

NMBU Veterinærhøgskolen  
Institutt for parakliniske fag  
Faggruppe for akvamedisin.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2023

Fordypning i akvamedisin

## **Utvikling av hjerteforandringer over tid etter eksperimentell smitte med PMCV hos atlantisk laks**

Studies of Temporal Changes of Heart Lesions  
Following Experimental PMCV Infection in Atlantic  
Salmon

Christopher Flinder Pedersen  
Kull 2018

Veileder Navn: Øystein Evensen

# Innhold

<b>Sammendrag .....</b>	<b>4</b>
<b>Definisjoner og forkortelser.....</b>	<b>6</b>
<b>Innledning.....</b>	<b>7</b>
<b>Formål .....</b>	<b>13</b>
<b>Materiale og metoder .....</b>	<b>13</b>
<b>Studiemodell:.....</b>	<b>13</b>
<b>Material og metoder .....</b>	<b>14</b>
<b>Fisk .....</b>	<b>14</b>
<b>Smitte .....</b>	<b>14</b>
Uttaksmetode og klargjøring av prøvemateriale for histologi .....	15
Testing av sammenheng mellom tid og histologisk score og statistiske analyser .....	18
Testing av sammenheng mellom Ct-verdi og histologisk score.....	19
<b>Resultater .....</b>	<b>20</b>
<b>Histopatologi.....</b>	<b>20</b>
Hjertepatologi og utvikling over tid.....	28
<b>Hjertepatologi og Ct-verdi sett i sammenheng.....</b>	<b>34</b>
<b>Sammenligning av Ct-verdi og summert hjertescore.....</b>	<b>38</b>
<b>Diskusjon .....</b>	<b>39</b>
<b>Histopatologi og utvikling over tid.....</b>	<b>39</b>
Sammenheng mellom Ct-verdi og hjertelesjoner .....	42
<b>Studiedesign og metode.....</b>	<b>46</b>

<b>RNA ekstraksjon og RT-qPCR .....</b>	<b>46</b>
<b><i>Konklusjon</i> .....</b>	<b>46</b>
<b><i>Takk til bidragsytene</i> .....</b>	<b>47</b>
<b><i>Summary</i> .....</b>	<b>48</b>
<b><i>References</i> .....</b>	<b>51</b>
<b><i>Vedlegg</i> .....</b>	<b>53</b>

## **Sammendrag**

*Tittel:* Utvikling av hjerteforandringer over tid etter eksperimentell smitte med PMCV hos atlantisk laks.

*Forfattere:* Christopher Flinder Pedersen

*Veileder:* Øystein Evensen, NMBU

Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en alvorlig hjertelidelse forårsaket av infeksjon med piscint myokarditt virus (PMCV) og affiserer oppdrettslaks i siste del i sjøfasen. CMS blir som oftest først diagnostisert etter forøket akutt dødelighet hos fisken, tett opp mot slaktetidspunktet.

CMS medfører sterkt redusert velferd hos fisken, men vil også ved et utbrudd, føre til store økonomiske tap for oppdretter. Utbrudd med CMS oppstår langs hele norskekysten og er ofte sett i forbindelse med økt stressbelastning, som for eksempel ved lusebehandling. I denne oppgaven har jeg evaluert histologiske forandringer i hjertet hos atlantisk laks etter eksperimentell smitte med PMCV. Snittene har blitt gradert i henhold til gitte kriterier.

Hjertets atrium og ventrikkel ble scoret, hver for seg, og gitt en score mellom 0 og 4, hvor score 4 representerer de mest uttalte forandringene. 88 snitt ble scoret. I teorien skulle 96 snitt vurderes og scores, men 8 snitt ble tatt ut av datamaterialet på grunn av avvikende kvalitet.

Snittene viser økende histologisk score over tid med patologiske forandringer som først starter i atrium, for så å manifestere seg i den spongiøse del av ventrikkelen. Atrium har generelt mer uttalte forandringer over hele infeksjonsforløpet. Ved siden av scoringen av histologiske snitt, ble det samtidig utført en RT-qPCR analyse for forekomst av PMCV genom i snittene for alle individene, to paralleller pr individ og et gjennomsnitt av parallelprøvene ble grunnlaget for Ct-verdien for hvert individ. Her var målet å se om det var en eventuell sammenheng mellom Ct-verdien og hjertelesjonens alvorlighetsgrad.

Studien viste en signifikant økning i histologisk score over tid etter smitte med PMCV, samt en signifikant sammenheng mellom økt mengde virus og økning i histologisk score, men vi kunne ikke se en signifikant økning i virusmengde fra 4 uker og noen av de senere tidspunktene fram til 12 uker etter smitte. Tross en relativt lav virusmengde 6 uker etter smitte med PMCV, med gjennomsnitt Ct-verdi på 25.6, som virket til å holde seg stabilt mellom 25 og 26 utover øvrige uttak, ble det likevel registrert en jevn utvikling i hjertelesjonene, som til slutt resulterte i lesjoner med generelt høy histologisk score. Høyeste histologiske score i atrium var 4, mens høyeste score i ventrikkel var en score av 3. Ved siste uttak, 12 uker etter smitte, viste 100% av fisken forandringer i hjertets atrium, og 95.7% viste samtidig forandringer i hjertets ventrikkel.

Årsaksforholdene bak en gradvis økning i histologisk score, til tross for liten økning i virus over tid, er ikke klargjort, men en mulig forklaring kan være at fiskens immunrespons/inflammatoriske respons ved tilstedeværelse av PMCV over tid, gir et vesentlig bidrag til de observerte forandringene.

## Definisjoner og forkortelser

PMCV	Piscint myokarditt virus
CMS	Kardiomyopatisyndrom
PD	Pankreas Disease
PRV-1	Piscint Orthoreovirus 1.
HSMB	Hjerte og skjelettmuskelbetennelse
SAV	Salmonid alfavirus
ORF	Åpen leseramme (open reading frame)
RdRP	RNA-avhengig RNA polymerase
RT-qPCR	Reverse transcription, quantitative Polymerase Chain Reaction
Ct-verdi	Cycle threshold value
Ip-injeksjon	Intraperitoneal injeksjon
WPC	Weeks post-challenge (uker etter smitte)

## **Innledning**

### **Generelt**

Kardiomyopatisyndrom hos laks (CMS) er den vanligste virale sykdommen som angriper hjertemuskulaturen hos atlantisk laks, *Salmo salar* L., i oppdrett, og vil over tid kunne medføre alvorlig hjertelidelse og redusert velferd hos fisken. Hjertelidelsen kan føre til akutt død, særlig sent i produksjonen og ofte uten at andre symptomer viser seg. CMS affiserer som oftest stor laksefisk på 3 – 4 kg i perioden 14 – 18 måneder etter sjøsetting. Til tross for at de fleste av utbruddene registret viser at CMS oppstår i siste del av sjøfasen, har det vært registrert tilfeller av CMS helt ned til én måned etter sjøsetting (Garseth et al., 2018, Fritsvold et al., 2021, Fritsvold et al., 2009). CMS ble først påvist i Norge i 1985 (Amin and Trasti, 1988), og har senere blitt påvist hos atlantisk laks i oppdrett i flere land som Skottland (Rodger and Turnbull, 2000), Færøyene (Poppe and Seierstad, 2003) og Canada (Brocklebank and Raverty, 2002). CMS forekommer langs hele norskekysten hvor det finnes oppdrett av atlantisk laks (Garseth et al., 2018). Siden utbrudd med CMS, stort sett oppstår sent i produksjonen, vil CMS-relaterte utbrudd i tillegg til å være et velferdsproblem, medføre en betydelig økonomisk tap for oppdretterne (Garseth et al., 2018).

### **Etiologi**

Allerede kort tid etter første påvisning av fikk man mistanke til at CMS skyldes en virusinfeksjon, men andre hypoteser om ikke-virale årsaker for utvikling av CMS har også blitt diskutert og utforsket, som underliggende immunologiske tilstander, fysiologiske årsaker, samt miljøfaktorer (Garseth et al., 2018). Etter 2009 ble det stadfestet at CMS var en smittsom sykdom da forskere etter injisering av smolt med et homogenisert vevsmateriale fra CMS-positiv laks, vellykket reproduserte karakteristiske CMS-lesjoner i hjertemuskulaturen hos

smolt opptil 40g (Fritsvold et al., 2009). I 2011, ble piscint myokarditt virus (PMCV) sekvensert og vist å gi karakteristiske CMS-lesjoner etter eksperimentell smitte (Haugland et al.). PMCV infeksjon har etter første påvisning, blitt ansett å være årsaken til CMS (Garseth et al., 2018). Underliggende virussykdommer hos laksen som PD og HSMB er sett å kunne gi økt risiko for å få CMS, mens økt stressbelastning av allerede PMCV-positiv laks som ved for eksempel lusebehandling, har vist å kunne gi økt risiko for mortalitet (Bang Jensen et al., 2020, Bang Jensen et al., 2013).

### **PMCV- oppbygning, replikasjon og transmisjon**

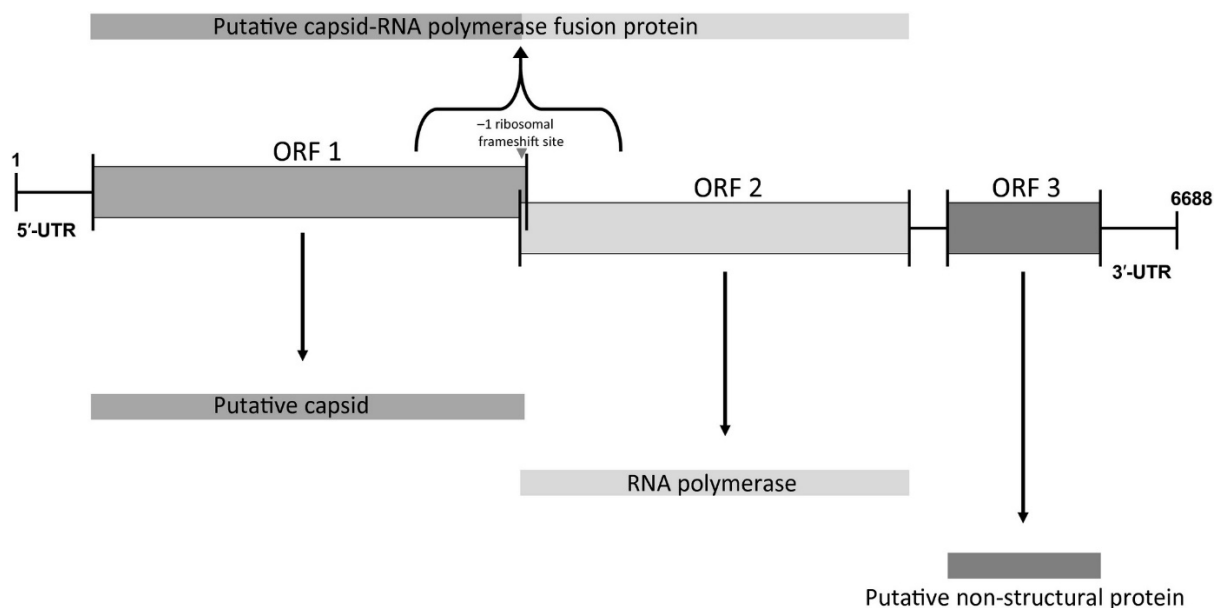
PMCV er et nakent, dobbelttrådet RNA virus, med mulig tilhørighet til virusfamilien *Totiviridae*, basert på karakteristiske geonomiske likheter med andre virus i samme familie. I dag omtales PMCV og beslektede virus som toti-lignende virus (totivirus-like viruses). Virus klassifisert som *Totiviridae* sprer seg når celler undergår celledeling, ved sporulering eller ved hjelp av fusjonering og angriper som regel encellede organismer. Det er også kjent at noen av virusene i familien, deriblant PMCV, består av et større genetisk materiale, noe som kan føre med seg andre egenskaper i forbindelse med smitteoverføring og virulens overfor vertebrater (Garseth et al., 2018).

PMCV har en diameter på ca. 50nm og genomet består av 6688 basepar, fordelt på 3 åpne leserammer; ORF 1 – 3. ORF-1, koder for kapsidet, som består av 861 aminosyrer (aa), ORF-2, koder for RNA-avhengig RNA polymerase (RdRp) og består av 726 aa, mens ORF-3, koder for protein bestående av 302 aa, og gir trolig viruset egenskaper som skiller PMCV fra mange andre virus i samme familie (Haugland et al., 2011, Løvoll et al., 2010).

De fleste virus klassifisert i Totiviridae-familien består av to åpne leserammer og infiserer encellede organismer, mens PMCV har tre åpne leserammer. At PMCV har en tredje leseramme, ORF-3, har vist å være et karakteristisk kjennemerke for PMCV og andre PMCV-



lignende virus. ORF-3 sin betydning er noe usikker, men det har vært diskutert om leserammen har betydning for oppbygningen av virusets kapsid, og kan legge til rette for en mer komplisert infeksjonsmåte, som blant annet smitte av multicellulære organismer ved hjelp av ekstracellulære omgivelser, noe de enklere Totivirus ikke gjør. Forskningen utført om PMCV sin replikasjon, peker i retningen av at viruset sprer seg til nye celler ved hjelp av en ekstracellulær transmisjonsrute (Haugland et al., 2011). En annen interessant hypotese om ORF-3 sin funksjon, er at denne gensekvensen kan ha betydning for regulering eller intensivering av inflammasjonsprosessen sett i forbindelse med CMS, da ORF-3 innehar en genetisk sekvens som koder for en cytokin-superfamilie i N-terminal del av ORF-3 (Haugland et al., 2011).



Figur 1: PMCV genomet. Aase B. Mikalsen, NMBU (Haugland et al., 2011).

