



NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for parakliniske fag
Seksjon for akvamedisin

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2022

Fordypning i akvakultur

Histopatologiske forandringer i hjertet hos atlantisk laks med kardiomyopatisyndrom (CMS) og testing for sammenheng med virusmengde i hjertevev

Histopathological cardiac lesions in atlantic salmon with cardiomyopathy syndrome (CMS) and testing for correlation with viral load in cardiac tissue

Ane Grøndahl
Kull 2016

Veileder Øystein Evensen

Innhold

Sammendrag.....	4
Definisjoner og forkortelser	5
Innledning.....	7
Formål	8
Materiale og metoder	9
Resultater.....	16
Diskusjon.....	35
Konklusjon	38
Takk til bidragsyttere.....	39
Summary	39
Referanser.....	40
Vedlegg	42

Sammendrag

Tittel: Histopatologiske forandringer i hjertet hos atlantisk laks med kardiomyopatisyndrom (CMS) og testing for sammenheng med virusmengde i hjertevev

Forfattere: Ane Grøndahl

Veileder: Øystein Evensen, Institutt for parakliniske fag

Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en utbredt sykdom hos stor atlantisk laks *Salmo salar* som står i sjøvann. Sykdommen skyldes Piscint kardiomyopativirus (PMCV), og gir blant annet hjertetamponade og sirkulasjonssvikt. Sykdommen affiserer atrium og spongiøst vev i hjertets ventrikkel. Denne studien graderer og beskriver histopatologiske forandringer i hjerte hos laks med klinisk CMS, og ser på sammenheng med virusmengde i hjertevev. Studien er en retrospektiv tverrsnittsstudie. Histopatologiske forandringer ble gradert fra 0-4 basert på grad av infiltrasjon av leukocytter, degenerasjon, nekrose og endokardial hyperplasi. Økt mengde bindevev og mulige regenerasjoner ble registrert. Virusmengde i ventrikkelvev ble målt ved rtPCR. De histopatologiske forandringene sammenfaller med de som er påvist hos andre laks med CMS. Fordelingen mellom de histopatologiske gradene var: 1 snitt med grad 1,5. 7 snitt med grad 2. 6 snitt med grad 2,5. 15 snitt med grad 3. 10 snitt med grad 3,5. 11 snitt med grad 4. Ingen av snittene var i grad 0, 0,5 eller 1. Nekroser, endokardial hyperplasi og leukocytinfiltrasjon var utbredt. Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant korrelasjon mellom grad av histopatologiske forandringer og virusmengde i vev.

Definisjoner og forkortelser

CMS	Kardiomyopatisyndrom
rtPCR	Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
PMCV	Piscint myocarditis virus
PD	Pancreas disease
ILA	Infeksiøs lakseanemi
HSMB	Hjerte-og skjelettmuskelbetennelse
ORF	Open reading frame (usikker på om brukes i teksten, se innledning)
ANOVA	Analysis of variance
Ct	Cycle threshold

Innledning

Generelt: Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en sykdom hos atlantisk laks *Salmo salar*. Sykdommen affiserer vanligvis stor fisk på 3-4 kg, ofte etter ca 1.5 år i sjø, men kan også affisere yngre fisk (Fritsvold et al., 2021, Fritsvold et al., 2009, Hillestad and Moghadam, 2019, Martinez-Rubio et al., 2014, Fagerland et al., 2013, Svendsen et al., 2019, Wiik-Nielsen et al., 2016). Det er kartlagt flere risikofaktorer for utbrudd av CMS hos laks. Risiko for utbrudd øker med tiden fisken står i sjøen. (Jensen et al., 2020, Jensen et al., 2013) Stress gir økt risiko for mortalitet hos laks med CMS, og dette gir utfordringer i forbindelse med lusebehandlinger, sortering og andre nødvendige håndteringsoperasjoner (Sommerset, 2022a, Frisk et al., 2020, Veterinærinstituttet). Fiskegrupper som har vært diagnostisert med andre virussykdommer som HSMB eller PD har forøket risiko for å få CMS (Jensen et al., 2020, Jensen et al., 2013). Fiskegrupper som sjøsettes på sen høst har også forøket risiko for å utvikle CMS enn de som sjøsettes tidlig vår (Jensen et al., 2020).

Etiologi: Sykdommen forårsakes av Piscint myokardittvirus (PMCV). Viruset er utbredt i Norge. PMCV ble funnet å være etiologisk årsak til CMS i 2010 (Haugland et al., 2011, Lovoll et al., 2010). PMCV er et nakent toti-liknende virus med dsRNA som arvestoff, med 3 ORF som koder for et overflateprotein, RNAPolymerase og et tredje protein med ukjent funksjon (Haugland et al., 2011, Nibert and Takagi, 2012, Sandlund et al., 2021) Viruset smitter horisontalt. Vertikal overføring kan ikke utelukkes, men er trolig av mindre betydning (Mikalsen et al., 2020, Bang Jensen et al., 2019). Virus kan påvises fra både frisk og syk fisk, og tid fra infeksjon til kliniske symptomer kan variere kraftig (Svendsen et al., 2019). Smitte persisterer i stor grad i fiskegrupper som har blitt infisert, gjerne helt frem til slaktetidspunkt (Fritsvold 2021).

Klinisk bilde: Fiskegrupper med CMS presenterer ofte som stor fisk som dør brått. Det er vanligvis lite svimere ved CMS. Obduksjonsfunn inkluderer hjertetamponade "hjertesprekk" med blodkoagel i hjertehulen, dilatert atrium, fibrin på lever, ascites, blødninger i hud på buk, skjellommeødem, eksoftalmus og misfarget lever. (Yousaf et al., 2013, Fritsvold et al., 2021, Bruno and Noguera, 2009).

Diagnostikk: Ofte kan diagnosen settes kun basert på typiske histopatologiske funn og obduksjonsfunn. Man kan skille CMS fra differensialdiagnosene PD og HSMB ved hjelp av

histopatologiske undersøkelser. Man kan også ta ut prøver fra apex av hjertets ventrikkel på RNAlater til PCR, men positiv prøve må kombineres med histopatologi eller kliniske symptomer for å bekrefte diagnosen CMS. (Veterinærinstituttet).

Histologisk i hjertevev: CMS affiserer i hovedsak myokard i atrium og spongiøs del av ventrikkel. Vanlige forandringer er infiltrasjon av leukocytter, myokarditt, degenerasjon og nekrose. Kompakt myokard er vanligvis ikke affisert, med unntak perivaskulær betennelse bestående av infiltrasjon av leukocytter fra epikard langs blodkar som løper inn i myokardium. (Bruno and Noguera, 2009, Fritsvold et al., 2021, Fritsvold et al., 2009, Rodger and Turnbull, 2000, Bruno et al., 2013) Lesjoner i atrium presenterer ofte tidligere enn i ventrikkel (Fritsvold et al., 2021, Fritsvold et al., 2009) Betennelsesceller er vanligvis mononukleære, sannsynligvis lymfocytter og makrofager (Bruno et al., 2013, Wiik-Nielsen et al., 2012). Endokardiale celler progredierer fra hypertrofi til hyperplasi etter hvert som betennelsen forverres, og kan danne tubulære strukturer uten normalt hjertevev inni (Fritsvold et al., 2009).

Samfunnsmessig betydning: Ettersom CMS i hovedsak affiserer stor laks som nærmer seg slaktetidspunkt, har det spesielt stor økonomisk betydning for oppdrettsnæringen ettersom oppdretter har investert mye tid og ressurser. (Brun et al., 2003) I Fiskehelse rapporten 2021 er CMS rangert som den viktigste årsaken til dødelighet hos laks i sjøfasen og sykdommen er utbredt i alle de norske produksjonsområdene. (Sommerset, 2022b) 111 anlegg fikk påvist CMS i 2020, som er det første året hvor laboratoriene har gitt ut info om sine påvisninger, slik at samme anlegg ikke blir registrert flere ganger. CMS er ikke en meldepliktig sykdom, så det reelle antallet kan være høyere. Fisk kan fortsette å stå i sjøen etter påvist CMS så langt det er dyrevelferdsmessig forsvarlig. Det er ingen tilgjengelig vaksine mot PMCV markedsført i dag.

Formål

MÅLSETNING:

Studien skal bidra til økt kunnskap om histopatologiske forandringer i hjerte hos laks med CMS, og hvor alvorlige disse forandringene vanligvis er. Den skal også se på om det er

korrelasjon mellom hvor alvorlige de histopatologiske forandringene er og mengde virus som kan påvises i hjertevevet.

PROBLEMSTILLING:

Hvordan er fordelingen i grad av histopatologiske forandringer i hjerte hos CMS-diagnostisert oppdrettslaks, hvordan kan forandringene beskrives, og er det samvariasjon mellom grad av histopatologiske forandringer og virusmengde i hjertevev?

Materiale og metoder

Studiedesign

Studien ble designet som en observasjonsstudie av typen retrospektivt tverrsnittsstudie. Alle prøveuttak ble gjort på samme dag, og det ble ikke gjort oppfølgende prøveuttak. Studieenheten ble definert som hjerte fra atlantisk laks. Studiepopulasjonen var atlantisk laks fra et kommersielt oppdrettsanlegg i Midt-Norge, produksjonsområde 6 Nordmøre og Sør-Trøndelag. Fiskegruppen ble satt ut i sjø i august-september 2017. Fiskegruppen fikk diagnostisert kroniske HSMB-forandringer i november 2017, og PD (SAV2) i mai 2018. Det ble påvist PRV hos 4 av 10 fisk den 28 juni 2018, åtte måneder etter histopatologisk HSMB-diagnose. Anlegget hadde moderat dødelighet og kliniske symptomer forbundet med HSMB, og lav mortalitet i forbindelse med PD. Fiskegruppen fikk først diagnostisert CMS ved histopatologisk analyse i november 2017, men disse forandringene kunne skyldes HSMB. Det er usikkert når fiskegruppen først ble infisert med PMCV. Det ble utført rtPCR for PMCV den 28 juni 2018, hvor alle prøver (10/10) var negative. Anlegget fikk utbrudd av CMS med kliniske symptomer i november 2018, og hadde høy mortalitet som følge av utbruddet. Prøvene til denne studien ble tatt ut i februar 2019, 3-4 måneder etter oppstart av kliniske symptomer på anlegget.

Studieutvalget var 50 fisk for histopatologi, hvor det hos 40 av disse også ble tatt ut prøver til rtPCR. All fisk ble tatt ut fra merd 2. Alle prøvene ble tatt fra nylig død fisk (død siste 24 timer). Eksklusjonskriteriene for utvalget var: Fisk som har hatt dårlig tilvekst over tid eller viser andre tegn til langvarig sykdom eller svakelighet, også kalt «pinnefisk» eller «taperfisk». Referansepopulasjonen ble definert som CMS-diagnostisert atlantisk laks i Norge.

Forberedelse av prøver til histopatologi:

Det ble utført langsgående snitt av hjertet fra 50 fisk etter prøvetakning av apex til PCR. Siden med atrium og bulbus arteriosus ble lagt på formalin for fiksering. Vevet ble så støpt i parafinvoks, bearbeidet, snittet og farget med standard histologiske teknikker. Alle snitt ble farget med hematoxylin og eosin (H&E). Snittene ble scannet inn for å kunne åpnes i programmet NDP.view2.

Gradering av snitt:

Alle 50 snitt ble gradert. Atrium og ventrikkel ble gradert, mens bulbus arteriosus ikke var en del av graderingen. Den histopatologiske klassifiseringen ble utført med utgangspunkt i (Fritsvold et al., 2009) sitt graderingsskjema for lesjoner i endo-, epi- og/eller myokard. Graderingsskjemaet fra Fritsvold er presentert i sin helhet i Figur 1. Skalaen rangerer snitt på en ordinal skala på 0-4. I graderingen som ble gjort i denne studien ble det også benyttet halve grader, 0,5, 1,5, 2,5 og 3,5, i tilfellene hvor et snitt viser utbredelse eller alvorlighet av lesjoner i øvre sjikt av en grad, men ikke nok til å gi en hel grad høyere. Se tabell 1 for mer utfyllende beskrivelse av gradene. Det ble gitt en grad til atrium, og en til ventrikkel. Deretter ble det satt en samlet grad til hele snittet, kalt Samlet grad. Tydelig bindevevsdannelse og tegn på regenerasjon ble kommentert i tillegg. Infiltrasjon av betennelsesceller i epikard inngikk ikke i graderingen.

