



UPPSALA
UNIVERSITET

Fibropapillomatosis, tumörutveckling hos soppsköldpaddor (*Chelonia mydas*)

Potentiella orsaker bakom sjukdomens ökade
utbredning samt dess association till herpesviruset
CFPHV

Malin Jigrud

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Fibropapillomatosis, tumörutveckling hos soppस्कöldpaddor (*Chelonia mydas*) – potentiella orsaker bakom sjukdomens ökade utbredning samt dess association till herpesviruset CFPHV

Malin Jigrud

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Sjukdomen fibropapillomatosis drabbar de flesta marina havssköldpaddor men främst arten soppस्कöldpadda, *Chelonia mydas*. Sjukdomen karaktäriseras av tumörer som tillväxer på yttre organ som hud och ögon men tumörerna kan även utvecklas i inre organ exempelvis i lungor och lever. Tumörerna har flera negativa effekter på djuret, däribland försämrad rörelseförmåga, förlorad syn samt att de inre organen förlorar sina normala funktioner. Dessa konsekvenser leder till att sköldpaddan blir kraftigt försvagad, strandar och inte sällan avlider. Sjukdomens spatiala och temporala mönster har studerats och har föranlett misstanke om en infektion som orsak till sjukdomen. Virus, *Chelonid fibropapilloma-associated turtle herpesvirus*, har genom olika PCR metoder ständigt detekterats i tumörer hos infekterade individer och anses därför starkt associerad till fibropapillomatosis. Trots att kunskapen om viruset är fortsatt bristfällig samt att Kochs postulat inte helt har uppfyllts är herpesviruset ändå sjukdomens främsta kandidat. Även hur fibropapillomatosis smittas, dess smittväg är okänd. Studier från de senaste åren tyder på att smitta sker genom *virus shedding*, direkt utsöndring av virus. En tidigare studie har däremot indikerat en marin igel som eventuell vektor för viruset.

Under mitten av 80-talet observerades en ökad förekomst av sjukdomen hos flera populationer av soppस्कöldpadda. Orsaken till denna ökning är inte bekräftad. Hypotesen att föroreningar eller kemikalier orsakar ett sänkt immunförsvar och på så sätt gör sköldpaddan mer mottaglig för sjukdomen har inte framgångsrikt bevisats. Däremot har ett samband mellan fibropapillomatosis och försämrad födokvalitet i eutrofierade kustvatten konstaterats. Om detta är orsaken till sjukdomens ökade utbredning återstår dock att se.

Inledning

Soppस्कöldpaddan (*Chelonia mydas*) även kallad grön havssköldpadda, är en marin havssköldpadda som tillsammans med fem andra arter utgör familjen Cheloniidae. Soppस्कöldpaddan är en herbivor med undantag för det juvenila pelagiska stadiet då den livnär sig på en något mer frikostig omnivorisk diet. Från det att soppस्कöldpaddan kläcks tills dess att den når en ryggsköldslängd på 20 – 35 cm (två till fem år) lever den i pelagiskt vatten. Därefter migrerar den juvenila sköldpaddan till en födoplats i kustnära vatten där den stannar tills sexuell mognad uppnåtts. Sköldpaddan livnär sig främst på sjögräs och alger. På grund av den proteinfattiga kosten tillväxer soppस्कöldpaddan långsamt och når sexuell mognad mellan 26 och 40 års ålder. I den adulta livsfasen migrerar soppस्कöldpaddan långa sträckor mellan födoplats och äggläggningsstränder (Spotila 2004).

Soppस्कöldpaddan bedömdes av International Union for Conservation of Nature (IUCN 2015) som fortsatt utrotningshotad år 2015 baserat på en sammanställning av Seminoff (2004). Utrotningshotad är det tredje mest kritiska stadiet på en sex-gradig skala. Både soppस्कöldpaddans kött och dess ägg anses i många länder vara en delikatess och jakten på sköldpaddan samt skördandet av dess bon har en uppenbart negativ påverkan på artens populationstillväxt. Även fiskeindustrin, där havssköldpaddor är en vanlig bifångst är ett vanligt hot (Work *et al*

2015). Utöver dessa faktorer tillkommer ytterligare hot såsom föroreningar, oljeutsläpp, habitatförstörelse och klimatförändringar (IUCN 2015).

På senare tid har även sjukdomen fibropapillomatosis (FP) börjat innebära ett hot för havssköldpaddornas framtida populationsutveckling (Herbst 1994). Denna sjukdom drabbar alla arter av marina havssköldpaddor utom havslädersköldpaddan (*Dermochelys coriacea*) (Flint *et al.* 2010). Sjukdomen, som anses vara potentiellt dödlig, karaktäriseras av tumörtillväxt på yttre organ såsom ögon och hud men kan även förekomma i inre organ (Jacobson *et al.* 1989). Soppsköldpaddan är den art som varit särskilt utsatt och har därför studerats i störst utsträckning (Herbst 1994). Det etiologiska sambandet, vad som orsakar FP, är ännu inte klarlagt men bevisningen som presenteras hittills tyder på ett herpesvirus som orsak till sjukdomen (Herbst *L et al.* 1995, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Quackenbush *et al.* 2001, Ene *et al.* 2005). En ytterligare studie har föreslagit marina iglar som potentiella vektorer för viruset (Greenblatt *et al.* 2004).

Under mitten av 80-talet fram till början av 90-talet observerades en oroväckande ökning av FP hos flera populationer av soppsköldpadda, bland annat i Australien, Indonesien, Hawaii och USA (Balazs 1991, Herbst 1994, Foley *et al.* 2005, Chaloupka & Balazs 2005, Chaloupka *et al.* 2009). Liksom det etiologiska sambandet saknar sjukdomens ökade förekomst en tydlig förklaring. Flera möjliga faktorer har studerats men en entydig förklaring kan inte konstateras (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre *et al.* 1995, Work *et al.* 2001, dos Santos *et al.* 2010, Keller *et al.* 2014). Däremot har resultaten från två sammanlänkade studier av Van Houtan *et al.* (2010, 2014) indikerat att det finns ett samband mellan markanvändning i kustnära lägen och ökad förekomst av FP. Markanvändning såsom jordbruk och urbanisering antas bidra till övergödning (eutrofiering) av kustvatten, vilket gynnar vissa arter av invasiva makroalger som ingår i soppsköldpaddans diet.

Denna text avser att redogöra för möjligheten att ett herpesvirus är orsaken bakom FP samt redogöra för sjukdomens eventuella smittvägar. Potentiella faktorer som kan ha bidragit till sjukdomens ökade utbredning kommer likaså beskrivas. För att klargöra dessa punkter krävs även svar på följande frågor: Vad är fibropapillomatosis? När i soppsköldpaddans livshistoria kommer den i kontakt med smittan och vilka konsekvenser får sjukdomen för en smittad individ?