Etter oppdagelsen av CMS, har konsensus lenge vært at utbrudd med CMS skyldes horisontal smitte (Bang Jensen et al., 2019, Haugland et al., 2011, Fritsvold et al., 2009), men et CMS-utbrudd på Færøyene, etter innførsel av rogn fra Norge, gav mistanke om at PMCV mulig også kan overføres vertikalt (Garseth et al., 2018). Mistanken om at det foreligger mulighet

for vertikal transmisjon av PMCV, ble videre styrket etter et forskningsprosjekt i 2018 påviste PMCV hos avkommene fra PMCV-positiv avlsfisk (Bang Jensen et al., 2019). Senere studier har imidlertid ikke bekreftet dette (Mikalsen et al., 2020).

## **Patogenese**

Patogenesen til CMS er på mange måter ikke kjent eller klargjort i sin helhet. Infeksjonsveien er heller ikke helt kjent. Studier med smitte av fisk ved hjelp av intraperitoneal injeksjon, så vel som kohabitant smitte ved hjelp av horisontal smitte, viser at PMCV oppformerer seg i fisken og fører til systemisk infeksjon med tilstedeværelse av virus på ulike tidspunkt i hjerte, nyre, gjeller, milt, muskel, serum, erythrocytter og leukocytter (Garseth et al., 2018).

PMCV har hjertet som målorgan, men i tidlig fase etter smitte med PMCV har det blitt registrert større mengder PMCV-RNA i midtnyre enn i hjerte, noe som gir mistanke om at PMCV først oppformerer i nyre før virus spres til hjertet (Fritsvold et al., 2022). Virus har blitt detektert i nyre og milt så tidlig som 1 uke etter smitte, med de høyeste verdiene i disse organene etter 2 uker. Det er også vist forøkte mengder PMCV-RNA i plasma i 10 og 20 dager etter smitte, noe som gir indikasjon om at det foreligger en viremisk fase (Fritsvold et al., 2022). RT-qPCR viser videre at konsentrasjonen av RNA reduseres i plasma i trend med økende konsentrasjon av PMCV-RNA i hjertet, noe som kan gi antydning til at den viremiske fasen ser ut til å avta etter at viruset har nådd sitt målorgan (Fritsvold et al., 2022, Garseth et al., 2018).

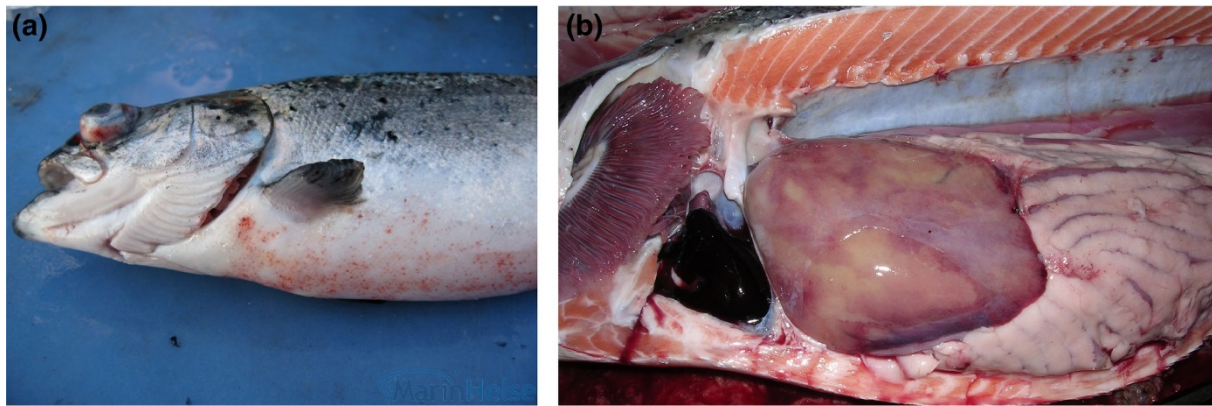
## **Utbrudd med CMS og kliniske tegn**

Utbredelsen av CMS ser ut til å ha endret seg siden dens oppdagelse. Tidligere diagnostiserte man CMS hovedsakelig nord i landet. I dag derimot, registreres det utbrudd langs hele

norskekysten og i 2020 var det registrert over 150 utbrudd langs hele kysten (Fritsvold et al., 2022).

Majoriteten av utbruddene av CMS, ser ut til å oppstå i løpet av andre året i sjø, men det har vært registrert utbrudd kort til etter utsett i sjø. Utbruddene er som oftest karakterisert med funn av akutt død fisk, uten at andre symptomer har blitt registrert, ofte sett i forbindelse med behandling av fisken, for eksempel ved lusebehandling hvor forøket stress er en antatt bidragsyter. Et utbrudd kan også ha et mer kronisk forløp med en lengre periode preget av forøket dødlighet (Garseth et al., 2018, Fritsvold et al., 2022).

Ved inspeksjon av død fisk etter et utbrudd med klinisk CMS, kan man ved makroskopisk vurdering av død fisk, tyde tegn til sirkulatoriske forstyrrelser trolig på grunn av underliggende kronisk hjertelidelse, hjertetamponade eller på grunn av endokarditt og myokarditt (Fritsvold et al., 2022). De makroskopiske funnene kan som sagt variere fra fisk til fisk, men typiske funn kan være petekkier ventralt på buken, exoptalamus og skjellommeødem. Ved obduksjon av fisken kan det videre observeres: ascites, mørk og misfarget lever, med fibrin i mer eller mindre grad kler den viscerale overflaten av leveren. Hos fisk med alvorlig CMS vil hjertets atrium og sinus venosus ofte være forstørret, noe som kan føre til hjertetamponade («hjertesprekk») og påfølgende akutt død. Funn av blod eller blodkoagler i hjertesekken er da et hyppig forekommende funn (Garseth et al., 2018, Fritsvold et al., 2022).



Figur 2: Makroskopiske endringer hos laks med CMS. Foto: Per Anton Sæther, Marinhelse. (b) Foto: Brit Tørud, Veterinærinstituttet (Garseth et al., 2018)

## Diagnostikk

Diagnosen CMS blir som oftest satt basert på kliniske observasjoner, obduksjonsfunn og ved bruk av histologisk undersøkelse av hjerte. Videre kan PMCV påvises ved bruk av RT-qPCR, ved immunhistokjemi, og ved bruk av *in-Situ hybridisering* (Fritsvold et al., 2022, Garseth et al., 2018). Ulike studier har vist at det foreligger korrelasjon mellom alvorlighetsgrad på hjertelesjonene og mengde virus-genom funnet ved bruk av PCR. Hos fisk med klinisk CMS, vil det typisk være markant forøket PMCV-RNA i hjerte, med registrerte Ct-verdier i intervallet 12 – 15. Det har også blitt påvist Ct-verdi under 7 i hjerte hos fisk med CMS, men dette er ansett som uvanlig lavt (Garseth et al., 2018).

### Histologiske endringer i hjertets atrium og ventrikkel:

Histologisk kjennetegnes CMS med lesjoner i hjertets atrium og ventrikkelens spongiose del. Man kan se inflammasjon og nekrose av atriets endokard- og myokardceller, etterfulgt av spredning til ventrikkelens spongiose del. PMCV-smitte vil som oftest starte som fokale lesjoner subendotelialt i hjertets atrium, med infiltrasjon av mononukleære betennelsesceller, bestående hovedsakelig av lymfocytter og makrofager (Wiik-Nielsen et al., 2012). På et

senere tidspunkt vil man kunne se multifokale til konfluente lesjoner, med funn av økte mengder betennelsesceller, vakuolisering, endotelial- hypertrofi og hyperplasi, samt nekrose med tap av muskelceller. På et senere stadium i sykdomsløpet, kan man etter spredning til ventrikkelen, tyde en histologisk skille mellom ventrikkelens spongiøse del som er diffust infiltrert med betennelsesceller, og ventrikkelens kompakte del, som i de fleste tilfeller pleier å være helt intakt og uaffisert (Garseth et al., 2018).

## **Formål**

Formålet med denne oppgaven er å vurdere og score histologiske forandringer i hjertemuskulaturen hos PMCV-infisert laks, med vekt på forekomst av inflammatoriske, degenerative og nekrotiske forandringer i hjertes atrium og spongiøse ventrikkel. Ved siden av histologisk scoring av hjertelesjonene, er det gjennomført en begrenset studie av forekomst av virus-genom på de samme tidspunktene etter smitte og en eventuell sammenheng mellom mengde virus-genom påvist i hjertet og hjertelesjonenes alvorlighetsgrad.

*Problemstilling: Etter eksperimentell smitte med PMCV, vil tid ha betydning for utvikling av hjertelesjoner og vil lesjonene utvikle seg over tid? Vil økende virusmengde sammenfalle med økning i histologisk score?*

## **Materiale og metoder**

**Studiemodell:** Studiemodellen er designet som et eksperimentelt smitteforsøk, longitudinell studie, hvor målet er å beskrive hjerteforandringer hos PMCV-infisert laks på gitte tidspunkt etter smitte, henholdsvis 4, 6, 8 og 12 uker etter eksperimentell smitte med

PMCV. Studiepopulasjonen er fordelt på to kar. Det ble totalt tatt ut prøver av 96 fisk. 24 PMCV-infisert laks ved hvert uttak, 12 stykker fra hvert av karene. I tillegg er det tatt ut 18 stk. 0-prøver, utført før smitte med PMCV.

## **Material og metoder**

### **Fisk**

Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ble oppstallet i ved NMBUs våtlab i ferskvannsstadiet med en vanntemperatur  $\approx 13$  °C. Fisk ble holdt i 12 kar på 90-270 L, med en tetthet på  $\approx 15$  kg/m<sup>3</sup>. Etter en lysstyringsperiode, 12:12 lys:mørke (6 uker) etterfulgt av 24:0 (lys:mørke) i ca. 6 uker. Fisken ble så overført til Solbergstrand i oksygenerte plastposer med bil. Etter overføring til Solbergstrand ble fisken holdt i kar på ca.  $\approx 1000$ L, ved ca. 10 °C og i sjøvann. Tettheten ved oppstart var ca. 15 kg/m<sup>3</sup> og ca. 30 kg/m<sup>3</sup> ved avslutning av forsøket. Fisken og karene ble stelt daglig av personell på Solbergstrand, og miljøparametere og fôringsmengder ble registrert daglig. Fisken ble fôret etter standard rutiner ved begge testanleggene, ved hjelp av fôrautomater. Daglig fôringsmengde var 1 % av levende vekt. Fisken ble tatt av fôr i 24 timer før smitte og prøvetaking.

### **Smitte**

PMCV inokulum brukt til smitte ble tillaget ved NMBU-Vet og testet for infektivitet før gjennomføring av hovedforsøket. Inokulumet stammer fra et klinisk utbrudd av CMS (i Norge), og opprinnelig fiskevev brukt til smitte var negativt for piscint orthoreovirus (PRV) var til stede på svært lavt nivå (Ct-verdier  $\approx 35$ ).

Etter homogenisering ble prøvene sentrifugert ved 3500 rpm, supernatanten ble aspirert og alikvotert i 2 ml Eppendorf-rør og frosset ved -80°C. Et hetteglass for for-smitte ble tint og væske ble aspirert, og klargjort for smitte, fortynnet 1:10, 1:100 og 1:1000 i steril PBS.

Den samme ampullen ble brukt (tint) for smitte i hoved forsøket. Fisken ble sultet 24 timer før smitte som ble gjort ved i.p. injeksjon, 0,1 ml/fisk ved bruk av engangssprøyter på 1 ml.

### **Uttaksmetode og klargjøring av prøvemateriale for histologi**

Det ble tatt ut 12 fisk fra to separate kar 4, 6, 8 og 12 uker etter smitte. Ved uttak ble fisken avlivet med en overdose med Benzokain (ca. 50ml/l). Buken ble åpnet ved bruk av ordinær obduksjonsmetode. Hjertet ble delt slik at atrium og ventrikkel ble tatt ut samtidig med steril teknikk og overført til 10% formalin og fiksert i minimum tre dager før dehydrering og fiksering. Etter fiksering ble hjertet lagt i parafinvoks og snittet til 2-3 mikrometer tykkelse. Snittene ble deretter farget med Hematoxylin og eosin (H&E) før digital skanning for videre analyse ved bruk av NDP.view 2 (Hamamatsu, <https://www.hamamatsu.com/jp/en.html>).

### **Histologi - scoringsmetode**

De de 96 skannede snittene ble vurdert og gradert etter scoringskriteriene beskrevet i Tabell 1 (Fritsvold et al., 2009). 88 snitt ble til slutt scoret, da 8 av snittene var av dårlig kvalitet og derfor ikke gitt en score. Hjertets atrium og ventrikkel ble gitt hver sin verdi fra: 0 – 4 i henhold til kriteriene i tabellen.

Tabell 1: Histologisk klassifisering av hjertelesjoner etter PMCV smitte (Fritsvold et al., 2009).

SCORE:	Beskrivelse av histopatologiske endringer i hjertet etter PMCV smitte:
0	Ingen patologiske endringer i vevet. Noen få leukocytter kan observeres.
1	En eller noen få fokale lesjoner. Mild infiltrasjon av leukocytter.
2	Flere distinkte lesjoner med få til moderat forhøyet infiltrasjon av leukocytter.
3	Multifokale til konfluente lesjoner, med moderat til uttalt infiltrasjon med leukocytter.
4	Konfluente lesjoner/diffus utbredelse. Utgjør >75% av hjertevevet. Uttalt mengde leukocytter.