Figur 1: Histopatologisk klassifiserings skjema for gradering av CMS-relaterte forandringer. Hentet i sin helhet fra Fritsvold et.al, 2009. Eksempler fra atrium er i venstre kolonne, og eksempler fra ventrikkel er i høyre kolonne.

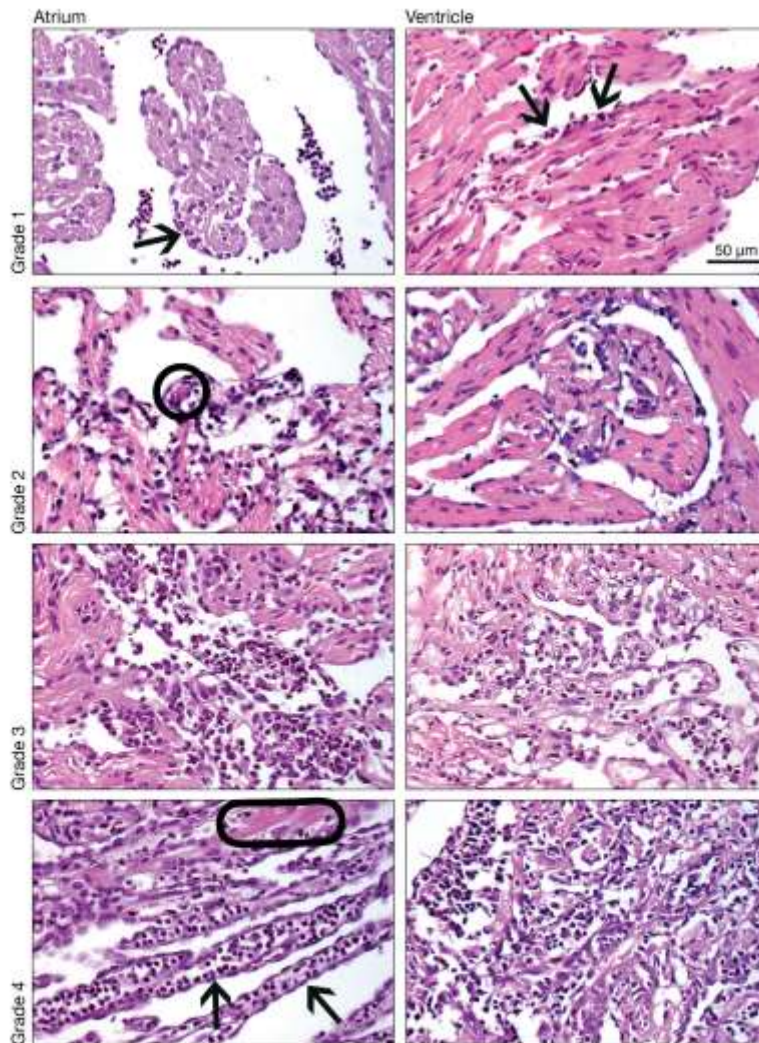


Fig. 1. Salmo salar. Histological classification of lesions in cardiac atrium and spongy ventricle, in accordance with the grading described in Table 1. Grade 1: arrows indicate minor inflammatory lesions consisting of sparse, focal subendocardial infiltration by mononuclear leukocytes and some degree 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

Tabell 1: Beskrivelse av histopatologiske forandringer som inngår i hver grad.

	Beskrivelse av grad
Grad 0:	Ingen patologiske funn

Grad 0,5:	Meget milde betennelsesforandringer. Enkelte mononukleære betennelsesceller eller subendokardial vakuolisering.
Grad 1:	Milde betennelsesforandringer. Små, få fokale subendokardiale infiltrasjoner av mononukleære leukocytter. Noe subendokardial vakuolisering.
Grad 1,5:	Flere milde fokale subendokardiale infiltrasjoner av leukocytter. Noe subendokardial vakuolisering
Grad 2:	Moderat - flere distinkte lesjoner og liten til moderat forekomst av leukocytter. Kan ha myocyttd degenerasjon og nekrose.
Grad 2,5:	Multifokale lesjoner med liten til moderat grad av leukocytter. Kan ha enkelte mindre områder med endokardial hyperplasi som danner rørstrukturer.
Grad 3:	Utbredt - multifokale til diffuse lesjoner og moderat til stor forekomst av leukocytter.
Grad 3,5:	Multifokale til diffuse lesjoner med stor forekomst av leukocytter, nekrose og endokardial hyperplasi.
Grad 4:	Alvorlig - Konfluente lesjoner som dekker over 75% av vevet, og meget kraftige infiltrasjoner av leukocytter. Flere store områder med endokardial hyperplasi som danner rørstrukturer med leukocytter inni.

Prøveuttak til RNA-ekstraksjon og rtPCR

Prøver fra apex av ventrikkelen hos 40 fisk ble tatt ut med steril teknikk og lagt på RNAlater. Prøvene ble oppbevart på -80°C, før de ble flyttet til -20°C i forkant av opptining og RNA-ekstraksjon. RNA-ekstraksjon ble utført med to metoder. Det ble benyttet robot for de første 24 prøvene, og manuell ekstraksjon for de resterende 16 prøvene. For den manuelle ekstraksjonen ble det først forsøkt RNeasy Fibrous tissue Mini Kit, men metoden produserte

lite RNA, viskøs konsistens på prøvene, og meget stor variasjon mellom parallellene. Det ble derfor forsøkt RNeasy Mini Kit isteden. Under følger protokoll for de to metodene som ble brukt. Måling av RNA-konsentrasjonene ble gjort med Epoch Microplate Spectrophotometer.

Prøve 17- 40 (24 prøver): RNA-ekstraksjon ble utført med roboten Biomek4000 med protokollen “RNA extraction from Fish Tissue” med kitet Promega Reliaprep SimplyRNA HT. Dette ble utført av Sandra Radunovic.

- Protokollens hovedtrekk:
 - 600µl 1-Thiol ble tilsatt 30 ml homogeniseringsløsning i et 50ml konisk rør. Blandingen ble kjølt ned til 4 grader.
 - Vevsprøvene ble veid til omtrent 32 mg, og tilsatt 250 µl 1-thiol/homogeniseringsløsningen som ble laget i forrige punkt, slik at blandingsforhold ble 125 mg/ml. Stålkuler ble tilsatt.
 - Prøvene ble homogenisert i “Fastprep” til de var fullstendig homogenisert, og sentrifugert i 5 minutter ved 2000 rpm, 4°C.
 - 200 µ homogenisert prøve ble overført til Thermo DWP round bottom 950404520, og holdt på is til roboten er klar til RNA-ekstraksjon.
 - Roboten ble fylt på med reagensene Cell lysis solution, Binding buffer III, DNase, Proteinase K, SimplyRNA resin (godt ristet), RNase-fritt vann, Binding buffer II, Wash buffer og 80%EtOH løsning etter instruksjon fra robot-programvaren.
 - RNA-ekstraksjon ble så kjørt etter anvisning fra robot-programvaren..

Prøve 41-56 (16 prøver): RNA-ekstraksjon ble utført manuelt ved hjelp av RNeasy® Plus Mini kit, standard protokoll for ekstraksjon fra vevsbiter. Dette ble utført av Ane Grøndahl og Amr Gamil.

- Prøvene ble tint i kjøleskap. Vevet var stabilisert i RNAlater siden prøvetakning.
- Vevsbiteene ble delt i biter på under 30 mg (mellom 20 og 30 mg), som anvist i tabell 3 s. 11 i protokollen ().
- Klargjøring av buffere:

- RPE buffer ble tilsatt 4 volum med 100% etanol.
- All sentrifugering ble gjort på 20-25 grader i vanlig mikrosentrifuge.
- Homogenisering: Hver vevsbit ble tilsatt 600µl Buffer RLT Plus og en metallkule, og lysert med 6 runder i FastPrep-24 til innholdet var homogenisert. Deretter ble homogenatet sentrifugert i 3 min på maksimum hastighet.
- Fjerning av gDNA: Supernatant ble pipettert ut uten å få med biter av pellet, og overført til gDNA Eliminator spin column plassert i et 2ml oppsamlingsrør fra RNeasy-kitet. Prøvene ble så sentrifugert på 10 000 rpm (8000 g) i 30 sekunder, og det ble kontrollert at all væske hadde passert gjennom membranen.
- 600µl 70% etanol ble tilsatt væsken som passerte membranen.
- Vasking: 700µl prøve ble tilsatt til en RNeasy spin column plassert i et 2ml oppsamlingsrør. Det ble sentrifugert på 10 000 rpm i 15 sekunder. Flow-through ble kastet, og oppsamlingsrøret ble gjenbrukt. 700µl Buffer RW1 ble tilsatt til RNeasy spin column, og sentrifugert på 10000 rpm i 15 sekunder for å vaske membranen. Flow-through ble kastet. 500µl Buffer RPE ble tilsatt og sentrifugert i 15 sekunder på samme hastighet. Til slutt ble membranen tilsatt 500µl Buffer RPE og sentrifugert i 2 minutter for å tørke av all etanol fra membranen. For å eliminere alle bufferrester ble RNeasy spin column overført til et nytt rør, og sentrifugert i 1 minutt på maks hastighet.
- RNeasy spin column ble overført til et 1,5ml oppsamlingsrør, og tilsatt 30µl RNasefritt vann direkte på membranen. Dette ble sentrifugert på 10 000 rpm i 1 minutt.

Preparering av prøver: Probebasert rtPCR ble brukt. Kit som ble brukt var SBC PMCV qPCR Kit. Primere og prober som ble brukt er inkludert i kitet, og sekvensen av disse er ikke allment tilgjengelig av konkurransehensyn fra bedriftens side. Probene er av typen TacMan. RNA fra ekstraksjonen ble fortynnet til 100 ng RNA/µl for alle prøvene, og resultatene er dermed standardisert etter mengde RNA. 14,8 µl PCR Master mix ble blandet med 1,2 µl PCR enzyme mixture, 2µl RNasefritt vann og 2µl RNA templat (100ng/µl) til et sluttvolum på 25µl. Positiv kontroll ble preparert på samme måte. Negativ kontroll ble gjort med RNasefritt vann. Det ble gjort 2 paralleller av hver prøve. Konsentrasjonen av løsningene i

standardkurven var: 1.00E+02, 1.00E+03, 1.00E+04, 1.00E+05 og 1.00E+06 RNA-kopier per μ l.

Real-time PCR for alle 40 prøver ble kjørt i AriaMX Real-Time PCR system. Annealing temperature for primere var 60 grader celcius. Det ble kjørt 40 sykluser.

Fortynningskurvens stigning («slope») ble kalkulert i programvaren Microsoft Excel.

RtPCR av prøve 17-40 ble kjørt av Sandra Radunovic. Prøve 41-56 ble preparert og kjørt på samme maskin av Ane Grøndahl.

Statistisk analyse for å teste sammenheng mellom histopatologisk gradering og virusmengde (Ct-verdi)

One-way ANOVA-test ble brukt for å teste hypotese og måle statistisk signifikans (F-verdi, sammenlignbar med p-verdi). Analysen ble utført i statistikkprogramvaren R og RStudio.

Forutsetningene for å kunne bruke ANOVA er som følger:

- Avhengig variabel (Ct-verdi) er tilnærmet normalfordelt.
- Uavhengige observasjoner (ingen tredje variabel som påvirker uavhengig og avhengig variabel)
- Homogen varians mellom kategoriene av histopatologisk score.

Nullhypotese og alternativ hypotese er beskrevet i Tabell 2.

