



Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

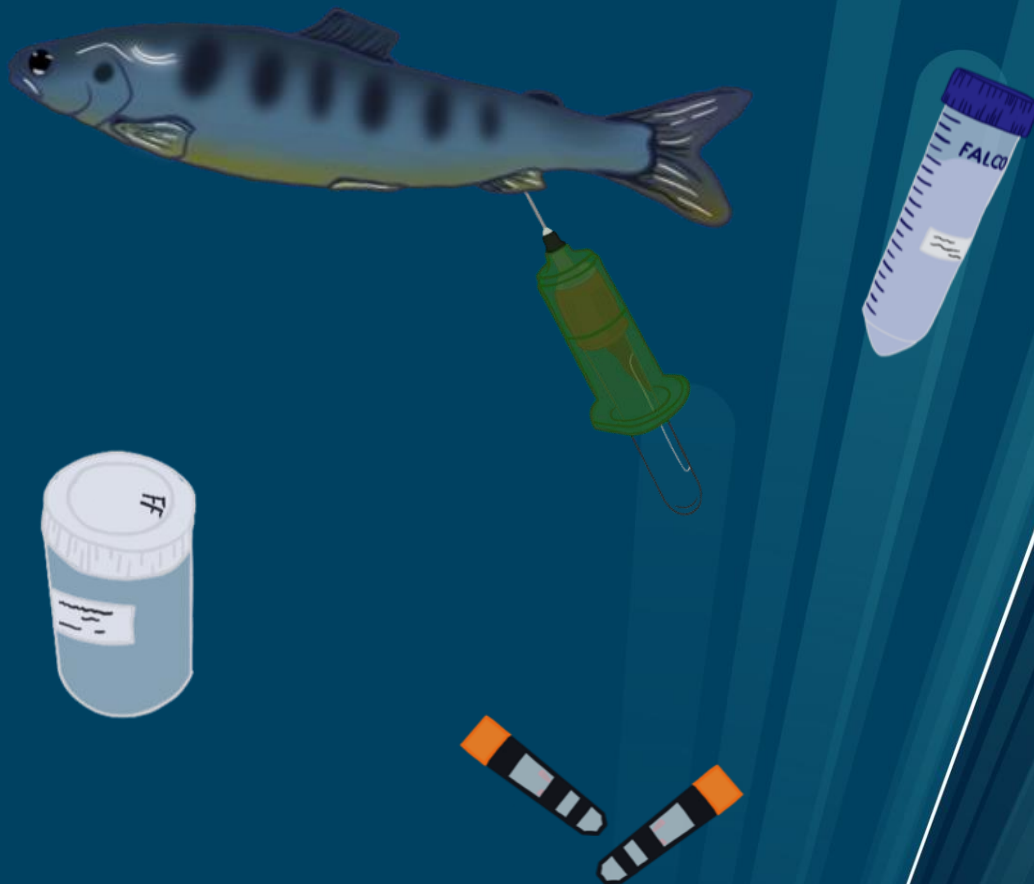
Er Atlantisk lakseparr (*Salmo salar* L.) mottakelig for piscint myokardittvirus (PMCV) ved bruk av kohabitant smittemodell?

En sammenligning mellom parr og smolt

60 stp.

Sunniva-Berly M. Gustavsen

Masteroppgave i Akvamedisin | BIO-3955 | mai 2021



Illustrasjon forside tegnet av Marie Svarlien

Forord

Oppgaven ble skrevet ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø – Norges arktiske universitet. Forsøket ble utført ved VESO Vikan i Namsos.

Det er mange jeg har lyst til å rette en stor takk til. **Tore Seternes** har vært en rolig, bestemt, oppklarende, rosende og veldig hjelpsom veileder, tusen takk. **Marie Løvoll, Makoto Inami, Hilde Sloot Bjøru** og **laboranter** ved VESO Vikan for forsøk, fasiliteter, røkting og veiledning. Blant laborantene må **Marie Svarlien** få en ekstra takk, for den fine illustrasjonen på forsiden.


For å kunne utføre analyse av prøvene har jeg vært nødt til å kjøre noen turer til Tromsø fra Namsos. Derfor ønsker jeg å takke min gode venninne **Astrid Stensvik**, for alltid støttende ord og husly i Tromsø. Ønsker å takke **Guro Strandskog** for at hun tok seg tid til å veilede og hjelpe meg på lab. Takk til medstudent **Endre Nordstrand** for hjelp og latter ved utførelse av histologiske snitt. Hans tips har gjort at jeg har spart dyrebar tid. Tromsøturene hadde ikke vært den samme uten **Maia Eggen**, ei jente som tror på meg som person, og alltid løfter meg opp når det trengs.

Sist, men ikke minst, må min utrolige flotte familie takkes. **Foreldre, besteforeldre** og **kjæreste** for og alltid ha stilt opp, uansett hva det måtte være. Uten deres ord, smil, trygghet og barnepass, hadde jeg aldri kommet så langt som jeg har gjort.

Min ville, omsorgsfulle og fantastiske unge, **Chrisander** – takk for at du er den du er.

Tusen takk!

Namsos, mai 2021



Sunniva-Berly Mikalsen Gustavsén

Sammendrag

CMS hos voksen laks i sjø skyldes piscint myokardittvirus (PMCV). På grunn av utbrudd rett før slakt, kan sykdommen gi store økonomiske problem. Ved forsøk med PMCV i laks, er viruset påvist flere ganger, men ved bruk av parr er det derimot ikke så mye data. Med tanke på smitte modeller ville det å kunne bruke parr i stedet for smolt, redusere vannmengde, tid og karplass. Det er derfor i samarbeid med VESO Vikan ønskelig å påvise PMCV i lakseparr, og dermed om mulig utvikle en smitte modell med PMCV i parr.

I denne oppgaven ble det utført to delforsøk med kohabitantsmitte, hvor PMCV ble brukt som smitteagens. I det ene delforsøket ble det brukt 164 parr, mens i det andre ble det brukt 164 smolt. Det ble tatt vannprøver, blodprøver og uttak av organer til histologi og PCR, men det var kun histologi og PCR som ble brukt som analysemetoder. Prøveuttak ble foretatt hver uke i minst 12 uker etter smitte.

En kohabitant fra smoltforsøket døde, uten påvisning av patologi. Adferden var normal, og det ble ikke notert ytre eller indre patologiske symptomer. Ved histologi ble det funnet fokale områder med betennelsesceller i atriet tidligst ved 6 uker etter smitte (wpc) hos parr shedder, og ved 8 wpc hos parr kohabitant. Hos smolt ble det funnet tidligst ved 6 wpc hos shedder, og ved 7 wpc hos kohabitant. Scoren varierte fra 0,5 – 2. Hos milt ble det ikke funnet pseudolobulering, men en del blødninger/stuvninger som ikke tydet på patologi. Det ble ikke funnet nekrose i lever, men vakuoler og fargeforandringer av hepatocytter rundt blodkar, dette ble heller ikke ansett som patologi. qPCR detekterte PMCV ved 7 wpc, 9 wpc (kun shedder) og 12 wpc hos parr, og ved 9 og 12 wpc hos smolt shedder. Det ble ikke detektert virus hos smolt kohabitant. Ct-verdiene og antall infiserte individ økte med antall uker etter smitte. Shedderne hadde lavest Ct-verdi. Av shedderne og kohabitantene var det parr som hadde flest infiserte individer. Noen individer hadde både histopatologiske tegn og påvist PMCV ved qPCR, mens noen hadde bare en av påvisningene.

Etter forsøk med smitte modellen for smolt og analysemetodene histologi og qPCR, ble det påvist PMCV i lakseparr ved bruk av kohabitant smitte modell.

Forkortelser

UM	Umerket
FF	Fettfinnemerket
PMCV	Piscint myokardittvirus
CMS	Kardiomyopatisyndrom
P	Parr
S	Smolt
PS	Parr shedder
PK	Parr kohabitant
SS	Smolt shedder
SK	Smolt kohabitant
VESO	Veterinærmedisinsk oppdragscenter
WPC	Week post challenge
cDNA	Komplementært DNA
gDNA	Genomisk DNA
DTT	Ditiotreitol
Ct	Threshold cycle
RT-qPCR	Kvantitativ real-time polymerase chain reaction
DGR	Døgngrader (temperatur x døgn)
BC	Betennelsesceller
QS	Quantiscrypt
I.P.	Intraperitoneal injeksjon
I.M.	Intramuskulær injeksjon
PD	Pankreassykdom
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse
PRV	Piscint orthoreovirus
QLT	Quantitative Trait Loci
dH ₂ O	Destillert vann

Innholdsfortegnelse

Forord	III
Sammendrag	V
Forkortelser	VI
Innledning	1
Bakgrunn	3
2.1 <i>Atlantisk laks</i>	3
2.1.1 Livssyklus	3
2.2.2 Oppdrettsnæring – livssyklus, sykdom og forsøk	4
2.2 <i>Kardiomyopatisyndrom</i>	6
2.2.1 Piscint myokardittvirus	7
2.2.2 Klinikk og patologi	8
2.2.3 Smitte, diagnose og bekjempelse	12
Problemstilling	13
Materialer og metoder	14
4.1 <i>Smitteforsøk</i>	14
4.1.1 Fisken	14
4.1.2 Karmiljø og røkting	15
4.1.3 Viruset	16
4.1.4 Intraperitoneal injeksjon av PMCV	16
4.1.5 Forsøksoppsett	17
4.2 <i>Prøveuttak og analyse</i>	18
4.2.1 Vannprøve	18
4.2.2 Blodprøve	19
4.2.3 Histologi	20
4.2.4 Kvantitativ RT-PCR (qPCR)	28
Resultater	35
5.1 <i>Parr</i>	35
5.1.1 Vekt og karmiljø	35
5.1.2 Dødelighet og observasjoner	37
5.1.3 Histologi	39
2.2.3 qPCR	50
5.2 <i>Smolt</i>	52