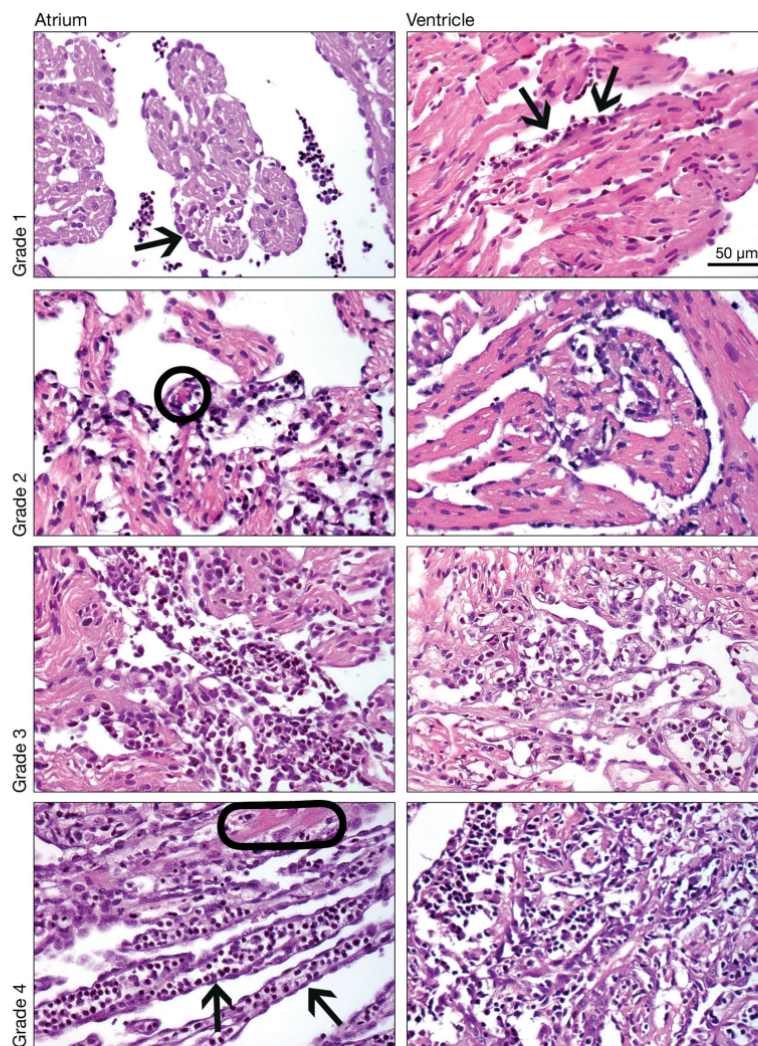


Fig. 1. *Salmo salar*. Histological classification of lesions in cardiac atrium and spongy ventricle, in accordance with the grading described in Table 1. Grade 1: arrows indicate minor inflammatory lesions consisting of sparse, focal subendocardial infiltration by mononuclear leukocytes and some degree of subendocardial vacuolisation, in both atrium and ventricle. Grade 2: several distinct lesions with small to moderately increased number of leukocytes. Myocyte degeneration and necrosis are encircled in the atrium. Grade 3: Multifocal to confluent lesions with moderate to severe leukocyte infiltration. Grade 4: Arrows indicate hyper-trophic endocardial cells in the atrium forming empty tubes where almost all muscle fibres have been replaced by inflammatory cells, dominated by small mononuclear lymphocyte-like cells. Myocyte degeneration and necrosis are encircled in the atrium. Ventricular example is from a focal Grade 4 lesion. Haematoxylin and eosin staining. Scale bar (applies to all panels) = 50 µm

Figur 3: Histologisk klassifisering av hjertelesjoner i hjertets atrium og ventrikkel, representert i bilder.



### **RT-qPCR :**

Det ble tatt prøver fra ubehandlet fisk ved smittetidspunkt (tid 0), og senere 4, 6, 8 og 12 uker etter smitte (som for histologisk preparering). Prøver på RNA-Later ble merket med forsøksnummer, tanknr., gruppenr., fiskenr. (som for histologiprøver), organer og dato. En hjerteprøve (hjertespiess) fra hver fisk ble overført til forhåndsmerkede rør. Vev samlet inn for RT-qPCR-analyse ble overført til rør med RNAlater. PCR-analyser inkluderte test for tilstedeværelse av PMCV-genom (alle tidspunkter) i hjerte for hver fisk etter smitte. Test for tilstedeværelse av piscint orthoreovirus (PRV-1) ble utført for 20 fisk ved uke 0.

Det ble benyttet en standard RT-qPCR-metode basert på spesifikke primere for ORF2. Preparering for RT-qPCR analyser ble gjennomført ved at hjertevev fra smittet fisk ble homogenisert i en lyseringsbuffer ved bruk av FastPrep-24 homogenisator (MPBiomedicals, Belgia) i 2 minutter ved 20 Hz. Isolering av RNA ble gjort ved bruk av QiaSymphony (robot) og gjennomført av teknisk personale ved Faggruppe for Akvamedisin. Isolert RNA ble videre kvantifisert ved å måle OD<sub>260/280</sub> forholdet på NanoDrop ND-1000 spektrofotometer (NanoDrop). Ratio ved OD<sub>260/280</sub> ble målt. Deretter ble mengde RNA normalisert slik at alle prøver ble justert til samme konsentrasjon av RNA (20 µg/ml, 20 ng/µl). Det ble tatt ut to paralleller per prøve.

En ett-trinns revers transkriptase RT-qPCR ble kjørt på RNA for å bekrefte tilstedeværelse og nivåer av PMCV-spesifikt RNA i prøvene. Dette ble utført ved bruk av QuantiFAST SYBR Green RT-qPCR kit (Qiagen) i kombinasjon med 2 µl RNA templat og primere CMS-RT-qPCR-F4 og CMS-RT-qPCR-R4 (tilgjengelig ved Fagseksjon for Akvamedisin). Alle RT-qPCR analyser ble kjørt ved hjelp av en AriaDx real-time PCR instrument, og var basert på produsentens prosedyrer, inkludert annealing og forlengelse ved 60 °C i 40 sykluser.

Etter RT-qPCR var gjennomført ble det tatt et gjennomsnitt av de to parallelle prøvene, som ga grunnlaget for Ct-verdien per fisk ved hvert uttak. Korrekt størrelse på amplicon ble undersøkt ved en smeltepunktanalyse.

### Testing av sammenheng mellom tid og histologisk score og statistiske analyser

	Hypotese:
<b>H<sub>0</sub></b>	Tid har ingen påvirkning på histologisk score etter smitte med PMCV
<b>H<sub>a</sub></b>	Tid har betydning på histologisk score etter smitte med PMCV

Målet med hypotesetestingen er å teste om det foreligger en korrelasjon mellom variablene «tid» og «histologisk score». Variabelen «tid» ble representert av uttakene; 4, 6, 8 og 12 uker etter smitte med PMCV. 88 observasjoner hadde histologisk score og tatt med i hypotesetestingen. Histologisk score er ordinal variabel, og man kan se på sammenheng ved bruk av ordinal regresjonsanalyse med bruk av statistikkprogrammet STATA (StataCorp, USA) for å regne ut korrelasjonen mellom de to variablene. Her testet vi H<sub>0</sub>, med et konfidensintervall = 95%. Ved en p-verdi  $\geq 0.05$  vil ikke H<sub>0</sub> forkastes. Hvis p-verdien  $< 0.05$  vil nullhypotesen forkastes.

## Testing av sammenheng mellom Ct-verdi og histologisk score

	Hypotese:
<b>H<sub>0</sub></b>	Det er ikke sammenheng mellom nivå av virus i hjertemuskelen og histopatologiske forandringer
<b>H<sub>a</sub></b>	Det er sammenheng mellom nivå av virus i hjertemuskelen og histopatologiske forandringer

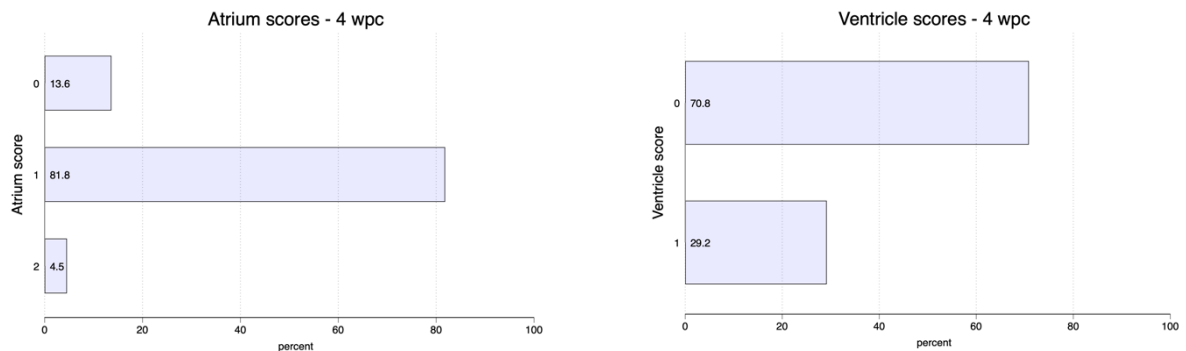
Hypotesetesting for korrelasjonen mellom variablene Ct-verdi og histologisk score, ble utført ved bruk av STATA, og sammenhengen mellom de to parametre ble testet ved bruk av Spearmans korrelasjon, da Spearmans metode passer godt for korrelasjonsanalyse av ordinale variabler som histologisk score. Totalt ble 85 observasjoner sjekket for sammenheng ved bruk av STATA og det testes primært for at Ct-verdier og histoscore er uavhengig verdier.

# Resultater

## Histopatologi

### Resultater etter gradering av snitt

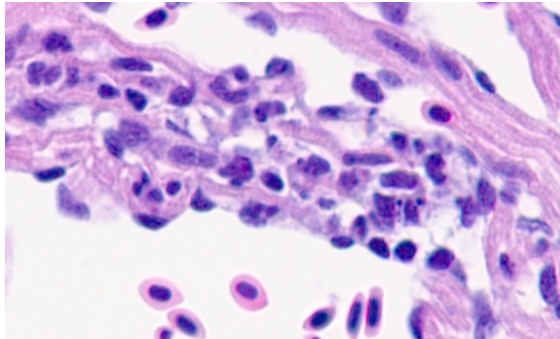
4 uker etter smitte med PMCV



Figur 4 og 5: Prosentvis fordeling av histologisk score-kategorier i atrium og ventrikkel, 4 uker etter smitte med PMCV.

Figur 4 og 5 viser prosentvis fordeling etter scoring av hjertets atrium og spongiøse ventrikkel, 4 uker etter smitte med PMCV. Totalt antall graderte snitt var 22 av 24, da to av snittene var av dårlig kvalitet og ikke gitt verdi. Gradering ble gjort i henhold til kriteriene beskrevet i tabell 1. Ett av snittene viste tegn til fokal infiltrasjon av monouklære betennelsesceller i epikardiet, forenlig med epikarditt, men blir ikke lagt videre vekt da fokuset er å gradere snitt etter allerede gitte CMS-kriterier. Ca. 86.4 % av fisken tatt ut på dette tidspunktet viste forandringer i hjertet. Til tross for at de fleste lesjonene observert, var lokalisert til hjertets atrium, var det likevel 29.2 % av fisken, som allerede 4 uker etter smitte viste forandringer i hjertets ventrikkel. Høyeste score gitt i atrium var 2, mens høyeste oppnådde score i ventrikkel var 1 - noe som indikerer funn av én eller få fokale lesjoner, med mild infiltrasjon av leukocytter i ventrikkel.

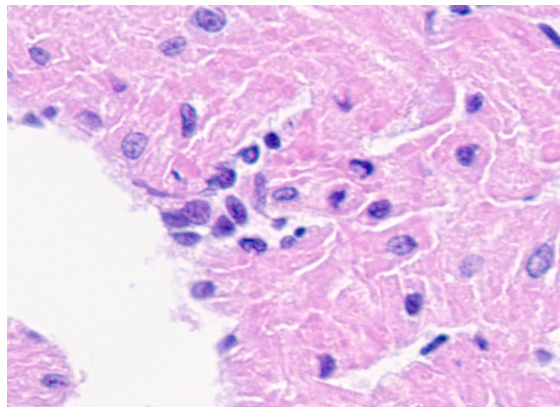
Noen utvalgte bilder, 4 uker etter smitte med PMCV:



Atrium:  
Fokal lesjon med subendotelial infiltrasjon av mononukleære betennelsesceller, samt område med fokal nekrose med hypereosinofilt preg.

Histologisk score 1

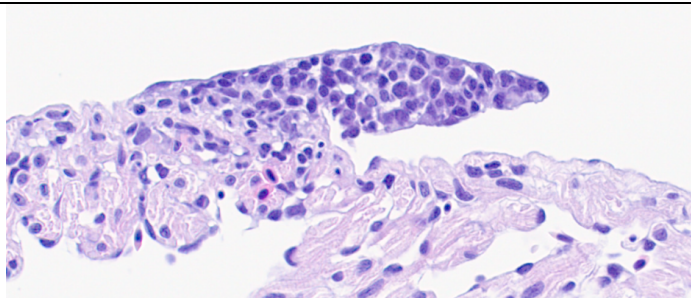
---



Ventrikkel:  
Fokal infiltrasjon i spongiøse ventrikkel med Betennelsesceller

Histologisk score: 1

---

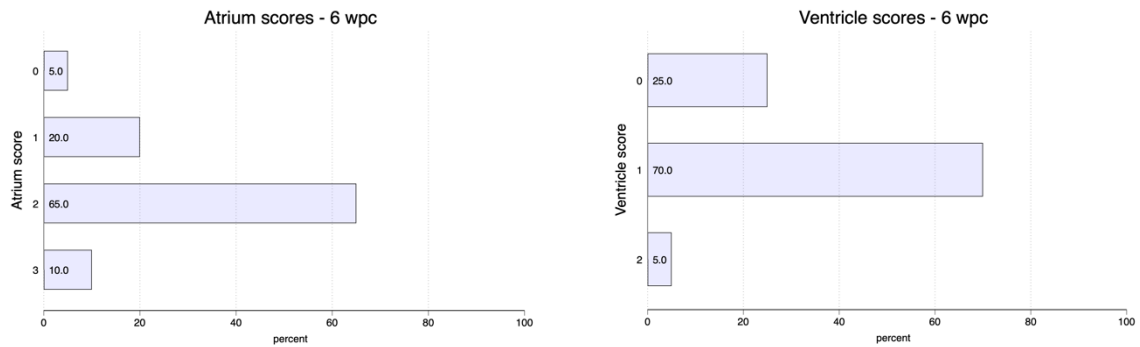


Atrium:  
Tydelig subendotelial infiltrasjon av betennelsesceller.