Tabell 2: Nullhypotese og alternativ hypotese for korrelasjon mellom histopatologisk grad og Ct-verdi

Nullhypotese:	Det er ingen forskjell i Ct-verdi mellom gradene av histopatologiske forandringer, og det er sannsynlig at variasjon skyldes tilfeldigheter.
Alternativ hypotese:	Det er forskjell i Ct-verdier mellom gradene av histopatologiske forandringer, og det er usannsynlig at dette kun skyldes tilfeldigheter.

Koden som ble brukt i RStudio er som følger:

- Samlet grad som uavhengig variabel:

```
> one.way <- aov(Ctsnitt ~ Samletgrad, data = cmsANOVA2)
```

```
> summary(one.way)
```

- Med Grad Atrium som uavhengig variabel:

```
> one.way <- aov(Ctsnitt ~ Atrium, data = cmsANOVA2)
```

```
> summary(one.way)
```

- Med Grad Ventrikkel som uavhengig variabel:

```
> one.way <- aov(Ctsnitt ~ Ventrikkel, data = cmsANOVA2)
```

```
> summary(one.way)
```

Resultater

Histopatologi:

Alle 50 snittene ble histopatologisk klassifisert etter graderingsskjemaet presentert i Figur 1 og Tabell 1. To av snittene hadde enkelte artefakter etter snitting og farging, men ble vurdert som gode nok for gradering.

Fordeling av snitt i samlet grad

Snittene fordelte seg hovedsakelig i de høyere gradene.

Ingen av snittene ble totalt sett gradert til grad 0 eller grad 1, som representerer ingen eller meget milde betennelsesforandringer. Ett snitt ble gradert til 1,5, med milde forandringer av

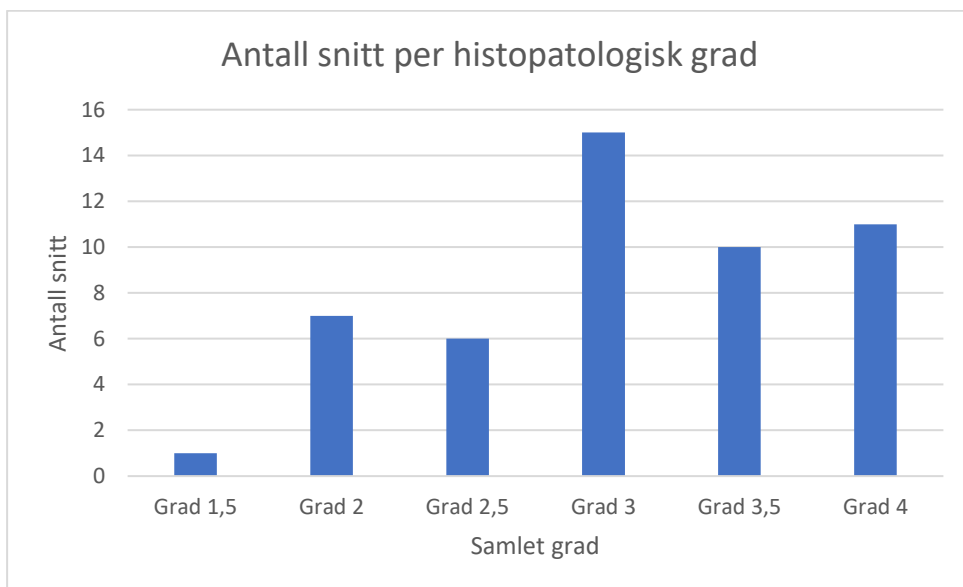
liten utbredelse. 7 snitt ble klassifisert til grad 2, og 6 snitt til grad 2,5. 72% av snittene ble klassifisert som grad 3 eller høyere, med multifokale til konfluente forandringer med moderat til kraftig infiltrasjon av leukocytter. Spesifikt ble 15 snitt klassifisert i grad 3, 10 snitt i grad 3,5 og 11 snitt i grad 4.

Tabell 3 viser hvor mange snitt som ble snitt som ble klassifisert i hver grad, og prosentfordeling av gradene. Dette er også visualisert i Figur 2.

Tabell 3: Oversikt over antall snitt per histopatologisk grad (Samlet grad) og prosentfordeling

Samlet grad	Antall snitt	Prosent
Grad 1,5	1	2
Grad 2	7	14
Grad 2,5	6	12
Grad 3	15	30
Grad 3,5	10	20
Grad 4	11	22
Sum	50	100

Figur 2: Fordeling av histologiske snitt på histopatologisk grad



Fordeling av snitt i grad Atrium og grad Ventrikkel

Figur 3 viser hvor mange atria og ventrikler som ble klassifisert til hver histopatologiske grad. Som vist var ett atrium og en ventrikkel klassifisert som grad 1, men ingen av disse snittene

ble klassifisert som grad 1 totalt sett på grunn av mer omfattende forandringer i resten av hjertet. Som nevnt er variabelen «Samlet grad» en sammenstilling av histopatologisk score i atrium og ventrikkel, og samlet grad vil derfor samvarierte med grad i atrium og ventrikkel. Figur 4 er et spredningsplot som viser at histopatologisk grad i atrium samvarierer kraftig med histopatologisk grad i ventrikkel. Høy histopatologisk grad i atrium forekommer vanligvis sammen med høy histopatologisk grad i ventrikkel i dette datamaterialet. Dette understøttes også av Spearman's korrelasjonsanalysen (Analyse 1) som ga en Spearman's rho på 0,6726. Verdier som ligger nært 1 har tilnærmet perfekt korrelasjon, mens verdier nært 0 ikke viser noen korrelasjon. Dette betyr at histopatologisk score for atrium har en sterk korrelasjon med grad for ventrikkel. Årsaker til dette er utdypet i diskusjonsdelen.

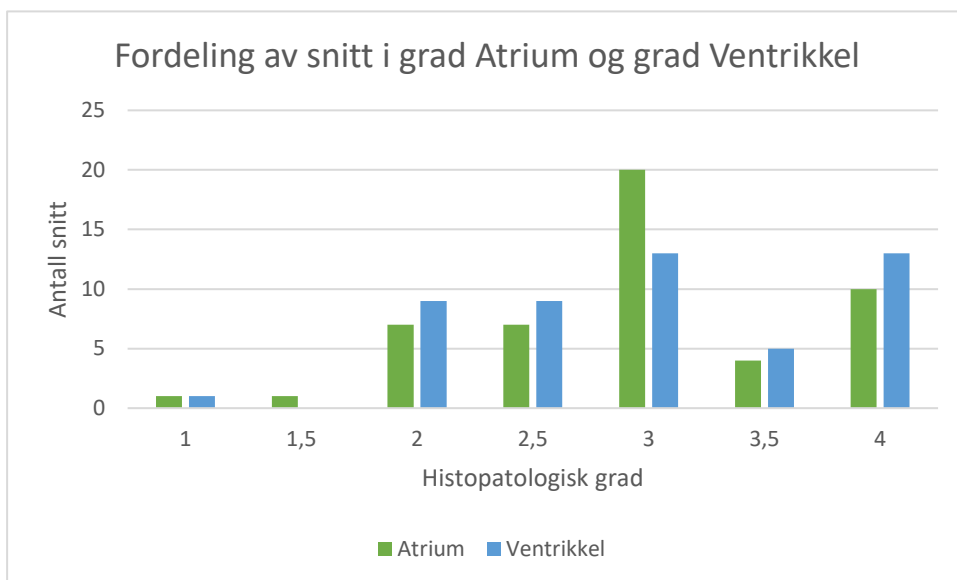
Analyse 1: Spearman's korrelasjon mellom grad atrium og grad ventrikkel.

. spearman v a

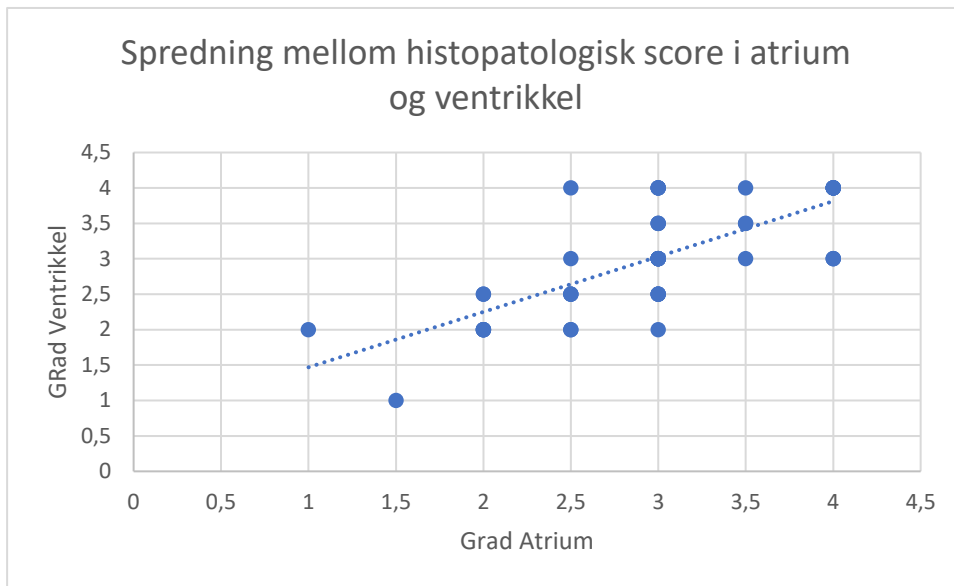
Number of obs = **40**
Spearman's rho = **0.6726**

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

Figur 3: Fordeling av atria og ventrikler etter histopatologisk grad



Figur 4: Spredningsplot mellom histopatologisk score i atrium og ventrikkel.

Utbredelse av histopatologiske forandringer:

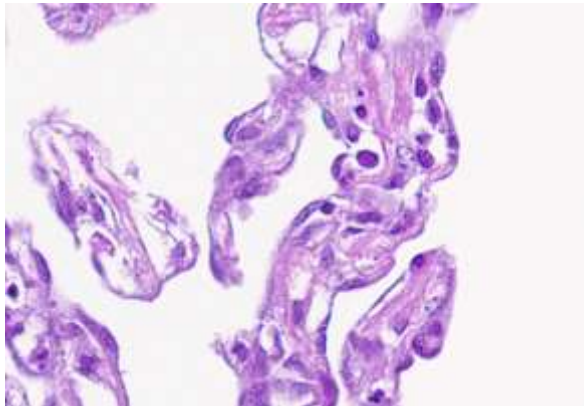
Forekomst av nekrose, endokardhyperplasi, trombedannelse, forøket bindevevsmengde og mulige regenerasjoner er vist i Tabell 4. Forskjellige nivåer av nekroser og hyperplasi av endokard var utbredt i prøvematerialet. Trombedannelser var ofte forekommende i snittene, både i atrium og ventrikkel, og i varierende grader. Flere snitt hadde mer enn 1 trombedannelse. Tydelig forøket bindevevsmengde ble registrert i 17 av 50 snitt, men målingen er usikker. Et bedre estimat på omfang av bindevevsproliferasjon blant fisk med klinisk CMS kan gjøres ved hjelp av spesialfarging for bindevev. Bilder og eksempler på de histopatologiske lesjonene som ble funnet er samlet i Tabell 5.