5.2.1	Vekt og karmiljø	52
5.2.2	Dødelighet og observasjoner	54
5.2.3	Histologi	56
5.2.4	qPCR	67
Diskusjon		68
6.1.1	Vekt og karmiljø	70
6.1.2	Dødelighet og observasjoner	72
6.1.3	Histologi	73
6.1.4	qPCR	75
Tanker til videre arbeid		77
Konklusjon		78
Referanseliste		79

Innledning

Hvis man går 50 år tilbake i tid, var fisken og også laksen noe å livnære seg på. Små, rimelige og enkle merder ble bygd, og oppdrettsnæringen fikk en start. Ved produksjon av flere fiskearter, har laksen utpekt seg som en av de beste oppdrettsfiskene. Både helsedirektoratet og Helsenorge anbefaler at vi spiser 300-450 gram ren fisk hver uke, hvorav 200 g av dette bør være fet fisk som f.eks. laks. Dette anbefales fordi laksen består av rikelig med fiskeolje og EPA/DHA (lange flerumettede omega-3-fettsyrer). Nasjonal og internasjonal forskning har kommet fram til at risikoen for hjertesykdom og hjertesvikt reduseres ved inntak av fet fisk. I tillegg inneholder fisken flere gode næringsstoffer som f.eks. vitamin D og B12 og proteiner [1].

Man ser at lakseproduksjonen øker parallelt med folkets interesse for fisk som hverdagskost. Sammen med økning av produksjon, har også sykdomsbildet for fisken blitt større. Flere bakterier, virus og parasitter, gjør det vanskeligere å holde fisken frisk. Samtidig har det gitt oss grunnlag for å øke kompetansen rundt patogener, og forebyggende- og bekjempelsesmetoder. Og denne kunnskapen har igjen gjort at helsesituasjonen i norsk oppdrett har blitt forbedret.

På grunn av tettheten mellom fiskene som oppstår i en oppdrettsmerd, kan det ofte utvikle seg patogener og parasitter. Det er flere truende patogener og parasitter i oppdrettsnæringen, men i denne oppgaven er det fokusert på virussykdommen kardiomyopatisyndrom (CMS), også kalt «hjertesprekk». CMS kan bli diagnostisert hos nyutsatt fisk, og da først og fremst høstsmolt, men det største problemet er at sykdommen stort sett rammer stor fisk som er på sitt andre år i sjø, uten utbredte symptomer. Akutt dødelighet hos slakteklar fisk gir store kostnadsutfordringer, og er derfor et vidt tema innen forskningen [2].

CMS skyldes viruset piscint myokardittvirus (PMCV), som er nært beslektet med totivirus. Viruset er et nakent, dobbeltrådig RNA, og har et lite, usegmentert genom (koder for 3-4 proteiner). Det er motstandsdyktig for ytre miljøpåvirkninger, og smitter horisontalt. PMCV infiserer fiskens hjerte, hvor man ved histologi vil kunne se degenerasjon, nekrose og innfiltrering av lymfocytter og makrofager (betennesceller) i den spongiøse muskulaturen i for (atrium)- og hjerte-kammeret (ventrikkel) [3]. Den kompakte muskulaturen vil være upåvirket, noe som blant annet skiller CMS fra virussykdommen HSMB (hjerte- og skjelettmuskelbetennelse) [4].

Navnet «hjertesprekk» kommer av at forkammerveggen kan sprekke, og blodkoagel kan ses i hjertehulen. Slik påkjenning på hjertet fører ofte til sirkulasjonssvikt, og sekundære forandringer i milt og lever. I tillegg kan man makroskopisk se blødninger i hud, utstående øyne, ødem i skjellommer, mørk lever med fibrinlag, og evt. acites. Makroskopiske tegn kan være utelukket hos dødfisk til tross for hjerteforandringene [4]. Det at CMS er en kronisk sykdom, med evt. manglende symptomer skaper en utfordring med tanke på diagnostisering og behandling.

Man ser at for å kunne finne nye metoder for diagnostisering, forebygging og behandling, må det kjøres forsøk. Ved å kjøre forsøk kan man finne nye og bedre smitte modeller, som gjør at man sparer tid og penger, men også gjør at fisken ikke lider lengre enn den må. Ved smitteforsøk med PMCV har VESO Vikan smitte modeller for smolt, men ikke en fullstendig modell for parr [5]. For å vite om en parrmodell kan fungere og når i smitteforløpet prøver bør tas, må det kjøres et forsøk på det sammen med sikkert smoltforsøk. Ved kjøring av forsøk, tas det prøver ukentlig for å detektere virus. F.eks. kan man ta ut blodprøver til plasma eller serum, og organprøver til histologi og PCR. Vil man se mengden virus som fisken slipper ut i vannet, kan man også ta vannprøver som filtreres.

Bakgrunn

2.1 Atlantisk laks

Atlantisk laks (*Salmo Salar* L) er en av artene som går under laksefamilien, altså Salmonidae. Kjennetegnet til denne familien er fettfinnen, som befinner seg mellom ryggfinnen og halefinnen. De fleste artene er anadrom, som vil si at fisken i løpet av livssyklusen gyter i ferskvann og vandrer senere til sjøvann for et større matutvalg – deriblant laksen [6].

2.1.1 Livssyklus

Laksen starter livet sitt i ferskvann, mer spesifikt elver. Rognkornene som er 5-7 mm i diameter, klekkes i april-mai og ut kommer små plommeseckkyngel. Plommeseckkyngelene er ca. 20 mm, og har som navnet sier – en plommeseck. Næringen i plommesekken består stort sett av fett og protein, som yngelen lever av i 5-6 uker. Yngelen begynner å spise, og endrer fasong, og får deretter navnet parr. Navnet kommer av parrmerkene, som er fiskens kamuflasjedrakt. Som parr svømmer den i elva i minst ett år – avhengig av temperatur og mattilgang [6].

Når parren har nådd en størrelse på 11-12 cm, begynner den å bli klar for å vandre ut i sjøen. Først må den gjennom smoltifisering. Smoltifisering består av prosesser som endrer fysiologien, adferden og morfologien til fisken. For å kunne opprettholde væske-saltbalansen, må laksen gå fra å ta opp salter og skille ut vann i ferskvann, til å kunne holde på vannet og kvitte seg med salter i sjøvann. Det er også et annet utvalg av mat i det marine miljøet, som gjør at stoffskiftet må endres. Og på grunn av lavere oksygenkonsentrasjoner i sjøen, blir hemoglobinet i blodet endret. Atferdsmessig går laksen fra å være territoriell, aggressiv og motstrøms, til å bli mer pelagisk, medstrøms og begynner å svømme i stimer. Morfologisk blir fisken slankere, på grunn av reduksjon i kondisjonsfaktoren, og øking av fettforbrenning. Parrmerkene forsvinner og laksen får en mer sølvfarget drakt, med mørkere finnetupper [6].

Miljøet er en kraftig påvirkningsfaktor på laksens smoltifisering, som for eksempel temperatur, lys, vannparametere og næringstilgang. Laksen kan være opp til fem år før den er ferdig smoltifisert. Hvis den ikke kommer seg ut i saltvann etter smoltifiseringen, vil den desmoltifiseres (gå tilbake til et tilpasset liv i ferskvann) [6].

Som ferdig smoltifisert laks vil den vandre til sjøvann på våren. Etter utvandring vil den oppholde seg i sjøvann i ett til fire år. Når den har fått i seg nok næring, og er klar for å bli kjønnsmoden, vandrer den tilbake til elva – ofte samme elva som den ble født i.

Kjønnsmodne lakser blir mørkere, og hannen får en såkalt krok på underkjeven. Hunnene ordner en grop i grusen for å gyte, og gytingen skjer oftest i oktober-november. Eggene blir befruktet av melken til en hann i gropen som hunnen har gytt dem i [7].

2.2.2 Oppdrettsnæring – livssyklus, sykdom og forsøk

Fiske har foregått over alt i verden siden tidenes morgen. Oppdrettsnæringen har gradvis økt i volum og verdi, og i 1999 var første gangen at oppdrettsnæringa hadde større verdi enn tradisjonelt fiske i Norge. Gjennombruddet for oppdrettsnæringa kom på 1970-tallet, som ei tilleggsnæring for bønder og fiskere langs kysten. 1970 var altså året hvor oppdrett i merder ble en begynnende suksess. I 1981 gikk fiskeoppdrett fra å ligge under Landbruksdepartementet til Fiskeridepartementet. For å unngå at fiskerinæringa skulle sentraliseres, ble det krevd konsesjoner fra de som ville drive med oppdrett. På 1980-tallet ble det delt ut flere konsesjoner, som gjorde at produksjonen økte. Produksjonen har gått litt opp og ned, men i 2019 ble solgt laks til en verdi av 68 milliarder kroner [8].

