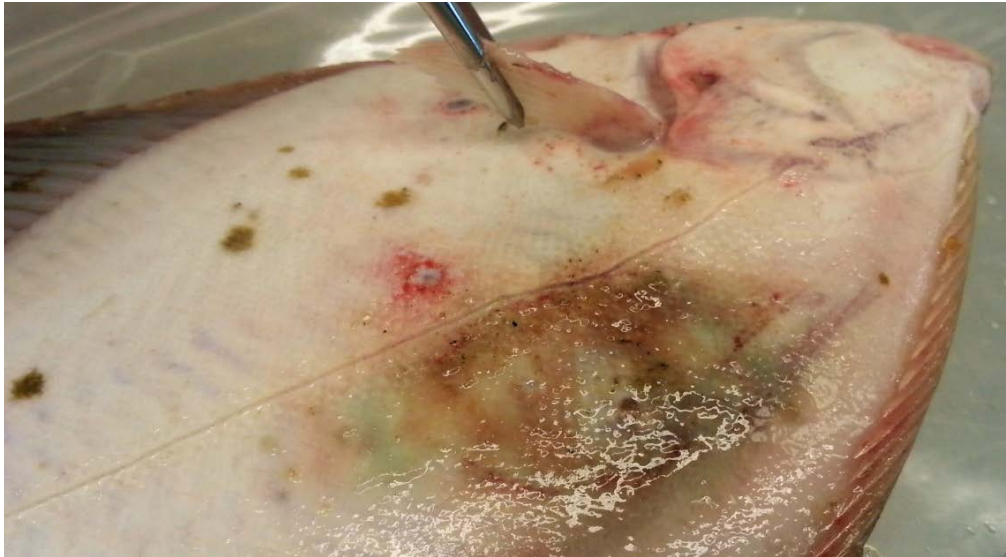


Bild 2b. Skrubba med hudsår



Bild 3a. Sårtyp 1. Bitmärken, torsk



Bild 3b. Sårtyp 1. Bitmärken, torsk



Bild 3c. Sårtyp 1. Bitmärken, penetrerande till bukålan, torsk. Tarmar hänger ut genom ett av hålen.



Bild 4a. Fokala nekrotiska sår av typ 2, torsk.



Bild 4b. Fokala nekrotiska sår av typ 2, genomskäring, torsk.



Bild 4c. Fokala nekrotiska sår av typ 2, torsk.



Bild 4d. Fokala nekrotiska sår av typ 2, genomskäring, torsk.



Bild 4e. Fokala nekrotiska sår av typ 2, tidigt stadium, torsk.



Bild 4f. Fokala nekrotiska sår av typ 2, tidigt stadium i genomskäring med blödning i underliggande muskulatur, torsk.



Bild 4g. Fokala nekrotiska sår av typ 2, torsk.



Bild 4b. Fokala nekrotiska sår av typ 2, sent stadium, kraftig infektion, torsk



Bild 4i. Fokala nekrotiska sår av typ 2, under avläkning, torsk



Bild 4j. Fokala sår av typ 2, under avläkning, torsk



Bild 5a. Sår av typ 3, generell inflammation/infektion och fenröta, torsk



Bild 5b. Sår av typ 3, generell inflammation/infektion och fenröta, torsk



Bild 5c. Sår av typ 3, generell inflammation/infektion och fenröta, torsk

DISKUSSION

Undersökningarna av torsk och skrubba i Hanöbukten delas in i två delar, en kvantitativ (loggdata, provfisken och trål) samt en kvalitativ (insänd sjuk fisk). Utifrån den kvantitativa delen har vi kunnat fastställa prevalens av sårskador på de två fiskarterna samt konstaterat att torskarna verkar ha en ökad andel sårskador under vintermånaderna januari och februari. Dock förtäljer inte insamlad loggdata vilken typ av sår som ses. Generellt förekommer patogener hos fisk i lägst omfattning när temperaturerna är låga i vattnet, med undantag av t.ex. ”winter ulcer disease” som förekommer på torsk i marina kalla vatten (<10°C) och orsakas av bakterien *Moritella viscosa*. Denna bakterie är dock saltberoende (Benediktsdottir & Heidarsdottir 2007) och borde inte trivas i Östersjöns bräckta vatten. För att inte förbise infektionen användes odlingsmedium med tillsatt salt och plattorna odlades i svalare temperaturer. Bakterien kunde dock inte påvisas. Det är mer sannolikt att tänka sig att orsaken till vintersåren har med fiskens eget immunförsvar att göra eller ännu mer troligt, yttre orsaker. I studien har vi bara data från ett år. För att veta om det är en ständig säsongsfluktuation eller en tillfällighet att vintermånaderna hade signifikant mer sårskadad fisk år 2015, behövs observationer insamlade under flera år och på ett standardiserat sätt. Noterbart är dock att man i Polen i ICES distrikt 24 såg en mycket hög sårprevalens i december år 1998 och 1999 (30 % resp. 14 %) hos torsk. Huruvida detta har ett samband med kalla vintermånader eller snarare faktorer i den närliggande miljön är oklart.

Prevalensen av sårskadad torsk i garnfångst och trål (2,8 % resp. <2,5 %) var inte alarmerande hög jämfört med tidigare observerade resultat från t.ex. polska studier år 2013 (6,9 %). Sår förekomsten verkar snarare minska hos östersjötorsken enligt tillgängliga data. Likaså gäller detta skrubba, där en prevalens på 0,6 % sårskadade fiskar möjligen förklarar det faktum att vi hade svårt att få in obduktionsmaterial från de lokala yrkesfiskarna. Det är oklart om den nedåtgående trenden är en del av ett cykliskt förlopp eller om den visar på faktiska förändringar i miljön.

Konditionsbedömning gjordes delvis i det tyska trålfisket (där både sjuk och frisk fisk inkluderades i beräkningarna) men också bland den inskickade fisken. Där sågs en diskrepans, med en lägre konditionsfaktor i trålfångsten (0,78 - 0,81) mot den inskickade fisken som i medeltal låg på den relativt goda konditionsfaktorn 0,94 (sjuk och frisk torsk tillsammans). Detta torde förklaras delvis av att trålfisket undersöker all fisk i alla storleksklasser som finns framför trålen medan den insända fisken hade en ”confounder” (statistikstörande faktor) i det att den valdes ut av yrkesfiskarna efter huruvida de hade sårskador, samt utifrån en fiskstorlek som skulle gå att skicka i kylboxarna. Dessutom är garnen som användes mer selektiva och fångar ett snävare storleksintervall. De insända fiskarna, som också var betydligt färre i antal (vilket påverkar statistiken) hade därför ett snävare spridningsmått i längd. Mot bakgrund av detta borde den trålade fiskens konditionsfaktor ge en mer rättvis siffra för torskbeståndet i helhet. Å andra sidan skiljer man ofta på fiskar nära kusten och de mer pelagiska (i fritt vatten), vilka båda på detta vis inkluderades i studien. Fördelningen av konditionsfaktor mellan fyndplats var inte signifikant och åter

igen fanns en ”confounder” i urvalet av insänd fisk. Mellan insänd sårskadad och frisk fisk sågs inte heller någon signifikant skillnad i konditionsfaktor (0,93 resp. 0,97), vilket talar för att såren inte påverkar fiskens kondition negativt.