Fibropapillomatosis

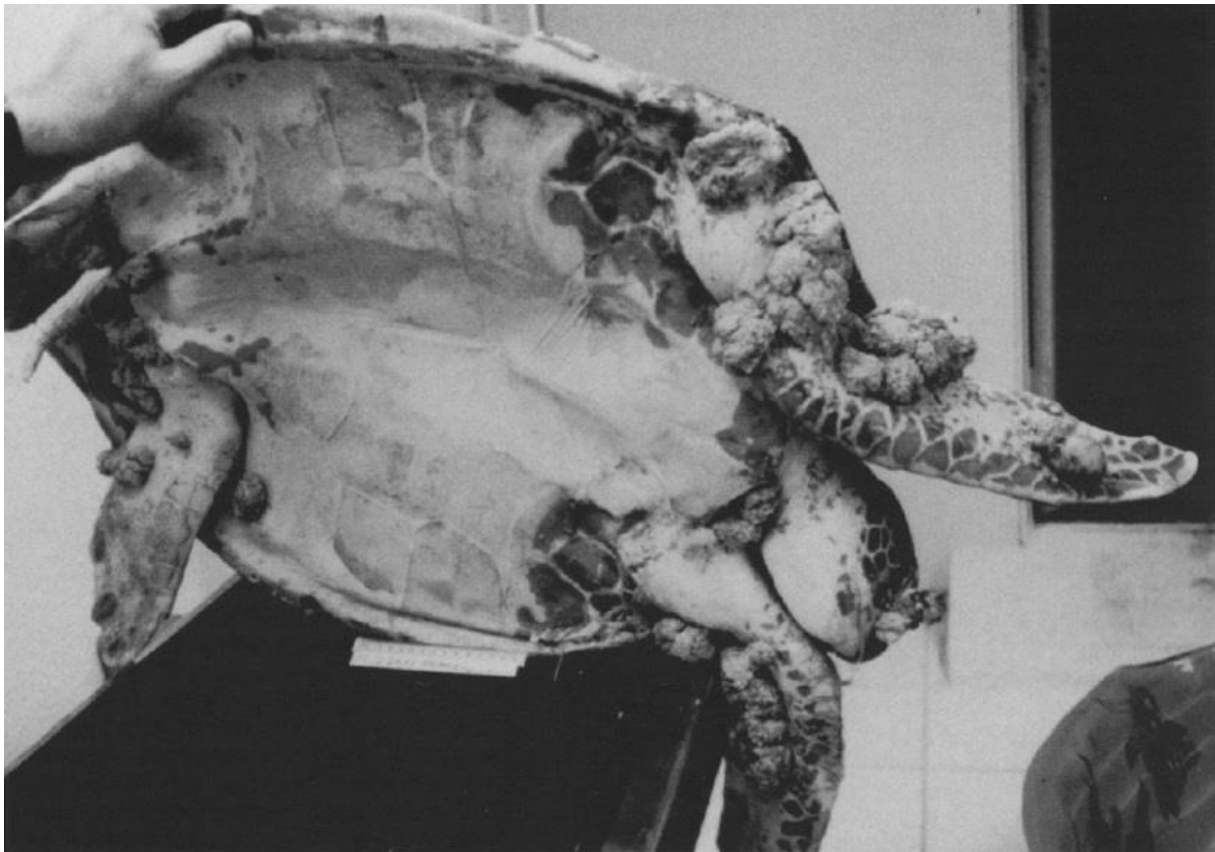
De första observationerna av fibropapillomatosis

FP observerades och beskrevs för första gången år 1938 på New York Aquarium av Smith och Coates (1938). En soppsköldpadda som var infångad utanför Key West, Florida två år tidigare hade utvecklat sjukdomens karaktäristiska tumörer till skillnad från akvariets resterande sköldpaddor. När Smith och Coates studerade FP utanför Key West var sjukdomen förhållandevis ovanlig och observerades endast hos 3 av 200 (1,5 %) vilda soppsköldpaddor. Ett decennium senare beskrev Schlumberger och Lucké (1948) sjukdomen utifrån tre soppsköldpaddor infångade utanför Florida och resultatet från studien visade även på tumörutveckling i interna organ. År 1958 observerades FP sporadiskt hos häckande honor i Malaysia (Hendrickson 1958) och samma år bekräftades det första, av vad som kom att bli många fall av FP utanför Hawaii (Balazs 1991).

Fibropapillomatos hos soppsköldpaddor

FP drabbar som tidigare nämnt de flesta arter av marina havssköldpaddor (Flint *et al.* 2010). När sjukdomen drabbar den mest välstuderade arten soppsköldpaddan, kallas sjukdomen *green turtle fibropapillomatosis* (GTFP). FP verkar genom att påverka cellernas självreglering som genom okontrollerad celltillväxt (neoplasi) leder till tumörbildning (Herbst 1994). Tumörerna har tidigare ansetts vara benigna (godartade) (Herbst *et al.* 1995, Lackovich *et al.* 1999) men en studie av Work *et al.* (2004) har visat på vissa maligna (elakartade) tendenser hos tumörer i interna organ.

Dessa neoplastiska tumörer som är karaktäristiska för sjukdomen kan utvecklas i stort sett var som helst på sköldpaddan. Den yttre tumörbildningen kan förutom att angripa alla hudområden såsom huvud, hals och simfötter också bildas på ryggsköld och buk (figur 1). De yttre tumörerna är även det mest uppenbara tecknet på en sjuk individ (Smith and Coates 1938). Dessa externa hudrelaterade tumörer förekommer som tre typer beroende på vilka delar av hudens två översta hudskikt som drabbas. Den första typen, *papilloma*, utgår från epidermis (överhuden) och har en mindre eller ingen påverkan på dermis (läderhuden). Den andra typen, *fibromas*, drabbar istället dermis och har minimal påverkan på epidermis. Den tredje typen kallas *fibropapillomas* vilket är när båda hudskikten är drabbade (Jacobson *et al.* 1989). Tumörerna kan variera i storlek från 0,5 till närmare 400 cm² i extrema fall. Större tumörer är ofta såriga och nekrotiska (Work *et al.* 2004).



Figur 1. En soppsköldpadda smittad med fibropapillomatos och har utvecklat de karaktäristiska tumörerna på bland annat simfötter, hals och ögon. Herbst LH. 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. Annual review of fish diseases 4: 389-425. Omtryckt med tillåtelse.

Förutom den yttre hudrelaterade förekomsten utvecklas även tumörer i inre organ samt i munhålan (Lucké 1948, Williams *et al.* 1994, Aguirre *et al.* 1994, Work *et al.* 2004). När Work *et al.* (2004) obducerade 255 soppsköldpaddor påträffades tumörer i munhålan hos 80 % (204 av

255) av sköldpaddorna, 39 % (99 av 255) hade utvecklat tumörer i interna organ. Vid en annan studie på Puerto Rico utförd av Williams *et al.* (1994) obducerades 17 sköldpaddor. Tumörer i interna organ påträffades hos 41 % av sköldpaddorna (7 av 17). Storleken på tumörerna varierade mellan 0,1 till över 20 cm i diameter.

Den sista formen av tumör som tas upp i denna text är den okulära tumörtyper (figur 2). Okulära tumörer uppkommer främst från hornhinna (Jacobson *et al.* 1989) och ögonlock och beskrevs för första gången av Brooks *et al.* (1994). I en studie av Flint *et al.* (2010) dokumenterades okulära tumörer hos soppsköldpaddor i Australiensiska vatten för första gången år 2008. Okulär FP hade innan dess endast dokumenterats i USA (Jacobson *et al.* 1989) och på Hawaii (Aguirre *et al.* 1994). Och trots att den Australiensiska populationen i området bevakats i över fyra decennier hade okulära tumörer inte observerats tidigare. I studien hade 4 av 787 (0,5 %) soppsköldpaddor tumörer som utvecklats från hornhinnan. Tumörerna varierade i storlek mellan 0,5 till 3,5 cm och hade helt eller delvis ersatt hornhinnan (Flint *et al.* 2010).



Figur 2. Den okulära tumörtyper hos en soppsköldpadda där tumörer utvecklats från hornhinna och ögonlock. Herbst LH. 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. Annual review of fish diseases 4: 389-425. Omtryckt med tillåtelse.

Fibropapillomatosis påverkan på soppsköldpaddan

FP är en potentiellt dödlig sjukdom med flera olika konsekvenser för sköldpaddan (Jacobson *et al.* 1989). Hur pass kraftigt FP påverkar soppsköldpaddan varierar mellan individer och beror på var på kroppen tumörer har utvecklats samt hur långt gången sjukdomen är (Aguirre *et al.* 1994). De hudrelaterade tumörerna påverkar sköldpaddans rörelseförmåga och risken blir också större att djuret trasslar in sig i förkastade linor eller annan fiskeutrustning (Foley *et al.* 2005). Okulära tumörer minskar det normala synfältet vilket kan leda till att synen helt går förlorad. Detta påverkar sköldpaddans förmåga att söka föda och innebär ökade svårigheter att undvika predatorer samt att interagera med andra individer (Brooks *et al.* 1994, Flint *et al.*

2010). Tumörer i interna organ kommer följaktligen påverka organens normala funktioner vilket leder till bland annat hjärtproblem, försämrad flytförmåga och nedsatt lungkapacitet (Herbst 1994, Herbst *et al.* 1995).