I oppdrett prøver man å følge laksens naturlige syklus så godt som mulig, men man vil ofte at prosessen skal være hurtigere og lagt opp til en mer helårlig produksjon. For å få det så naturlig som mulig, blir stamfisken flyttet over i ferskvann. Når stamfisken er klar til å gyte, strykes rogn ut av hunnen, og melke ut av hannen, og rogn og melke blandes. Rogna står på en gitt temperatur (aldri over 8°C). Når rogn har nådd 360-400 døgngader (dgr), blir den normalt sendt til en settefiskprodusent. Befruktet rogn blir lagt i klekkebakker/renner/kar – alt etter fasilitetene til settefiskanlegget. Hvite rognkorn (døde) blir plukket daglig, for å unngå oppblomstring av sopp. Rogna er ferdig klekket ved 510 dgr, og ligger da i klekkeskap i ca. 400 dgr etter klekking, og benytter seg av plommesekken. Yngelen settes i startfôringskar og begynner tilvenning av fôr. Laksen går over til å bli parr, og ved bruk av lysstyring gis fisken et vintersignal. Dette består av seks uker med tolv timer lys og tolv timer mørke, etterfulgt av seks uker med kontinuerlig lys [9]. De senere årene har det blitt mer vanlig med bruk av supersmolt, hvor fôret inneholder fritt tryptofan (aminosyre) og en sammensetning av ioner og aminosyrer. Via hjernen stimulerer tryptofan til smoltifisering, og sammensetningen opprettholder osmoregulering og hindrer desmoltifisering. Ved å bruke denne metoden unngår man å miste tilvekst på grunn av mørkeperioden [10].

Når laksen er ferdig smoltifisert, blir den fraktet med brønnbåt til et matfiskanlegg og satt i merder i sjø. Ved 0-åringer vil fisken bli satt i sjø samme året som den ble klekt, mens 1-åringer vil bli satt i sjø året etter. I merdene vil fisken vokse til den har en slaktevekt på 4-5 kilo. Den blir da fraktet med brønnbåt til et slakteri [9].

Ved alle prosessene som foregår i en produksjonssyklus er det viktig å hindre smittespredning og forebygge sykdom. Allerede ved rognmottak blir rogn desinfisert, for å unngå smitte av eventuelle patogener i rognvæska. Videre i produksjonen prøver man stort sett å desinfisere blant annet utstyr, transportfartøy og kar. Man unngår å blande fisk fra ulike settefiskanlegg og lokaliteter. Brakklegging av bekjempelsessoner kan forekomme ved alvorlige smittsomme diagnostiserte sykdommer, for å få kontroll på smitten. I tillegg til smitteforebygging er det også viktig at fisken har det så godt som mulig, og får beholde sin egenverdi. For å oppnå dette finnes det anbefalte velferdsbehov. Laksen må ha tilgang til næringsrik mat, og den må ha et vannmiljø med riktig innhold av diverse parametre, som f.eks. saltinnhold, pH, oksygen, og temperatur. Den må også ha plass til å kunne bevege seg, og unngå farer [11].

Ved en sammensetting av laks, patogen og miljø er det stor sjanse for at sykdom kan oppstå. Det påvirker spredning mellom miljø og patogen, stress mellom laks og miljø, og smittepress mellom laks og patogen. Som nevnt tidligere er tettheten til mange lakseindivider en påvirkende faktor for at sykdom skal opptre. En annen stor påvirkningsfaktor er driftsoperasjonen, hvor fisken blir håndtert. Håndtering av fisk kan virke stressende, og kan også gi resultater som skjelltap, rifter og sår. Hver for seg, og sammen utgjør dette en inngangsport for ulike patogener. Jo mer stresset og skadet fisken er, jo lavere terskel har den for sykdom [12].

Det er naturlig at når sykdom først oppstår, må man prøve å begrense smittearealet og antall smittede individer. For å få kunnskap om hvordan man skal kunne forebygge og begrense de ulike sykdommene som er tilstede per dags dato, er forskning en viktig del.

Mot CMS hos laksefisk har det blant annet blitt kjørt forsøk for å oppnå genetisk resistens, motstandsdyktighet i forskjellige familier, forsøk med funksjonelt fôr, og vaksineforsøk. VESO Vikan kjører slike forsøk, men for å kunne gjøre det, selger de smitte modeller. Dette er et oppsett på smitteforsøk som de vet virker. Det består av hvor mye smittemateriale i forhold til smittevei (shedder/kohabitant, intraperitoneal injeksjon, intramuskulær injeksjon), antall individer, tidsperiode og prøveuttak.

2.2 Kardiomyopatisyndrom

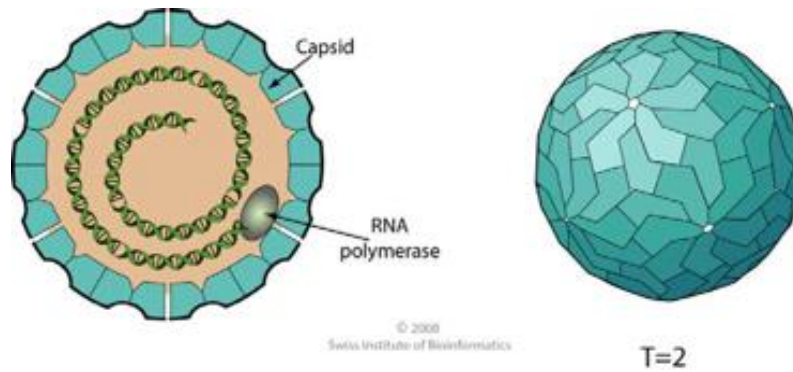
I forhold til andre infeksjonssykdommer rammer CMS stor og slakteklar laks. På grunn av at sykdommen svekker hjertemuskulaturen i forkammeret og blodkar, kan det bli en oppsamling av blod i hjerteposen (*perikard*), som deretter kan revne. Dette er årsaken til at sykdommen har fått navnet "hjertesprekk". Det var laks på Nordmøre som først ble omtalt med CMS, i 1985. Årene etter ble viruset også detektert på Færøyene, i Skottland, Irland og Canada [13]. I 2010 ble piscint myokardittvirus identifisert. Dette gjorde at nye verktøy og metoder for identifisering ble brakt på banen, og flere studier ble satt i gang. På grunn av dette ble det lansert et treårig forskningsprosjekt i 2015: "CMS-Epi - Epidemiologisk studie av kardiomyopatisyndrom: Utredning av spredning, risikofaktorer og sykdomsforløp i norsk lakseoppdrett". Denne omfatter studie basert på blant annet sykdomstegn, vertsrespons, PMCV, epidemiologi og bekjempelse. Det er gitt ut flere oppdaterte rapporter, som gir mer omfattende funn [14].

Siden sykdommen som oftest rammer fisken når den er slakteklar, og anlegget har investert store summer i produksjonen, kan sykdomsutbruddet gi store økonomiske tap. I senere tid er det også blitt oppdaget at sykdommen kan ramme fisken tidligere, allerede når fisken bare er 100-300 gram [15]. PMCV kan påvises fra 0-7 måneder etter sjøsetting. Det er også blitt funnet en sammenheng mellom settefiskleverandør og mulig utbrudd av CMS. PMCV kan overføres til yngel fra stamfisk, via assosiasjon mellom viruset og egget. Dette kan skje hvis viruset ikke blir fjernet ved desinfeksjon, eller re-kontaminering etter desinfeksjon. Det viser seg at fisk som blir satt ut på høsten har større risiko for CMS, enn fisk som blir satt ut om våren. Til tross for dette er det ofte stressfaktorer som er årsaken til utbrudd, som håndtering, trenging og mekanisk avlusning [16].

I Fiskehelse rapporten 2020 står det at det var dobbelt så mange diagnoser fra januar til juli, enn i forhold til perioden august til nyttår. I tillegg var det i Norge flest utbrudd i Nordmøre og Sør-Trøndelag (produksjonsområde 6) [17].

2.2.1 Piscint myokardittvirus

PMCV har likheter med andre virus som er i familien *Totiviridae*, men er det første lignende viruset som kan infisere virveldyr, de andre infiserer sopp og parasitter. Som CMS viser, har viruset hjertemuskelceller som sitt infeksjonsmål. Via cellenes omgivelser blir viruset overført mellom cellene, dette til forskjell for totivirusene [18].



Figur 1: Oppbygging av virus i familien *Totiviridae* [13].

Viruset er lite, nakent, og har en proteinkappe som omslutter et dobbeltrådig RNA, og dermed ikke en ytre membran (figur 1). Som man ser på figuren over, er viruset rundt, med 50 nm i diameter. Det dobbeltrådet RNAet har tre gener, ORF1, ORF2 og ORF3. ORF1 koder for et kappeprotein med 861 aminosyrer, ORF2 koder for en RNA-polymerase med 726 aminosyrer, mens ORF3 har ikke strukturelle likheter med proteiner fra totivirusene. ORF3 har en lengde på 302 aminosyrer. Det virker som at disse ekstra genene spiller en rolle for virusets egenskap til å infisere nye celler via omgivelsene [13].