Obduktionerna påvisade ingen gemensam patogen som kunde förklara fiskens ohälsa. Däremot kunde tre typer av skador observeras; sårtyp 1 (nära 24 %) som sannolikt orsakats av sälbett, sårtyp 2 (17 %) som var runda med ett karaktäristiskt utseende och ofta likartad placering på fisken, samt sårtyp 3 (60 %) som inte kunde förklaras med genomförda analyser (miljögiftsanalyser ej ännu utförda).

Sårtyp 1 - tydliga bitskador, återfanns endast från Hanöbuktens norra delar, där skärgården också härbärgerar sälkolonier.

Såren av typ 2 *borde* ha en gemensam nämnare då likheterna var uppenbara i utseende, djup, och placering. Vissa virusorsakade eller bakteriella infektioner, t.ex. ”winter ulcer disease” kan ge runda sår av denna typ. Att ingen gemensam patogen kunde isoleras var förbryllande. Dessa sår har också studerats av både danska och polska forskare utan framgång (Stachnik & Nadolna-Altyn, 2015), men en heltäckande studie som denna borde ha upptäckt etiologiska agens om sådana funnits. Danska forskare klassade såren som mekaniska (Miljøstyrelsen m.fl. 1982). Såren av typ 2 uppvisar stor likhet med de som kan ses hos olika fiskarter efter angrepp från parasitära nejonögon, *Lampetra fluviatilis*. Huruvida detta är en möjlig förklaring är inte fastställt. Man vet dock att flodnejonogat har sitt kärnområde i Östersjön med tillrinnande vattendrag. Eklöv (2006) kartlade förekomsten av nejonöga på Österlen och konstaterade att den fanns nära utloppen i 8 av 9 undersökta vattendrag. Dock kunde arterna ej typas, så det framgår inte om det var bäcknejonöga som anses vara strikt sötvattenslevande, eller flodnejonöga där vuxna individer lever i havet och parasiterar på fiskar längs kusterna. För bara 15 år sedan ansågs flodnejonöga vara starkt hotad i Östersjön efter att de större norrlandsälvarna byggdes ut (mellan 1955 och 1982), då stora arealer lek- och uppväxtområden försvann. Det innebar en kraftig försvagning av populationen ända fram till slutet av 1980-talet varefter en stabilisering började göra sig märkbar. Sedan 2010 bedöms fisken åter som livskraftig. Flodnejonöga har vid flera tillfällen observerats i Hanöbukten och bedöms som bofast i området (Artdatabanken 2016 samt 2002; Sjölander & Nathanson 2001). Det är inte helt känt vilka fiskarter som parasiteras av flodnejonögats havslevande fas, men man har sett att den kan sätta sig fast på, eller ovanför sidolinjen hos sill. Den käklösa munnen omges av en sugkopsliknande platta med s.k. radulatänder. Fisken biter sig fast, suger blod och raspar bort hud och muskelvävnad från värden i ett runt till ovalt mönster. Kircheis (2004), och Docker (2014) konstaterade att den Atlantlevande släktingen havsnejonöga, *Petromyzon marinus* ofta sätter sig ventralt/kaudalt på sina bytesfiskar. I en rysk undersökning av en annan släkting, stillahavsnejonogat *Lampetra tridentata* såg man i nordvästra Stilla havet att 25 % av nejonögonen valde just bakre delen av buken/stjärtspolen, under sidolinjen, när de parasiterade på stillahavstorsk. Stillahavsnejonogat valde dessutom i 62,5 % den vänstra sidan av fisken, vilken också var placeringen för majoriteten av de sår som sågs på Hanöbukstorsken. Såren var i medeltal 24 mm stora och 6 mm djupa. Maitland (1980) visade att ärr och skador efter

flodnejonögat (som finns i Östersjön) har en rund eller svagt oval form och mäter 15-20 mm. Sår som blir sekundärinfekterade och inflammerade ökar i diameter. Tuunainen *et al* (1980) rapporterade om sår på torsk efter nejonögon i Östersjön men senare beskrivningar saknas och det finns inga publicerade observationer om fångade torsk med nejonögon fastsittande på kroppen. En djupare analys av torskarnas och flodnejonögonens habitat och möjlighet till interaktioner skulle kunna ge fler ledtrådar om huruvida denna alternativa förklaring är en rimlig orsak till de runda/ovalsåren.

En möjlig förklaring till sårtyp 3 är den som beskrevs i inledningen (Fig. 1 & 2), d.v.s. förhållandet mellan miljö, fisk och mer eller mindre opportunistiska patogener som normalt inte påverkar fisken. En förändrad miljö, och därmed ökad yttre stress för fisken, kan bidra till ohälsa. Alternativt kan kemiska retningar orsaka inflammationer utan uppenbara fynd. För att fastställa sådana samband behövs kompletterande analyser av miljöföroreningar, vattenkemi, sedimentprover etc. i samband med fisket och under standardiserade provtagningsformer.

En bidragande orsak till torskens åkommor torde vara dess mjuka känsliga hud. I garnfångsterna från provfisket observerades hos i stort sett samtliga torsk, hudirritation och rodnader där de suttit fast i garnen. Torsken är dessutom en känslig fisk som ofta dör redan i garnet, medan majoriteten av de andra arterna som fångades kunde leva i timmar efter att garnen plockats upp på land. Det är möjligt att torsken då också är den art som lättare drabbas av olika sårskador från yttre faktorer.

Skrubbornas sår, oftast på den opigmenterade sidan, kan vara relaterade till det enstaka fynd av bakterien atypisk *Aeromonas salmonicida*, som gjordes i bakterieodlingen. Bakterien är svår att odla fram och kräver oftast provtagning i fält direkt från färska sår. I infektionsförsök (Wiklund 1994) har bakterien visat sig orsaka infektion även vid små hudirritationer uppkomna vid t.ex. hantering av fisken. I de fall bakterien injicerats under huden har den orsakat kraftiga sår. Atypisk *Aeromonas salmonicida* verkar endast drabba plattfisk och utgör inget hot mot t.ex. laxfisk. Bakterien kan överleva utanför värdfisken i upp till två månader i sediment i bräckt vatten. Möjligen finns denna bakterie i stor utsträckning i Hanöbukten och drabbar fisken då dess slemskikt påverkas av yttre omständigheter. Kompletterande undersökningar av bakterier i sedimentet skulle kunna bidra till en sådan konklusion.