Sammantaget leder dessa konsekvenser till kraftigt försvagade djur som ibland lider av kronisk stress och har ett nedsatt immunförsvar (Aguirre *et al.* 1995, Work *et al.* 2001). Sköldpaddor med FP hittas inte sällan strandade, i dåligt skick eller avlidna (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre *et al.* 1998, Work *et al.* 2004, Chaloupka *et al.* 2008). I en studie utförd av Chaloupka *et al.* (2008) undersöktes 3 861 strandade sköldpaddor (år 1982 – 2003) för att fastställa orsaken till strandning. Studien visade att FP var den främsta orsaken till strandade sköldpaddor och utgjorde 28 % av de fall där en orsak kunde fastställas.

Naturlig återhämtning från fibropapillomatosis har observerats

Tumörutvecklingen och sjukdomens konsekvenser kan verka ödesdigra för den smittade individen men i flera oberoende studier har fåtalet sköldpaddor observerats helt eller delvis återhämta sig från FP (Jacobson *et al.* 1989, Chaloupka *et al.* 2009, dos Santos *et al.* 2010, Page-Karjian *et al.* 2014). Vid en studie som utfördes utav Jacobson *et al.* (1989) observerades sex juvenila sopp-sköldpaddor med multipla papillomas och fibropapillomas. Syftet med studien var bland annat att dokumentera tumörernas progression, ett område där kunskapen än idag är mycket bristfällig. Eftersom det hittills inte finns något effektivt sätt att ta reda på när sköldpaddan smittas är det också mycket svårt att fastställa hur snabbt tumören tillväxer, utvecklas och sprider sig. Studien pågick i sex månader och medan de flesta tumörer tillväxte i långsam takt fanns det även fåtalet tumörer som minskade i storlek. Vid en annan studie av Chaloupka *et al.* (2009) observerades återhämtning i det vilda. Denna studie utfördes utanför Molokai, Hawaii. En population sopp-sköldpaddor iaktogs mellan åren 1982 och 2007 genom ett *capture – mark – recapture* program och visade att även sköldpaddor med långt gånge FP kunde återhämta sig helt inom loppet av några år.

Fibropapillomatosis – smitta och orsakerna bakom sjukdomen

Enda sedan det första fallet av FP år 1938 har forskare sökt efter orsaken bakom FP. Det spatiala och temporala mönstret i hur sjukdomen uttrycker sig hos vilda populationer av sopp-sköldpadda har noggrant observerats och indikerar att en infektion skulle kunna vara orsaken bakom sjukdomen (Herbst 1994). Exempelvis är variationen av sjukdomsförekomster stor hos olika populationer och förekomsten varierar även från år till år (Balazs 1991, Herbst 1994). FP har också spontant uppkommit på nya geografiska platser och har på samma hastiga vis försvunnit från ett område (Foley *et al.* 2005, Chaloupka & Balazs 2005, Maldonado-Graca & Zapata-Rosales 2007, Chaloupka *et al.* 2009, Duarte *et al.* 2012). Ett utbrott av GTFP på en sköldpaddsfarm på Grand Cayman, Caymanöarna dokumenterades av Jacobson *et al.* (1989). Sjukdomen spred sig från infångade sköldpaddor (vilda) till farmens uppfödda sköldpaddor. Efter många år lyckades sjukdomen utrotas från farmen och har sedan dess inte återkommit till området. Det har även noterats skillnader i tumörernas tillväxthastighet beroende på säsong med en högre tillväxthastighet under varma månader i jämförelse med kallare månader (Herbst *et al.* 1995, Foley *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008, Page-Karjian *et al.* 2014). Att vissa individer helt har återhämtat sig från sjukdomen styrker ytterligare det faktum att det rör sig om en infektionssjukdom (Jacobson *et al.* 1989, Chaloupka *et al.* 2009, dos Santos *et al.* 2010).

Smittämne – den orsakande faktorn

Smittämne är ett samlingsnamn för de olika mikroorganismer, exempelvis bakterier, virus och svampar som kan förorsaka infektionssjukdomar. För att en mikroorganism helt och hållet ska accepteras som den orsakande faktorn till en sjukdom krävs det att alla fyra kriterier i Kochs postulat uppfyllts. Dessa kriterier är att 1) mikroorganismen i fråga ska förekomma i varje sjukdomsfall, 2) mikroorganismen ska inte förekomma i andra sjukdomar, slumpartat eller som en icke-patogen organism, 3) mikroorganismen kan isoleras och upprepat odlas i renkultur samt 4) ska kunna introduceras i friska individer på nytt (Rivers 1937).

Kochs postulat publicerades år 1890. Postulaten var på sin tid avgörande för utvecklingen av kunskapen om infektionssjukdomar. Framöver kom postulatet däremot att utgöra ett visst hinder för arbetet med virussjukdomar då virus aldrig kan odlas utanför den levande cellen (Rivers 1937).

Vad gäller FP hos soppsköldpaddor har tre av de fyra kriterierna i Kochs postulat uppfyllts för ett herpesvirus (Herbst *et al.* 1995, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Quackenbush *et al.* 2001, Greenblatt *et al.* 2005, Ene *et al.* 2005, Page-Karjian *et al.* 2014). Detta herpesvirus anses starkt associerat till sjukdomen och forskarvärlden fortsätter rikta sina blickar mot viruset. Som tidigare nämnt kan det tredje kriteriet, som avser odling av mikroorganismer i renkultur, omöjligt uppfyllas för virussjukdomar. Detta kriterium har således modifierats och istället har forskningen fokuserats till att försöka kultivera viruset i cellkultur (Moore *et al.* 1997, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Work *et al.* 2009). Nedan följer en kortare beskrivning av studier som varit framgångsrika med att påvisa ett orsakssamband mellan FP och herpesviruset.

Chelonid fibropapilloma-associated turtle herpesvirus (CFPHV)

Med hjälp av olika PCR metoder har ett alfaherpesvirus (Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Greenblatt *et al.* 2005) som benämns *Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus* (CFPHV), även kallat *Chelonid herpesvirus 5* (ChHV5) eller ibland *green turtle herpes virus* (GTHV), detekterats hos varje smittad individ som undersökts (Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Quackenbush *et al.* 2001, Ene *et al.* 2005, Page-Karjian *et al.* 2014). Vävnadsprover från friska sköldpaddor har inte innehållit herpesvirusets DNA-sekvens (Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000). Herbst *et al.* (1995) har framgångsrikt lyckats framkalla sjukdomen hos friska sköldpaddor från tumörextrakt hämtat från sjuka individer. Alla de 12 sköldpaddor som ingick i studien utvecklade tumörer som detekterades mellan 15 och 43 veckor efter att smittan inducerades. Till skillnad från dessa framgångar inom forskningsområdet har ingen forskningsgrupp ännu lyckats kultivera viruset i cellkultur vilket motsvarar det tredje av Kochs postulats fyra kriterier (Moore *et al.* 1997, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Work *et al.* 2009) och av den anledningen kan CFPHV inte fullt ut fastställas som den orsakande faktorn till FP.

Exempelstudier

I ett försök av Lackovich *et al.* (1999) användes vävnadsprover från 19 sköldpaddor med FP (17 soppsköldpaddor och två oäkta karetsköldpaddor, *Caretta caretta*). CFPHV detekterades hos alla sköldpaddor och i 96 % (83 av 93) av tumörerna som testades för viruset. Även synligt friska hudprover från dessa 19 sköldpaddor (FP+) testades. Endast 3 av 33 av dessa friska hudprover visade sig innehålla herpesviruset. De positiva svaren kom från tre olika sköldpaddor där proverna var tagna mindre än två cm från en tumör. Utöver detta togs vävnadsprover från fyra friska sköldpaddor (FP-). Alla dessa 18 prover var negativa för CFPHV (tabell 1). I samma studie genomgick fem sköldpaddor en operation för att avlägsna tumörer och trots att

endast ett av de elva ärrvävnadsproverna som analyserades var positiva för herpesvirus så hade två av fem sköldpaddor fått en återväxt av tumörer. Övriga tre sköldpaddor var fortsatt tumörfria under studiens resterande tid (i över ett år).