2.2.2 Klinikk og patologi

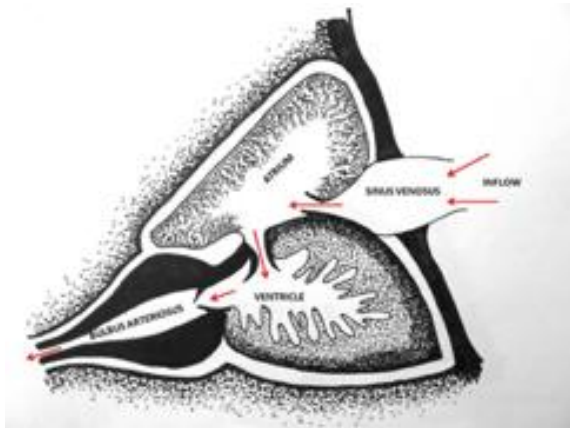
På grunn av evt. sene kliniske tegn, er det vanskelig å identifisere et påbegynt CMS-utbrudd. Det ble funnet i et feltforsøk at det kunne ta 3-13 måneder fra fisken var infisert til den viste kliniske tegn. På grunn av dette er det ikke vanlig med svimere, og fisken kan ha fin adferd og god appetitt frem til plutselig død. Hvis fisken skulle vise nedsatt allmenntilstand, ville det vært sløvhhet, nedsatt appetitt og deretter ytre symptomer som utstående øyne (exophthalmia), punktblødninger (petecchier) i buk, skjellødem og utspilt buk på grunn av ascites. Blødninger i buk, ødem og ascites kommer ofte av at det blir en oppsamling av blod på den venøse siden av hjerte, som en følge av dårlig hjertepumping. Denne nedsatte allmenntilstanden er da forårsaket av sirkulasjonsforstyrrelser [13]. Utviklingen av kliniske tegn kan være avhengig av hvordan viruset infiserer cellene, og hvordan det påvirker cellene. Hvis fisken allerede har underliggende sykdommer som svekker hjertet, kan risikofaktorer som stress og smitte med PMCV overbelaste fiskens hjerte [2]. Stressfaktorer som kan påvirke til utbrudd av CMS og individuell død ved utbrudd av CMS, kan blant annet være predatorer, transport og behandlinger. I tillegg til individuell plutselig død, er det vanlig at CMS opptrer som en kronisk sykdom med moderat dødelighet over lengre tid. Fram til en eventuell død, vil fisken mest sannsynlig vokse etter normal vekstkurve, ha normal kroppslig tilstand og naturlig tarminnhold [3].

Ved obduksjon er det vanlig å finne en mørk eller marmorert lever, ofte med et fibrinlag over levra, og ascites i bukhulen. På grunn av sirkulasjonsforstyrrelser, vil det også kunne forekomme blødninger i diverse organer. Når det gjelder hjertet vil atrium og *sinus venosus* være svullen. Det kan også være så ille at atrium revner og fører til blodkoagel i hjertehulen (figur 2) [13].



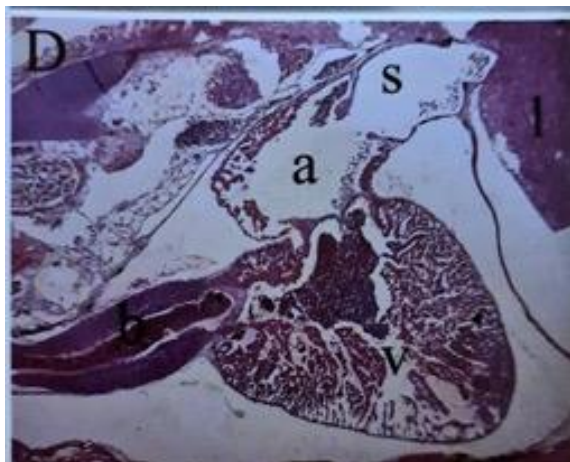
Figur 2: Obduksjonsfunn relatert til CMS. Viser koagulering i hjertehulen, og marmorert lever. [13].

Når det kommer til histopatologi vil forandringene starte i atrium, og deretter utvikle seg til ventrikkelen. Hjertet til laksen består av fire kammer (figur 3); *sinus venosus*, atrium (forkammer), ventrikkel (hjerterkammer) og *bulbus arteriosus*. Oksygenfattig blod pumpes fra muskler og organer i kroppen, og inn gjennom *sinus venosus*. Deretter pumpes blodet inn i atrium, videre til ventrikkel, gjennom *bulbus arteriosus* og til gjellene for påfyll av oksygen [13].



Figur 3: Anatomi av laksehjerte og retning av blodstrøm [13].

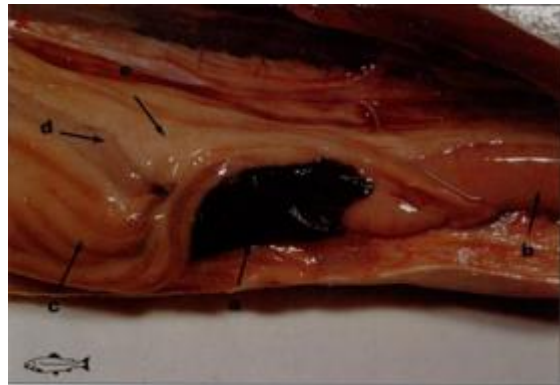
Histologisk sett er hjertet tredelt. Ytterst ligger epikard, deretter myokard, og innerst er det et lag som kalles endokard. Epikardet og endokardet består av epitel og bindevev, mens myokardet er et muskellag. I atrium går muskelcellene innover i lumen i trabekler, som gir et litt uryddig inntrykk. Endokardet hos atriet er høyere enn hos ventrikkelen. I ventrikkelen er det et ytre kompakt muskellag som kalles compactum, og et indre spongiøst lag som kalles spongiosum. I spongiosum er det også trabekler, og disse er tykkere enn i atriet [19].



Figur 4: Histologisk snitt av laksehjerte. s: sinus venosus, a: atrium, v: ventrikkel og b: bulbus arteriosus [19].

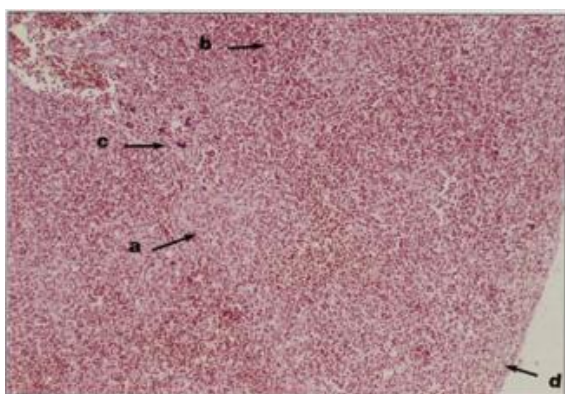
Endokardet vil være fortykket, og man vil kunne se betennesceller som mononukleære celler, lymfocytter og makrofager. I spongiøst myokard vil det også befinne seg nekrose. Det kan forekomme epikarditt (betennelse) på ytterflaten av hjertet ved alvorlige tilfeller. Virusset går på det spongiøse muskellaget, og det er derfor ikke vanlig å se betennesceller i det kompakte muskellaget. Siden betennelsen når atriet først, er det ofte mer infiltrasjon av betennesceller der, enn i ventrikkelen. På grunn av hjertesvikt vil det kunne vises forandringer i milt og lever [13].

Milt er et hematopoietisk (bloddannende) organ, og ligger stort sett i fettvevet caudalt for pankreas. Den er mørkerød (figur 5), og ofte litt avlang. Milten har en tynn kapsel, som kapsler inn rød og hvit pulpa. Rød pulpa er et erythrocyttproduserende vev, mens hvit pulpa er leucocyttproduserende [19].



Figur 5: Pil a markerer milten [18]

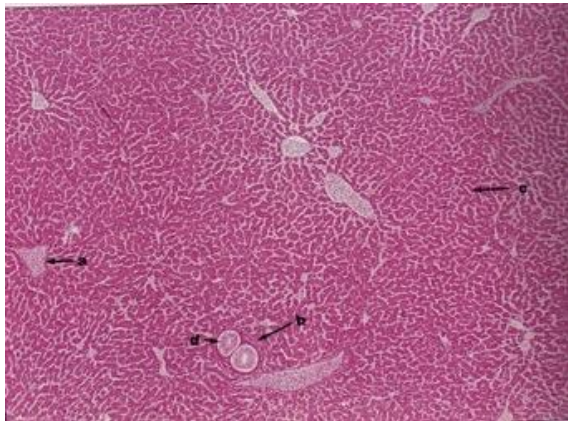
I stedet for muskelceller, har milten såkalte retikulære celler som støtteapparat. Blodet kommer inn i milten via en gren av *arteria gastrolienalis*, og deretter gjennom ellipsoider, som er glatt muskulatur i veggen. I sinusoider (åpne hulrom) renner blodet med både erythrocytter og leucocytter. Sinusoidene i milten kalles for lacuner, og gamle erythrocytter blir her fanget opp. Blodet ledes inn i venøse kapillærer, som videre blir samlet til *vena lienalis*. Via *vena portae hepatis* blir blodet sendt videre til leveren. Det er ofte å se brune pigmenter i milten, dette er melanomakrofager. Melanomakrofager akkumulerer forskjellige nedbrytningsprodukter, ved problemer for utskillelse av disse produktene [19].



Figur 6: Histologisk bilde av milt. Hvit pulpa (a), rød pulpa (b), melanomakrofag (c) og kapsel (d) [20].

Ved forandringer i milten som sekundærskade, kan det forekomme lyse drag. Dette er områder som er mindre cellerik, og kalles for pseudolobulering [21].