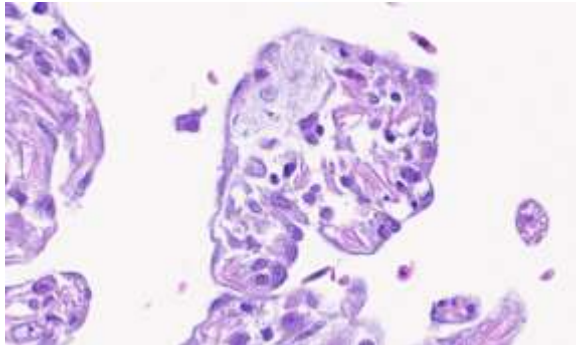
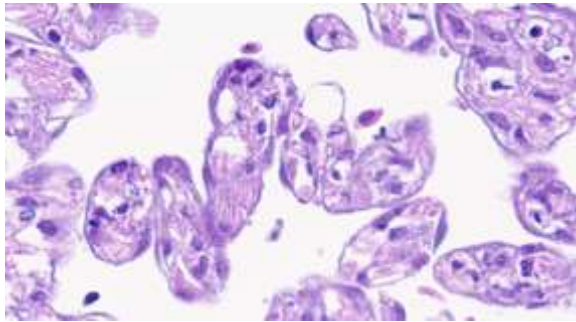
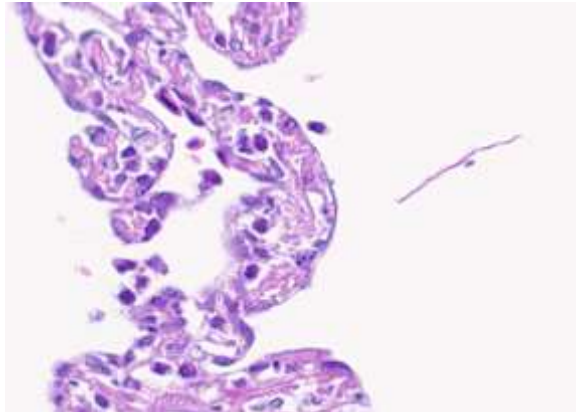
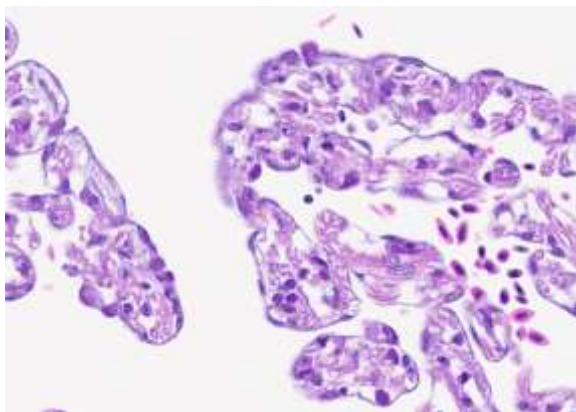
Tabell 4: Utbredelse av histopatologiske forandringer i snitt

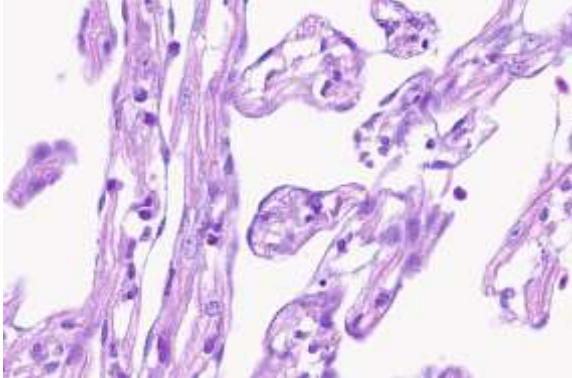
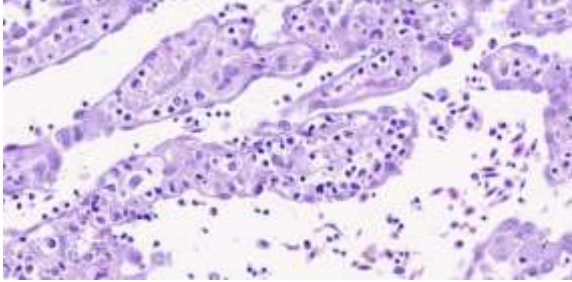
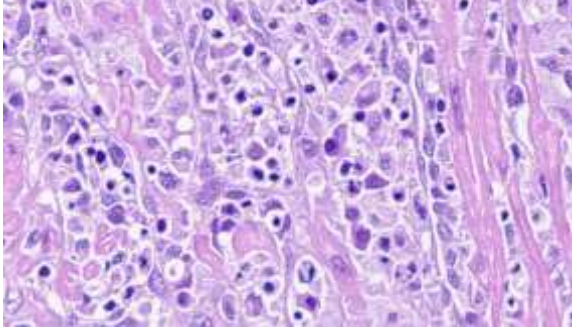
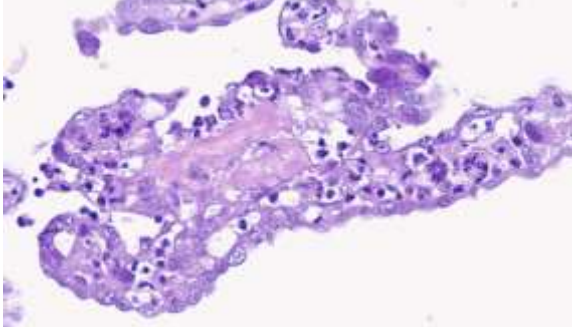
Funn	Antall snitt av 50	Prosent av snitt	Kommentar
Infiltrasjon av leukocytter (0/1)	50	100%	Også en vesentlig del av den histopatologiske graderingen.

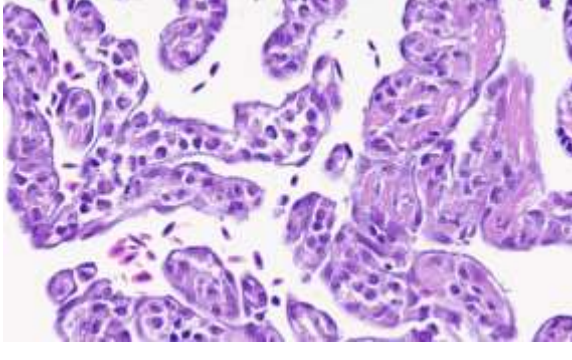
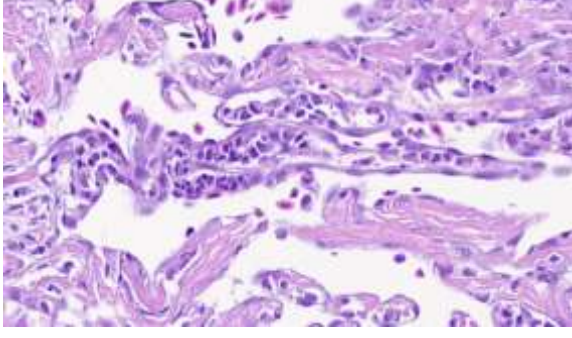
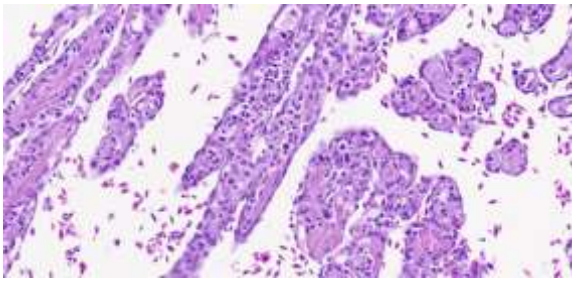
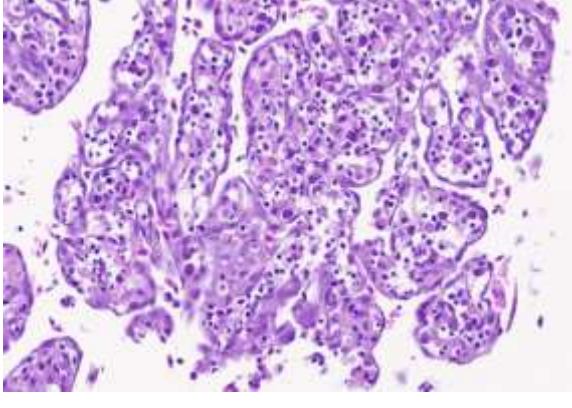
Nekrose (0/1)	48	96 %	Alle grader av nekroser ned til nekroser av enkeltceller
Endokardhyperplasi (0/1)	44	88 %	Tegn til at endokard danner hulrom uten kardiomyocytter inni.
Tromber (0/1)	19	38 %	Tette ansamlinger av betennelsesceller og blodceller i tett nærhet til vev. Tilheftning til vev er ikke synlig i snittet hos alle.
Mulige regenerasjoner (0/1)	6	12 %	Meget stor usikkerhet i registreringen.
Forøket bindevev (0/1)	17	34 %	Stor usikkerhet i registreringen, reelt antall er sannsynligvis høyere.

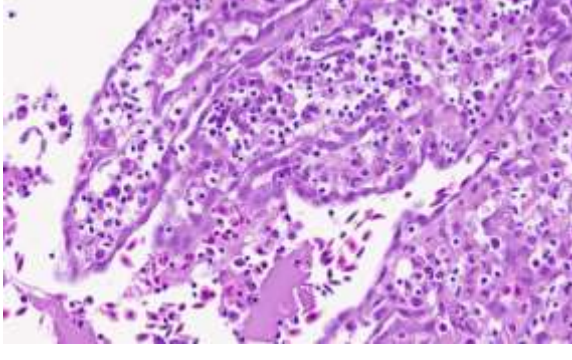

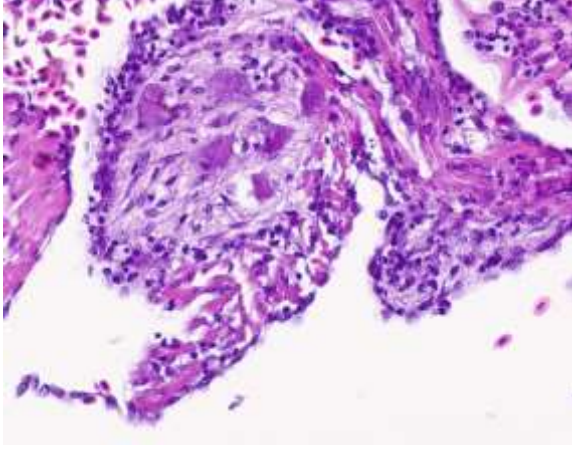
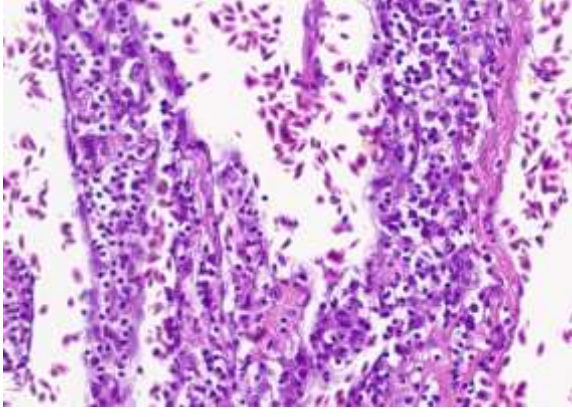
Tabell 5: Bilder av histopatologiske lesjoner fra snitt, med kommentarer.