Histologisk score: 1

---

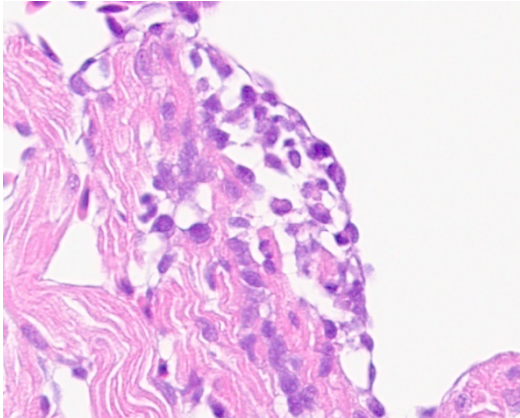
## Uttak 6 uker etter smitte



Figur 6 og 7. Prosentvis fordeling av histologisk score-kategorier i atrium og ventrikkel 6 uker etter smitte.

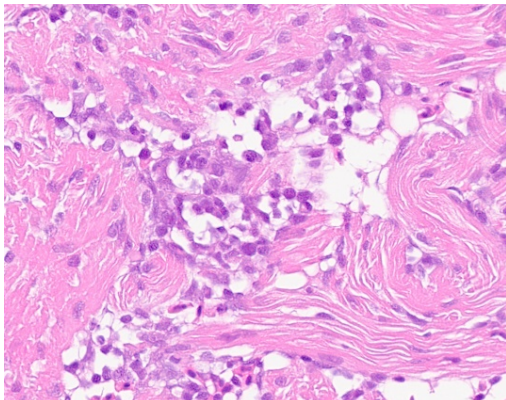
Figurene over viser histologisk-score fordelt på atrium og spongiøse ventrikkel 6 uker etter smitte. Totalt graderte snitt ved dette uttaket var 19 av 24. 2 snitt manglet i datasettet, og 3 av snittene var av dårlig kvalitet og ble derfor ikke gitt score. Ett snitt skilte seg ut med en score av 2 i både atrium og ventrikkel. To snitt nådde en score på 3 i hjertets atrium, med multifokale til konfluente lesjoner med moderat infiltrasjon av mononukleære betennelsesceller, men ett av disse snittene var noe «blekt» i fargen, og kan ha blitt gitt falsk høy score. 95% av fisken viste forandringer i hjertet, med høyeste atriumscore på 3. 75% av fisken hadde forandringer i hjertes ventrikkel 6 uker etter smitte og 70% ble gradert til 1, men én fisk hadde endringer i hjertets ventrikkel forenlig med en score på 2.

Noen utvalgte bilder, 6 uker etter smitte med PMCV:

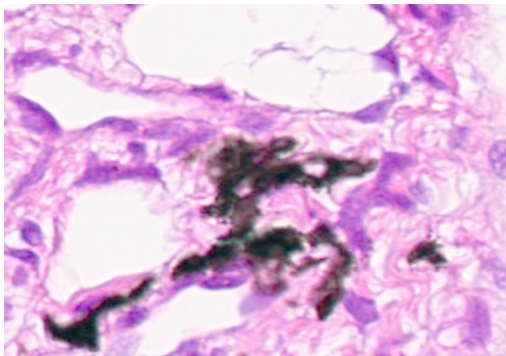


Atrium:

Snittet viste flere distinkte lesjoner med betennelsescelle infiltrasjon, subendotelial hypertrofi og tegn til myocyt nekrose



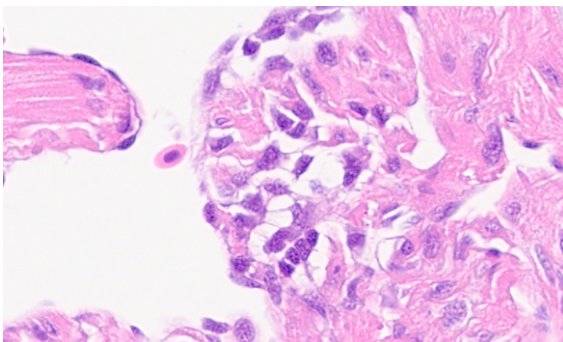
Histologisk score: 2



Atrium:

Bifunn,

Fokalt område med melaninavleiring/  
melanomakrofager.

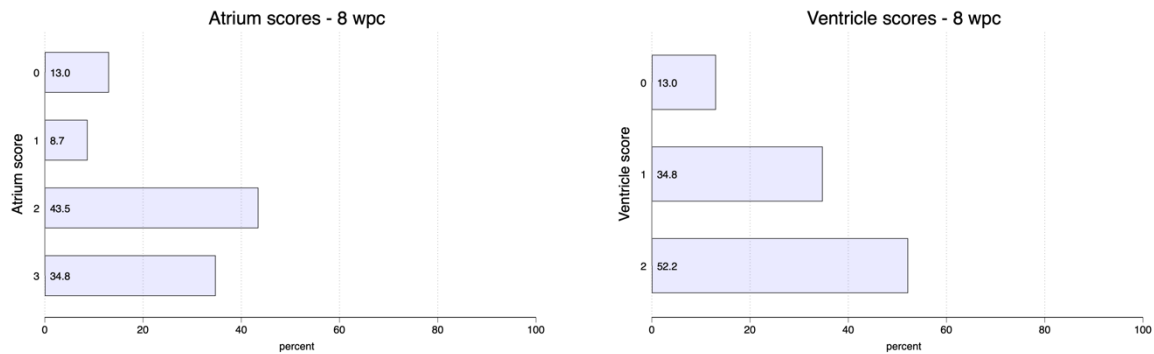


Ventrikkel:

Snittet viste flere distinkte lesjoner i både atrium og ventrikkel.

Histologisk score: 2

## Uttak 8 uker etter smitte

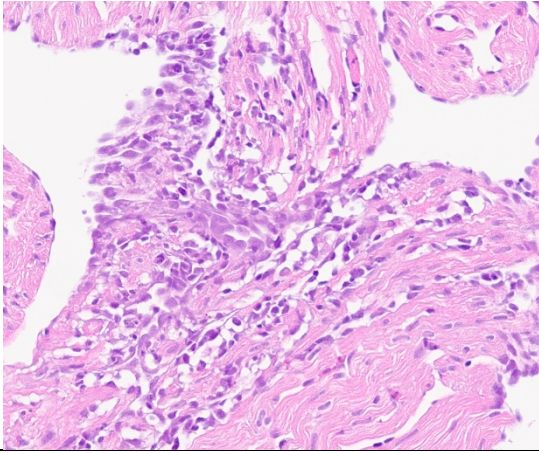


Figur 8 og 9. Prosentvis fordeling av histologisk kategori-score i atrium og ventrikkel, 8 uker etter smitte.

Ved uttak etter 8 uker ble det gradert totalt 23 av 24 snitt. Ett av snittene viste dårlig kvalitet, spesielt av spongiøse ventrikkel, hvor vevet så ut til å ha lagt seg dobbelt. Snittet ble derfor vurdert til å være av dårlig kvalitet og ikke gitt noen score. 2 av snittene ble gradert med 0 for både atrium og ventrikkel, men snittene var dårlig farget, og kan ha fått falsk lav verdi. I tre av snittene var det lite atriumvev tilgjengelig, snittene som dette gjaldt ble gradert i spennet 0 – 3, men kan ha mottatt falsk lav verdi, siden vevet tilgjengelig muligens ikke reflekterer tilstanden i resten av ariet. I sammenligning med forrige uttak, viser 87% av fisken endringer i atrium og ventrikkel, mot 95% ved forrige uttak. 35 % av atriene viser lesjoner med multifokale til konfluente lesjoner, med moderat til uttalt infiltrasjon av leukocytter. 87% av fisken viste forandringer i ventrikkel, hvorav ca. 52% ble tildelt en histologisk-score på 2.



Utvalgte bilder, 8 uker etter smitte med PMCV:

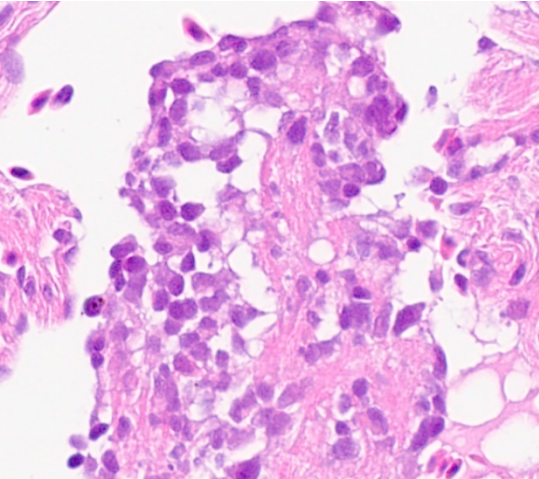


Ventrikkel:

Viste flere distinkte lesjoner, med områder med moderat forøket antall betennelsesceller.

Histologisk score 2:

---



Atrium:

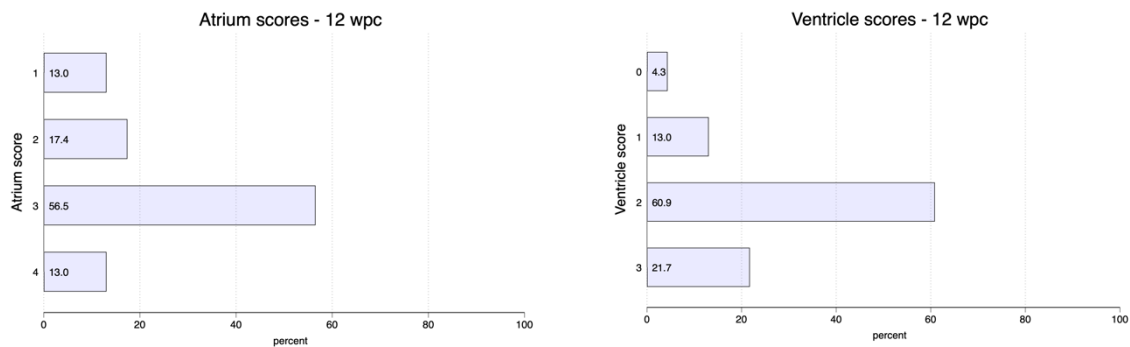
Snittet viste multifokale til konfluente lesjoner, med moderat infiltrasjon av leukocytter.

Områder med oppklaring etter degenerasjon/nekrose av myocytter.

Histologisk score: 3

---

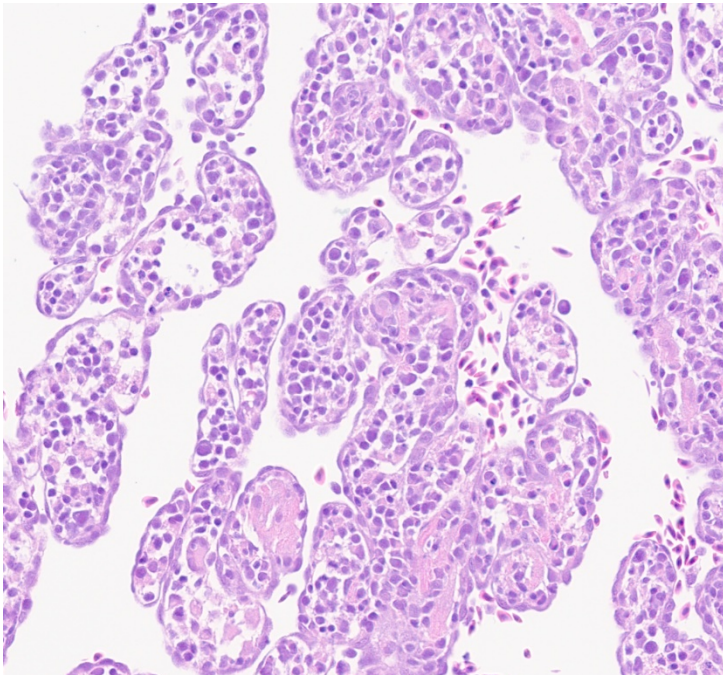
Uttak 12 uker etter smitte



Figur 9 og 10. Prosentvis fordeling av histologisk kategori-score i atrium og ventrikkel, 12 uker etter smitte. Merk at ingen fisk hadde score 0 i atriet.

Ved siste uttak 12 uker etter smitte ved PMCV, er alle snittene av god kvalitet og det ble her gitt score til 23 snitt. Tre av snittene viste tegn til både diffus og fokal epikarditt i tillegg til mer «CMS-typiske» lesjoner, men blir ikke lagt noe fokus på her. 2 av snittene viste dårlig opptak av H&E farge, men av god nok kvalitet til å få score. 100% av fisken ved dette uttaket viser endringer i hjertet. 13% oppnådde høyeste score på 4, i hjertets atrium, mens 21.7% av fisken hadde endringer i ventrikkel forenlig med en score på 3. 95,7 % av fisken hadde endringer i både atrium og ventrikkel 12 uker etter smitte med PMCV.