Lever er et viktig og metabolsk organ. Levra ligger cranialt i bukhulen, og har en rødbrun farge. Den får tilført oksygenrikt blod fra *arteria hepatica*, og venøst blod fra *vena portae hepatis*. Levra har flere funksjoner, som blant annet styring av aminosyre-, karbohydrat- og fettstoffskiftet. Den lagrer vitaminer, fett og glykogen, og produserer galle. I sinusoider blandes venøst og arterielt blod, før det blir ledet gjennom sentralvenene. Cellene i levra er stort sett hepatocytter, som er polygonale og har en sentralt lokalisert kjerne. I sentrum av en tubulær struktur danner hepatocytterne et gallekapillær som ender i galleganger, og gallegangene er kledd av høye sylinderepitelceller. I mellom tubulære strukturer går det sinusoider [19].



Figur 7: Lever hos laksefisk med sentralvene (a), portaområde (b), hepatocytter (c) og gallegang (d) [20].

Histologiske forandringer i leveren kan være multifokale nekroser [18]. Det vil også kunne være betennelsesforandringer i leverkapselen [6].

Like sykdommer som pankreassykdom (PD) og hjerte-og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) gir mye av de samme symptomene. Disse gir også nekrose i myokard, men i alle lagene i ventrikkel. I forhold til CMS gir disse sykdommene betennelse i rød skjelettmuskulatur, og PD forårsaker nekrose i eksokrint pankreasvev. Ved HSMB kan man, i likhet med CMS se levernekroser [22].

2.2.3 Smitte, diagnose og bekjempelse

Vannbåren smitte (horisontal) mellom fisk og anlegg er det vanligste. Fisk som er infisert med PMCV kan frigi viruset fra cellene, og skille det ut gjennom feces til omgivelsene, og deretter smitte frisk fisk [13]. Selv om troen har vært at smitten kun forekommer horisontalt, viser et prosjektarbeid utført av Veterinærinstituttet at viruset også er blitt gjenkjent i rogn og yngel fra infisert stamfisk. I tillegg spiller det en rolle hvilket settefiskanlegg fisken kommer fra, uvitende om det er genetisk eller miljøbasert påvirkning. Grupper som har hatt forekomst av PD eller HSMB har større mulighet for å utvikle CMS. Det samme gjelder fisk som blir satt i anlegg som tidligere har hatt utbrudd av CMS. PMCV er et virus som enkelt kan blomstre ved at fisken blir utsatt for stress [16].

For å kunne diagnostisere CMS må det til flere analysemetoder, som støtter hverandre. Ved plutselig død, blir det ofte sjekket etter histopatologiske funn, og virusmengde forsøkt detektert ved bruk av RT-qPCR (kvantitativ reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qPCR)). Det kan forekomme ytre kliniske tegn, og symptomer på CMS ved obduksjon. For analyse er nok hjertet det vanligste organet å analysere, siden hjertet er målorganet til viruset. Ved 4 og 8 uker etter smitte (wpc) kan det forekomme høy virulens i hjerte, milt og nyre [23]. Ved å spinne serum fra blod kan man bruke det til qPCR, eller for å detektere antistoffer ved bruk av ELISA. Histologi blir som nevnt brukt for å mikroskopere organer, og sjekke etter unormale vevsforandringer som kan tyde på patologi. Dette er en tjeneste som tilbys av bedrifter med laboratoriske verktøy for slik gjennomføring. Dette gjelder også for screening med qPCR, en metode som blir brukt for å detektere virus, og virusmengde. Ved qPCR vil en Ct-verdi på mindre enn eller lik 36 være positive, mens 37-40 kan være et tegn på tidlig infeksjon eller forurensning [24]. Ved interesse av virusmengde i vann opp mot kohabitantsmitte, kan det tas vannprøve som filtreres,

Kardiomyopatisyndrom er ikke en listeført sykdom, og det er heller ikke vaksine mot sykdommen. Derimot er det salg av CMS-QLT (Quantitative Trait Loci)-smolt. Blant annet kunne SalmoBreed etter rognsesongen 2018/2019 lansere CMS-QLT. Ved bruk av genetikken viste det seg i et forsøk kjørt hos VESO Vikan, at fisken med QLT hadde lavere virusmengde og mindre hjerteskader [25]. På grunn av lite hjelpemidler når det kommer til forebygging og bekjempelse av CMS, er det viktig at fisken blir håndtert riktig – uten for mye stress. Det er også vist at rett ernæring, for eksempel økt mengde EPA og DHA gjør at fisken blir mer motstandsdyktig mot virussykdommer [26].

Problemstilling

På grunn av økonomiske konsekvenser for oppdrettere og velferdsproblemer hos laksen, er utvikling av forebyggende tiltak nødvendig. Som de fleste andre virus er det heller ikke blitt utviklet en funksjonell vaksine mot PMCV, men det er kommet CMS-QLT-smolt på markedet. Man vet at stress er en faktor for sykdomsutbrudd, men man vet lite om virusets biofysiske egenskaper [2]. Dette gjør at man trenger verktøy for å kunne finne mulige problemløsninger.

Det er erfart at gode smitte modeller spiller en vesentlig rolle innen forskningen av sykdomsforløpet til CMS, med PMCV som årsak. Smitte modeller med PMCV for smolt finnes og er effektive [5]. På grunn av høye kostnader basert på vannforbruk og tid, er det derfor interessant å utvikle en smitte modell med PMCV for lakseparr. Dette vil redusere vannforbruket, og i tillegg gi rom for flere forsøk på grunn av redusert tid. For å kunne utvikle en slik modell, må det dokumenteres at smitte materiale gir utslag og et sykdomsforløp i smitte med PMCV i parr.

Hovedmål

Hovedmålet til denne oppgaven er å finne ut om lakseparr (*Salmo Salar* L) er mottakelig for piscint myokardittvirus (PMCV) i en kohabitant smitte modell.

Påvise piscint myokardittvirus (PMCV) i Atlantisk lakseparr (*Salmo Salar* L), ved bruk av ferdig utviklet smitte modell for smolt som kontroll.

Delmål

- Å gjennomføre et kohabitant smitteforsøk med PMCV i lakseparr. En tilsvarende studie vil gjennomføres i laksesmolt som kontroll og sammenligningsgrunnlag.
- Velferd og dødelighet hos parr og smolt smittet med PMCV vil følges opp gjennom hele forsøksperioden.
- For å se på patologi og vevsskade i ulike organer i lakseparr og smolt etter PMCV-smitte, vil prøver tas ut på flere tidspunkter og analyseres ved hjelp av histologi og histopatologi. Både sheddere og kohabitanter vil undersøkes.
- Mengde virus i ulike organer etter PMCV-smitte vil undersøkes ved hjelp av qPCR ved flere tidspunkter etter smitte.

Materialer og metoder

VESO Vikan er et veterinærmedisinsk oppdragscenter, lokalisert 2 mil utenfor Namsos. I deres fasiliteter og i samarbeid med dem, ble det kjørt et forsøk med piscint myokardittvirus (PMCV). Dette forsøket besto av to delforsøk:

- Et forsøk med parr i ferskvann
- Et forsøk med smolt i sjøvann.

Delforsøkene startet høsten 2020, hvor parrforsøket gikk over 14 uker og smoltforsøket over 12 uker, begge ekskludert akklimatiseringstid. Tidslinjen ble bestemt ut fra tidligere forsøk gjort med PMCV på smolt, hvor det var vist at smitten ikke økte betraktelig etter 12 uker. Før forsøket kunne starte, ble det sendt søknad til Norwegian Food Safety Authority National Assignments Department.

4.1 Smitteforsøk

På grunn av at det allerede var ferdig akklimatisert parr på Vikan, startet parrforsøket en måned tidligere enn smoltforsøket. Parren ble stikksmittet ved bruk av intraperitoneal injeksjon (i.p.) 12.08.20, og smolten 09.09.20. Forsøket ble utført etter en standard protokoll som ble skrevet for å få forsøket godkjent, og ble utført i henhold til Lov om dyrevelferd (Dyrevelferdsloven, LOV-2009-06-19-97) og Forskrift om bruk av dyr i forsøk (FOR-2015-06-18-761).

4.1.1 Fisken

Både parren og smolten var Atlantisk laks (*Salmo Salar L.*), og ble levert fra VESO sitt eget klekkeri på Skorstad. Rogna kom fra avlsstasjonen Stofnfiskur Vågavik på Island, et firma i Benchmark. På klekkeriet ble rogn desinfisert før den ble lagt i klekkeskap. Parren var restfisk fra et tidligere forsøk, noe som gjorde at den hadde blitt akklimatisert. Smolten ble akklimatisert ved Vikan i ca. en uke. Ved oppstart hadde parren en snittvekt på 23,7 g, og smolten på 110,6 g. I tabell 1 under, vises noen nøkkeldata om fisken som ble brukt i forsøket.

Tabell 1: Nøkkeldata for fisken i delforsøkene med parr og smolt.

	PARR	SMOLT
STARTDATO	12.08.2020	09.09.2020
SLUTTDATO	19.11.2020	02.12.2020
ANTALL V/SMITTE	164	164
SNITTVEKT V/START	23,7 g	110,6 g
FÔRSTØRRELSE/AUTOMAT?	2 mm / Ja	3 mm / Ja
FÔRPROSENT	1-2	1-2
LYSREGIME	24:0	24:0
TEMPERATUR	12	12
SALINITET	0	25
KAR	1 m	1,5 m

4.1.2 Karmiljø og røkting

Ved Vikan ble fisken plassert i kvadratiske kar, med en størrelse som ble bestemt av forsøksleder ut fra biomassen. Parr ble holdt i 1-meterskar, mens smolt ble holdt i 1,5-meterskar. Ved daglig røkt ble det sjekket om lyset var på, om det var rett vannivå, hvordan adferden til fisken var, om luftekar og temperatur stemte, og om karet var rømmingssikkert.