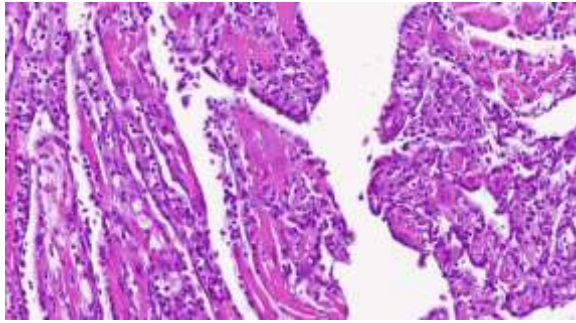
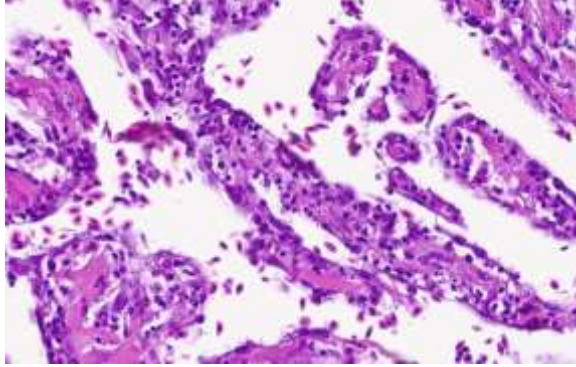
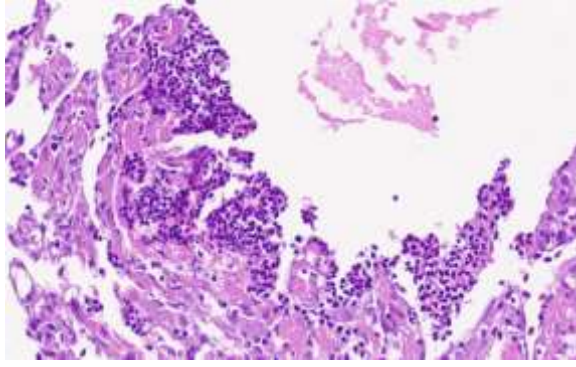
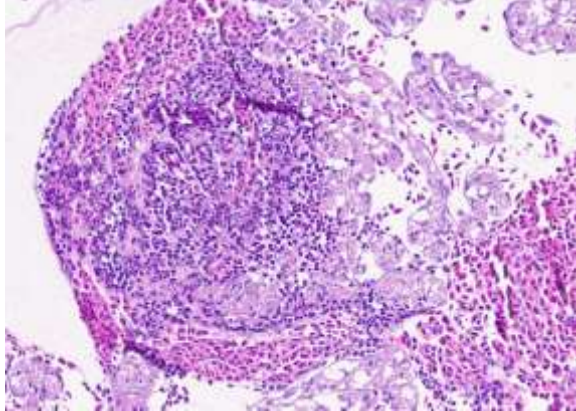
	<p>Atrium, grad 1</p> <p>Enkelte mononukleære betennelsesceller subendokardialt.</p>
---	--

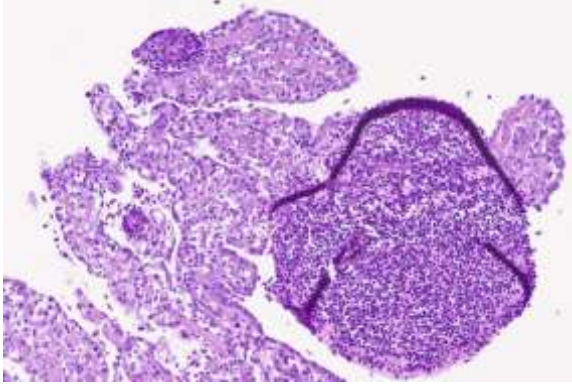
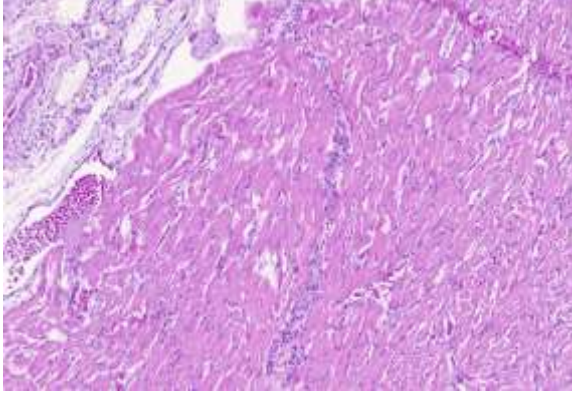
	<p>Atrium, grad 1 Noe bindevevsdannelse, flere betennelsesceller subendokardialt Enkelte nekroser.</p>
	<p>Atrium, grad 1. Kjernefragmenter. Mild infiltrasjon av betennelsesceller.</p>
	<p>Atrium, grad 1,5. Infiltrasjon av betennelsesceller, degenerasjon av enkelte kardiomyocytter.</p>
	<p>Ventrikkel, grad 1,5. Subendokardial infiltrasjon av betennelsesceller, celledegenerasjon.</p>

	<p>Ventrikkel, grad 1,5. Intakt tverrstriping flere områder, men også infiltrasjon av betennelsesceller og celledegenerasjon. Enkelte nekrotiske leukocytter. Enkelte hypertrofiske endokardiale celler.</p>
	<p>Ventrikkel, grad 2. Moderat mengde leukocytter.</p>
	<p>Ventrikkel, grad 2.</p>
	<p>Ventrikkel, grad 2,5 Nekroser, tap av vevsstruktur.</p>

	<p>Atrium, grad 2,5 Hyperplasi av endokard, fylt med betennelsesceller. Nekrose og degenerasjon. Moderat infiltrasjon av betennelsesceller</p>
	<p>Atrium grad 2.5 Hyperplasi av endokard. Fokal lesjon med mye betennelsesceller. Nekrose.</p>
	<p>Ventrikkel, Grad 3. Moderat infiltrasjon av betennelsesceller. Noe endokardial hyperplasi. Nekrose.</p>
	<p>Atrium. Lesjon med grad 3,5.</p>

	<p>Atrium, lesjon med grad 3,5. Hyperplasi av endokard, utsvedning av homogent materiale (mulig protein), stor infiltrasjon av leukocytter.</p>
	<p>Atrium grad 4. Massiv infiltrasjon av leukocytter. Omfattende nekrose. Bindevevsproliferasjon til høyre i bildet.</p>
	<p>Atrium grad 4. Nekrose og bindevevsproliferasjon. Kraftig infiltrasjon av betennelsesceller.</p>
	<p>Atrium, grad 4. Tydelig endokardial hyperplasi, nekrose av kardiomyocytter. Massiv infiltrasjon av leukocytter.</p>

	<p>Ventrikkel, grad 4.</p>
	<p>Ventrikkel, grad 4. Omfattende nekrose og infiltrasjon av leukocytter.</p>
	<p>Atrium. Samlinger av leukocytter rundt vev, mulig en begynnende trombedannelse. Leukocytinfiltrasjon og nekrose i vev.</p>
	<p>Trombedannelse. Tromben består av leukocytter, erythrocytter og enkelte bindevevsceller, sannsynligvis fibroblaster og fibrocytter.</p>

	<p>Atrium. Flere trombedannelser i samme snitt.</p>
	<p>Perivaskulitt. Ventrikkel, kompakt del. Epikardial infiltrasjon av betennelsesceller (øvre venstre hjørne) og infiltrasjon langs et blodkar i myokardium (midt i bildet).</p>

Resultater fra rtPCR

Ct-verdier, standardavvik, negative kontroller og normalfordeling

Ct-verdiene fra de 40 prøvene rangerte fra 11,5 til 20,3. En prøve med lavere Ct-verdi har mer virus enn en prøve med høyere Ct-verdi. Forskjellene mellom replikat 1 og 2 for Ct-verdier er illustrert i Tabell 5. Replikatenes ligger nært hverandre, som vist med største avvik i Ct-verdi på 0,54 og standard avvik på 0,25. Alle prøvene fikk positiv viruspåvisning, og kan derfor brukes til å teste for korrelasjon mellom Ct-verdi og histopatologisk score.

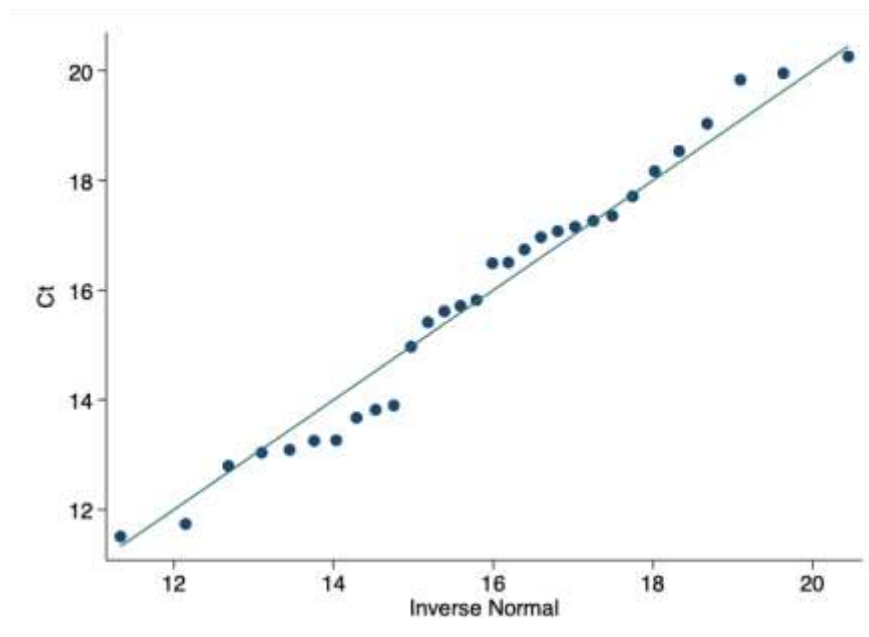
Tabell 5: Standardavvik, største og minste avvik mellom Ct replikat 1 og 2.

Standardavvik mellom replikat 1 og 2	0,25
Største avvik	0,54
Minste avvik	0,01

Det var problemer med at de negative kontrollene ikke fikk negativt resultat. De to negative kontrollparallelene som ble kjørt sammen med prøve 41-56 var ikke negative, men lå på Ct=32,43 og 32,36. I tillegg hadde 2 av totalt 4 paralleller med negativ kontroll til prøve 17-40 også Ct-verdi, disse på henholdsvis 31,78 og 35,97.

Ct-verdi, som er en kontinuerlig variabel, ser ut til å være normalfordelt i dette datamaterialet. Dette er presentert i Figur 5.

Figur 5: Plot for å vurdere normalfordeling av variabelen Ct snitt.



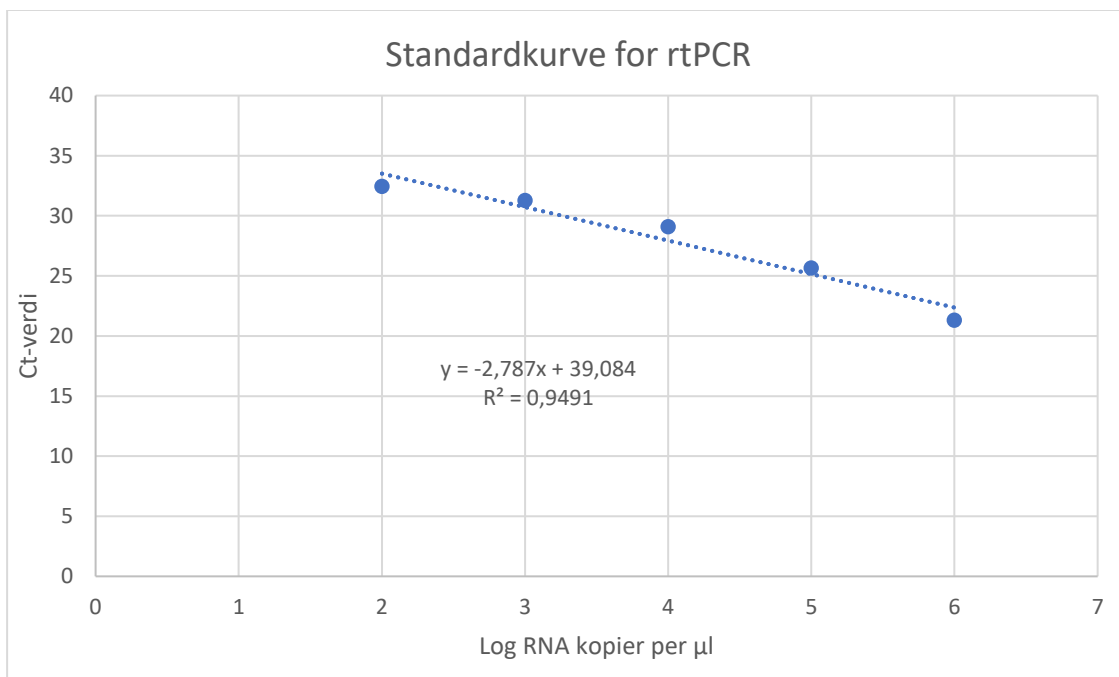
Vurdering av standardkurve og PCR Effekt

Ct-verdier fra fortynningsrekken som ble brukt som standardkurve er vist i Tabell 6. Tabellen ble brukt til å regne ut standardkurvens stigning, «slope», som er vist i Figur 6. PCR Efficacy eller effekt basert på standardkurven ble regnet ut etter Formel 1, hvor E= 128.46. Dette er høyere enn det ønskelige nivået på under 110. Det er sannsynligvis usikkerhet forbundet med at det kun ble gjort 1 parallell av fortynningsrekken.