Utvalgte bilder, 12 uker etter smitte med PMCV:

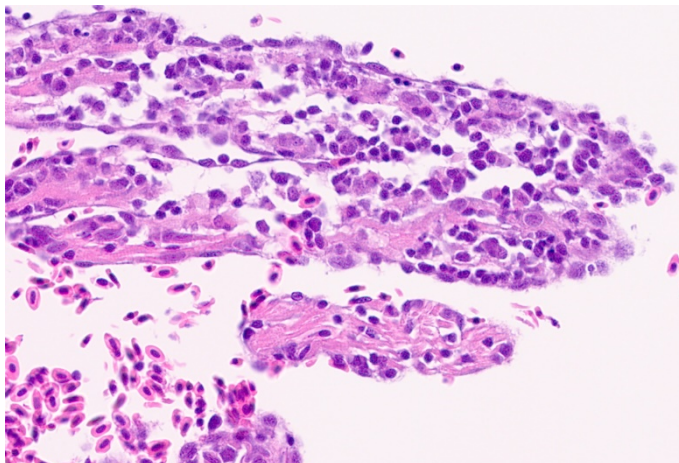


Atrium:

Diffuse lesjoner >75% av vevet affisert.

Uttalt antall leukocytter,  
endotelial hypertrofi, myocyt  
degenerasjon og nekrose.

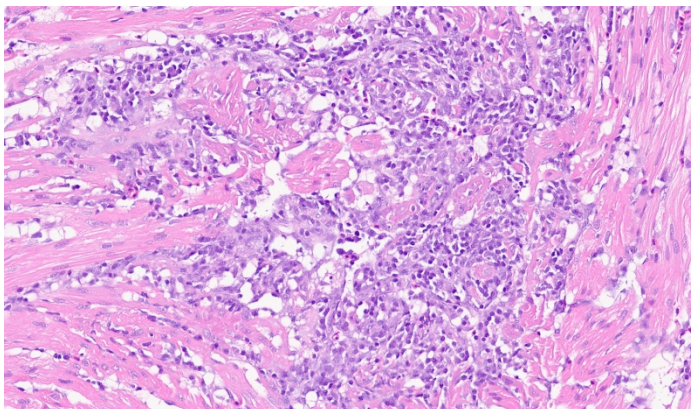
Histologisk score: 4



Atrium:

Diffuse lesjoner, endotelial hypertrofi og  
flere områder med eosinofilt preg.

Histologisk score 3

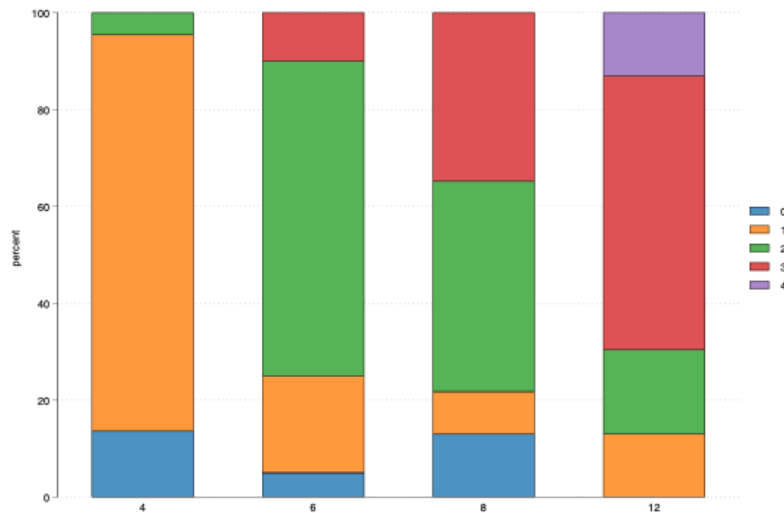


Ventrikkel:

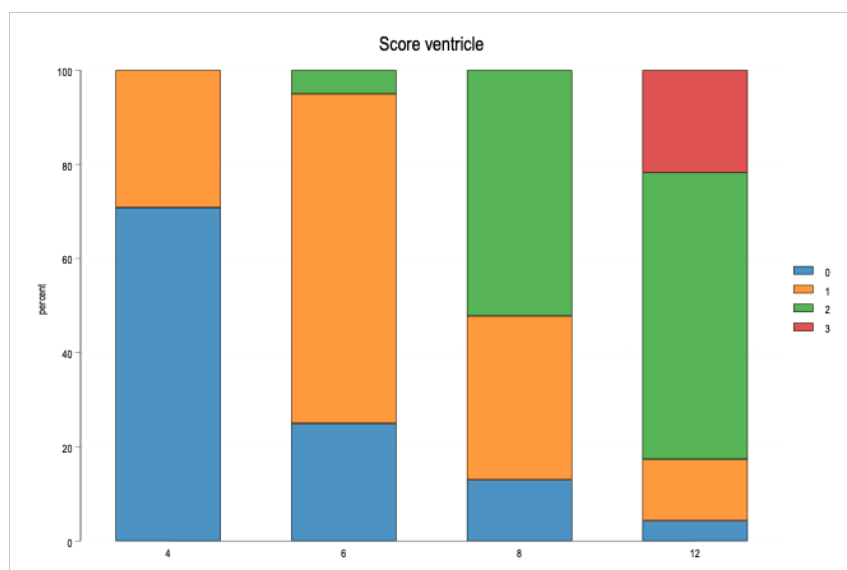
Multifokale lesjoner, dels konfluente.  
Med moderate mengder ned  
betennelsesceller

Histologisk score: 3

## Hjertepatologi og utvikling over tid



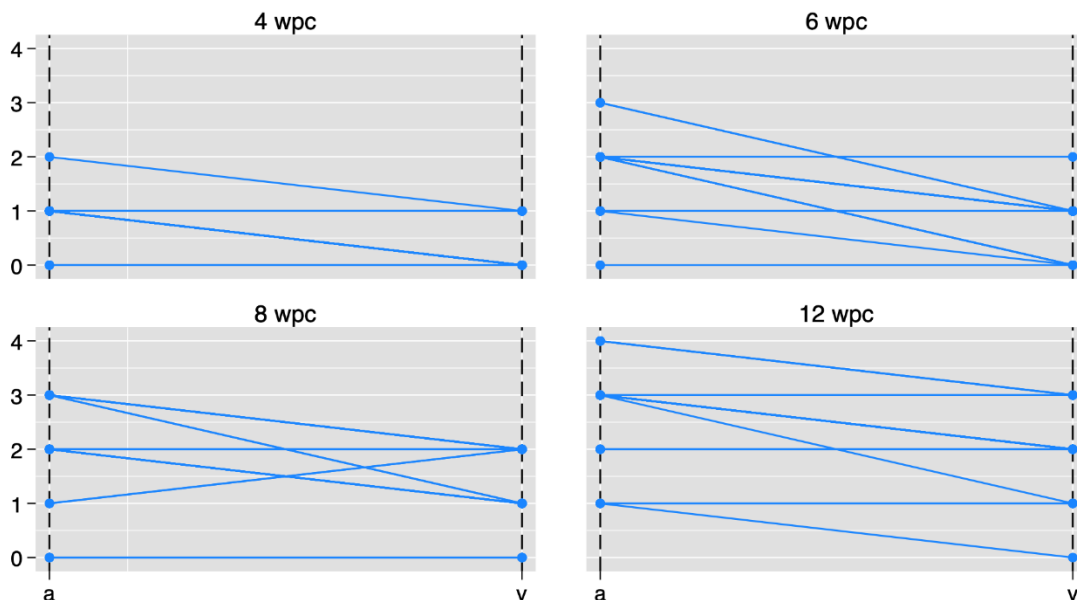
Figur 11. Utvikling hjertepatologi over tid i atrium. Stackbar diagram.



Figur 12. Utvikling hjertepatologi over tid i ventrikkel.

Figur 11 og 12 over, viser en skjematisk fordeling av hjertelesjonenes utvikling over tid, i henholdsvis atrium og ventrikkel. Resultatene viser at hjertepatologien øker gradvis over tid. Hjerteforandringene ser ut til å starte i hjertets atrium, med gradvis økende alvorlighetsgrad, og med påløpende utvikling av lesjoner i spongiose ventrikkel. Lesjonene viser generelt

høyere alvorlighetsgrad i atrium, sammenlignet med ventrikkel. Ved uttak 12 uker etter smitte, viste 13% av snittene forandringer i atrium analogt med en histologisk score på 4, det vil si konfluente lesjoner med over 75% av vevet affisert og med uttalt infiltrasjon av lymfocytter. Forandringer i ventrikkel kunne ses allerede 4 wpc, med fokale forandringer i ventrikkelen hos ca 30% av fisken, og etter 12 uker etter smitte, hadde ca. 95% av fisken forandringer i ventrikkelen av varierende alvorlighetsgrad i spennet 1 – 3. Ingen av ventriklene vurdert i denne studien nådde en score av 4, men ca. 21 % av ventriklene 12 wpc, viste lesjoner forenlig med en histologisk score på 3. Forholdet og differansen mellom utvikling av lesjoner i atrium og ventrikkel, er grafisk fremstilt i figuren under (figur 13).



Graphs by wpc

Figur 13. Atrium og ventrikkel, score over tid. Parvist plot pr individ. Flere individer har fått samme score og av den grunn blir antall individer tilsynelatende lavt.

Figur 13, viser et parvist plot pr individ. Denne figuren fremstiller hvordan atriumscore sammenfaller med ventrikkelscorene per fisk. Mange av snittene hadde samme verdi, og er derfor representert av samme strek. Figuren viser i likhet med figur 11 og 12, histopatologiske forandringer i hjertets atrium, av høyere histologisk score enn i ventrikkel, og over tid, gradvis

påløpende endring i ventrikkel. Man kan også merke seg en generell økning i score for både atrium og ventrikkel over tid, mens differansen mellom atrium og ventrikkel opprettholdes.

Mean estimation Number of obs = 87

	Mean	Std. err.	[95% conf. interval]	
c.av@wpc				
4 wpc	<b>1.181818</b>	<b>.1562045</b>	<b>.8712939</b>	<b>1.492342</b>
6 wpc	<b>2.578947</b>	<b>.2334059</b>	<b>2.114952</b>	<b>3.042943</b>
8 wpc	<b>3.391304</b>	<b>.3250973</b>	<b>2.745032</b>	<b>4.037576</b>
12 wpc	<b>4.695652</b>	<b>.317069</b>	<b>4.06534</b>	<b>5.325964</b>

Figur 14. fordeling av histologisk score, gjennomsnitt av a+v summert ved uttak 4, 6, 8 og 12 wpc.

Figur 14, viser gjennomsnittsverdien av atrioms og ventrikkelens sammenlagte histologiske score for 87 observasjoner. Resultatene viser jevn økning i score fra og med første uttak ved 4 uker, til og med 12 uker etter smitte med PMCV. Med en differanse mellom av-sammenlagt ved uttak: 4. og 6 wpc = 1.39, mellom 6. og 8 wpc = 0.82 og mellom 8. og 12 wpc = 1,30. Differansen mellom gjennomsnitt av sammenlagt verdi, for hvert uttak, ser ut til å være størst mellom uttak 4 og 6 wpc.

## Test av sammenheng mellom TID og histologisk score

Hypotese:	
<b>H<sub>0</sub></b>	Tid har ingen påvirkning på histologisk score etter smitte med PMCV
<b>H<sub>a</sub></b>	Tid har betydning på histologisk score etter smitte med PMCV

Ved bruk av STATA og ordinal regresjonsanalyse er tid etter smitte analysert som forklaringsvariabel for histologisk score, og histologisk score i atrium er satt som avhengig variabel (y).

```

Iteration 0:  log likelihood = -122.68274
Iteration 1:  log likelihood = -99.551213
Iteration 2:  log likelihood = -98.204218
Iteration 3:  log likelihood = -98.197842
Iteration 4:  log likelihood = -98.19784

Ordered logistic regression              Number of obs =    88
LR chi2(3)      =  48.97
Prob > chi2     =  0.0000
Pseudo R2      =  0.1996

Log likelihood = -98.19784

```

a	Coefficient	Std. err.	z	P> z	[95% conf. interval]	
wpc	0 (base)					
4						
6	2.328422	.6501517	3.58	0.000	1.054149	3.602696
8	2.940443	.6827239	4.31	0.000	1.602329	4.278558
12	4.564285	.7556689	6.04	0.000	3.083201	6.045369
/cut1	-1.151836	.4484576			-2.030797	-.2728754
/cut2	1.665954	.5064202			.6733884	2.658519
/cut3	3.753081	.6158104			2.546115	4.960047
/cut4	6.757851	.8723211			5.048133	8.467569

Figur 15. Ordinal regresjonsanalyse med atrium-score som avhengig variabel og tid som uavhengig variabel.

I modellen over (Figur 15) har det inngått 88 observasjoner. Forandringene over tid er her sammenlignet mot funnene 4 uker etter smitte og 4 wpc brukes da her som en base for sammenligning (0.verdien). Resultatene viser en signifikant sammenheng mellom tid og utvikling av histologisk score (Prob>chi2 = 0.0000) og at det samtidig foreligger en

signifikant økning i histologisk score ved hvert av tidspunktene etter 4 wpc, ( $P < 0.000$ ). Noe som betyr at tiden etter PMCV smitte, er en variabel som har en signifikant betydning for utvikling av hjertelesjonene. Vi kan også se basert på koeffisientverdiene oppført ved hvert av uttakene, at sammenhengen mellom tid og histologisk score er positiv, noe som i seg selv betyr at når én variabel øker vil den andre variablene også øke. Tolkning kan være som følge at jo lenger tid som går etter smitte, jo høyere vil histologisk score være.