Tabell 1. Vävnadsprover från 19 sköldpaddor med FP (FP+) och fyra friska sköldpaddor (FP-) samt antalet prover som innehöll herpesvirus (CFPHV+) och som inte innehöll spår av virus (CFPHV-).

	FP+ sköldpaddor		FP- sköldpaddor
	Tumörprov	Hudprov	Hudprov
CFPHV+	83	3	0
CFPHV-	10	33	18

Även en studie utförd av Lu *et al.* (2000) visade på samma etiologiska koppling som försöket ovan. I detta experiment undersöktes till synes frisk samt sjuk vävnad från 19 soppssköldpaddor (FP+) samt vävnad från tre friska sköldpaddor (FP-). Resultatet visade att samtliga tumörer (51 av 51) innehöll CFPHV-sekvensen. 80 % (133 av 167) av vävnadsproverna från sköldpaddor med FP innehöll CFPHV medan samtliga vävnadsprover från de tre friska sköldpaddor (28 av 28) var negativa för CFPHV (tabell 2).

Tabell 2. Vävnadsprover från 19 sköldpaddor med FP (FP+) och tre friska sköldpaddor (FP-) samt andelen prover som innehöll herpesvirus (CFPHV+) och som inte visade på virus (CFPHV-).

	FP+ sköldpaddor		FP- sköldpaddor
	Tumörprov	Hudprov	Hudprov
CFPHV+	51	133	0
CFPHV-	0	34	28

Latens

När Quackenbush *et al.* (2001) studerade vävnadsprover från 25 till synes friska sköldpaddor (Moreton Bay, Australia) visade resultatet att prover från 5 av dessa sköldpaddor var positiva för CFPHV. Även i studien av Page-Karjian *et al.* (2015) detekterades CFPHV hos 13 av 31 sköldpaddor som inte utvecklat några tumörer. Av resultaten från dessa studier spekulerar båda forskargrupperna om detta skulle kunna vara ett tidigt tecken på infektion. Vidare har Work *et al.* (2009) samt Alfaro-Nuñez och Gilbert (2014) lyft frågan om CFPHV kan finnas latent hos sköldpaddor och vad som i så fall får sjukdomen att bryta ut. Vidare forskning om CFPHV och dess latent förmåga saknas dock.

Smittväg – hur smittämnet överförs

Ponera att CFPHV är den faktiska orsaken till FP, hur smittas då soppssköldpaddan av viruset? Redan 1938 spekulerade Smith och Coats (1938) om möjliga smittvägar, däribland lyftes möjligheten att viruset smittar genom en vektor.

Marin igel kan vara en möjlig vektor

I ett försök utfört av Greenblatt *et al.* (2004) samlades olika parasiter in ifrån soppssköldpaddor utanför Hawaii. De arter som undersöktes var havstulpaner (*Platylepas* ssp.), märlkräftor (ordning Talitroidea), sugmaskar (Trematoda) och marina iglar (*Ozobranchus* ssp.). Från parasiternas vävnad kunde herpesvirus med hjälp av PCR-metoder detekteras och därefter kvantifieras (qPCR). Genom kvantifiering kunde antalet viruskopior per cell jämföras för att se om detta skiljde sig åt parasitarterna emellan. Vissa av sugmaskarna, havstulpanerna och iglarna innehöll spår av herpesviruset. Detta behöver inte betyda att arterna är vektorer, de kan eventuellt fått smittan från den sjuka sköldpaddan. Däremot menar forskarna som genomfört studien att just igeln innehöll en mycket högre andel kopior, 10^4 DNA-kopior, jämfört med exempelvis sugmask som innehöll 300 – 400 kopior. Antalet DNA-kopior var så pass stor att om

igeln fått smittan från soppsköldpaddan skulle det ha inneburit att igeln innehöll 10 % sjuk vävnad i förhållande till sin kroppsvikt. Detta borde enligt forskarna i så fall varit synligt vid inspektion av igeln. Baserat på resultatet finns således en misstanke om att detta släkte av marina iglar eventuellt kan vara vektor för viruset.

McGrowin *et al.* (2011) påpekar att två arter av marina iglar ingår i släktet *Ozobranchus ssp.*; *Ozobranchus branchiatus* och *Oobranchus margoii*. I försöket av Greenblatt *et al.* (2004) specificerades dessvärre inte vilken av arterna som undersöktes eller om båda arter fanns närvarande i studien. Arterna är morfologiskt lika och således svåra att särskilja. Däremot är *O. branchiatus* den art som specialiserat sig på soppsköldpaddan vilket också är den art som drabbats av FP i högst utsträckning. Därför spekulerar forskargruppen att det är denna art som är den primära vektorn för FP men kan emellertid inte utesluta att båda arterna potentiellt kan vara vektorer för CFPHV.

Utsöndring av virus – en annan tänkbar smittväg

Trots spekulationerna om att smitta eventuellt sker med hjälp av en vektor har det på senare tid fokuserats på möjligheten att viruset utsöndras direkt från sköldpaddan via de hudrelaterade tumörerna (*virus shedding*) (Work *et al.* 2015). Fortsättningsvis visade Herbst *et al.* (2008) i deras studie att inte bara sköldpaddor med FP utan även sköldpaddor som saknade tecken på FP (externa hudrelaterade tumörer) hade antikroppar mot sjukdomen. När de undersökte en population sköldpaddor utanför Florida visade det sig att 83,6 % av sköldpaddorna hade dessa antikroppar, något som man tidigare trodde att sköldpaddorna utvecklade efter att de hudrelaterade tumörerna uppkommit. Som en konsekvens av Herbst *et al.* (2008) studie spekulerade Page-Karjian *et al.* (2015) om möjligheten till alternativa smittvägar. I försöket detekterades CFPHV i urin från 27 % av de FP-positiva sköldpaddorna (10 av 37). Resultatet skulle kunna vara en indikation på att viruset kan utsöndras med urin och på så sätt smitta andra individer.

Smittillfälle - när smitta sker

Kunskap om när och var soppsköldpaddan kommer i kontakt med FP är högst relevant för att förklara sjukdomens smittväg och även orsaken till sjukdomens ökade utbredning. Om smitta sker under en specifik period av sköldpaddans livshistoria kan vissa faktorer som tidigare ansetts ha inverkan på sjukdomen på så sätt uteslutas.

Observationer och studier har visat på en högre andel FP-smittade individer i den juvenila gruppen som nyligen migrerat till de kustnära födoplasterna än andra grupper av soppsköldpaddor (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre & Balazs 2000, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008). Chaloupka *et al.* (2008) undersökte och dokumenterade FP-förekomst under en 20-årsperiod hos ett stort antal strandade sköldpaddor (ryggsköld 20 – 100 cm). Denna dokumentation visade att FP-förekomsten dominerade i storleksklass 40 till 60 cm vilket representerar den grupp juveniler som nyligen anslutit sig till en födoplast. Inga juvenila pelagiska sköldpaddor (ryggsköld < 20 cm) med FP dokumenterades. Varken Aguirre & Balazs (2000) eller dos Santos *et al.* (2010) dokumenterade några pelagiska sköldpaddor i sina observationsstudier, vilket därmed stödjer det faktum att juveniler i kustnära vatten drabbas hårdast av FP. Även Foley *et al.* (2005) noterade en högre förekomst av FP i kustnära områden (38,9 %) i jämförelse med pelagiska områden (14,6 %). Baserat på information som denna spekuleras det om det är i det kustnära livsstadiet som soppsköldpaddan kommer i kontakt med smittan (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre & Balazs 2000, Foley *et al.* 2005, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008, dos Santos *et al.* 2010). Däremot går det inte att utesluta att individer även riskerar att smittas i de tidigare livsstadierna – som juvenila pelagiska sköldpaddor eller

att smitta sker via honan i samband med äggläggning eller äggkläckning (*maternal shedding*). Pelagiska juvenila soppsköldpaddor är på grund av sin mobilitet mycket svårstuderade och dokumentationen om denna grupp är därför bristfällig. Om sköldpaddan kommer i kontakt med smittan redan vid äggläggning/äggkläckning eller i det pelagiska stadiet är det möjligt att de flesta individer helt enkelt inte överlever smittan alternativt att sjukdomen bryter ut först efter ett visst antal år när de migrerat till kustnära vatten och att det är anledningen till en hög förekomst av FP hos juveniler i kustnära vatten (Herbst 1994).