Fôrmengden ble automatisk beregnet fra dag til dag, og ved dødelighet eller uttak ble mengden beregnet på nytt, slik at den bestandig var parallell med antall fisk i karet, og dens størrelse. Fôrmengden ble veid opp etter det, og fôret ble fordelt utover en fôrautomat. Ved bruk av fôrautomat fikk fisken fôret jevnt utdelt utover dagen. Fôret som fisken i forsøket fikk, var Skretting sitt Nutra Olympic 2 og 3 mm fôr.

Hver morgen ble det sjekket for dødfisk, og eventuell dødfisk ble plukket opp, identifisert, og som oftest ble det utført bakteriologi. For å holde god vannkvalitet og gi en hurtig tømning av rask og feces, ble karet tappet. Ved samme røkterunde ble fôrmengde, lufterør, vanntemperatur, flow og dødelighet registrert. I tillegg ble det målt oksygen eller flow hver mandag, og dette ble også gjort etter uttak av fisk eller ved oppstart av kar. På ettermiddagen ble det tatt en ny røkterrunde for å sjekke at alt sto greit til, at fôret på automatene hadde beveget seg, og at ingen fisk i karet var døde.

4.1.3 Viruset

På grunn av at dyrking av PMCV i cellelinjer er vanskelig, ble det fra CMS-diagnostisert fisk brukt vevshomogenat for eksperimentell overføring av PMCV [13]. Fra dette homogenatet har det ved dyrking in vivo og RT-qPCR blitt bekreftet at det ikke fantes andre patogener. Til dette forsøket ble det brukt smitte materiale fra en batch fra 2019, og dagen før smitte ble det tatt ut av fryseren for tining. Agenset ble hele tiden holdt på is.

4.1.4 Intraperitoneal injeksjon av PMCV

Fisken ble smittet ved intraperitoneal injeksjon (i.p.), som vil si innsprøyting av smitte materiale i bukhulen. For å unngå feilstikk, ble fisken sultet 24 timer før smitte. 82 umerket (kohabitant) fisk ble flyttet fra akklimatiseringskaret, og til forsøkskaret. Ved bruk av overdose av Benzoak vet. ble ti fisk avlivet, og brukt til null-prøver (kontrollprøver) (viser til punkt 4.2 om prøveuttak).

På grunn av størrelsen til smolten, måtte den beroliges før smitte for å gjøre det enklere å håndtere fisken. Dette ble gjort ved å sedere den med AQUI-S vet. (Isoeugenol 540 mg/ml). Før bruk ble flasken ristet godt, og det ble laget en stamløsning fortynnet i forholdet 1:10 AQUI-S vet. og ferskvann ved 20°C. Ved sedasjon for enklere håndtering lå doseringen på ca. 2-5 mg/l, som tilsvarte 0,4-0,9 ml løsning per 100 liter karvann. Ved bruk av AQUI-S i kar var det nødvendig med luftestein for å sikre tilstrekkelig oksygenkonsentrasjon.

Før oppstart av smitte ble det gjort klart to baljer og en bøtte. I den ene baljen ble det tilsatt 10 liter vann fra karet, og 2,7 ml med Benzoak vet. 20%. Mengden Benzoak vet. ble brukt i henhold til standard operasjonsprosedyre for anestesi, sedasjon og avlivning av fisk, hvor det sto 10 L vann og 2,5-3 ml Benzoak vet. I den andre baljen og bøtten var det rent karvann. Fra karet ble fisken håvet over i baljen med bedøvelse. Da fisken var nok sedert, ble fettfinnen avklipt og fisken ble merket shedder. Deretter ble fisken lagt i baljen med karvann, hvor den ble injisert med 0,1 ml smitteagens. Under hele smitteprosessen ble smitteagenset holdt på is.

Til selve stikkprosessen ble det brukt 1 ml engangssprøyte, og stålkanyle. Nålstørrelsen på kanylen var 3 x 0,7 mm. Ved stikking ble fisken holdt med buken opp, og nålen ble holdt i 45° vinkel en bukfinnelengde foran bukfinnene. Nålen penetrerte deretter gjennom bukveggen, og smitteagenset ble presset sakte ut. Fisken ble deretter lagt i en bøtte, og flyttet til et annet kar sammen med kohabitantene. Til sammen var det 82 fisk som fikk merkingen FF (fettfinne), og ble sheddere.

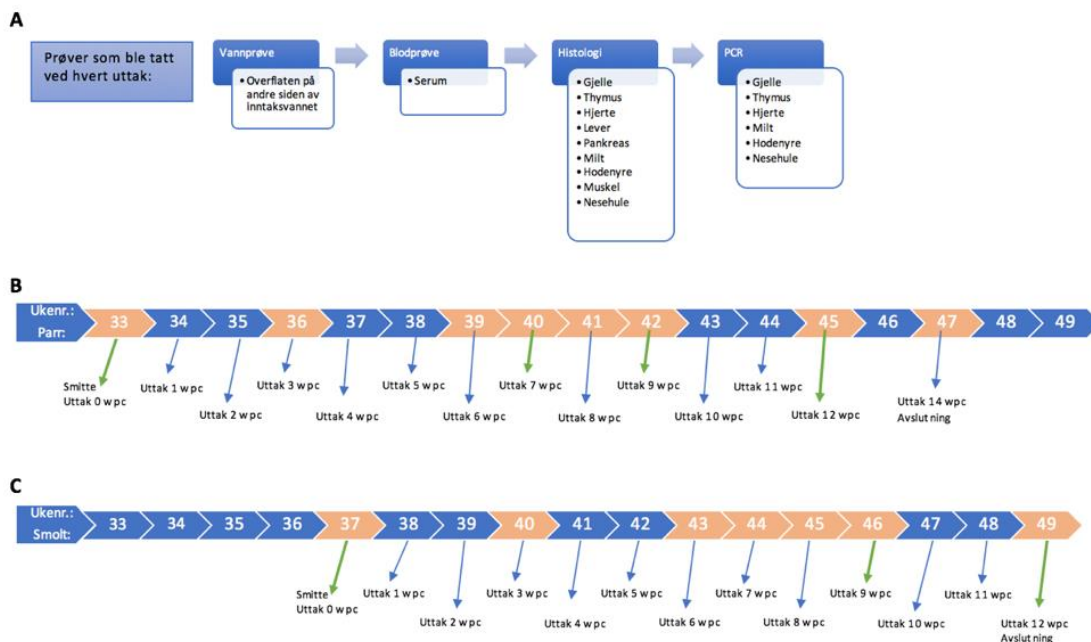
4.1.5 Forsøksoppsett

I protokollen ble det lagt med et par enkle oppsett på delforsøkene. Tabell 2 under viser hvor mange fisk i hvert delforsøk som ble smittet med PMCV, og ble merket sheddere.

Tabell 2: Oversikt over oppsett av antall sheddere og kohabitanter i hvert delforsøk.

Gruppe	Fra kar	Til kar	Antall	Merking	Smittemetode	Volum ml/fisk	Agens
Parr Shedder	L-11	I-4	82	Fettfinne	I.P.	0,1	PMCV
Parr Kohab.	L-11	L-4	82	Umerket	-	-	-
Smolt Shedder	L-13	L-12	82	Fettfinne	I.P.	0,1	PMCV
Smolt Kohab.	L-13	L-12	82	Umerket	-	-	-

Figur 8 under gir en oversikt over når de forskjellige prosessene i forsøket ble gjennomført, og hva som ble gjort. Den viser når starten av hvert delforsøk var, når hvert uttak ble gjennomført, hvilke prøver som ble tatt, og hvilke organer som ble skjært ut ved prøveuttakene.



Figur 8: Skjematisert framstilling av tidslinje og oppgaver ved prøveuttak. Oversikt over stegene i forsøket (A), og hvilke uker de forskjellige stegene ble gjennomført i både parrforsøket (B) og smoltforsøket (C). Lyse piler indikerer uttak med histologiske analyser. Grønne piler indikerer uttak med utførelse av qPCR.

4.2 Prøveuttak og analyse

For å unngå innhold i tarm og redusere stressnivået til fisken, ble den sultet i 24-48 timer før prøveuttak. Fra hvert kar ble det tatt en vannprøve før sortering til prøveuttak. Før sortering ble smolten sedert med AQUI-S (slik som ved smitte), mens parren kunne håndteres uten sedering. Til sortering ble det brukt 2,7 ml Benzoak vet. til bedøvelse, og overdose av Benzoak vet. til avlivning. Fra hver gruppe (UM/FF) ble det sortert ut seks fisk, som ble avlivet og tatt prøver av. Ved uttak ble det tatt blodprøver, og organprøver til histologi og qPCR.

4.2.1 Vannprøve

Ved vannprøvetaking, ble det brukt en glassflaske til å ta en prøve av vannet på motsatt side av innløpet. Fra glassflasken ble vannet sugd opp i en 60 ml sprøyte. Det ble satt på et filter med 2,2 μm , og vannet ble deretter filtrert ut dråpe for dråpe i et falcon rør som rommet 50 mL (figur 9). Vannprøven ble fryst ved -20°C .