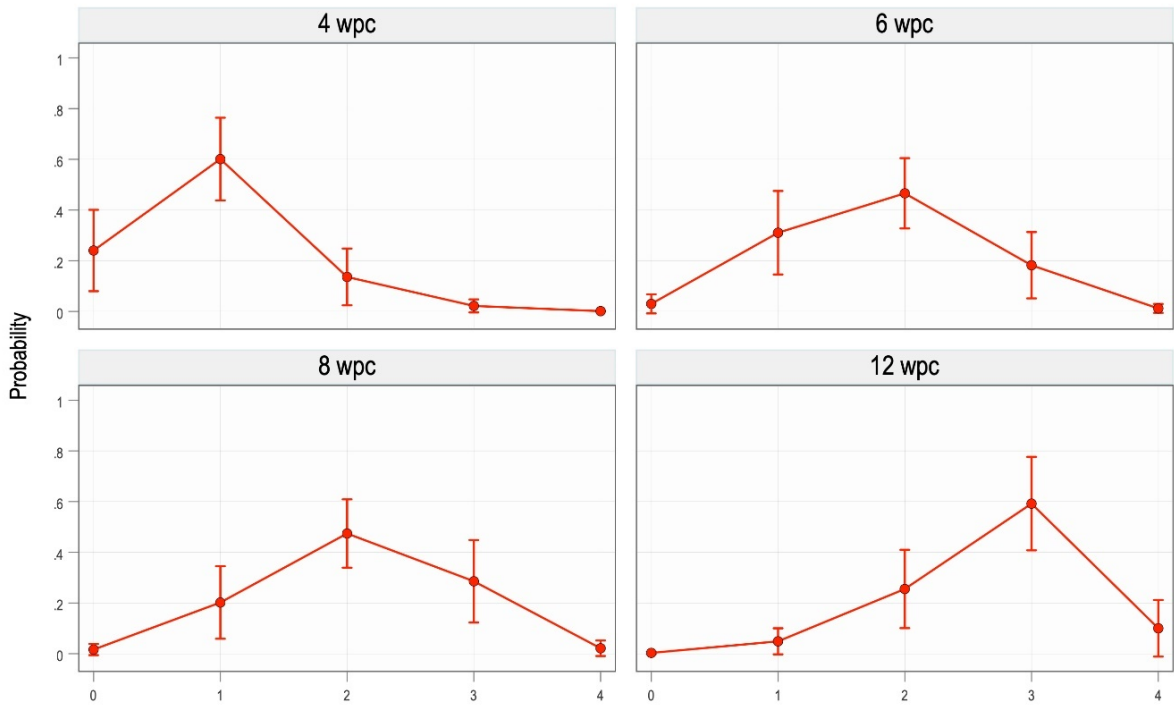
Siden p-verdien er  $< 0.05$ , kan man her forkaste  $H_0$ , og samtidig påstå, med mer enn 95% sikkerhet, at tiden har betydning for utvikling av hjertelesjoner etter eksperimentell smitte med PMCV.

Basert på samlet data og satt i modell, fremstiller figur 16 og 17 (under), den predikerte modellen med 95% konfidens, utviklingen av hjertelesjoner i atrium og ventrikkel over tid og viser samtidig den predikerte sannsynligheten for å nå en viss histologisk score på hver av de gitte tidspunktene. Sannsynligheten er fremstilt på y-linjen med verdi mellom 0 og 1.

Histologisk score 0 - 4 på x-linjen.

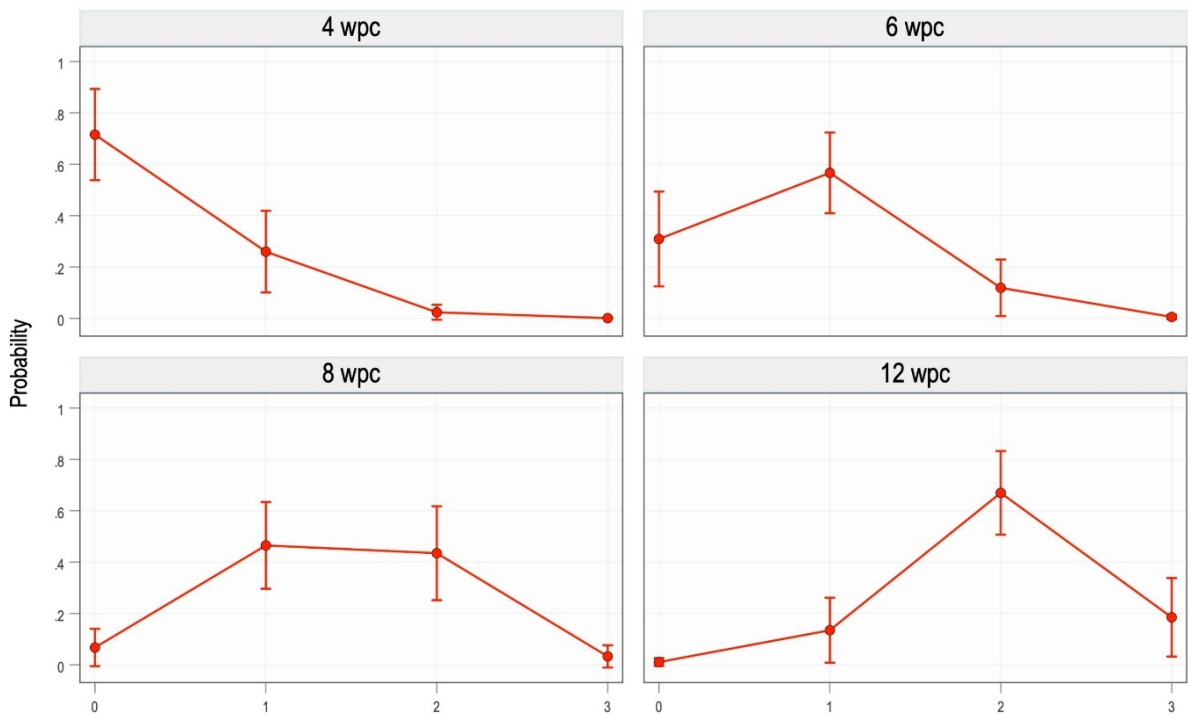


Predictive margins with 95% CIs



Figur 16: Predikerte verdier, atrium, 95% konfidensintervall (CI).

Predictive margins with 95% CIs



Figur 17. Predikerte verdier, ventrikkell, 95 % CI.

## Hjertepatologi og Ct-verdi sett i sammenheng

	Hypotese:
<b>H<sub>0</sub></b>	Det er ikke sammenheng mellom mengde virus i hjertemuskelen og histopatologiske forandringer
<b>H<sub>a</sub></b>	Det er sammenheng mellom mengde virus Hjertemuskelen og histopatologiske forandringer

```

. spearman a cth

Number of obs =      85
Spearman's rho =    -0.4569

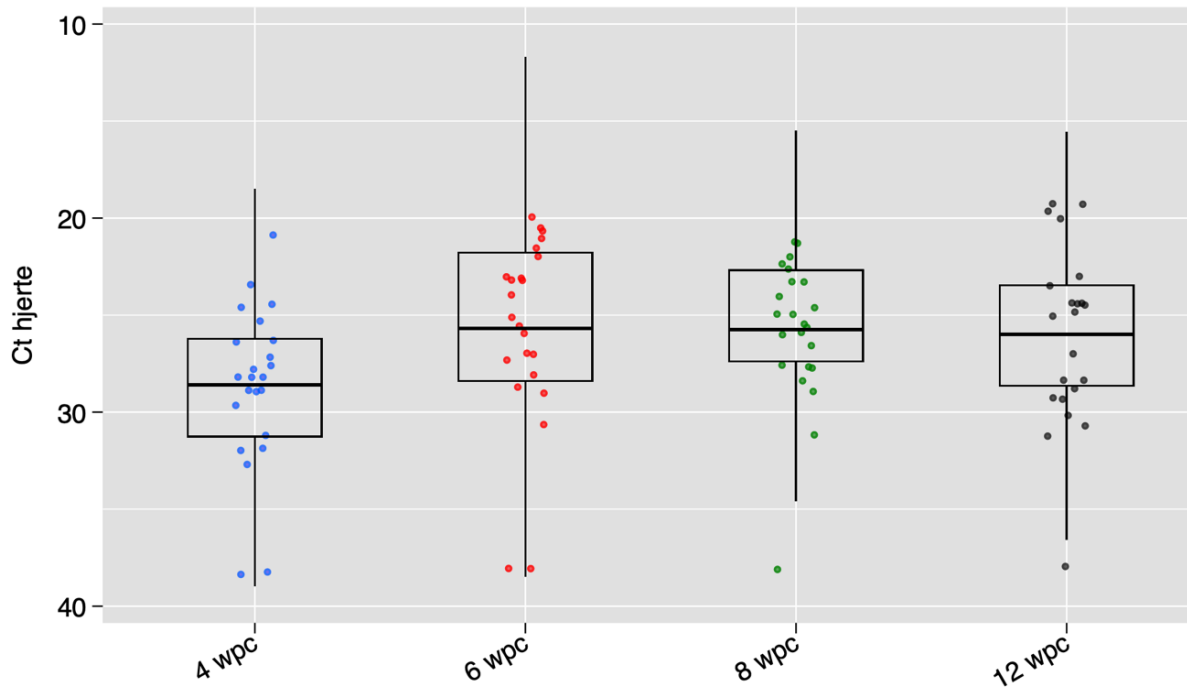
Test of H0: a and cth are independent
Prob > |t| =      0.0000

```

Figur 18. STATA, Spearman metode for 85 observasjoner.

Resultatene for hypotesetesting om korrelasjon (sammenheng) mellom Ct-verdi (mengde virus) og histologisk score, viser ved bruk av STATA og Spearman metode for 85 observasjoner (figur 18), en signifikant korrelasjon mellom de to variablene (Prob > |t| = 0.0000). Sammenhengen mellom de to er negativ (Spearman's rho = -0.4569), det vil si at sammenhengen mellom variablene er omvendt proporsjonal med hverandre. Tolkning her vil være at når Ct-verdien synker (virus mengden øker), kan man forvente en økning i histologisk score.





Figur 20: Boxplot med individuelle Ct-verdier i hjerte for hver fisk. Y-aksen er reversert.

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	91
Model	133.950204	3	44.6500681	F(3, 87)	=	2.34
Residual	1661.41423	87	19.0967153	Prob > F	=	0.0791
Total	1795.36443	90	19.9484937	R-squared	=	0.0746
				Adj R-squared	=	0.0427
				Root MSE	=	4.37

cth	Coefficient	Std. err.	t	P> t	[95% conf. interval]
wpc					
6 wpc	-2.891087	1.288636	-2.24	0.027	-5.452391 - .3297824
8 wpc	-2.842826	1.288636	-2.21	0.030	-5.404131 - .2815216
12 wpc	-2.59913	1.303198	-1.99	0.049	-5.189377 - .0088837
_cons	28.58913	.9112036	31.38	0.000	26.77801 30.40025

Figur 21: Regresjonsmodell for utviklingen av Ct-verdi over tid i hjertet.

Figur 21, en lineær regresjonsmodell for sammenhengen mellom ct-verdi i hjertet og tid, dvs. virusreplikasjon (økning i virus) over tid, viser en økning fra 4 til 6 wpc, og senere tidspunkt er også signifikant høyere enn verdiene ved 4 wpc.

Mean estimation		Number of obs = 91		
	Mean	Std. err.	[95% conf. interval]	
c.cth@wpc				
4 wpc	<b>28.58913</b>	<b>.8630087</b>	<b>26.87461</b>	<b>30.30365</b>
6 wpc	<b>25.69804</b>	<b>1.021565</b>	<b>23.66853</b>	<b>27.72756</b>
8 wpc	<b>25.7463</b>	<b>.7789333</b>	<b>24.19882</b>	<b>27.29379</b>
12 wpc	<b>25.99</b>	<b>.9863635</b>	<b>24.03042</b>	<b>27.94958</b>

Figur 22: Gjennomsnitt Ct-verdi ved hvert uttak.

Gjennomsnitt av Ct-verdi ved hvert uttak er presentert i figur 22. Her er det en reduksjon i Ct-verdi mellom uke 4 og 6, fra 28.58 til 25.69 ( $\approx 7.5x$  økning i virusreplikasjon).

Ser man på uttakene for 6, 8 og 12 wpc, viser resultatene en gjennomsnittlig Ct-verdi mellom 25 og 26, og med en slik stabil Ct-verdi, viser dette i stor grad samme tendens som vist i Figur 20, med utflating av virusreplikasjonen etter uke 6.