Formel 1: $E = [(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100]$

Tabell 6: Resultater fra rtPCR-standardkurven

RNA kopier per μl	Log RNA kopier per μl	Ct-verdi
1,00E+02	2	32,42
1,00E+03	3	31,25
1,00E+04	4	29,08
1,00E+05	5	25,64
1,00E+06	6	21,29

Figur 6: Standardkurve for rtPCR på formelen $y=ax+b$, hvor a er stigningsgrad (slope) og b er skjæringspunkt med y-aksen. Figuren er basert på Tabell 6.

Ct-verdier i sammenheng med histopatologisk score

Histopatologisk grad og Ct-verdier er presentert i tre tabeller. Tabell 7 viser fordeling av Ct-verdier på histopatologisk grad (Samlet grad). Tabell 8 viser fordelingen av Ct-verdier på histopatologisk grad i atrium, og Tabell 9 gjør det samme for histopatologisk grad i ventrikkel.

Tabell 7: Oversikt over histopatologisk grad (Samlet grad) og tilhørende Ct-verdiers gjennomsnitt og standardavvik.

Samlet grad	Antall Samlet grad	Gjennomsnitt av Snitt Ct	Standardavvik Snitt Ct
1,5	1	15,62	
2	5	15,34	1,46
2,5	4	14,72	2,89
3	9	16,22	2,30
3,5	10	16,30	2,80
4	11	16,32	2,66
Totalsum	40	15,99	2,42

Tabell 8: Oversikt over histopatologisk grad i atrium og tilhørende Ct-verdiers gjennomsnitt og standardavvik.

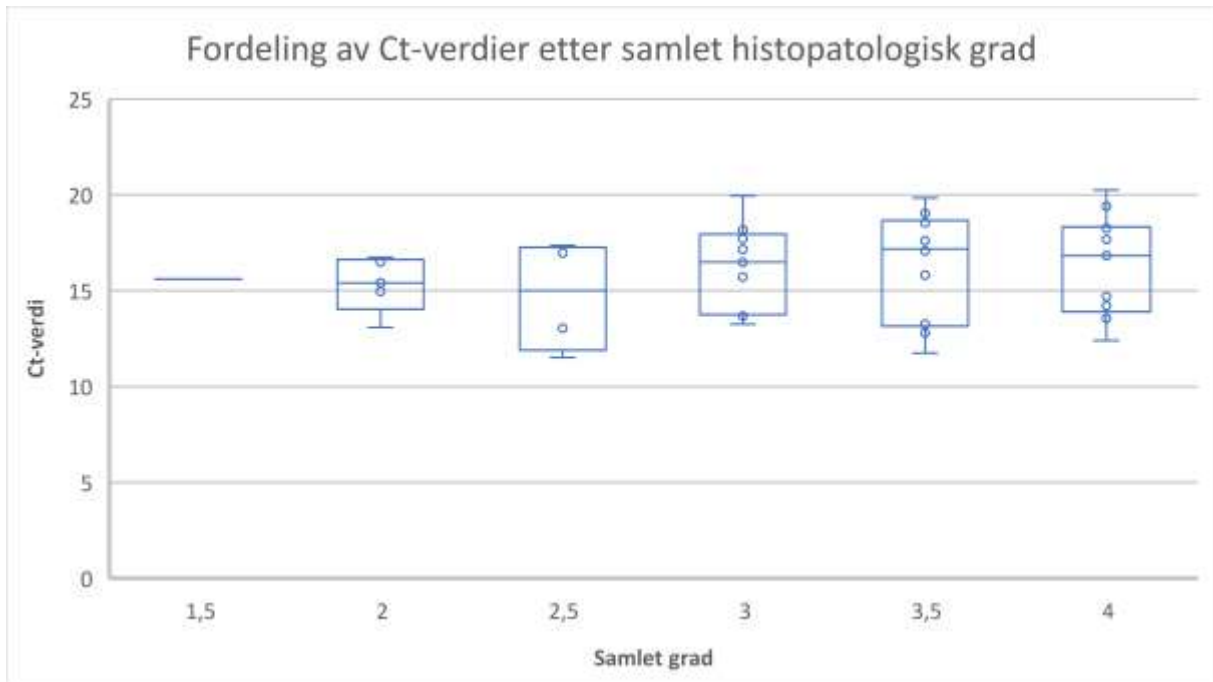
Atrium grad	Antall Atrium grad	Gjennomsnitt av Snitt Ct	Standardavvik Snitt Ct
1	1	13,09	
1,5	1	15,62	
2	4	16,06	1,08
2,5	6	15,09	2,27
3	14	15,86	2,52
3,5	4	17,45	2,93
4	10	16,42	2,73
Totalsum	40	15,99	2,42

Tabell 9: Oversikt over histopatologisk grad i ventrikkel, og tilhørende Ct-verdiers gjennomsnitt og standardavvik

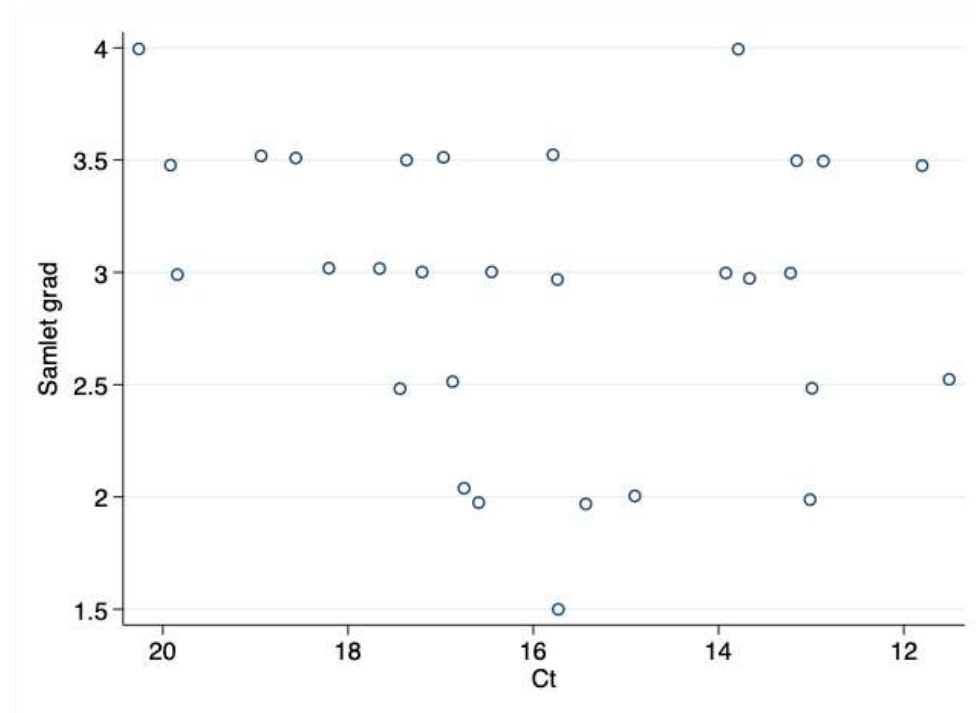
Ventrikkel grad	Antall Ventrikkel	Gjennomsnitt Snitt Ct	Standardavvik Snitt Ct
1	1	15,62	
2	7	14,80	1,53
2,5	5	15,81	3,39
3	9	16,98	2,32
3,5	5	17,05	2,27
4	13	15,64	2,56
Totalsum	40	15,99	2,42

Ct-verdiene er generelt like mellom de forskjellige histopatologiske gradene, som visualisert i Figur 7 og Figur 8 for samlet grad, Figur 9 og Figur 10 for grad i ventrikkel, og Figur 11 og Figur 12 for grad i atrium. Dette er også illustrert ved hjelp av en One-way ANOVA som beskrevet under.

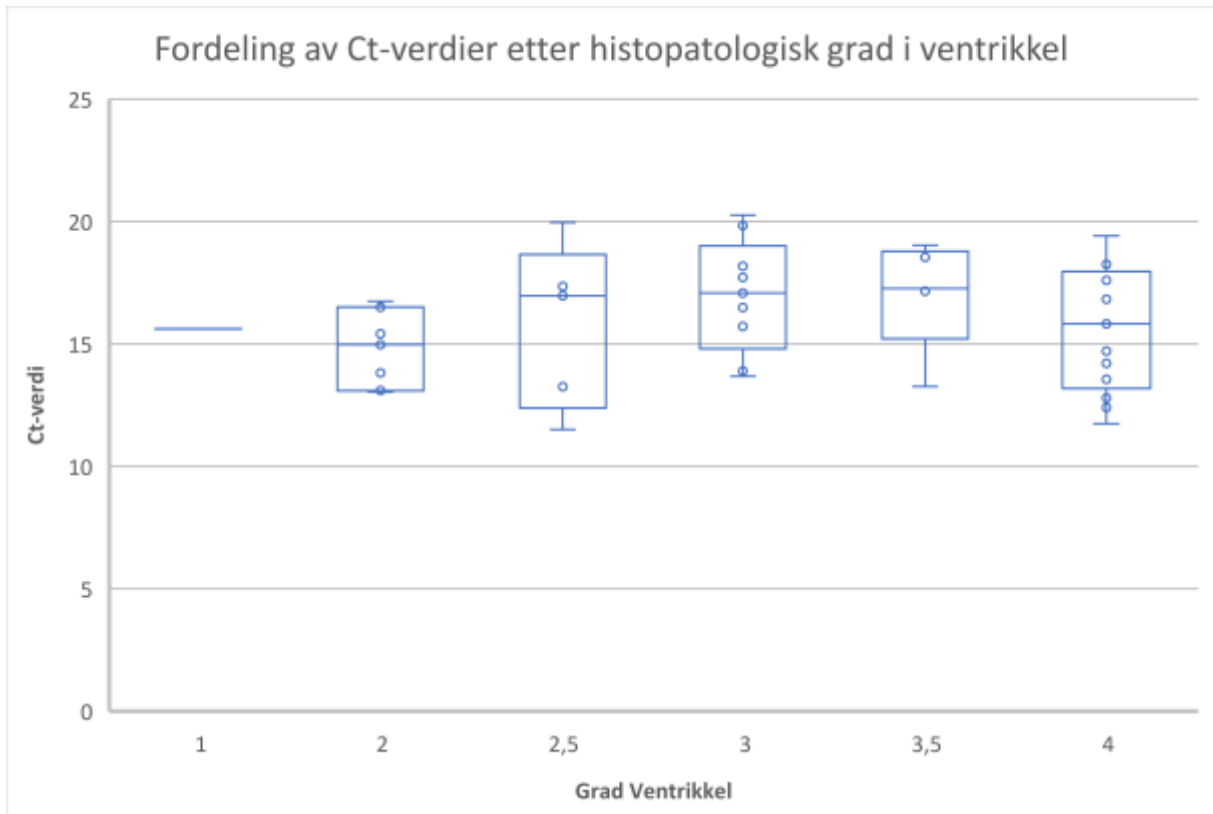
Figur 7: Box plot som viser fordeling av Ct-verdier innenfor histopatologiske grader (Samlet grad)