Tre skrubbor analyserades för senapsgasmetaboliter och rester av andra kemiska stridsmedel utifrån förekomst av sår på "buksidan" tillsammans med det faktum att leken för de södra bestånden sker i Bornholmsdjupet på 100 meters djup (där även torsk leker) (SLU & HaV 2013). Bornholmsdjupet är en känd plats för dumpning av kemiska stridsmedel (HaV 2013). Analyserna visade ingen förekomst av metaboliterna. Provstorleken var dock liten, och det är oklart hur länge en sådan metabolit är stabil i levande organismer i vattenmiljö.

Vid obduktionerna kunde ofta konstateras att fisken var i normalt hull och magsäckarna fulla. Detta tyder på att de trots skador och sår, orkar jaga och kan

äta. Flera av fiskarna hade även helt eller delvis läkta sår vilket visar att skador och sår inte måste ha dödlig utgång. Lindrig till måttlig förekomst av parasitära maskar av de slag som sågs vid obduktionerna är vanligt förekommande hos vild fisk och anses i lindrig mängd inte påverka fiskarnas allmäntillstånd eller konditionsfaktor (Buchmann, 1986, Perdiguero-Alonso *et al.* 2008).

Sammanfattningsvis kan man misstänka multifaktoriella orsaker till fiskarnas lidanden. En viktig pusselbit är de kemiska analyserna som vid rapportens sammanställning inte var klara.

Hos vild marin fisk finns en stor variation normalbild och förekomst av patogener utifrån habitat. Utan ett övervakningsprogram vet vi idag inte vilken prevalens av en viss patogen eller annan sjukdomsorsak som kan räknas som normal i ett visst område. Detta komplicerar även arbetet vid identifiering av orsaken till sjukdomsutbrott. Enbart fallbaserade riktade undersökningar utan kunskap om normalbilden i området gör det svårt att dra några slutsatser eller utföra statistiska analyser.

För att få en bättre insikt i fiskarnas miljö, kännedom om sjukdomar och deras naturliga nivå av förekomst krävs regelbunden insamling av data och material över längre tidsperioder. Först då kan sammanställningar av epidemiologisk karaktär och trendspaning utföras för att tidigt hitta samband mellan t.ex. miljöföroreningar och ohälsa hos akvatiska organismer. Ett övervakningsprogram kräver provtagningar i fält för att få helt färska prover av bra kvalitet för analys av både virus, bakterier, parasiter och histologiska undersökningar. Dessa data behöver sedan kopplas samman med stora dataset från bl.a. klimatregistreringar, sediment-, vatten- och miljöprover. ICES har tagit fram ett sådant "Fish Disease Index" (Lang & Wosniok, 2008), en metod för att utvärdera sjukdomsdata hos vildfisk i samband med marin miljöövervakning, för att hjälpa medlemsländerna att standardisera sina provtagningar och analyser.

Del 2. Uppföljning och övervakning av sjukdomstillståndet hos vilda fiskpopulationer

BAKGRUND

SJUKDOMARS BETYDELSE

Hälsotillståndet hos fisk och skaldjur utgör en alltmer efterfrågad och viktig pusselbit i bedömningar av miljötillståndet i hav och kustvatten. Klimatförändringar såväl som miljöföroreningar och uppträdandet av nya invasiva främmande arter är några av många faktorer som kan kopplas till akvatiska organismers hälsa. Det finns skäl att anta att en påverkan på ekosystemet kan komma att ge kliniska symptom på utsatta fiskarter innan de ger symptom på fåglar och/eller fiskätande däggdjur. Därför bör fisk kunna användas som en parameter/indikator på ekosystemets hälsotillstånd (Naturvårdsverket 2005). Nationella bestandsövervakningsprogram och internationella organ för olika havsområden som exempelvis Baltic Marine Environment Protection Commission - Helsinki Commission (HELCOM) och ICES har därmed intresse av att akvatiska organismers hälsostatus kontinuerligt följs upp inom nationella sjukdomsprogram.

Sjukdomar kan ha otaliga konsekvenser på både individ- och populationsnivå som inte alla kan beaktas här. Akvatiska organismer drabbas med ibland förödande konsekvenser som slår ut hela populationer (ex. kräftpest) med allvarliga konsekvenser för ekonomi, fiske och ekosystem. Vissa patogener (sjukdomsalstrare) kan orsaka hög dödlighet på t ex. ägg och yngel medan infektion hos unga eller fullvuxna individer inte ger tydliga symptom. Exempel på sådana sjukdomar är ostronherpesvirus och infektiös pankreasnekros (IPN), en virusinfektion som orsakar celldöd i fiskars bukspottskörtel. Sådana sjukdomar kan därför drabba beståndens tillväxt utan att man är medveten om orsaken. Vissa sjukdomar kan även påverka individers kondition negativt utan att ge ytterligare symptom, något som felaktigt kan tolkas som tecken på födobrist.

En ökande förekomst av invasiva främmande arter kan föra med sig för Sverige helt nya och allvarliga sjukdomar. Kunskap om det aktuella sjukdomsläget kan vara avgörande för t ex. importregler för levande akvatiska organismer och för att kunna utföra kvantitativa och kvalitativa konsekvensanalyser (amerikansk hummer är nu aktuell i detta sammanhang).

Enligt Strategi för svenskt vattenbruk (SJV 2012) respektive Handlingsplan för svenskt vattenbruk (SJV 2015) bör verksamheten inom svensk akvakultur dubbleras mellan 2012-2020. Men ökad täthet på odlad fisk kan förekomsten av sjukdomar på vild fisk orsaka ökade problem för odlad fisk och vice versa. Detta är redan aktuellt då risken för smittspridning från odlad till vild fisk har ökat under senare år, ett fenomen som redan orsakat stora problem i vårt grannland Norge och som potentiellt redan är ett, ännu i vilande fas, problem i

Sverige. Även av detta skäl är en fördjupad kunskap om hälsotillståndet i vilda fiskpopulationer önskvärd.

FÖRUTSÄTTNINGAR FÖR KUNSKAPSIHÄMTNING

Sverige är dåligt rustat för att hantera problem och vetenskapliga utmaningar på vild fisk. Vi hör till de länder som idag står helt utan rutinmässig övervakning av akvatiska sjukdomar hos vilda populationer. Ett exempel på detta är tillståndet i Hanöbukten, där myndigheter sedan flera år fått in rapporter om sårskadad fisk från fiskare och från allmänheten (HaV 2013). Hade Sverige haft ett fungerande övervakningsprogram hade situationen uppmärksamats i ett tidigt skede och man hade kunnat föra en bättre dialog med intressenterna. Man hade också lättare kunnat tolka resultaten av riktade undersökningar i bukten och utvärdera de fynd som gjorts mot bakgrundsfakta om normalförekomst av olika tillstånd.

I dagsläget finns två heltidsanställda veterinärer samt fyra biologer som arbetar med svensk fiskhälsa vid SVA. De huvudsakliga arbetsuppgifterna innefattar odlad fisk inom akvakulturens övervakningsprogram (offentliga kontrollen och stamfiskkontrollen) som har statligt stöd från SJV, samt den frivilliga sjukdomsövervakningen som bekostas av odlarna själva. På vildfisk finns idag överhuvudtaget inga medel för en dylik övervakning och inte heller någon rutin för insamling av fisk för sjukdomsanalys.