## Sammenligning av Ct-verdi og summert hjertescore

Figur 23 viser samlet utviklingen i hjertescore over tid sammenlignet med gjennomsnitt Ct-verdi utvikling over tid.

a) Mean estimation Number of obs = 87

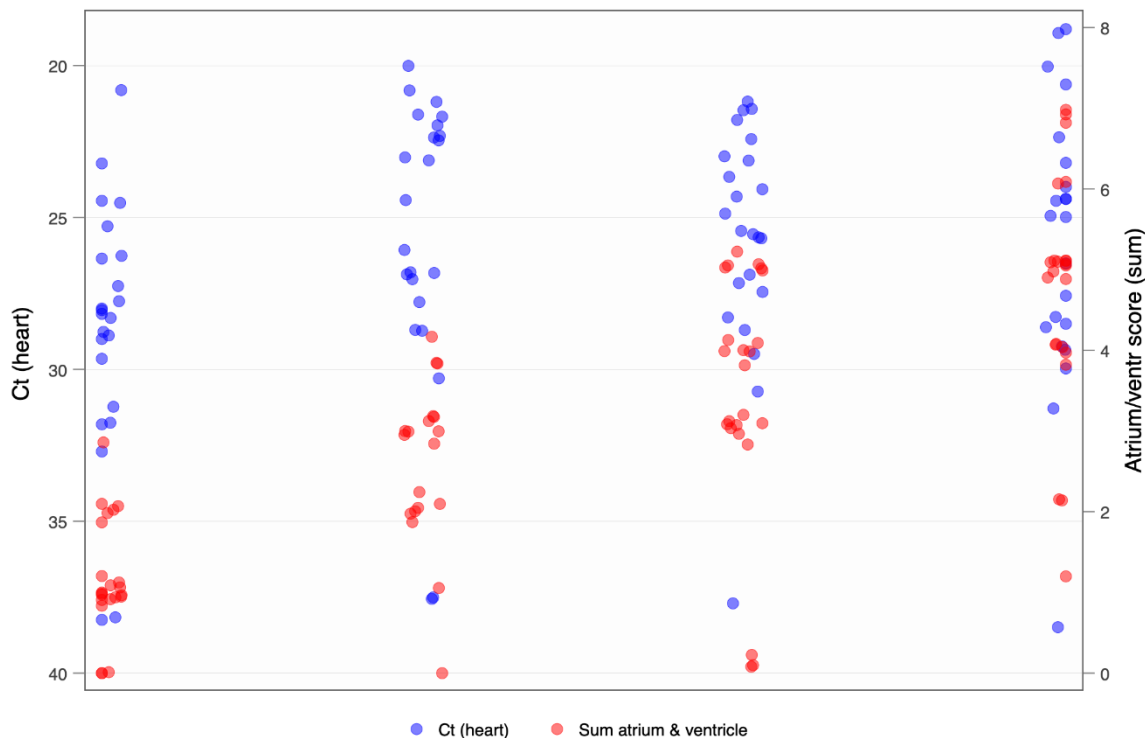
	Mean	Std. err.	[95% conf. interval]	
c.av@wpc				
4 wpc	<b>1.181818</b>	<b>.1562045</b>	<b>.8712939</b>	<b>1.492342</b>
6 wpc	<b>2.578947</b>	<b>.2334059</b>	<b>2.114952</b>	<b>3.042943</b>
8 wpc	<b>3.391304</b>	<b>.3250973</b>	<b>2.745032</b>	<b>4.037576</b>
12 wpc	<b>4.695652</b>	<b>.317069</b>	<b>4.06534</b>	<b>5.325964</b>

b) Mean estimation Number of obs = 91

	Mean	Std. err.	[95% conf. interval]	
c.cth@wpc				
4 wpc	<b>28.58913</b>	<b>.8630087</b>	<b>26.87461</b>	<b>30.30365</b>
6 wpc	<b>25.69804</b>	<b>1.021565</b>	<b>23.66853</b>	<b>27.72756</b>
8 wpc	<b>25.7463</b>	<b>.7789333</b>	<b>24.19882</b>	<b>27.29379</b>
12 wpc	<b>25.99</b>	<b>.9863635</b>	<b>24.03042</b>	<b>27.94958</b>

Figur 23: a) atrium og ventrikkel summert og b) gjennomsnitt Ct-verdi over tid.

Merk at figur 14 (øverst i figur 23) viser et gjennomsnitt av den summerte verdien av atrium- og ventrikkel score ved hvert uttak. Når vi sammenligner disse figurene kan man se en gradvis økning i histologisk score over tid, mens Ct verdiene som tidligere vist, ser ut til å flate ut og legger seg stabilt mellom 25 og 26 fra og med uke 6. Figur 24 (under) viser hvordan histologisk score gradvis øker mens Ct-verdi/virusmengde flater ut.



Figur 24. scatterplot, atrium og ventrikkel summert, sammenlignet med Ct verdi per fisk.

## Diskusjon

### Histopatologi og utvikling over tid

Ved første uttak, 4 uker etter smitte kunne man observere forandringer i atrium hos 80% av fisken, i tillegg var det 30% av fisken som samtidig viste fokale forandringer i ventrikkel. Ved uttak 6 og 8 uker etter smitte, var det en jevn økning i histologisk score for både atrium og ventrikkel. Siste uttak, 12 uker etter smitte, viste at 100% av fisken hadde forandringer i atrium, mens 13 % av fisken viste samtidig uttalte forandringer forenlig med høyeste histologisk score på 4. Majoriteten av fisken ved siste uttak, viste samtidig forandringer i ventrikkelen forenlig med en score på 2, mens 21.7% av fisken viste multifokale til konfluente lesjoner med moderat mengde betennelsesceller og ble gitt en histologisk score på 3. En histologisk score på 3 var den høyeste scoren gitt ventrikkel i denne studien. Tross for at

100% av fisken ved siste uttak viste forandringer i hjertes atrium og majoriteten av fisken viste betydelige forandringer også i ventrikkel, var det likevel 4% som ikke viste tegn til forandringer i ventrikkel 12 uker etter smitte med PMCV.

Den prosentvise fordelingen av forandringene i hjertets atrium og spongiøse ventrikkel etter smitte viser en jevn og gradvis økning i score over tid, med lesjoner allerede synlig 4 uker etter smitte med PMCV. Det er allerede tidlig i forløpet av infeksjonen en differanse i score mellom atrium og ventrikkel (figur 13), hvor forandringene i hjertets atrium generelt var høyere score sammenlignet med ventrikkel, en trend som stemmer godt overens med tidligere studier av eksperimentell smitte med PMCV, hvor hjertes atrium ser ut til å affiseres først med en senere opptreden av forandringer i spongiøs ventrikkel (Garseth et al., 2018). For å kunne komme nærmere en forståelse av om forskjellen vedvarer, eller om ventrikkel når samme histologisk score som atrium over tid, vil man ha behov for en studie av lengre varighet, da studien her er for kort til å avdekke disse forholdene. Funn fra CMS-syk fisk fra felt tilsier at den samme grad av forandring opptrer i ventrikkelen som i atriet (Evensen, personlig meddelelse). Under eksperimentell smitte manifesterer forandringene i hjertet seg i tidlig fase i atriet som fokale subendoteliale lesjoner, med mild infiltrasjon av mononukleære/lymfocytære betennelsesceller, som over tiden utviklet seg til flere distinkte lesjoner og videre til multifokale og konfluente lesjoner med samtidig forekomst av betennelsesceller (Haugland et al., 2011).

Ved testing av korrelasjonen mellom tiden etter smitte og utvikling av hjertelesjoner (figur 15), viste resultatene at det var en signifikant korrelasjon mellom de to variablene, og resultatene kan forstås i retning av at tiden etter smitte har betydning for utvikling av hjertelesjonene, som igjen vil resultere i en økning i histologisk score over tid. Figur 16 og 17,



viser den predikerte utviklingen av hjertelesjonene over tid i atrium og ventrikkel med 95% konfidens, og viser i stor del den samme trenden som fremstilt i figur 11 og 12, med en utvikling av hjertepatologi som starter med fokale lesjoner i hjertets atrium og en påløpende utvikling av lesjoner i spongiøse ventrikkel. Lesjonene i atrium og ventrikkel viser en gradvis utvikling, samtidig som differansen i histologisk score, som fremstilles i figur 13, virker til å vedvare for de 4 uttakene.

Mulige feilkilder ved uttak, preparering, skanning og avlesning av snittene er flere.

Flere faktorer som kan påvirke, for eksempel mangel av vev på snitt for gradering – kan skyldes feil ved kutting eller fiksering før kutting. «Bleke» snitt – trolig på grunn av feil under farging av snitt med H&E. Snittene som ble vurdert å være av dårlig kvalitet ble ikke gradert, siden å inkludere disse snittene kunne ha gitt en falsk høy eller falsk lav verdi, som igjen kunne ha interferert med vurderingen og konklusjonen ved samlet vurdering av resultatene. Noen av snittene som ble merket som «bleke» i fargen ved avlesning, ble likevel vurdert og gradert om snittene ble vurdert til å ha god nok kvalitet for å kunne se eventuelle forandringer ved lysmikroskopisk avlesning. Scoring av snittene ble vurdert opp imot satte kriterier beskrevet i tabell 1, og avlesning av snitt er i seg selv en subjektiv metode og baserer seg på å vurdere enkeltsnitt ut ifra kriterier hengitt i tabell 1. Ved bruk av tabell med spesifikke kriterier, vil dette føre til en standardisering av en subjektiv metode, som vil øke objektiviseringen ved avlesning og scoring av lesjonene. Ut ifra kriteriene beskrevet tidligere, skal avleser kunne gjenkjenne typiske og karakteristiske endringer i histologien som er forventet etter smitte med PMCV. Til tross for kriteriene i tabellen er klare, er det likevel ikke sikkert at alle snitt har blitt korrekt gradert da dette også baserer seg på at avleser har en viss form for erfaring å kunne se endringer i vev. Flere av snittene kan også oppfattes å være i «gråsonen» mellom to verdier, noe som kan føre til en feilaktig score som kan være

misvisende. Det er også andre mulige avvik med metoden, som for eksempel at hver verdi i tabellen består av å vurdere flere faktorer samtidig. Eksempel på dette kan være mengde infiltrasjon av betennelsesceller, lesjonenes utbredelse, og ved stor del av vevet som er affisert, hvorav over 75% av vevet må være affisert. Samtidig er dette en vurdering som tas ved vurdering av tilgjengelig vev på snittet, ikke sikkert at dette er representativt for hjerte vurdert i sin helhet. Med flere faktorer å vurdere opp imot hverandre, vil dette åpne for mulig feilkategorisering av snitt. Likevel til tross for denne usikkerheten, ser man ved vurdering av resultatene at graderingen av snittene viser en tydelig tendens i lesjonenes utvikling, en utvikling som igjen stemmer godt overens med tidligere forskning om CMS.

### **Sammenheng mellom Ct-verdi og hjertelesjoner**

Det er en signifikant negativ korrelasjon mellom Ct-verdi og utvikling av hjertelesjoner, som vil si at en økning i virusnivå/-replikasjon er signifikant korrelert med økning i histologisk score. At sammenhengen mellom variablene er negativ og at histologisk score øker ved synkende Ct-verdi, kan på mange måter være misvisende, men en Ct-verdi er basert antall sykluser som må gjentas før PCR-analyse detekterer spesifikt viralt genom. Det vil i prinsippet si at jo færre sykluser, jo mer virus. Når Ct-verdien her synker, vil det i realiteten bety at virusmengden øker og at man kan forvente en økning i histologisk score som et resultat.

Ved å se på sammenhengen mellom Ct-verdi og utviklingen i atrium (figur 19) kan man merke seg at en økning i histologisk score korrelerer godt med synkende Ct verdi og at disse variablene derfor er omvendt proporsjonale til hverandre. Det er noen tydelige «outliers», til tross for signifikant korrelasjon mellom virusmengde og histopatologiske endringer i hjertet, Hvor virusmengden er liten og atrium score er 2, men andre fisk har histologisk score på 0,

mens virusmengden er tilsynelatende høy med en lav Ct-verdi. Dette kan skyldes flere mulige feilkilder som ved feil under prosessering eller avlesning av PCR eller ved feilscoring ved histologi, men det har vært observert at fiskens immun-/inflammasjonsprosess kan reagere noe ulikt på tilstedeværelsen av PMCV i hjertevevet, hvorav noen fisk til tross for lav virusmengde likevel utvikler hjertelesjoner og andre fisk med høye verdier av virus ikke ser ut til å utvikle betydelige hjertelesjoner (Timmerhaus et al., 2012). En interessant teori som mulig kan forklare de få avvikende verdiene.

Ct-verdien viser økning i virusmengde mellom 4 og 6 uker etter smitte (figur 20 og 22), men etter dette flater virusreplikasjonen ut. Om man ser på figur 22, som viser gjennomsnitt Ct-verdi ved uttakene, kan man merke seg Ct-verdien på 28, 4 uker etter smitte, mens Ct-verdien ved uttak 6 uker etter smitte viser en Ct på 25.6, noe som betyr omtrentlig 7,5 ganger økning i virusmengde mellom disse to uttakene. En økning som muligens i seg selv ikke vurderes som en markant økning, men likevel en aktiv infeksjon med pågående virusreplikasjon. Videre viser de påløpende Ct-verdiene en vedvarende Ct-verdi mellom 25 og 26. En gjennomsnitt Ct-verdi rundt 25, er ikke ansett som et særlig høyt virusnivå, og kanskje spesielt i forbindelse med PMCV-infeksjoner, hvor et særs høyt virusnivå virker å være hyppigere observert sammenlignet med andre virusinfeksjoner som angriper hjertet (Garseth et al., 2018). Selv om Ct-verdien viser seg å være mer eller mindre stabil etter 6 wpc, er det likevel en pågående infeksjon i fisken, og selv om det ikke foregår en økning virusreplikasjon i perioden 6 – 12 uker etter smitte, viser resultatene en mer stabil vedvarende replikasjon, med verken særlig stigende eller synkende Ct-verdier.

Det interessante er at lesjonene i hjertet viser en jevn økning til tross for stabile Ct-verdier. Figur 11 og 12, viser lesjonenes utvikling etter smitte i henholdsvis atrium og ventrikkel,

mens figur 14 og 23a, viser den gjennomsnittlige utviklingen av atrium og ventrikkel summert. Nevnte figurer viser alle jevn utvikling i histologisk score over tid, en utvikling som bare ser ut til å fortsette å øke, og dette til tross for en Ct-verdi som er stabil og flat. Dette er en interessant funn, som kan tolkes i retning av at det muligens ikke bare er virusmengden eller en aktiv virusreplikasjon som har betydning for lesjonenes utvikling/grad av skade i hjertemuskulaturen. I dette tilfelle ser vi ikke særlig utvikling i Ct-verdi etter uttak 6 wpc, noe som gir en indikasjon at andre årsaker enn bare virusets tilstedeværelse har betydning for økning i omfang og grad av lesjon, som blant annet fiskens egne immunologiske respons mot PMCV. Figur 24 viser utviklingen i histologisk score som et resultat av tilstedeværelse av PMCV over tid, med økende hjertepatologi. Vi vet at synkende Ct-verdier signifikant korrelerer med økning i histologisk score, men denne figuren illustrer samtidig også hvordan virusets tilstedeværelse over en lengre periode ser ut til å ha betydning for stigende score. Årsakssammenheng bak relativt lav virusreplikasjon og gradvis økning i hjertelesjoner har ikke vært gjenstand for inngående studier i dette forsøket, men kan spekuleres i at underliggende årsaker som fiskens immunologiske respons, mot tilstedeværelse av virus over tid påvirker utviklingen av hjertelesjonene.