Figur 9: Filtrering av vannprøve

4.2.2 Blodprøve

Ved blodprøve ble det brukt utstyr som vacutainerrør som rommet 4 ml, holdere til rørene, og kanyler som var 0,7 x 25 mm. Nålen ble stukket ved midten av gattfinnen (figur 10), inn til ryggspylen og deretter trukket litt ut. Etter blodtakingen ble blodprøvene satt i kjøleskap (4-8°C) over natten, for at blodet skulle koagulere før sentrifugering.

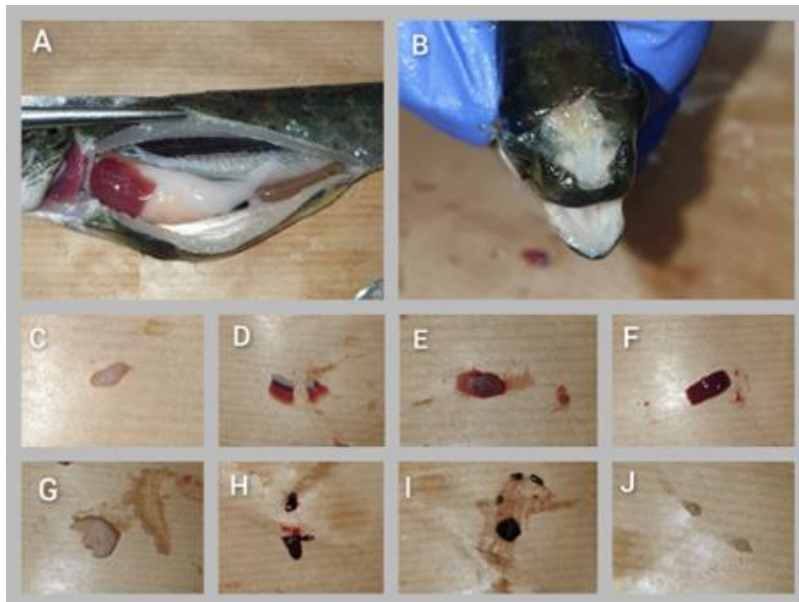
For å skille serumet fra blodet, ble prøvene sentrifugert ved 2000 rpm i 10 minutter ved 4°C. Deretter ble serumet pipettert over i eppendorfrør, og fryst ved -80°C.



Figur 10: Blodprøve av fisk under prøvetaking.

4.2.3 Histologi

Til oppbevaring av organer til histologi, ble det brukt 60 ml prøveglass, med 40 ml formaldehydoppløsning 4 % med fosfatbuffer. Dette for at det skulle være nok formalin i forhold til prøvene, altså 10 ganger mer væske enn volum av organer. På grunn av formalin, ble prøvetakingen holdt over avtrekk, for å unngå inhalering. Organbitene som ble skjært ut av fisken var maks fire millimeter tykke, dette for at formalinen skulle klare å trekke inn og fikserer hele vevsbiten. Fiksering ble gjort for å unngå diverse prosesser som skjer når individet dør og vevet ikke får tilgang på oksygen. Slike prosesser er for eksempel bakteriell nedbrytning, intracellulære prosesser, og autolyse. Ved fiksering blir i tillegg strukturen til vevet opprettholdt [27]. Til histologi ble det i begge delforsøkene tatt ut deler av gjelle, thymus, hjerte, lever, milt, pankreas, hodenyre, muskel og nesehule (figur 11).



Figur 11: Bilder av de forskjellige organene som ble tatt ut ved prøveuttak (Parr, 2 wpc). A: Indre organer. B: Åpnet inn til nesehule. C: Thymus. D: Gjelle. E: Hjerte. F: Lever. G: Pankreas. H: Milt. I: Hodenyre. J: Nesehule.

Fremføring

Etter at prøvene var tatt, og vevet fiksert, ble det "fremført". Dette ble gjort i en maskin som dehydrerte, klargjorde og parafinerde vevsbitene, slik at vevsstrukturen ble hard. Før selve fremføringen ble to flasker på 1000 ml med 70 % EtOH fylt. Ved bruk av 96% etanol og vann, måtte det fortynnes til 70 % ved bruk av formel 1 under.

Formel 1: Fortynningsformel:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \leftrightarrow V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$
$$V_1 = \frac{500 \text{ ml} \times 70 \%}{96 \%} = 364 \text{ ml med } 96 \%$$

$$500 \text{ ml} - 364 \text{ ml} = 136 \text{ ml vann}$$

Ved bruk av formelen over ble det regnet ut at i hver flaske ble det tilført 364 ml 96 % EtOH og 136 ml vann. Av organene hjerte, milt og lever ble halve organet lagt i en kassett.

Dette ble gjort fra både kohabitanter og sheddere, fra begge delforsøkene. Det ble gjort på individene 1-6 fra nullprøvene, og 1-3 fra 0, 3, 7, 9 og 12 uker etter smitte (wpc). Det ble i tillegg gjort på individ 1-3 hos sheddere 6 wpc, og 1-3 hos kohabitanter 8 wpc. For parr det ble også gjort på individ 4-6 ved 12 wpc, og 1-3 ved 14 wpc. Kassetten ble lagt i etanol over natten for at vevene skulle bli dehydrert (figur 12).



Figur 12: Bilder av skjærebrett med kutting av organer, og flasker med 70 % ethanol og kassetter med vevsbiter.

Til forberedelsen av innstøping i voks ble det brukt en fremføringsmaskin som kalles for Shandon citadel 1000 ("Jomfrua" på NFH). Denne ble brukt for å dehydrere, klargjøre og parafinere vevsbitene. Maskinen ble stilt inn Program A, step 1, og kassetene ble satt i posisjon 1. Som man ser i tabell 3 under, ble vevsbitene lagt i etanol for dehydrering, slik at alt vannet ble trukket ut. HistoClear ble brukt for å "klargjøre" vevet for at parafinen skulle kunne trekke igjennom hele vevsbiten. Til slutt lå kassetene med vevsbitene i parafinvoks.

Tabell 3: Oversikt over Program A i ("Jomfrua") [28].

Kar nr.	Tid og innhold (PROGRAM A)
3	2 timer 96% etanol
4	2 timer 96% etanol
5	2 timer 100% etanol
6	2 timer 100% etanol
7	1 timer 100% etanol + Xylen (HistoClear) (1:1)
8	1 time Xylen (HistoClear)
9	1 time Xylen (HistoClear)
10	1 time Xylen (HistoClear)
11	1 time Xylen (HistoClear) + Parafinvoks (1:1)
12	3 timer Parafinvoks (minimum 2 timer)
Totalt antall timer	15-16

Ved uttak da maskinen var ferdig ble prøvene heist opp, tatt ut og lagt i en voksprocessor

Innstøping

Maskinen for innstøping ble satt på om morgenen, siden den brukte litt tid før den hadde nådd 70°C. Kassetten ble lagt over i varmerom.

Størrelsen på metallbeholderne ble valgt ut i fra størrelsene på vevsbitene og antall vev. Noen få dråper med parafinvoks ble helt i beholderen, og vevsbitene ble lagt med snittsiden ned. Beholderen ble satt på kuldeelement for at bitene skulle sitte fast, før mer parafin ble tilført. Bunnens av kassetten ble lagt i beholderen som vist i figur 13 under. Da voksen hadde stivnet, ble beholderne lagt i kjøleskap. De ble ikke lagt på kjøleelement på grunn av erfaringer med at voksen sprekker (temperaturforskjeller).

Da voksen hadde vært i kjøleskapet i 30-40 minutter, kunne man enkelt fjerne beholderne fra kassetten. Voksblokkene ble lagt tilbake i kjøleskapet, og oppbevart der. Dette ble gjort for at voksen ikke skulle sprekke da blokkene ble lagt på is senere for snitting.



Figur 13: Øverste bilde viser vevsbitene i metallbeholder. Bildet nederst til venstre viser kassettbunn i beholder med voks i, mens bildet nederst til høyre viser ferdigstøpte blokker som er klar til snitting.

Snitting

Til forberedelse ble en vannbeholder med varme fylt med vann og satt på temperatur 42°C. Luftbobler fra vannbadet ble fjernet med forsiktige slag på siden av beholderen. Av andres erfaring ble det funnet ut at snittene ble best hvis blokkene ble lagt i isbad før snitting. Når en blokk var kald nok, ble den montert i mikrotomet, slik at organene var vendt framover. Ved første runde ble blokken bare trimmet ned til organene, og deretter lagt tilbake i isbadet. Da alle blokkene var trimmet, ble snittykkelsen stilt inn på 5 µm, og snittet til det kom ut fine snitt (figur 14). Blokkene lå i isbad underveis for å at forskjellen mellom voks og vev skulle minske, slik at voksen ikke ble porøs. Ved hvite eller krøllete vev ble knivbladet skiftet.

Snitt man ble fornøyd med la man over i vannbadet (figur 14). Fra vannbadet ble snittene tatt opp med et merket objektglass (figur 14), og plassert i en snittbeholder. Snittene ble deparafinert og tørket i varmeskap på 60°C i 30-60 minutter.



Figur 14: Tre bilder som viser prosessen av snittingen. Bildet øverst til venstre viser hvordan voksblokken var montert i maskinen. Bildet nederst til venstre viser når en snittbit ligger i varmebadet for å strekkes ut. Bildet til høyre viser snittene på objektglass.