Vid Institutionen för akvatiska resurser, SLU, arbetar i huvudsak biologer med kompetens inom ekologi och populationsdynamik samt provtagning i fält. SLU har också uppdrag inom Östersjöstrategin och är ensam organisation om att bedriva långsiktig fisk- och skaldjursprovtagning i kust och hav. Provtagningarna fördelas mellan Kustlaboratoriet i Öregrund och Havsfiskelaboratoriet i Lysekil. Övriga universitet i Sverige har inga dylika provtagningar som kan utnyttjas i ett nationellt sjukdomsprogram. Länsstyrelserna och vattenvårdsförbunden har få och begränsade provtagningsprogram. (Øresland 2015).

Sammantaget saknas i dagsläget medel och samordning för möjlighet till övervakning av akvatiska sjukdomar i Sverige (NV 2005).

DET FÖRESLAGNA PROGRAMMET

SYFTE

Programmet syftar till att ge Sverige en modern sjukdomsövervakning i akvatisk miljö, och som i kombination med inrapportering från fiskeindustri och allmänhet förväntas fånga upp både lokala och storskaliga förändringar i akvatiska organismers hälsostatus. Programmet innebär att vi kan:

- Upptäcka för Sverige nya sjukdomar
- Följa redan kända sjukdomar i tid och rum

- Undersöka effekter av sjukdomar på individ- och populationsnivå samt utveckla ny och redan befintlig diagnostik
- Utveckla och optimera provtagning
- Bistå med rådgivning, rapporter och upplysning till myndigheter, organisationer, företag och allmänhet
- Delta aktivt i internationella samarbeten för ett hållbart nyttjande av haven

Vi föreslår att programmet benämns: **Svenska programmet för akvatiska patogener** vilket på engelska blir Swedish Programme for Aquatic Pathogens, med samma akronym (SPAP) på båda språken. Detta är viktigt, då våra resultat kommer att redovisas internationellt till bland annat ICES/WGPMO och HELCOM.

FINANSIERING OCH PROGRAMUTVECKLING

Vi föreslår att SPAP i likhet med övervakningen av landlevande vilt finansieras med statliga medel och att SVA, i enlighet med regleringsbrevet och som redan ansvarig för sjukdomsövervakning på landsidan, ges ansvaret för programmet. Kostnader för programmets 3 första år beräknas till drygt 10,9 miljoner kr (Bilaga 2). Då det saknas erfarenhet av att bedriva mer omfattande övervakningsverksamhet av akvatiska sjukdomar i Sverige rekommenderar vi att programmet startas i mindre skala för att under den första treårsperioden successivt byggas upp till behovsnivån. På sikt kan även övervakning av inlandsvatten komma att läggas till. Vi föreslår att programmet utvärderas efter tre år för optimering av fortsatt verksamhet.

PROGRAMMETS UTFORMNING

I programmet ingår

- Övervaknings- och uppföljningsprogram
- Utbildning av personal
- En ”akutfond” motsvarande fallviltfonden på landsidan

Ett begränsat antal arter (framför allt fiskar, men även skaldjur och mollusker) undersöks regelbundet inom ramen för programmet. Artsammansättningen och undersökta patogener kan komma att variera över tid utifrån internationella och nationella larmrapporter, samt beroende på om provtagningen gäller väst- eller östkust. Verksamheten delas in i två delar:

1. Standardiserad screening. Insamlandet sker med gängse fångstmetoder inom ramen för SLU:s befintliga provtagningsverksamhet. Materialet selekteras utifrån en visuell selektion av fisk med sjukdomssymptom och provtas tillsammans med slumpmässigt utvalda symptomfria referensfiskar. Med ett sådant brett förfarande optimerar man möjligheterna att hitta kända, helt okända eller för svenska vatten nya sjukdomar.

2. Riktade provtagningar mot kända sjukdomsalstrande organismer med betydelse för kommersiella arter eller ekosystem. Dessa används för att avgöra geografisk spridning, prevalens och påverkan av redan identifierade sjukdomar.

Provmaterial kommer, för att sänka omkostnaderna, primärt att samlas in av SLU:s och SVA:s personal i fält i samband med SLU:s provfisken enligt punkt 1. Lämpligen provtas därmed också fiskarter och fiskindivider som ingår i mätningarna från provfiskerna för att ge en större kunskapsbas genom att kunna korrelera SLU:s och SVA:s data för fiskarna på individ- och populationsnivå. En eventuell utökning till riktade expeditioner enligt punkt 2 bör finnas med som plan för utveckling av programmet ifall övervakningen inte kan ses som tillräcklig genom SLU:s rutinmässiga provfisken.

I Östersjön genomförs årligen 70 tråldrag mellan Bornholm och Åland. Utsjöfisket fördelas på tre tillfällen (kvartal 1, 3 och 3/4). Havsfiskelaboratoriet utför årligen en utsjöprovtagning under kvartal 3 i Skagerack och Kattegatt, inkluderande ca 140-180 bottentrålprovtagningar. Ytterligare 35 bottentrålprovtagningar sker i fjord och skärgårdsområden längs västkusten. Vid Havsfiskelaboratoriet finns också en snabbgående provtagningsbåt som är utrustad med minitrål. Båten är väl lämpad för mindre kustnära provtagningar vid t ex akutprovtagning. SLU använder sig i huvudsak av garnfiske för provtagningar av fisk i kustnära områden och 2015 gjordes 51 provtagningar på 29 lokaler. Under åren 2016-2018 kommer dessutom ett stort nationellt marint karteringsprojekt att pågå, där utökade provfisken planeras.

SLU:s expeditioner och all annan provtagning som kan användas av SPAP redovisas i rapporten Fiskhälsa (*Öresland, 2015*). Vi föreslår att detaljer i SPAP:s fältprovtagning, t ex antal provtagna fiskar och fiskarter per provfiske, vilka kustpunkter som ska ingå och när provtagning där ska ske, utformas i detalj av SVA:s fiskpatologer i samråd med SLU, HaV och eventuellt övriga berörda myndigheter. Utformningen bör baseras på ICES Fish Disease Index för att möjliggöra jämförelse med internationellt insamlade data.

AKUTFOND

Vi föreslår att programmet skall förfoga över en akutfond, som avsätts specifikt för nedanstående ändamål. Motsvarande SVA:s fallviltsfond som får en fast summa per år. Medel som inte används fullt ut förs över till nästa års budget och fylls på till angiven nivå till nästkommande års programbudget. Beslut om akutfondens användande fattas av programansvarig vid SVA. Akutfondens nivå föreslås ligga på 1 miljon kr/år.