Når det gjelder immunologisk respons hos fisken, har tidligere forskning vist at det foreligger en oppregulering av medfødt immunrespons som antivirale- og IFN-avhengige gener, fra og med 2 uker etter smitte med PMCV (Timmerhaus et al., 2011). Videre er det sett aktivering av komplement i tidlig fase, etterfulgt av både B- og T-celle respons (CD4 og CD8 positive celler) på samme tid hvor det var registrert tydelig leukocytinfiltrasjon og CMS-lignende lesjoner i hjerte (Timmerhaus et al., 2011). Oppregulering av komplement etterfulgt av økning i antistoff produksjon, har gitt indikasjon om mulig komplement-aktivert humoralt antistoff produksjon, en respons som også har vært satt i sammenheng med nedgang i

virusmengde og gjenoppretting/regenerasjon av skadet vev. (Timmerhaus et al., 2011). Til tross for aktiv immunrespons, er det sett at virus-genom av PMCV kan vedvare i celler til tross for en massiv leukocytinfiltrasjon (Wiik-Nielsen et al., 2012). Et eksperimentelt smitteforsøk med PMCV, delte en smittet fiskegruppe i 2 grupper basert på responsen til PMCV-smitte. En gruppe viste klassiske lesjoner i hjerte med økende patologi i hjerte i korrelasjon med økende virusmengde, mens den annen fiskegruppen viste seg å ha mindre synlige patologiske endringer i hjertet. For gruppen med få patologiske endringer, har mistanken vært at dette skyldes en rask aktivering av cytotoxiske T celler og samtidig økt aktivering av kardiomyocyttenes egen metabolisme, noe som kunne resultere i regenerasjon av skadet vev (Timmerhaus et al., 2012). Gruppen med tydelige hjertelesjoner, derimot, viste seg å ha oppregulering av apoptose og annen celledød-aktivering i tidlig fase, mens senere fase av infeksjonen viste en immunrespons dominert av T celler, en respons som er satt i sammenheng med å kunne gi patologiske forandringer i hjerte (Timmerhaus et al., 2012). Basert på at PMCV-genom kan vedvare i celler til tross for massiv aktivering av immunologisk respons, og at immunresponsen i seg selv er satt i sammenheng med videre utvikling av hjertepatologi hos fisk som viser tydelige hjerteforandringer etter smitte med PMCV, kan dette være en mulig årsak bak fenomenet vi merket oss med lav virusreplikasjon etter 6 uker med en likevel gradvis tiltagende hjertepatologi.

Oppsummert så vi en signifikant sammenheng mellom økende virusmengde og økning i histologisk score, men vi kan derimot ikke bevise en signifikant økning i virus over tid. Årsakssammenhengen bak at virusreplikasjonen virker til å flate ut 6 uker etter smitte, mens hjertelesjonene viser en gradvis økning, er uvisst, men underliggende årsaker som for eksempel tilstedeværelse av virus over tid i vevet og fiskens immunologiske/inflammatoriske respons er en mulig hypotese til funnene observert.

## **Studiedesign og metode**

Her er det kun screenet spesifikt for PMCV infeksjon ved bruk av PCR, og samtidig er spesifikke hjertelesjoner forenlig med infeksjon med PMCV vurdert. Histologiske tegn på sykdom som var fravikende til kriteriene beskrevet i tabell 1, som for eksempel funn av fokal til diffus epikarditt ved noen av snittene i uttak 4 og 6 uker etter smitte, er det ikke fokusert på da det er et fåtall fisk som har disse forandringene. Fisken var frisk ved forsøkets oppstart, men det var små mengder av PRV-genom ved PCR analyser av inokulum noe som kan ha bidratt til de forandringer som er observert i epikard.

## **RNA ekstraksjon og RT-qPCR**

PCR analysene ble ikke utført av undertegnende og det gis derfor en kortfattet beskrivelse av anvendt metode, gjennomføring ved uttak og prosessering av RT-qPCR analysen, utover det som allerede beskrevet under «Materialer og metoder» og resultatene som er diskutert ovenfor.

## **Konklusjon**

CMS er en sykdom forårsaket av PMCV, en sykdom som har vesentlige dyrevelferdsmessige- og økonomiske konsekvenser. Sykdommen CMS, som ofte utarter i felt i form av forøkt akutt dødelighet, kan være sjokkerende og for mange overraskende, da fisken ser ut til å være av god kondisjon og ikke virker til å vise symptomer på underliggende kronisk sykdom. CMS er ikke en sykdom man aktivt screener for i felt, og er heller ikke meldepliktig, derfor kan et utbrudd med CMS være utfordrende å forutse. Ved denne eksperimentelle smittestudien har man sett på hjerteforandringer over tid etter smitte med PMCV, men også sett på

sammenhengen mellom virusmengde (Ct-verdi) og hjertelesjonenes alvorlighetsgrad representert av gitt en tallverdi fra 0 – 4. Det viser seg at det foreligger en signifikant korrelasjon mellom tid etter smitte med PMCV og utviklingen av hjertelesjoner.

Virusmengden, her representert i form av en Ct-verdi, viser seg også å ha en signifikant betydning for utvikling av hjertelesjoner. Men til tross for en økning i histologisk score over tid, kan vi ikke påvise en signifikant økning i virus over tid. Et funn som kan peke i retning av at det kan være andre faktorer som kan ha betydning for utvikling av hjertelesjonene etter smitte med PMCV, og ikke bare økningen i mengde virus på grunn av en underliggende aktiv virusreplikasjon. Forandringene i hjertet hos fisken utviklet seg jevnt gjennom forsøket, og resulterte ved siste uttak med en merkverdig høy histologisk score hos majoriteten av fisken, med atrium score 3 – 4, og score på 2 – 3 i ventrikkel. Disse forandringene oppsto til tross for utflatende trend på Ct-verdier og bare med en moderat virusmengde registrert, sammenlignet med Ct-verdier tidligere observert etter smitte med PMCV. Hvilke andre faktorer eller årsaker som kan være med på å påvirke utviklingen av hjertelesjonene hos PMCV-smittet laks, er ikke testet eller påvist ved denne studien, men det spekuleres løst om mulig årsak bak økningen i histologisk score til tross for en fraværende økning i virusmengde, kan skyldes fiskens immun-/inflammatoriske respons mot tilstedeværelse av PMCV i hjerte over tid, og kan være en vesentlig bidragsyter bak de observerte forandringene.

## **Takk til bidragsytere**

Vil gjerne takke min veileder, Øystein Evensen, for god veiledning underveis, om det skulle være via epost korrespondanse, fysiske møter på Ås eller over en kaffekopp i Oslo. Takk for tålmodigheten og takk for at du til tross for en hektisk hverdag alltid virket til å ha tid og overskudd til å svare på spørsmål. Jeg er kanskje spesielt takknemlig for at han fant en

hovedoppgave om et tema jeg fant særdeles spennende og som samtidig viste seg å være svært relevant for mitt arbeid videre etter veterinærstudiet.

## **Summary**

Piscine myocarditis virus (PMCV) is the causative agent of Cardiomyopathy-syndrome (CMS) in farmed salmon. PMCV is a *Toti*-like virus affecting the heart and is characteristically known to cause acute death during the second year in sea. CMS-related outbreaks are for often unexpected, since CMS is not a disease that you commonly screen for, is non-reportable, and the fish seldom, clinically, show any symptoms of underlying chronic disease. Periods of induced stress have been shown to cause an increase in mortalities due to CMS. CMS is a major concern regarding animal welfare and can also present a significantly economic consequence for the fish farmers. In this study we aimed to score temporal changes and development of cardiac lesions within the atrium and spongy myocardium of the ventricle, post experimental infection with PMCV. The study also looked at plausible correlation between time passed after experimental PMCV infection and the increase in histological score, and the correlation between increased viral load and an increase in histological score. Scoring of the lesions was based on preset criteria, and the lesions was scored with number 0 – 4, whereas a score of 4, represented the most severe pathological changes. A total of 96 fish was examined, and 24 fish was taken out at a time, 4-, 6-, 8- and 12-weeks post challenge. 88 hearts were examined by histology since 8 slides was seen to be of poor quality and not given a score.

Results show that there is a significant correlation between time and histological changes, also significant correlation between an increase in viral load and increase in the severity of the heart lesions. Even though the correlation between viral load and histological score, seemed to be significant, we however cannot prove a significant increase in viral load over time.



Histologically the lesions seemed to start in the subendotelium of the atrium, with infiltration of mononuclear inflammatory cells, predominantly lymphocytes and macrophages, with an increase in lesion size and distribution over time, and successively also affecting the spongiosum of the ventricle. The atrium of the heart seems to show more severe lesions than the ventricle and maintains a higher histological score throughout the study. The highest score of 4 was given to atrium 12wpc, while a score of 3, was the highest score given to the ventricle. 12 weeks after infection with PMCV, 100% of the fish shows pathological changes within the atrium, but 4% of the fish do not show histological changes within the ventricle. The lesions observed seems to keep growing in severity throughout the study, while the replication of virus seems to be flattening out after 6 wpc. Interestingly we see that the histological score keeps rising, while the viral load maintains a stable mean Ct-value of 25 +/- 1. Causes for this observation, is not documented or studied in this study, but the immunological response/ inflammatory changes within the heart, in the presence of PMCV, are discussed to have an importance and contribution regarding the development of cardiac lesions post experimental infection with PMCV.

*Title:* Studies of temporal changes of heart lesions following experimental PMCV infection in Atlantic salmon

*Authors:* Christopher Flinder Pedersen

*Supervisor:* Øystein Evensen, NMBU.



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)

## References

- AMIN, A. & TRASTI, J. 1988. Endomyocarditis in Atlantic salmon in Norwegian sea farms. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 8, 70-71.
- BANG JENSEN, B., BRUN, E., FINEID, B., LARSSSEN, R. B. & KRISTOFFERSEN, A. B. 2013. Risk factors for cardiomyopathy syndrome (CMS) in Norwegian salmon farming. *Dis Aquat Organ*, 107, 141-50.
- BANG JENSEN, B., MÅRTENSSON, A. & KRISTOFFERSEN, A. B. 2020. Estimating risk factors for the daily risk of developing clinical cardiomyopathy syndrome (CMS) on a fishgroup level. *Prev Vet Med*, 175, 104852.
- BANG JENSEN, B., NYLUND, S., SVENDSEN, J. C., SKI, P.-M. R. & TAKLE, H. 2019. Indications for a vertical transmission pathway of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, 42, 825-833.
- BROCKLEBANK, J. & RAVERTY, S. 2002. Sudden mortality caused by cardiac deformities following seining of preharvest farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and by cardiomyopathy of postintrapitoneally vaccinated Atlantic salmon parr in British Columbia. *Can Vet J*, 43, 129-30.
- FRITSVOLD, C., KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T., ØRPETVEIT, I., HEUM, M. & POPPE, T. T. 2009. Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 87, 225-34.
- FRITSVOLD, C., MIKALSEN, A. B., HAUGLAND, Ø., TARTOR, H. & SINDRE, H. 2022. Characterization of early phases of cardiomyopathy syndrome pathogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) through various diagnostic methods. *Journal of Fish Diseases*, 45, 1267-1279.
- FRITSVOLD, C., MIKALSEN, A. B., POPPE, T. T., TAKSDAL, T. & SINDRE, H. 2021. Characterization of an outbreak of cardiomyopathy syndrome (CMS) in young Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 44, 2067-2082.
- GARSETH, Å. H., FRITSVOLD, C., SVENDSEN, J. C., BANG JENSEN, B. & MIKALSEN, A. B. 2018. Cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: A review of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 41, 11-26.

- HAUGLAND, O., MIKALSEN, A. B., NILSEN, P., LINDMO, K., THU, B. J., ELIASSEN, T. M., ROOS, N., RODE, M. & EVENSEN, O. 2011. Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *J Virol*, 85, 5275-86.
- HAUGLAND, Ø., MIKALSEN, A. B., NILSEN, P., LINDMO, K., THU, B. J., ELIASSEN, T. M., ROOS, N., RODE, M. & EVENSEN, Ø. Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the Totiviridae Family.
- LØVOLL, M., WIİK-NIELSEN, J., GROVE, S., WIİK-NIELSEN, C. R., KRISTOFFERSEN, A. B., FALLER, R., POPPE, T., JUNG, J., PEDAMALLU, C. S., NEDERBRAGT, A. J., MEYERSON, M., RIMSTAD, E. & TENGS, T. 2010. A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). *Virology*, 7, 309.
- MIKALSEN, A. B., LUND, M., MANJI, F., KJØNSTAD, M. V., BERGTUN, P. H., RITCHIE, G., ASPEHAUG, V., DEVOLD, M. & EVENSEN, Ø. 2020. Lack of evidence of vertical transmission of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Fish Dis*, 43, 715-718.
- POPPE, T. T. & SEIERSTAD, S. L. 2003. First description of cardiomyopathy syndrome (CMS)-related lesions in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56, 87-88.
- RODGER, H. & TURNBULL, T. 2000. Cardiomyopathy syndrome in farmed Scottish salmon. *Vet Rec*, 146, 500-1.
- TIMMERHAUS, G., KRASNOV, A., NILSEN, P., ALARCON, M., AFANASYEV, S., RODE, M., TAKLE, H. & JØRGENSEN, S. M. 2011. Transcriptome profiling of immune responses to cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 12, 459.
- TIMMERHAUS, G., KRASNOV, A., TAKLE, H., AFANASYEV, S., NILSEN, P., RODE, M. & JØRGENSEN, S. M. 2012. Comparison of Atlantic salmon individuals with different outcomes of cardiomyopathy syndrome (CMS). *BMC Genomics*, 13, 205.
- WIİK-NIELSEN, J., LØVOLL, M., FRITSVOLD, C., KRISTOFFERSEN, A. B., HAUGLAND, Ø., HORDVIK, I., AAMELFOT, M., JIRILLO, E., KOPPANG, E. O. & GROVE, S. 2012. Characterization of myocardial lesions associated with

cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using laser capture microdissection. *J Fish Dis*, 35, 907-16.

## **Vedlegg**