Potentiella orsaker till den ökade förekomsten av FP

När Smith och Coates (1938) först studerade FP utanför Key West var FP en förhållandevis ovanlig sjukdom med en förekomst på 1,5 %. Det var först under mitten av 80-talet som en kraftig ökning av FP observerades hos vissa populationer av soppsköldpaddor utanför Hawaii. När sjukdomen sedan kulminerade, på början av 90-talet, var mer än varannan (53 %) sköldpadda smittad (Balazs 1991). Åren därefter blev sjukdomen mindre vanlig och förekomsten minskade bland populationerna utanför Hawaii (Chaloupka *et al.* 2009). Även på andra geografiska platser observerades en ökad förekomst av smittade individer och det rapporteras regelbundet om nya fall av FP på helt nya lokaler (Foley *et al.* 2005, Chaloupka & Balazs 2005, Maldonado-Graca & Zapata-Rosales 2007, Chaloupka *et al.* 2009, Duarte *et al.* 2012).

Som nämnts tidigare är den generella tron att soppsköldpaddor smittas efter att de migrerat till kustnära födoplatser där de stannar tills de uppnår sexuell mognad (Aguirre *et al.* 1994, Herbst 1994, Aguirre & Balazs 2000, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008). I detta stycke har därför fokus lagts på studier som koncentrerar sig på dessa kustnära miljöer och faktorer som kan ha en negativ påverkan på soppsköldpaddan samt öka deras mottaglighet för sjukdomen.

Eutrofierade kustvatten

I en epidemiologisk studie av Van Houtan *et al.* (2010) analyserades data från 3 939 strandade sköldpaddor under en 28-årsperiod för att undersöka om det fanns något samband mellan hög förekomst av FP och förekomst av invasiva makroalger och/eller markanvändning. Markanvändningen representerades av ett kväve-fotavtryck som var analytiskt beräknat och baserat på olika faktorer som exempelvis urbanisering, jordbruk, boskapsskötsel, hamnar samt estuarier. En liknande sammanställning gjordes för tre arter av invasiva makroalger som ingår i soppsköldpaddans diet. Den analytiska studien visade att i eutrofierade områden med ett stort kväve-fotavtryck var också utbredningen av invasiva makroalger som störst. Sambandet förklaras av att höga kvävehalter gynnar dessa invasiva alger som konkurrerar ut andra arter av alger vilket leder till minskad diversitet. Fortsättningsvis visade studien att även förekomsten av FP-drabbade sköldpaddor var högre i eutrofierade områden med stor andel invasiva arter. Det har visat sig att de invasiva arterna av makroalger lagrar kväve i form av aminosyran arginin. Arginin har tidigare visats ha en inverkan på tumörtillväxt (Olshevsk & Becker 1970, Mikami *et al.* 1974). Från studiens resultat spekuleras det om det är möjligt att sköldpaddor i områden med hög förekomst av makroalger konsumerar dessa i högre utsträckning och på så sätt får i sig en högre andel arginin som förvärrar sjukdomsutvecklingen (Van Houtan *et al.* 2010).

I en uppföljningsstudie prövade Van Houtan *et al.* (2014) den ovan nämnda hypotesen i områden utanför Hawaii. I studien jämfördes tumörvävnad med kontrollvävnad från soppsköldpaddor och resultatet visade på förhöjda värden av fem olika aminosyror, däribland arginin. Av dessa fem aminosyror var det endast arginin som också förekom i förhöjd mängd hos invasiva makroalger i eutrofierade kustvatten. Resultatet indikerar att makroalger i eutrofierade

vatten ansamlar kväve i form av arginin. Detta resulterar i förhöjda värden av arginin hos soppsköldpaddan vilket eventuellt påskyndar tumörutveckling och är en bidragande faktor till den ökade förekomsten av FP.

Habitat- och födokvalitet

I en annan studie jämfördes två områden utanför Espírito Santo Bay, Brasilien, det ena med friska sköldpaddor (område A) och det andra med en hög andel soppsköldpaddor sjuka i FP (58,3%) (område B). Syftet med studien var att jämföra kvalitén på områdena för att se om det fanns ett samband mellan habitatkvalitet och en ökad sjukdomsförekomst. De två områdena värderades genom ett index, EEI (environment evaluation index) som baserades på diversitet av djuphavsalger. Dessa alger fungerar som indikator för vattenkvalitet och är även den främsta födan för soppsköldpaddor. Studien visade att det fanns ett samband mellan habitatkvalitet och sjukdomsförekomst. Område A erhöll ett EEI = 8 vilket motsvarar en god habitatkvalitet medan område B gavs ett EEI = 2 vilket istället innebär en sämre habitatkvalitet. Område B, med en stor andel FP-sjuka sköldpaddor, var således av sämre kvalitet med en låg diversitet av djuphavsalger där en art (*Caulerpa mexicana*) dominerade (89,8 %). Slutsatsen som kan dras är att dessa individer konsumerar en mer ensidig diet och tillsammans med habitatkvalitet kan dessa faktorer vara bidragande till utvecklingen av FP (dos Santos *et al.* 2010).

Utsläpp, föroreningar och tungmetaller

Det har hypotiserats kring miljöföroreningar som en potentiell faktor som skulle ha en negativ påverkan på sköldpaddornas immunförsvar och på så sätt göra dem mer mottagliga för herpesviruset. Som nämnts tidigare har studier redan påvisat att sköldpaddor med FP har ett nedsatt immunförsvar (Aguirre A *et al.* 1995, Work *et al.* 2001) men om detta är en konsekvens av sjukdomen i sig eller om immunförsvaret var nedsatt *innan* smittan skett är inte känt.

Hittills har något samband mellan miljöföroreningar och en ökad förekomst av FP inte bekräftats. I en studie av Keller *et al.* (2014) där vävnadsprover från fyra grupper sköldpaddor med varierad förekomst av FP (0 %, 8 %, 38 % och 100 %) analyserades för att undersöka om det fanns något samband mellan FP och långlivade organiska föroreningar (POP – persistent organic pollutants). Studien visade dock inte något samband och forskarna menar att POPs inte är en faktor som ökar sköldpaddors mottaglighet för FP. I en annan studie av Aguirre *et al.* (1994) prövades tungmetaller och andra föroreningars påverkan på soppsköldpaddor. Studien resulterade i liknande slutsatser som försöket utav Keller *et al.* (2014) vilket indikerar att föroreningar, utsläpp och tungmetaller har en minimal påverkan på sköldpaddors mottaglighet för FP.

Diskussion

Fibropapillomatosis är en sjukdom som har flera negativa effekter på marina sköldpaddor, konsekvenserna drabbar både individen och långsiktigt även hela populationer. Forskning pekar på att det är när sköldpaddan migrerar till kustnära vatten som den kommer i kontakt med smittan (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre & Balazs 2000, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008). Det går däremot inte att utesluta att sköldpaddan smittas i ett tidigare livsstadium på grund av svårigheterna i att studera individer i dessa livsstadier samt att data därmed inte kan sammanställas. Det är även möjligt att pelagiska juveniler som bär smittan inte överlever sjukdomen eller att sjukdomen kan ligga latent (Work *et al.* 2009, Alfaro-Nunez & Gilbert 2014) och inte bryter ut förrän de migrerat till de kustnära födoplasterna (Herbst 1994).