SVA, SLU och HaV får årligen ett stort antal telefonsamtal från allmänheten om sjuka eller döda fiskar och skaldjur. Dessa samtal är ibland viktiga indikatorer på att något sker i havsmiljön. Hittills har dock medel saknats för att vidare kunna registrera och analysera fynden. Då döda eller potentiellt sjuka akvatiska djur påträffas av fiskare, allmänheten, organisationer och företag skall SVA kontaktas för beslut om fynden skall undersökas. Om beskrivna symptom bedöms som intressanta för diagnostik så skall material kunna skickas in

kostnadsfritt, alternativt hämtas av SLU, för vidare analys vid SVA. Allmänhetens observationer av sjuka djur är ett viktigt komplement till övervakning av sjukdomar. Information till fiskare, allmänhet, organisationer och företag kommer därför att ges via hemsidor hos SVA, SLU och HaV, artiklar i fiskeri- och sportfisketidsskrifter, samt genom föredrag och artiklar i massmedia.

I samband med ökad dödlighet eller massdödlighet av en eller flera arter är det nödvändigt att skyndsamt inhämta material för undersökning av orsak och spridning. Ett genomförande måste kunna ske omedelbart och utan dröjsmål. Ekonomiska medel för detta måste därför ständigt finnas tillgängliga. Likaså i de fall en för Sverige främmande art påträffas i svenska vatten, är snabba åtgärder av vikt för att undersöka förekomst av främmande sjukdomar och parasiter som potentiellt kan överföras till de svenska bestånden. Programansvarig patolog vid SVA tar beslut om insatser som finansieras av akutmedel.

DIAGNOSTISKA METODER

Programmet kommer att utgå från ICES/OSPARS standard för sjukdomsövervakning av vildfiskarter (ICES 2015, Lang & Wosniok 2008, Feist *et al* 2004, Bucke *et al* 1996, Anon.1989), rekommendationer av EU:s centrala referenslaboratorium för organismen ifråga samt World Organisation for Animal Health (OIE) akvatiska manual. Vid behov kan metodutveckling komma att genomföras.

UPPSTART AV PROGRAMMET

Den första treårsperioden skall bland annat innefatta:

- Tillsättande av föreslagna tjänster vid SVA (1st., 80 %, programansvarig patolog/veterinär) och vid SLU (1st., 50 %, koordinator för SVA:s del i SLU:s expeditioner och kustprovtagningar, stationerad vid Kustlaboratoriet)
- Studiebesök och samordning med befintliga program inom EU
- Utbildning av övrig provtagningspersonal vid Kustlaboratoriet och Havsfiskelaboratoriet (SLU)
- Etablera samverkan med myndigheterna HaV, NV, SMHI samt andra relevanta aktörer som länsstyrelser, kommuner, universitet etc.
- Införliva SPAP som en del i ICES internationella rapporteringssystem
- SPAP-provtagning implementeras inom SLU:s ordinarie expeditions- och provtagningsverksamhet genom att SVA-personal deltar i expeditioner.
- Uppstart och optimering av SVA:s analysverksamhet inom SPAP

UTBILDNING

SVA ansvarar för utbildning av totalt 7 personer vid Kustlaboratoriet och Havsfiskelaboratoriet som deltar i fältprovtagning. Utbildningen skall omfatta:

- Urval och insamling av värddjur som skall ingå i undersökning
- Provtagning för optimal analys, journalföring, märkning
- Diagnostik och patologi som är möjlig att genomföra makroskopiskt och i fält
- Insändande av material
- Kvalitetssäkring i samband med diagnostisk verksamhet enligt SVA:s rutiner
- Kurs i allmän sjukdomslära för fisk, kräftdjur och musslor
- Kurs i försöksdjurskunskap och etik

Undervisningen planeras att genomföras vid både SVA, Havsfiskelaboratoriet, Kustlaboratoriet och i fält. Utbildningen längd, antal dagar, beslutas efter hand utifrån de behov som framkommer, men preliminärt avsätts två arbetsveckor.

Efter genomgången utbildning kan laboratoriernas personal utföra provtagningar inom den planerade verksamheten för att bistå den SVA-patolog som deltar i expeditionerna. Vidareutbildning bör ske årligen. Förslagsvis hålls månatliga ”ronder” för diskussion om aktuella ärenden, uppkomna problem samt kompetensöverföring via videolänk.

REFERENSER

- Alfjorden, A., Jansson, E. & Johansson, K.E. (2006). A systemic granulomatous inflammatory disease in wild Atlantic cod, *Gadus morhua* associated with a bacterium of the genus *Francisella*. DIPNET Newsletter 44.
- Alfjorden, A., & Ruane, N. (2015). Francisellosis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 64. 5 s. ISBN 978-87-7482-173-1
- Anon. (1989). Methodology of fish disease surveys. Report of an ICES Sea-going Workshop held on RV U/F 'Argos' 16-23 April 1988. ICES Cooperative Research Report, 166. 33 s.
- Artdatabanken SLU. (2016). <http://artfakta.artdatabanken.se/taxon/102127>
- Austin, B. & Austin, D.A. (2012). Bacterial Fish Pathogens. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Science + Business media Dordrecht. ISBN 978-94-007-4884-2.
- Benediktsdottir E., Heidarsdottir K.J. (2007). Growth and lysis of the fish pathogen *Moritella viscosa*. Letters in Applied Microbiology 45; 115-120. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02161.x
- Buchmann, K. (1986). On the infection of Baltic cod (*Gadus morhua* L.) by the acanthocephalan *Echinorhynchus gadi*. Nordisk veterinärmedicin 38(5):308-14.
- Bucke, D., Vethaak, A.D., Lang, T., Møllergaard, S. (1996) Common diseases and parasites of fish in the North Atlantic: Training guide for identification. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences 19, 27 s.
- Colquhoun, D.J. & Duodu, S. (2011) *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. Veterinary Research 42.
- Docker, M.F. (2014). Lampreys: Biology, Conservation and Control, Volym 1. Springer, 438 s.
- Eklöv, A. (2006). Fiskar och fiske i nio Österlenår. Österlens Vattenvårdsförbund.
- Feist, S.W., Lang, T., Stentiford, G.D., Köhler, A. (2004). The use of liver pathology of the European flatfish, dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring biological effects of contaminants. ICES Techniques in Marine Environmental Science, 28: 47 s.
- Havs- och vattenmyndigheten. (2013). Hanöbokusutredningen. Rapport av regeringsuppdrag. 2013-10-31
- ICES (2015). Report of the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms (WGPDMO), 24–28 February 2015, Helsinki, Finland. ICES CM 2015/SSGEPI:01.124 s.
- ICES (2016). NATIONAL REPORT for 2015: Denmark (including the Faroes) Information from Technical University of Denmark, National Veterinary Institute (DTU Vet), University of Copenhagen (KU), Faculty of Health and Medical Sciences, Danish Veterinary and Food Administration (DVFA) Food and Veterinary Agency, National Reference Laboratory for Fish Diseases, Faroe Islands. (Opubl.).