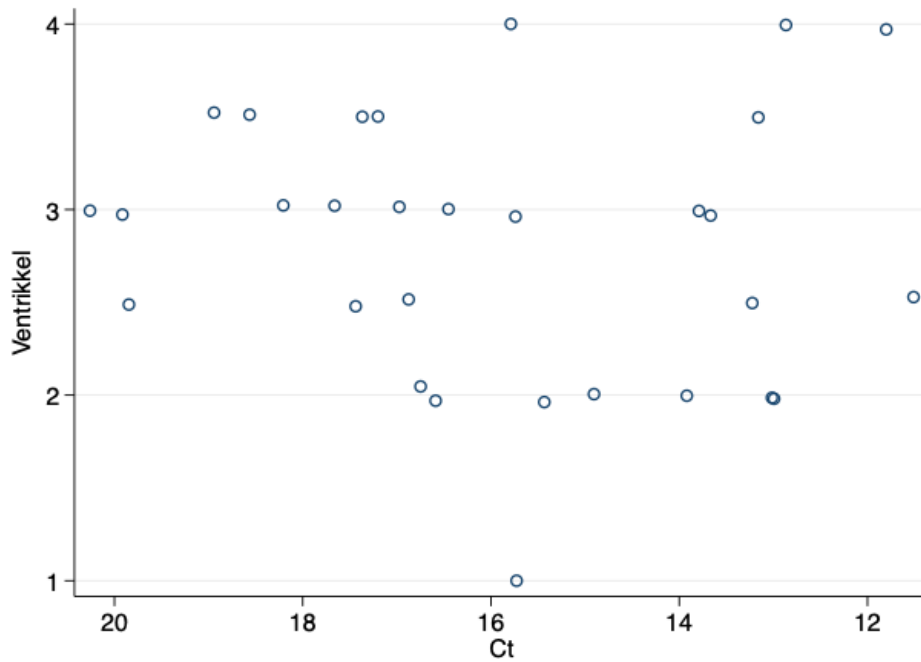
Figur 8: Spredningsplot for Ct-verdi og histopatologisk score (samlet grad)



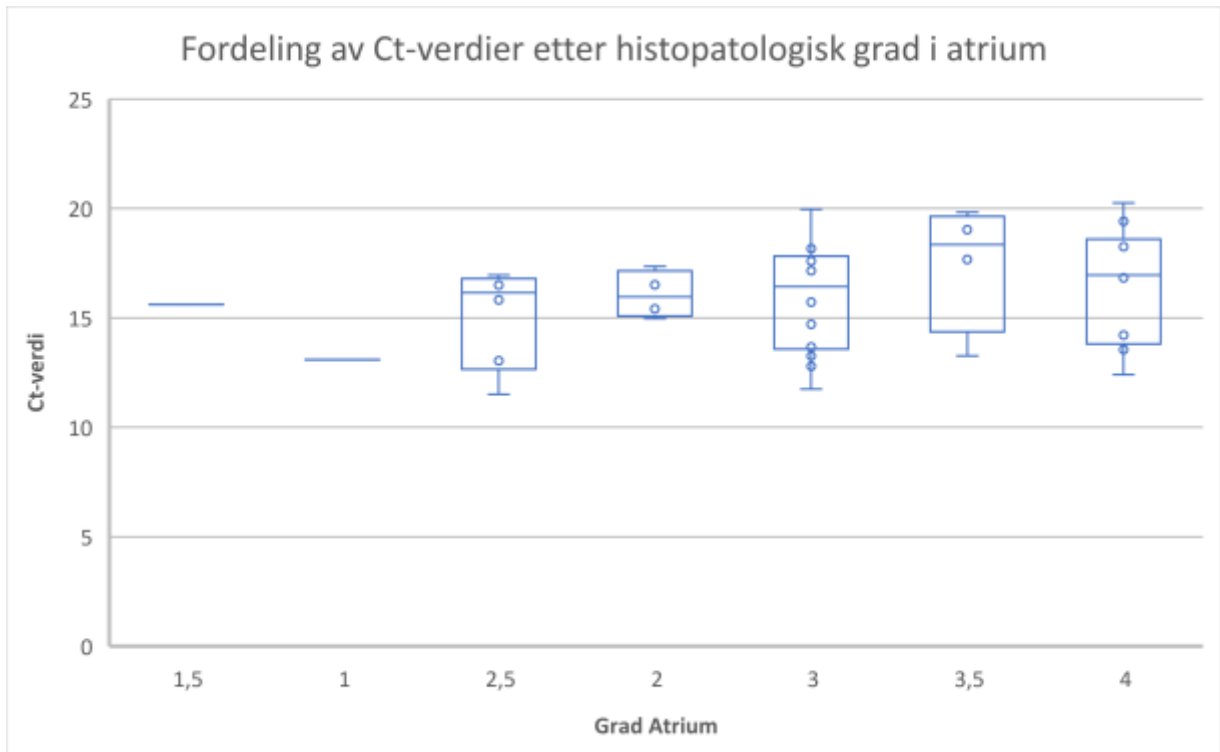
Figur 9: Box plot som viser fordeling av Ct-verdier innenfor histopatologiske grad i ventrikkel



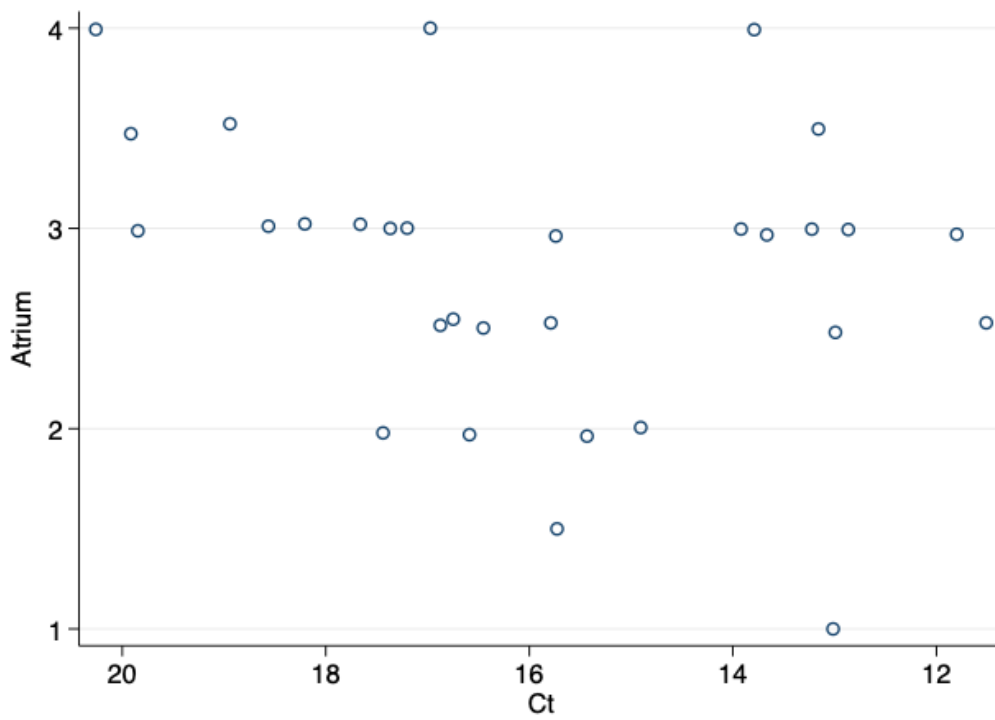
Figur 10: Spredningsplot med Ct-verdi og histopatologisk score i ventrikkel.



Figur 11: Box plot som viser fordeling av Ct-verdier innenfor histopatologiske grader i atrium



Figur 12: Spredningsplot med Ct og histopatologisk score i Atrium



One-way ANOVA for histopatologisk score og Ct-verdi

One-way ANOVA ble gjort for å se på grad av korrelasjon mellom histopatologisk grad og Ct-verdi, og for å kunne beregne statistisk signifikans i form av F-verdi og den korresponderende Probability for >F (forkortet til Pr(>F)). Signifikansnivået var satt til 0,95, så Pr(>F) verdien måtte være under 0,05 for at resultatet skulle regnes som statistisk signifikant. Med statistisk signifikant menes det at det skal være under 0,05 sannsynlighet for at resultatene kunne opptrådt uten at det var korrelasjon mellom variablene. F-verdien reflekterer hvor sannsynlig det er at den målte variansen ikke skyldes tilfeldigheter, slik at en høy F-verdi indikerer statistisk signifikans. Resultatene for One-way ANOVA analysen er registrert i Tabell 10 for samlet histopatologisk grad, Tabell 11 for grad i atrium, og Tabell 12 for grad i ventrikkel.

Tabell 10: Resultater One-way ANOVA med Samlet grad som uavhengig variabel, og Ct-verdi som avhengig variabel.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Samlet grad	5	11.31	2.262	0.354	0.876
Residualer	34	217.37	6.393		

Tabell 11: Resultater One-way ANOVA med grad Atrium som uavhengig variabel, og Ct-verdi som avhengig variabel.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grad Atrium	6	24.03	4.005	0.646	0.693
Residualer	33	204.65	6.202		

Tabell 12: Resultater One-way ANOVA med grad ventrikkel som uavhengig variabel, og Ct-verdi som avhengig variabel.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grad ventrikkel	5	26.32	5.264	0.885	0.502
Residualer	34	202.36	5.952		

Med bakgrunn i Pr(>F)-verdiene fra de tre analysene kan ikke nullhypotesen forkastes. Nullhypotesen er beskrevet under materiale og metoder. Det er ingen signifikant forskjell i Ct-verdiene mellom de forskjellige histopatologiske gradene.

Diskusjon

Studiedesign og analyse:

Det er mulige feilkilder i studiedesign og analysering av resultatene. All fisk ble hentet fra 1 merd, merd nr.2 Det kan tenkes å være forskjell mellom merder i forhold til histopatologiske skader, og virusmengde eller tid siden utbruddet startet. Det er ukjent om noen av merdene viste kliniske symptomer før eller etter merd nr.2. Alle prøver ble tatt fra selvdød fisk, og dette kan ha bidratt til at en stor andel av prøvene viste moderate til alvorlige histopatologiske forandringer. Det er mulig at inkludering av avlivet fisk og svimere i utvalget hadde endret fordelingen på histopatologiske grader noe.

Det hadde vært ønskelig å kunne korrigere for tid som har passert siden hver fisk fikk kliniske symptomer, men dette var ikke mulig å gjøre i en observasjonsstudie som denne. Tid etter oppstart av kliniske symptomer vil sannsynligvis påvirke både grad av histopatologiske forandringer og virusmengde i vev (Fritsvold et al., 2009)

Fiskegruppen hadde tidligere også vært diagnostisert med HSMB og PD, men det hadde gått flere måneder og fiskegruppen hadde ikke lenger kliniske symptomer eller obduksjonsfunn forenlig med disse sykdommene. Vi går derfor ut ifra at alle de histopatologiske endringene skyldes CMS.

Histopatologi:

De histopatologiske forandringene fra denne fiskegruppen sammenfaller med funn som tidligere er beskrevet for CMS (Garseth et al., 2018, Fritsvold et al., 2021, Wiik-Nielsen et al., 2012, Yousaf et al., 2013, Timmerhaus et al., 2012, Martinez-Rubio et al., 2014, Fritsvold et al., 2009). Hjerterpøvene har generelt blitt klassifisert høyt, med 72% klassifisert i grad 3 og over. Årsaker til dette kan være:

- at alle prøvene er tatt ut på selvdød fisk
- at utbruddet hadde pågått i noen måneder (3-4 mnd) og mange fisk trolig var infisert
- Infeksjonen hadde pågått lenge nok til at forandringene hadde rukket å utvikle seg i både atrium og ventrikkel
- ukjente egenskaper ved fiskegruppen eller virus

Histopatologisk grad i atrium og ventrikkel viser sterk assosiasjon. Dette er en naturlig konsekvens av at atrium vanligvis viser histopatologiske forandringer før ventrikkel, før PMCV også infiserer ventrikkelvev og gir utvikling av histopatologiske forandringer der en tid senere. Det fører til at fisk med høy histopatologisk score i atrium også gjerne har høy histopatologisk score i ventrikkel, så lenge det har gått nok tid. (Fritsvold et al., 2009)

De histopatologiske forandringene inkluderte infiltrasjon av leukocytter, og i hovedsak mononukleære leukocytter som lymfocytter, makrofager og plasmaceller. Som vist i Tabell 4 er det også mye endokardial hyperplasi. Mekanismen for dette fenomenet er ikke fullt klarlagt. Nekroser er også vanlig forekommende. Det er også noe usikkerhet forbundet med registrering av tromber. Alle trombeliknende ansamlinger av celler ble registrert som tromber hvis de lå i tett kontakt med hjertevev, selv hvor det ikke ble påvist fast tilhefting til vevet. Dette kan ha medført enkelte falske positive registreringer. Hematoxylin og eosin-fargede snitt er ikke ideelt for påvisning av bindevev i snitt. For videre undersøkelse av grad av reparasjon og forøket bindevev bør det utføres spesialfarging.