Viruset CFPHV är uppenbart associerade till FP men har inte helt accepterats som den orsak-

ande faktorn bakom sjukdomen (Herbst *et al.* 1995, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Quackenbush *et al.* 2001, Ene *et al.* 2005). Kochs postulat som tidigare varit ett viktigt verktyg för kunskapen om infektionssjukdomar har istället blivit ett hinder för att hitta orsakssamband mellan virus och dess sjukdomar då postulatens tredje kriterium inte kan appliceras på virus (Rivers 1937). Istället har kriteriet modifierats och forskarvärlden strävar efter att kultivera viruset i cellkultur, något som ännu inte varit framgångsrikt (Moore *et al.* 1997, Lackovich *et al.* 1999, Lu *et al.* 2000, Work *et al.* 2009). Mycket lite är känt om viruset och för att komma längre med att utreda dess association till FP är ytterligare forskning och kunskap om viruset av största vikt. Exempelvis finns ingen säker metod att detektera om en individ har smittats av FP förrän de karaktäristiska tumörerna har utvecklats.

Återhämtning från FP har observerats (Chaloupka *et al.* 2009, dos Santos *et al.* 2010, Page-Karjian *et al.* 2014) men inga av de studier som publicerats fram till idag har haft återhämtningen som huvudfokus. Jag kan endast spekulera i varför forskning angående denna punkt saknas. Det är möjligt att den generella kunskapen om CFPHV och FP ännu inte är tillräcklig för att studera återhämtning. Området kan också ses som svårstuderat då tumörregression tar flera år och återhämtning inte är garanterat hos alla individer (Chaloupka *et al.* 2009).

Trots den forskning som aktivt bedrivits sedan början på 90-talet, då sjukdomen kulminerade, (Balazs 1991) är det fortfarande okänt *hur* sjukdomen sprids. Det har spekulerats i att en marin igel kan vara vektor för sjukdomen (Greenblatt *et al.* 2004), men trots denna uppmärksammade studie har ingen ytterligare forskning bedrivits för att bekräfta sambandet mellan igeln och CFPHV. Istället har fokus hamnat på möjligheten att sjukdomen sprider sig genom utsöndring av virus (Herbst *et al.* 2008, Page-Karjian *et al.* 2015, Work *et al.* 2015). Detta skulle i så fall kunna förklara den ökade sjukdomsförekomsten och att sköldpaddor smittas när de aggregerar vid de kustnära födoplasterna (Aguirre *et al.* 1994, Aguirre & Balazs 2000, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2008). Däremot kan det inte uteslutas att det är just i de kustnära vattnen som den marina igeln förekommer då kunskapen om denna art och dess livshistoria är ytterst begränsad (McGowin *et al.* 2011).

Varför sjukdomsförekomsten haft en så kraftig ökning saknar tydligt samband. Att kemikalier och miljöföroreningar skulle sänkt sköldpaddornas immunförsvar och på så sätt göra dem mer mottagliga för infektion verkade tidigt som en möjlig orsak till den ökade förekomsten av FP. Överraskande nog har något sådant samband ännu inte lyckats fastställas (Aguirre *et al.* 1994, Keller *et al.* 2014). Flera studier har visat att soppsköldpaddor sjuka i FP lider av immunosuppression (Aguirre *et al.* 1995, Work *et al.* 2001). Frågan är dock om detta förorsakat FP eller om det nedsatta immunförsvaret snarare är en följdkonsekvens av sjukdomen i sig.

Forskning från senare år har antytt att födokvalitet kan påverka alternativt påskynda sjukdomsutveckling (dos Santos *et al.* 2010, Van Houtan *et al.* 2010, Van Houtan *et al.* 2014). I ovan nämnda studier analyserades områden med hög förekomst av FP. Gemensamt för dessa områden var ett habitat av sämre kvalitet med en låg diversitet av makroalger som dominerades av en eller ett par invasiva arter. Van Houtan *et al.* (2010) kunde också konstatera att markanvändning i kustnära områden bidrog med kväveutsläpp vilket gynnar dessa invasiva makroalger. De invasiva arterna konkurrerar ut andra viktiga alger vilket leder till minskad diversitet. Den ensidiga dieten skulle kunna ha en inverkan på sköldpaddan som konsumerar en hög andel av vissa näringsämnen och samtidigt går miste om andra viktiga ämnen och blir på så sätt mer mottaglig för sjukdomen (dos Santos *et al.* 2010). Van Houtan *et al.* (2010, 2014) spekulerade istället kring de invasiva makroalgernas förmåga att lagra kväve i form av arginin vilket kan ha en inverkan på tumörutveckling.

Det är nyligen som spekulationerna kring ett latent stadie hos FP har lyfts. Ingen direkt forskning har bedrivits på området utan funderingarna grundar sig främst i observationsstudier där CFPHV har detekterats hos sköldpaddor som inte utvecklat yttre tumörer (Quackenbush *et al.* 2001, Page-Karjian *et al.* 2015). Följaktligen finns det inte heller några studier angående vad som får FP att bryta ut. Faktorer som försämrade födokvalité (dos Santos *et al.* 2010, Van Houtan *et al.* 2010, Van Houtan *et al.* 2014) eller möjligtvis immunosuppression (Aguirre *et al.* 1995, Work *et al.* 2001) skulle eventuellt kunna få den latent sjukdomen att aktiveras. Det verkar inte omöjligt att detta i så fall kan vara en orsak bakom den ökade sjukdomsförekomsten.

Soppsköldpaddans migratoriska livshistoria samt det faktum att de är långlivade och uppnår sexuell mognad förhållandevis sent gör arten svår att studera. Kohortstudier är välbehövliga för att öka kunskapen om FP men är av dessa anledningar problematiska att genomföra. Att sköldpaddorna migrerar och rör sig mellan olika geografiska platser ökar även svårigheten att hitta biotiska och abiotiska faktorer som kan vara av relevans för sjukdomssambandet. Detta faktum tillsammans med bristande finansiellt stöd för sköldpaddsstudier i vissa delar av världen gör det svårt att få en övergripande bild av sjukdomen.

Inom forskningsområdet är valmöjligheterna av studiemetoder stora och risken för bias är större för vissa metoder. Exempelvis utförs många observationsstudier på häckningsstränder där främst häckande honor och postpelagiska juveniler förekommer. Resultaten som presenteras i sådana studier riskerar därför att vara överrepresenterade av dessa två grupper. Till följd av detta är även risken stor att förekomsten av FP *underskattas* eftersom försvagade och sjuka sköldpaddor inte alltid förökar sig och därför inte observeras på dessa stränder. Motsatt situation kan uppstå i studier som baseras på strandade sköldpaddor. Eftersom FP är en av de vanligaste anledningarna till att sköldpaddor strandar riskerar dessa studier istället att *överskatta* sjukdomens utbredning. En annan typ av metodik där det finns risk för en omedveten selektion är användning av nät. Nätens maskor är ofta för stora för de minsta sköldpaddorna som inte fastnar och alltså inte observeras i studien. Som nämntes tidigare lider sköldpaddor med externa tumörer en högre risk att fastna i nät och kan därför vara överrepresenterade i dessa studier. Den typ av metodik som verkar minst bias utförs genom slumpmässig fångst vid snorkling. Denna metod må vara mindre bias men är sannolikt både mer fysiskt ansträngande och tidskrävande än de tidigare nämnda datainsamlings-metoderna.