- ICES (2016). ICES NATIONAL REPORT for 2015: Poland. Podolska, M. National Marine Fisheries Research Institute, Gdynia, Poland (Opubl.).
- ICES (2016). NATIONAL REPORT for 2015: Russia. Bezgachina T., Burlachenko I.– Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow. Karaseva T., Shamray T., Bessonov A., Bakay Yu. – Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (PINRO), Murmansk. Rodjuk G., Davidovich V., Krasowskaya N.– Atlantic Scientific Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (AtlantNIRO), Kaliningrad. Frolov E., Polteva E., Galanina E., Frolova S.– Sakhalin Scientific Research Institute of Fisheries and Oceanography (SakhNIRO), Yuzhno-Sakhalinsk (Opubl.).
- ICES (2016). Report of the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms (WGPDMO), 16–20 February 2016, Gloucester Point, Virginia USA. ICES CM 2016 (Opubl.).
- Kircheis F.W. L.L.C., (2004). SEA LAMPREY. *Petromyzon marinus* Linnaeus 1758. Carmel ME.
<http://www.fws.gov/GOMCP/pdfs/lampreyreport.pdf>.
 Accessed 6 June 2014.
- Lang, T., and Wosniok, W. (2008). The Fish Disease Index: a method to assess wild fish disease data in the context of marine environmental monitoring. ICES CM 2008/D:01. 13 s.
- Lunneryd S.G., Ljungberg P., Ovegård M., Bernt K., Boström M. (2015). Sälmask och spiralmask i torsk och rötsimpa i svenska kustvatten. Aqua reports 2015:1. Sveriges lantbruksuniversitet, Lysekil. 23 s.
- Länsstyrelsen i Skåne Län. (2012). Fiskarnas observationer avseende förändringar i de skånska Östersjökustområdena. Johan Wagnström, Fiskeridirektör.
- Naturvårdsverket. (2005). Effekter av miljögifter på däggdjur, fåglar och fiskar i akvatiska miljöer. Rapport 5908. Reviderad december 2008.
- Maitland P.S (1980). Scarring of Whitefish (*Coregonus lavaretus*) by European River Lamprey (*Lampetra fluviatilis*) in Loch Lomond, Scotland Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37(11):1981-1988.
- Miljöstyrelsen, Laboratoriet for akvatisk patobiologi, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Fiskepatologisk Laboratorium, Danmarks Fiskeri- og Havundersøgelser. (1982). Undersøgelse af fiskesygdomme i felten. Kandrups Bogtrykkeri ApS, København. ISBN 87-503-4214-2.
- OIE (2015). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris, France: World Organisation for Animal Health.
- Orlov, A.M., Beamish, R.J., Vinnikov, A.V., Pelenev, D. (2009). Feeding and prey of Pacific Lamprey in coastal waters of the western North Pacific. *In* Challenges for diadromous fishes in a dynamic global environment. Edited by Haro A., Smith K.L., Rulifson R.A., Moffitt C.M., Klauda R.J., Dadswell M.J., Cunjak R.A., Cooper J.E., Beal K.L., and Avery T.S. American Fisheries Society, Symposium 69, Bethesda, Md. pp. 875–877.

- Perdiguero-Alonso, D., Montero, F.E., Raga, J.A. & Kostadinova, A. (2008). Composition and structure of the parasite faunas of cod, *Gadus morhua* L. (Teleostei: *Gadidae*), in the North East Atlantic. *Parasites & Vectors*, 2008 1:23 doi:10.1186/1756-3305-1-23.
- Sjölander, E. & Nathanson J.E. (2001). Faktablad: *Lampetra fluviatilis*-flodnejonöga. Artdatabanken, SLU. 2002-11-21.
- SLU och HaV (2013). Resursöversikt 2013. Skrubbskädda/Skrubba/Flundra.
- Sniezko, S. 1974. Diseases of Fishes Bacteria. TFH Publications ISBN-13: 978-0876660386.
- Stachnik M., & Nadolna-Altyn K. (2015). Screening for viral hemorrhagic septichemia in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. 17th EAFP programme book.
- Statens jordbruksverk. (2012). Svenskt vattenbruk– en grön näring på blå åkrar. Strategi 2012–2020.
- Statens jordbruksverk. (2015). Handlingsplan för utveckling av svenskt vattenbruk. Konkretisering av Strategi 2012-2020.
- Thulin, J., Höglund J., & Lindesjö, E. (1989). Fisksjukdomar i kustvatten. Naturvårdsverkets förlag.
- Tuunainen, P., Ikonen, E. & Auvinen, H. (1980). Lampreys and lamprey fisheries in Finland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37. pp. 1953–1959
- Wiklund, T. (1994). Skin ulcer disease of Flounder (*Platichthys flesus*): Disease patterns and characterization of an etiological agent. Avhandling, Åbo Akademi University, Åbo Finland.
- Wiklund, T. & Bylund, G. (1993). Skin ulcer disease of flounder *Platichthys flesus* in the northern Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol 17: sid 165-174.
- Øresland, V. (2015). Fiskhälsa. Rapport till Havs och Vattenmyndigheten, 26 s.

BILAGOR

BILAGA 1. ANALYS AV SENAPSGASRELATERADE SUBSTANSER I VÄVNAD FRÅN FISK



Handläggare/Our reference
Johanna Qvarnström

FOI MEMO

Projekt/Project

Sidnr/Page no

Analys av skadad fisk

1 (7)

Uppdragsnummer/Project no

E41702

Kund/Customer
SVA

Datum/Date

2015-07-01

Memo nummer/number

FOI Memo H1549

SEKRETESS
Enligt 2 kap. 1 § offentlighets-
och sekretesslagen (2009:400)
2015-07-03
SEKRETESSKLASSIFICERAD
Totalförsvarets forskningsinstitut

SKYDDAD/PROTECTED A

**Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad
från fisk**

Johanna Qvarnström och Jenny Rattfelt Nyholm

Sändlista/Distribution: Marlene Areskog, SVA

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 2 (7)
----------	--------------------------	--------------------

sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------

Bakgrund

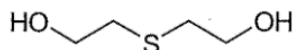
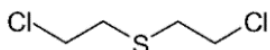
I Hanöbukten har man på senare år observerat fisk, framför allt skrubbskädda, med frätliknande sårskador. Statens Veterinärmedicinska anstalt, SVA, har därför fått i uppdrag från regeringen att undersöka orsaken till detta. Bakgrunden till hur såren har uppkommit har ännu inte kunnat fastställas.

På uppdrag av SVA har FOI genomfört kemisk analys på skadad vävnad från fisk för att försöka komma ett steg närmare orsaken till hudskadornas ursprung. En hypotes är att frättskadorna kan ha orsakats av närkontakt med dumpad kemisk ammunition (senapsgas) som finns i närområdet.

Inledning

Analys av nedbrytningsprodukter relaterade till senapsgasexponering har utförts på vävnad från fisk som fångats av yrkesfiskare i Hanöbukten och skickats in till SVA. Det ämne som i första hand söktes är tiodiglykol, som kan vara en stark indikation för att fisk exponerats för senapsgas. I andra hand har analysen riktats mot arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen som Clark, arsinolja och adamsit.