Det kan være flere feilkilder forbundet med den histopatologiske graderingen. Graderingen ble ikke gjort av erfaren histopatolog, og dette kan ha ført til feilaktig gradering av snitt. Forhold som avhjelper på dette problemet er at alle snittene er gradert av samme person, og snitt i hver histopatologisk grad er kontrollert mot hverandre. Dette har trolig gitt en mer enhetlig gradering. En annen kilde til feil er at kun ett snitt fra hvert hjerte har blitt gradert, og andre snitt fra samme hjerte kan tenkes å ha andre grader av forandringer.

RNA-ekstraksjon og rtPCR

Alle prøvene var positive for PMCV på rtPCR. Dette sammenfaller med at alle de prøvetatte fiskene hadde histopatologiske forandringer typisk for CMS, og at prøvene ble tatt ut 3-4 mnd etter oppstart av kliniske symptomer på anlegget. I løpet av disse månedene øker sannsynligheten for at en stor andel fisk tester positivt for PMCV etter horisontal smitteoverføring innad og mellom merder.

Standardkurven som ble brukt for rtPCR hadde noe forøket E. Det er en del usikkerhet forbundet med at det kun ble utført 1 parallell av standard fortynningskurven. Denne feilkilden er trolig ikke stor nok til å endre konklusjonen på problemstillingen med tanke på Ct-verdi og korrelasjon med histopatologisk score.

Det kan være flere årsaker til at de 4 negative kontrollene som ble brukt fikk registrert Ct-verdi. Kontaminasjon av mastermix, enzymmix eller RNasefritt vann er en mulig årsak, men det må ha blitt gjort ved to forskjellige anledninger, og av to forskjellige personer. Ct-verdiene for de negative kontrollene var likevel høye (over 30), og har trolig heller ikke stor nok innvirkning til å endre konklusjonen på problemstillingen.

Ct-verdier og sammenheng med histopatologi:

Denne studien fant ingen forskjell i virusmengde i hjerte hos fisk med store histopatologiske forandringer enn med mindre histopatologiske forandringer. I feltsammenheng ser det ut at man ikke kan predikere sannsynlig virusmengde i hjertet ved å se på histologisk score eller motsatt. Ifølge One-way ANOVA-testen som ble gjort er $Pr(>F)$ langt over nivå for statistisk signifikans. Det er sannsynlig at virusmengde i hjertet i større grad varierer med hvor i sykdomsforløpet fisken er, fiskens immunstatus og andre faktorer enn med histopatologisk score. For å få mer kunnskap om trendene i histopatologisk score og virusmengde kan det gjøres studier som tar hensyn til tid mellom oppstart av kliniske symptomer og prøvetakning.

Intern validitet: Kan utvalget si noe om studiepopulasjonen? Utvalget og resultatene er sannsynligvis delvis representative for CMS-syk fisk ved anlegget. En utfordring er at prøvene kun ble tatt ut fra en merd, og kun fra selvdød fisk. Man kan ikke ekstrapolere til all fisk ved anlegget, med mindre sannsynligheten er stor for at all fisk er CMS-syk.

Ekstern validitet: Kan utvalget si noe om referansepopulasjonen, CMS-syk laks i Norge? Utvalget som ble gjort er sannsynligvis sammenlignbart for andre selvdøde fisk fra CMS-syke fiskegrupper av atlantisk laks. Dette understøttes av at flere studier har vist liknende forandringer i hjertevev hos laks med CMS. De målte virusmengdene kan sannsynligvis også si noe om sannsynlig virusmengde i annen norsk laks med CMS. Resultatene kan ikke ekstrapoleres til andre sykdommer eller andre fiskearter.

Konklusjon

Problemstilling: Hvordan er fordelingen i grad av histopatologiske forandringer i hjerte hos CMS-diagnostisert oppdrettslaks, hvordan kan forandringene beskrives, og er det samvariasjon mellom grad av histopatologiske forandringer og virusmengde i hjertevev?

Fordelingen av histopatologisk klassifisering var:

- Grad 0, 0,5 og 1: 0%
- Grad 1,5: 2%
- Grad 2: 14%
- Grad 2,5: 12%
- Grad 3: 30%
- Grad 3,5: 20%
- Grad 4: 22%.

De histopatologiske forandringene var dominert av infiltrasjon av leukocytter i atrium og spongiøst myokard i ventrikkel, nekroser, endokardial hyperplasi og trombedannelser. Det ble også registrert forøket bindevevsmengde og mulige regenerasjoner av hjertevev.

I denne studien ble det ikke funnet noen korrelasjon mellom grad av histopatologiske forandringer og virusmengde i hjertevev.

Takk til bidragsyttere

Takk til Øystein Evensen for god veiledning,

Amr Gamil og Sandra Radunovic for assistanse med labarbeid,

og Åshild Gandrud for hjelp til kontrollesning.

Summary

Title: Histopathological cardiac lesions in atlantic salmon with cardiomyopathy syndrome (CMS) and testing for correlation with viral load in cardiac tissue

Authors: Ane Grøndahl

Supervisor: Øystein Evensen, Department for paraclinical sciences

. Cardiomyopathy syndrome (CMS) is a widespread disease in large Atlantic salmon *Salmo salar* farmed in seawater. The causative agent is Piscine cardiomyopathy virus (PMCV). Clinical symptoms and post-mortem findings are cardiac tamponade and symptoms of circulatory failure. The disease primarily affects the atrium and the spongy part of the ventricular myocardium. In this retrospective cross-sectional study, the histopathological cardiac lesions of Atlantic salmon diagnosed with CMS were described and graded on a 0–4-point scale. The histopathological scale considers levels of leukocyte infiltration, necrosis, degeneration and endocardial hyperplasia. Possible correlation between severity of histopathological lesions and viral load in heart tissue was also investigated. Ct-values for PMCV were obtained using rtPCR. Histopathological lesions and severity were comparable to the results in other

studies. 75% of samples were categorized in grade 3 og higher. No samples were graded as 0-1. Leukocyte infiltration, necrosis and endocardial hyperplasia were found in the majority of samples. No statistically significant correlation between the degree of histopathological lesions and viral load was found.

Referanser

- BANG JENSEN, B., NYLUND, S., SVENDSEN, J., SKI, P. M. & TAKLE, H. 2019. Indications for a vertical transmission pathway of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, 42.
- BRUN, E., POPPE, T., SKRUDLAND, A. & JARP, J. 2003. Cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: occurrence and direct financial losses for Norwegian aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56, 241-247.
- BRUNO, D. W. & NOGUERA, P. A. 2009. Comparative experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 87, 235-42.
- BRUNO, D. W., NOGUERA, P. A. & POPPE, T. T. 2013. *A colour atlas of salmonid diseases*, Springer Science & Business Media.
- FAGERLAND, H. A. S., AUSTBO, L., FRITSVOLD, C., ALARCON, M., RIMSTAD, E., FALK, K., TAKSDAL, T. & KOPPANG, E. O. 2013. Pathological pigmentation in cardiac tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with cardiomyopathy syndrome. *Veterinary Research*, 44, 7.
- FRISK, M., HOYLAND, M., ZHANG, L. L., VINDAS, M. A., OVERLI, O. & JOHANSEN, I. B. 2020. Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 529, 10.
- FRITSVOLD, C., KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T., ORPETVEIT, I., HEUM, M. & POPPE, T. T. 2009. Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87, 225-234.
- 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, A. H., FRITSVOLD, C., SVENDSEN, J. C., JENSEN, B. 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.
- HILLESTAD, B. & MOGHADAM, H. K. 2019. Genome-Wide Association Study of Piscine Myocarditis Virus (PMCV) Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Heredity*, 110, 720-726.
- JENSEN, B. B., BRUN, E., FINEID, B., LARSEN, R. B. & KRISTOFFERSEN, A. B. 2013. Risk factors for cardiomyopathy syndrome (CMS) in Norwegian salmon farming. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107, 141-150.
- JENSEN, B. B., MARTENSSON, A. & KRISTOFFERSEN, A. B. 2020. Estimating risk factors for the daily risk of developing clinical cardiomyopathy syndrome (CMS) on a fishgroup level. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 7.
- LOVOLL, M., WIJK-NIELSEN, J., GROVE, S., WIJK-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.
- MARTINEZ-RUBIO, L., EVENSEN, O., KRASNOV, A., JORGENSEN, S. M., WADSWORTH, S., RUOHONEN, K., VECINO, J. L. G. & TOCHER, D. R. 2014. Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV). *Bmc Genomics*, 15, 20.
- MIKALSEN, A. B., LUND, M., MANJI, F., KJONSTAD, M. V., BERGTUN, P. H., RITCHIE, G., ASPEHAUG, V., DEVOLD, M. & EVENSEN, O. 2020. Lack of evidence of vertical transmission of piscine myocarditis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, 43, 715-718.
- NIBERT, M. & TAKAGI, Y. 2012. Fibers come and go: Differences in cell-entry components among related dsRNA viruses. *Current opinion in virology*, 3.
- RODGER, H. & TURNBULL, T. 2000. Cardiomyopathy syndrome in farmed Scottish salmon. *Veterinary Record*, 146, 500-501.
- SANDBLUND, L., MOR, S. K., SINGH, V. K., PADHI, S. K., PHELPS, N. B. D., NYLUND, S. & MIKALSEN, A. B. 2021. Comparative Molecular

- Characterization of Novel and Known Piscine Toti-Like Viruses. *Viruses*, 13, 1063.
- SOMMERSET, I. W., C.S, BANG JENSEN, B.B. WIIK NIELSEN, J. BORNØ, G. OLIVEIRA, V.H.S, HAUKAAS, A. BRUN, E. 2022a. Fiskehelse rapporten 2021. *Veterinærinstituttets rapportserie*. www.vetinst.no: Veterinærinstituttet.
- SVENDSEN, J. C., NYLUND, S., KRISTOFFERSEN, A. B., TAKLE, H., BUHAUG, J. F. & JENSEN, B. B. 2019. Monitoring infection with Piscine myocarditis virus and development of cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 42, 511-518.
- TIMMERHAUS, G., KRASNOV, A., TAKLE, H., AFANASYEV, S., NILSEN, P., RODE, M. & JORGENSEN, S. M. 2012. Comparison of Atlantic salmon individuals with different outcomes of cardiomyopathy syndrome (CMS). *Bmc Genomics*, 13, 14.
- VETERINÆRINSTITUTTET. *Kardiomyopatisyndrom* [Online]. Available: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kardiomyopatisyndrom-cms> [Accessed].
- WIIK-NIELSEN, J., ALARCON, M., JENSEN, B. B., HAUGLAND, O. & MIKALSEN, A. B. 2016. Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *Journal of Fish Diseases*, 39, 1495-1507.
- WIIK-NIELSEN, J., LOVOLL, M., FRITSVOLD, C., KRISTOFFERSEN, A. B., HAUGLAND, O., 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. *Journal of Fish Diseases*, 35, 907-916.
- YOUSAF, M. N., KOPPANG, E. O., SKJODT, K., HORDVIK, I., ZOU, J., SECOMBES, C. & POWELL, M. D. 2013. Comparative cardiac pathological changes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI), cardiomyopathy syndrome (CMS) and pancreas disease (PD). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151, 49-62.

Vedlegg



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no