Även om den forskning som hittills bedrivits har gett en generell riktning och möjliga svar på frågor som sjukdomsorsak, smittväg och vad som orsakat den ökade förekomsten av FP, så är ändå oklarheterna inom forskningsområdet många. För att få ökad klarhet och i förlängningen även kunna undersöka möjligheten att bota FP krävs ytterligare forskning. Främst behövs ökad kunskap om CFPHV och virusets smittväg men även en sammanställning över sjukdomens lokala och även globala förekomst är av hög relevans. Med vetskap om var FP ökar i förekomst blir vägen till svaret om varför sjukdomen ökat lättare att nå. Även en utvärdering av IUCNs bedömning att soppsköldpaddan är utrotningshotad kan vara på sin plats då studier har visat att soppsköldpaddans status möjligtvis, trots denna grymma sjukdom, är bättre än vi idag tror (Broderick *et al.* 2006, Seminoff & Shanker 2008).

Tack

Ett hjärtligt tack till min handledare Irene Söderhäll som varit till stor hjälp vid framtagandet av denna text. Jag vill också rikta min tacksamhet till återkopplingsgruppen bestående av

Marisol, Anton, Simon, Ida och Erik, en salig blandning av personligheter som alla bidragit med de bästa av kommentarer. Tack till Lawrence Herbst för tillåtelse att använda publicerade bilder samt till George Balazs och Thierry Work för att ni tillhandahöll publicerat material som jag annars inte haft möjlighet att använda.

Referenser

- Aguirre AA, Balazs GH. 2000. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. *Comparative Haematology International* **10**: 132-137.
- Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR, Gross TS. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology* **68**: 831-854.
- Aguirre AA, Balazs GH, Zimmerman B, Spraker TR. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia-mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases* **30**: 8-15.
- Aguirre AA, Spraker TR, Balazs GH, Zimmerman B. 1998. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles from the Hawaiian Islands. *Journal of Wildlife Diseases* **34**: 91-98.
- Alfaro-Nuñez A, Gilbert MTP. 2014. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in latent turtle infections. *Journal of Virology Methods* **206**: 38-41.
- Balazs GH, Pooley SG. 1991. Research plan for marine turtle fibropapilloma. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SWFSC-156: 113.
- Broderick AC, Frauenstein R, Glen F, Hays GC, Jackson AL, Pelembe T, Ruxton GD, Godley BJ. 2006. Are green turtles globally endangered? *Global Ecology and Biogeography* **15**: 21-26.
- Brooks DE, Ginn PE, Miller TR, Bramson L, Jacobson ER. 1994. Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia-mydas*). *Veterinary Pathology* **31**: 335-339.
- Chaloupka M, Balazs GH. 2005. Modelling the effect of fibropapilloma disease on the somatic growth dynamics of Hawaiian green sea turtle. *Marine Biology* **147**: 1251-1260.
- Chaloupka M, Balazs GH, Work TM. 2009. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. *Journal of Wildlife Diseases* **45**: 1138-1142.
- Chaloupka M, Work TM, Balazs GH, Murakawa SKK, Morris R. 2008. Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian archipelago (1982-2003). *Marine Biology* **154**: 887-898.
- Dos Santos RG, Martins AS, Torezani E, Baptistotte C, Farias J da N, Horta PA, Work TM, Balazs GH. 2010. Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brail. *Diseases of Aquatic Organisms* **89**: 87-95.
- Duarte A, Faisca P, Loureiro NS, Rosado R, Gil S, Pereira N, Tavares L. 2012. First histological and virological report of fibropapilloma associated with herpesvirus in *Chelonia mydas* at Principe Island, West Africa. *Archives of Virology* **157**: 1155-1159.
- Ene A, Su M, Lemaire S, Rose C, Schaff S, Moretti R, Lenz J, Herbst LH. 2005. Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: Molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. *Journal of Wildlife Diseases* **41**: 489-497.
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300-million years of marine turtle evolution. *Molecular biology and evolution* **12**: 432-440.
- Flint M, Limpus CJ, Patterson-Kane JC, Murray PJ, Mills PC. 2010. Corneal fibropapillomatosis in green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Australia. *Journal of Comparative Pathology*

- 142:** 341-346.
- Foley AM, Schroeder BA, Redlow AE, Fick-Child KJ, Teas WG. 2005. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980-98): Trends and association with environmental factors. *Journal of Wildlife Diseases* **41**: 29-41.
- Greenblatt RJ, Quackenbush SL, Casey RN, Rovnak J, Balazs GH, Work TM, Casey JW, Sutton CA. 2005. Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. *Journal of Virology* **79**: 1125-1132.
- Greenblatt RJ, Work TM, Balazs GH, Sutton CA, Casey RN, Casey JW. 2004. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Virology* **321**: 101-110.
- Hendrickson JR. 1958. The green sea turtle, *Chelonia mydas* (Linn.), in Malaya and Sarawak. *Proceedings of the zoological society of London* **130**: 455-535.
- Herbst LH. 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual review of fish diseases* **4**: 389-425.
- Herbst LH, Jacobson ER, Moretti R, Brown T, Sundberg JP, Lein PA. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms* **22**: 1-12.
- Herbst LH, Lemaire S, Ene AR, Heslin DJ, Ehrhart LM, Bagley DA, Klein PA, Lenz J. 2008. Use of a baculovirus-expressed glycoprotein H in an enzyme-linked immunosorbent assay developed to assess exposure to chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus and its relationship to the prevalence of fibropapillomatosis in sea turtles. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**: 843-851.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2015. *Chelonia mydas*. WWW-dokument 2015-04. <http://www.iucnredlist.org/details/4615/0>. Hämtad 2016-04-12.
- Jacobson ER, Mansell JL, Sundberg JP, Hajjar L, Reichmann ME, Ehrhart LM, Walsh M, Murru F. 1989. Cutaneous fibropapillomas of green turtles *Chelonia mydas*. *Journal of comparative pathology* **101**: 39-53.
- Keller JM, Balazs GH, Nilsen F, Rice M, Work TM, Jensen BA. 2014. Investigating the potential role of persistent organic pollutants in Hawaiian green sea turtle fibropapillomatosis. *Environmental Science & Technology* **48**: 7807-7816.
- Lackovich JK, Brown DR, Homer BL, Garber RL, Mader DR, Moretti RH, Patterson AD, Herbst LH, Oros J, Jacobson ER, Curry SS, Klein AP. 1999. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Diseases of Aquatic Organisms* **37**: 89-97.
- Lu Y, Wang Y, Yu Q, Aguirre AA, Balazs GH, Nerurkar VR, Yanagihara R. 2000. Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. *Archives of Virology* **145**: 1885-1893.
- Maldonado-Graca A, Zapata-Rosales MT. 2007. First reports of green turtles, *Chelonia mydas* with fibropapillomas, in Yucana, Mexico. *CICIMAR Oceanides* **22**: 29-33.
- Mikami T, Onum M, Hayashi TTA. 1974. Requirement of arginine for replication of Marek's Disease herpes-virus. *Journal of General Virology* **22**: 115-128.
- McGowin AE, Truong TM, Corbett AM, Bagley DA, Ehrhart LM, Bresette MJ, Weegw ST, Clark D. 2011. Genetic barcoding of marine leeches (*Ozobranchus ssp.*) from Florida sea turtles and their divergence in host specificity. *Molecular Ecology Resources* **11**: 271-278.
- Moore MK, Work TM, Balazs GH, Docherty DE. 1997. Preparation, cryopreservation and growth of cells prepared from the green turtle (*Chelonia mydas*). *Methods in Cell Science* **19**: 161-168.