Det har tidigare visats att senapsgas kan binda till aminosyror som glutaminsyra och asparaginsyra i keratin. Keratin är ett protein som bland annat finns i huden. Senapsgas som binds in till aminosyran bildar en 2-hydroxyetyltioetyladdukt, $-C_2H_4SC_2H_4OH$. Bindningen kan brytas genom behandling med bas [G. van der Schans *et al.*]. Då frigörs tiodiglykol ($HOC_2H_4SC_2H_4OH$), som kan detekteras i derivatiserad form med GC-MS/MS, se strukturer i figur 1.



Senapsgas (HD)

CAS 505-60-2

Tiodiglykol (TDG)

CAS 111-48-8

Figur 1. Molekylstrukturer för senapsgas och tiodiglykol

SVA har tillhandahållit material från tre fiskar med synliga sår och material från tre fiskar utan synliga sårskador, se tabell 1. När proverna anlände till FOI var de något tinade men fortfarande kylda och de förvarades fortsättningsvis vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 3 (7)
----------	--------------------------	--------------------

sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------

Tabell 1. Fiskvävnad som analyserats

Benämning, SVA	Kommentar
U150108-0384, 000117	Sårskadad fisk
U150325-0399, 000362	Sårskadad fisk
U141210-0421, 006542	Sårskadad fisk
U150421-0490, 000486	Vävnad utan synliga skador
U150422-0498, 000533	Vävnad utan synliga skador
U150325-0399, 000363	Vävnad utan synliga skador

Resultat

Vid analys av proverna har ingen av de sökta substanserna kunnat detekteras. Analysen gav därmed ingen indikation på att fiskarna exponerats för senapsgas eller arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen.

Slutsatser och kommentarer

Vi har inte kunnat påvisa tiodiglykol eller arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen i något av proven.

Experiment

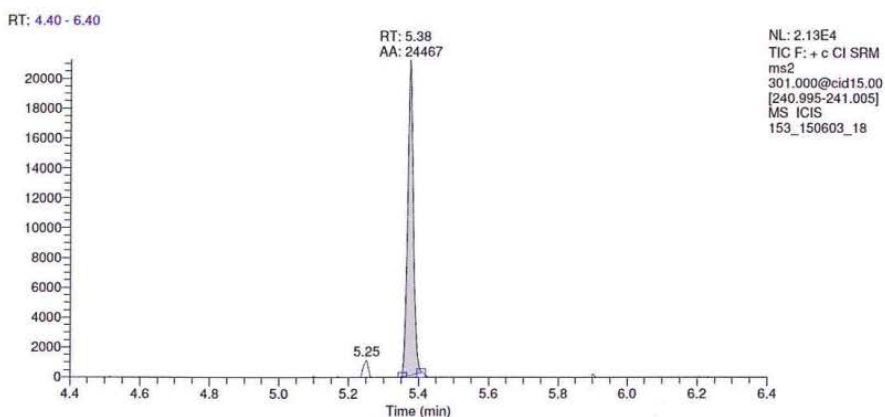
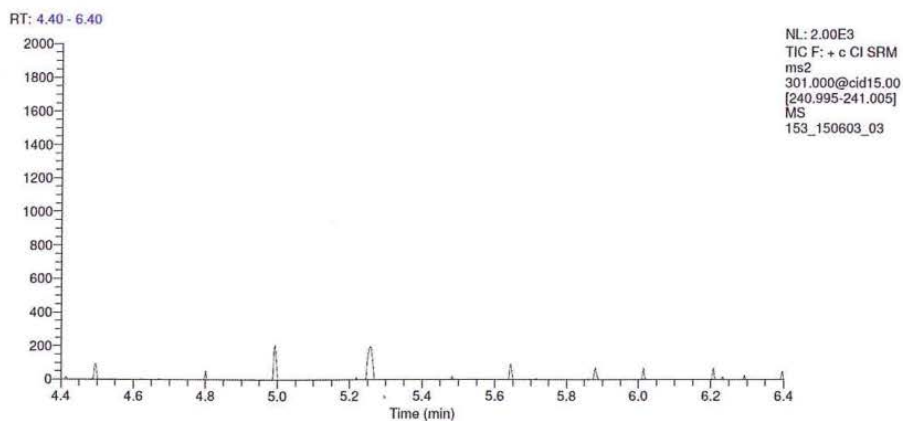
Upparbetning av vävnad

Vävnadsprover från de olika fiskarna (0,5-1,2 g) tvättades först i två omgångar genom att de skakades med rent vatten (ca 2 ml) i ca 20 minuter. Därefter återupprepades tvätten på samma sätt fast med acetonitril som tvättvätska. Mellan varje tvätt överfördes bitarna till nya vialer. Vävnadsbitarna överfördes därefter återigen till nya vialer och skakades i basisk vattenlösning i ca en timme för att bryta eventuella inbindning av, och extrahera ut, tiodiglykol. Extraktet neutraliserades med saltsyra och analyserades efter fastfasextraktion [L. Öberg *et al.*] och derivatisering [J. Riche's *et al.*] med GC-MS/MS. Det neutraliserade extraktet har även analyserats med LC-MS/MS enligt [J.R. Nyholm *et al.*] för att vi eventuellt skulle kunna detektera nedbrytningsprodukter av de arsenikbaserade tårgas-/kräkämnen Clark, adamsit och arsinolja.

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 4 (7)
----------	--------------------------	--------------------

sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------



Figur 2. Kromatogram från GC-MS/MS analys av kemiskt derivat av tiodiglykol. Överst: basiskt extrakt av vävnad från fisk som uppvisat sårskador, nederst: standard av tiodiglykol.

Inbindningsförsök - verifiering av metod

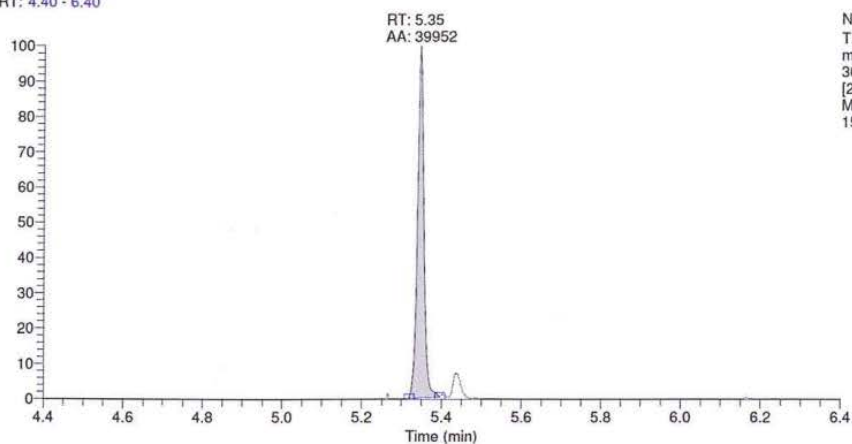
Till vävnadsbitar (0,5-1,2 g) tillsattes 1 µg deutererad senapsgas löst i isopropanol. Efter en timmes skak i rumstemperatur tvättades och extraherades/behandlades provbitarna enligt den ovan beskrivna proceduren. Verifiering av metoden redovisas i figur 3.