- Olshevsk U, Becker Y. 1970. Synthesis of herpes-simplex virus structural proteins in arginine deprived cells. *Nature* **226**: 851-853.
- Page-Karjian A, Norton TM, Krimer P, Groner M, Nelson SE, Gottdenker NL. 2014. Factors influencing survivorship of rehabilitating green sea turtles (*Chelonia Mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **45**: 507-519.
- Page-Karjian A, Norton TM, Ritchie B, Brown C, Mancina C, Jackwood M, Gottdenker NL. 2015. Quantifying chelonid herpesvirus 5 in symptomatic and asymptomatic rehabilitating green sea turtles. *Endangered Species Research* **28**: 135–146.
- Quackenbush SL, Casey RN, Murcek RJ, Paul TA, Work TM, Limpus CJ, Chaves A, duToit L, Perez JV, Aguirre AA, Spraker TR, Horrocks JA, Vermeer La, Balazs GH, Casey JV. 2001. Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR. *Virology* **287**: 105-111.
- Rivers TM. 1937. Viruses and Koch's postulates. *Journal of Bacteriology* **33**: 1-12.
- Schlumberger HG, Lucké B. 1948. Tumors of fishes, amphibians, and reptiles. *Cancer Research* **8**: 657-753.
- Seminoff JA. 2004. *Chelonia mydas*. The IUCN red list of threatened species 2004. doi 10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T4615A11037468.en
- Seminoff JA, Shanker K. 2008. Marine turtles and IUCN red listing: A review of the process, the pitfalls, and novel assessment approaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **356**: 52–68.
- Smith GM, Coates CW. 1938. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas*. *Zoologica* **23**: 93-98.
- Spotila JR. 2004. Sea turtles. A complete guide to their biology, behavior, and conservation. The Johns Hopkins University Press and Oakwood Arts, Baltimore.
- Van Houtan KS, Hargrove SK, Balazs GH. 2010. Land Use, Macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. *Plos One*, doi 10.1371/journal.pone.0012900.
- Van Houtan KS, Smith CM, Dailer ML, Kawachi M. 2014. Eutrophication and the dietary promotion of sea turtles. *PeerJ*, doi 10.7717/peerj.602.
- Williams EH, Bunkley-Williams L, Peters EC, Pinto-Rodriguez B, Matos-Morales R, Mignucci-Giannoni AA, Hall KV, Rueda-Almonacid JV, Sybesma J, Bonnelly-De Calenti I, Boulon RH, 1994. An epizootic of cutaneous fibropapillomas in green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of a panzootic? *Journal of Aquatic Animal Health* **6**: 70-78.
- Work TM, Balazs GH, Rameyer RA, Morris RA. 2004. Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands, 1993-2003. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**: 163-176.
- Work TM, Dagenais J, Balazs GH, Schettle N, Ackermann M. 2015. Dynamics of virus shedding and in situ confirmation of chelonid herpesvirus 5 in Hawaiian green turtles with fibropapillomatosis. *Veterinary Pathology* **52**: 1195–1201.
- Work TM, Dagenais J, Balazs GH, Schumacher J, Lewis TD, Leong J-AC, Casey RN, Casey JW. 2009. In vitro biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of General Virology* **90**: 1943-1950.
- Work TM, Rameyer RA, Balazs GH, Cray C, Chang SP. 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 574-581.

Fibropapillomatosis – tumörutveckling hos soppsköldpaddor (*Chelonia mydas*): etisk bilaga

Malin Jigrud

Självständigt arbete i biologi 2016

Uppsatsen syfte

Uppsatsens syfte var att presentera och redogöra för möjligheten att herpesviruset CFPHV är den orsakande faktorn bakom fibropapillomatosis (FP), en sjukdom som drabbar marina havssköldpaddor genom tumörtillväxt externt på hud och i interna organ och är ett hot mot arternas populationstillväxt. I uppsatsen jämfördes också studier som utförts för att hitta en förklaring till varför sjukdomsförekomsten ökade så kraftig under mitten av 80-talet.

Material och metod – Positiva och negativa aspekter av studieteknik

Studieområdet i stort har ett gott syfte – att hitta vad som är orsaken till en allvarlig sjukdom. Sköldpaddor som drabbas hittas ofta strandade, undernärda och kraftigt försvagade. Deras överlevnadschans i den situationen är minimal. På platser där sköldpaddorna strandar finns lokala rehabiliteringscenter. Forskning har visat på att sköldpaddorna i fåtal fall kan återhämta sig och chansen för att detta ska ske ökar med lite mänsklig omvårdnad (Jacobson et al. 1989, Page-Karjian et al. 2014).

Det är även på dessa rehabiliteringscenter som den största delen av forskningen utövas vilket är ett praktiskt sätt att samla in data utan att orsaka onödig störning för arten i dess naturliga habitat. Å andra sidan är dessa individer redan i dåligt skick, att utsätta dem för mer stress kan snarare skada individens återhämtning. Operationer där tumörer avlägsnas har utförts av flera forskningsgrupper med varierat resultat (Jacobson et al. 1991, Page-Karjian et al. 2014). Operationerna syftar till ökad kunskap om sjukdomen men utförs på individer i rehabiliteringssyfte (Page-Karjian et al. 2014). Vissa individer har återhämtat sig helt från sjukdomen och kunnat släppas ut i det vilda, andra individer klarade inte av operationen och avled. En kan fråga sig om dessa operationer var nödvändiga? Hade individen klarat sig bättre om operation uteblivit?

Vissa strandade sköldpaddor är i så pass dåligt skick att de inte har någon chans att återhämta sig. I dessa situationer är det inte ovanligt med avlivning för att lindra lidandet. Jag anser detta vara en rimlig åtgärd eftersom det är det mest skonsamma att göra i dessa fall. Återigen används dessa individer i många forskningsförsök för att studera och dokumentera förekomsten av FP i interna organ.

Studier har utförts där det kan diskuteras kring individens lidande för den goda sakens skull. Exempelvis inducerades FP i friska individer med syftet att förstå sjukdomens mönster och hitta orsaken till smittan (Herbst et al. 1995). I andra studier har sköldpaddor inducerats med främmande ämnen för att utreda sambandet mellan föroreningar, stress och immunosuppression (Aguirre et al. 1994, Work et al. 2000).

En kan även fråga sig om det är etiskt försvarbart att ta dessa sköldpaddor ifrån deras naturliga miljö med syfte att utföra forskningsstudier som stör och stressar djuren. Särskilt funderas man när det rör sig om djur som migrerar långa sträckor och även bedöms vara utrotningshotade.

Forskningsetik

Artiklarna som ligger till grund för detta arbete är utvalda baserat på trovärdighet, arbetssätt och forskarens etiska förhållningssätt. Jag har strävat efter en så objektiv syn på forskningsområdet som möjligt och har haft ett kritiskt förhållningssätt vid bedömning av studiernas trovärdighet.

I studier där individen blir lidande tvingas man ställa sig frågor som – är studiesättet etiskt försvarbart? Kunde försöket genomfört på ett mer skonsamt sätt? Syftet med studierna är att rädda dessa havssköldpaddor som alla är utrotningshotade. I fall där syftet inte kunde motivera djurens lidande uteslöts artikeln från uppsatsen (Jacobson *et al.* 1991). Kunde metodiken istället motiveras inkluderades artikeln om resultatet var av betydelse för forskningsområdet som helhet (Herbst *et al.* 1995).

Referenser

- Aguirre AA, Balazs GH, Zimmerman B, Galey FD. 1994. Organic contaminants and trace-metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian-Islands. *Marine Pollution Bulletin* **28**: 109-114.
- Herbst LH, Jacobson ER, Moretti R, Brown T, Sundberg JP, Lein PA. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms* **22**: 1-12.
- Jacobson ER, Buergelt C, Williams B, Harris RK. 1991. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **12**: 1-6.
- Jacobson ER, Mansell JL, Sundberg JP, Hajjar L, Reichmann ME, Ehrhart LM, Walsh M, Murru F. 1989. Cutaneous fibropapillomas of green turtles *Chelonia mydas*. *Journal of comparative pathology* **101**: 39-53.
- Page-Karjian A, Norton TM, Krimer P, Groner M, Nelson SE, Gottdenker NL. 2014. Factors influencing survivorship of rehabilitating green sea turtles (*Chelonia Mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **45**: 507-519.
- Work TM, Balazs GH, Rameyer RA, Chang SP, Berestecky J. 2000. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**: 179-194.