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 5 (7)
----------	--------------------------	--------------------

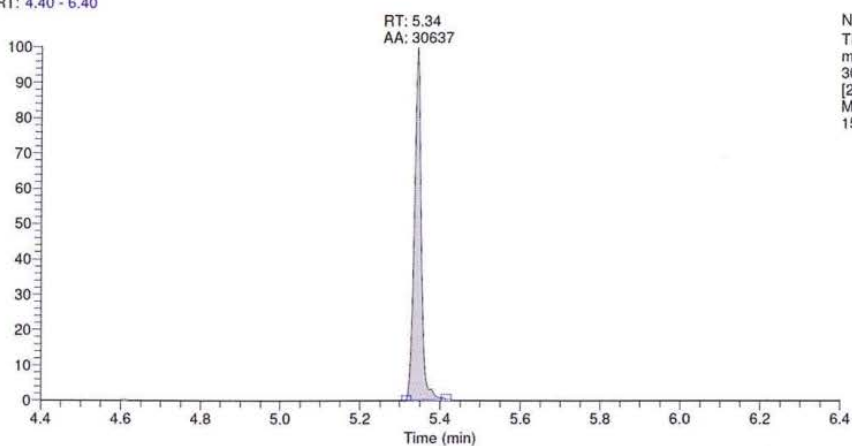
sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------

RT: 4.40 - 6.40



RT: 4.40 - 6.40



Figur 3. Kromatogram från GC-MS/MS-analys av kemiskt derivat av tiodiglykol. Överst: basiskt extrakt från fiskvävnad behandlad med 1 µg D₈-senapsgas, nederst: standard av D₈-tiodiglykol.

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 6 (7)
----------	--------------------------	--------------------

sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------

Referenser

Riches J., Read R.W., Black R.M. 2007. Analysis of sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography – ion trap tandem mass spectrometry: Journal of Chromatography B, 845(1), p. 114-120.

van der Schans G., Noort D., Mars-Groenendijk R., Fidder A, Chau L., de Jong L., Benschop H. 2002. Immunochemical detection of sulfur mustard adducts with keratins in the stratum corneum of human skin: Chemical Research in Toxicology, v. 15, p. 21-25.

Öberg L., Nygren Y., Wingfors H., Nyholm J.R., Östin A. 2013. Extraktion av hydrolyserade och oxiderade produkter från kemiska stridsmedel med polymera fastfas-kolonner. FOI-R--3694--SE.

Nyholm J.R., Nygren, Y., Qvarnström, J., Berglind R., Östin, A. 2014. Analysis of chemical warfare related compounds in sediment samples from the Baltic Sea performed at the Swedish Defence Research Institute in the CHEMSEA project. FOI-D-0567--SE

FOI MEMO	Datum/Date 2015-07-01	Sida/Page 7 (7)
----------	--------------------------	--------------------

sekretess, se sid 1

Titel/Title Analys av senapsgasrelaterade substanser i vävnad från fisk	Memo nummer/number FOI Memo H1549
--	--------------------------------------

Bilaga 1 - Instrumentella betingelser

GC-MS/MS

Prover analyserades med en gaskromatograf (ThermoScientific Trace 1300) kopplad till en trippelkvadropol masspektrometer (ThermoScientific TSQ 8000Evo).

Injektionsvolym: 1 µl

Kolonn: Agilent J&W DB-5MS (5 % fenylarylen och 95 % dimetylpolysiloxan),

30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Temperaturprogrammering av GC-ugn: 80 °C (1 min); 20 °C/min till 280 °C (2 min)

Typ av analys: positiv kemisk jonisering med metan som reaktionsgas, SRM-analys (Tiodiglykol: 301→241, 301→169, D₈-tiodiglykol 309→245, 309→169)

LC-MSMS

Waters Acquity UPLC kopplat till Waters Xevo masspektrometer

Mobilfas A: 0,1 % myrsyra i Milli-Q-vatten, mobilfas B: 0,1 % myrsyra i acetonitril

Mobilfas-flöde: 0,5 ml/min, gradienteluerung från 5 % B till 98 % B på 3 minuter

Injektionsvolym: 5 µl

Kolonn: Acquity HSS C18 SB, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm, Waters

Kolonntemperatur: +60 °C

Typ av MS-analys: elektropray, positiv jonisering, multi reaction monitoring (MRM)

BILAGA 2. BUDGETPLAN FÖR UPPFÖLJNING OCH ÖVERVAKNING AV SJKDOMSTILLSTÅNDET HOS VILDA FISKPOPULATIONER

Utbildningar	Kr
Första årets grundutbildning	
Två veckors grundutbildning för sex "nyckelpersoner" från K-lab och H-lab	
Logi, traktamenten och resor	70 000
Lönekostnader (ingår lönersättning även för kursdeltagare)	
Administrativ kostnad	26 000
Materiel:	30 000
Summa grundutbildning år 1:	126 000
Vidareutbildning	
Årskostnader (år 2 och 3 har samma kostnad)	
Möten: Ett årligt möte a 2-3 dagar per år vid SVA resp H-lab/Kustlab. Genomgång av resultat samt korta specialutbildningar	
Logi, traktamenten och resor	30 500
Administrativ kostnad	10 500
Materiel	8 000
Summa utbildning /år, år 2 resp 3	49 000
Summa utbildning år 2 och 3	98 000
Totalsumma utbildning	224 000
Tjänster	
Lönekostnader (år 1, 2 och 3 har samma kostnader)	
Tjänst 80%, SVA (programledare)	786 000
Tjänst 50% K-lab koordinator	592 000
Summa Tjänster	1 378 000
Totalsumma tjänster år 1,2,3	4 134 000
Provtagningsverksamhet	
Material och lokala båt-kostnader	
Lönekostnad fältassistenter samt fälttillägg inkl OH)	90 000
Utveckling av diagnostik och specialundersökningar av vissa patogener för att påvisa effekter på individ och populationsnivå (löner och material)	
Administrativ kostnad	75 000
Analyser vid SVA	1 000 000
Summa årskostnad provtagningsverksamhet	1 165 000
Totalsumma årskostnader (år 1,2 och 3)	3 495 000
Akutfond	
Akutfond årskostnad	1 000 000
Totalsumma akutfond år 1, 2, 3	3 000 000
Totalsumma programmet år 1,2,3	10 853 000



STATENS
VETERINÄRMEDICINSKA
ANSTALT

besöksadress: ulls väg 2 B **adress:** 751 89 Uppsala **telefon:** +46 18 67 40 00
fax: +46 18 30 91 62 **e-post:** sva@sva.se **webb:** www.sva.se