Farging – Harris hematoxylin og Eosin Y (HE-farging)

Til farging av snittene ble det brukt HE-farging. Dette ble gjort etter en protokoll, som vist i tabell 4 under.

Tabell 4: Protokoll for HE-farging [29].

Histoclear	6 min		Vannskylning	90 s.
Abs. EtOH	90 s.		Eosin	90 s.
96 % EtOH	90 s.		96 % EtOH	90 s.
96 % EtOH	90 s.		96 % EtOH	90 s.
Vannskylning	90 s.		Abs. EtOH	90 s.
Hematoxylin	90 s.		Abs. EtOH	90 s.
Hematoxylin	90 s.		Histoclear	90 s.
Vannskylning	90 s.		<u>Total tid:</u>	<u>27 min</u>

Snittbeholderen med snittene ble flyttet fra beholder til beholder med de forskjellige løsningene ut i fra tabell 4 over. Da dette var gjennomført, ble et dekkglass lagt på objektglasset ved bruk av Eukitt quick-hardening mounting. Prøvde å unngå å få bobler. Deretter ble snittene tørket i avtrekksskap.

Scoring

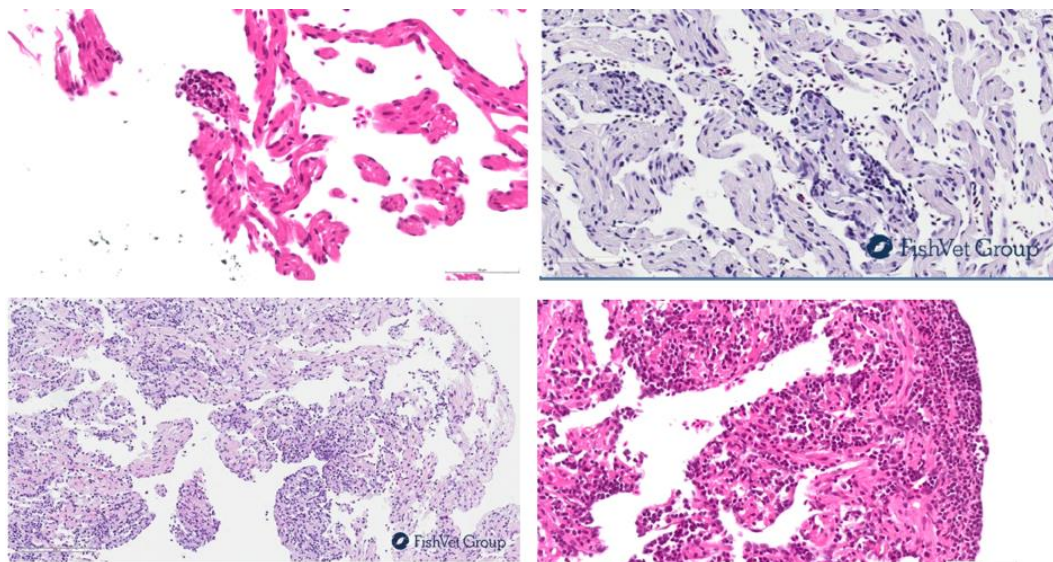
Da snittene var ferdige til bruk, kunne de mikroskoperes. Alle de tre vevene: hjerte, milt og lever, ble mikroskopert. Det ble sett etter forandringer i vevet, og evt. patologi. Ved forandringer ble det laget tabeller som viste hvilke individer som hadde de ulike forandringene.

For hjerte ble det laget et scoresystem for patologi i atriet/ventrikkel. For lever og milt ble det laget tabeller med +/-, som viste hvilke individer som hadde forandringene som ble funnet. Det ble i tillegg laget en tabell som viste hvor mange individer i hver gruppe som hadde de forandringene det ble sett etter (tabell 5).

Tabell 5: Modell av tabell som ble brukt under scoring av histologi.

Parr/Smolt	WPC					
	6	7	8	9	12	14
Shedder/i.p.						
Kohabitasjon						

Figur 15 under viser ulike scoringer av betennelse i atrium og ventrikkel hos fisk i sjøvann og ferskvann ved ulike uker etter smitte.



Figur 15: Betennelse i atriet/ventrikkel ved fra tidligere forsøk med PMCV. **A** viser score 0,5 hos kohabitant i ferskvann ved 12 wpc. **B** viser score 1 hos kohabitant i sjøvann ved 24wpc [30]. **C** viser score 1,5 hos shedder i sjøvann ved 8wpc [30]. **D** viser score 2 hos shedder i ferskvann ved 12 wpc..

For å kunne score betennelse i hjertet, ble det laget et scoresystem som vist i tabell 6 under. Denne er basert på scoringssystemet fra referanse [18], med noen endringer for å redusere scoringsområdet. Scoresystemet gikk fra 0,5 til 2, hvor score 0 ble merket med -. Ved et fokalt område med betennelsesceller (BC), eller BC som var litt spredt, ga det score 0,5. Ved et slikt fokalt område i tillegg til noen spredte BC og/eller fokal nekrose, ga det score 1. Ved flere fokale områder med BC (multifokalt) eller spredte og/eller multifokale nekroser fikk det en score på 1,5. Hvis det var overtall av BC i forhold til hjertemuskulatur, fikk det en score 2. Ved antydning til mer patologi, ga det en score på 2+.

Tabell 6: Oversikt over scoresystemet og hva som skal til for at et individ får de forskjellige scorene.

Score	Forandringer
0,5	Betennelsesceller fokalt (BC) eller noe spredt
1	BC fokalt + noen spredte BC eller/+ fokal nekrose
1,5	Multifokale BC eller flere spredte eller/+ multifokal nekrose
2	Multifokale BC + flere spredt, evt. med nekrose

4.2.4 Kvantitativ RT-PCR (qPCR)

Kvantitativ reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), ble brukt som en av analysemetodene i dette forsøket. qPCR ble brukt for å identifisere PMCV, og da bestemme forekomsten og mengden av den spesielle DNA-sekvensen til PMCV.

Standard PCR handler om termosykluser, som består av økning og redusering av temperatur. For å kunne utføre slike sykluser, er man avhengig av det originale DNAet, innholdet i DNA (deoksynukleotidene (dNTPs), primere (forward og reverse) og DNA-polymerase. Hver termosyklus består av tre steg: denaturering, annealing (primerbinding) og elongering. Under denaturering øker man temperaturen til 94-98°C for å bryte hydrogenbindingene mellom basene i det dobbelttrådig DNAet. Etter det første steget med denaturering har man to separerte DNA-tråder. I det neste steget som er annealing, senker man temperaturen til 40-65°C for at primerne (korte DNA-stykker, en forward og en reverse) skal kunne binde seg på rett plass. Denne plassen vil være ovenfor den sekvensen man vil ha, altså på 3'-enden. Ved det tredje steget, elongeringen, øker man temperaturen igjen til 72-80°C. Dette gjøres for at DNA-polymerasen skal kunne replikere fra 3'-OH-enden av primerne. DNA-polymerasen må derfor være varmeresistent. Etter en runde har man en fordobling, og DNAet fordobles ved hver syklus [31].

Ved bruk av qPCR er det et spektrofluorometer som via en lyskilde kan måle DNA-mengde via fluorescens, ved hver syklus. Dette er i forhold til generell PCR, hvor man får resultatene etter at reaksjonen er ferdig. For å kunne følge med akkumuleringen av PCR-produktet, må det tilføres et fluoriserende fargestoff, som øker parallelt med mengde produsert PCR-produkt etter hver amplifiseringssyklus. Dette fargestoffet er innholdet i en probe ved bruk av TaqMan. I proben er fluorophore bundet i 5'-enden, mens det i 3'-enden er bundet noe som kalles for quencher. Quencher er en inhibitor av fluorophore, som absorberer all fluorescens som kommer ut av fluorophore. Ved denaturering vil probe binde seg spesifikt til en sekvens på DNA-tråden. Ved elongeringssteget vil polymerasen starte å bryte ned proben, når den når fluorophoren. Når fluorophore er brutt ned og ikke er i nærheten av Quencher lenger, kan ikke Quencher absorbere fluorescensen, og fluorescensen detekteres i et qPCR-instrument [32].

For kvantifisering er det i qPCR fokusert på to verdier: threshold og Ct. Threshold er punktet hvor målt fluorescens ligger signifikant over bakgrunnsfluorescens, mens Ct er antall sykluser man trenger for å nå threshold. Ct-verdien øker parallelt med lavere virusmengde. Altså jo høyere Ct-verdi, jo mindre virus er detektert [32].

For å kunne gjennomføre denne metoden, måtte det som tidligere nevnt utføres et uttak av organer, blant annet hjerte. De to hjertespißbitene ble lagt på RNA-later til senere bruk. Før qPCR kunne utføres måtte RNAet i den ene hjertebiten isoleres, og komplementært DNA (cDNA) måtte syntetiseres fra RNA-templat via reverse transcription. De ulike stegene vises i figur 16 under.



Figur 16: Viser de fem stegene for kjøring av qPCR: uttak av organer, oppbevaring av organer i RNA-later, RNA-isolering, cDNA-syntese og qPCR.

PCR-bokser som inneholdt prøverør med RNA-later, fra Patogen ble brukt for å oppbevare organene. Det ble tatt ut prøver av gjeller, hjerte, thymus, milt, hodenyre og nesehule.

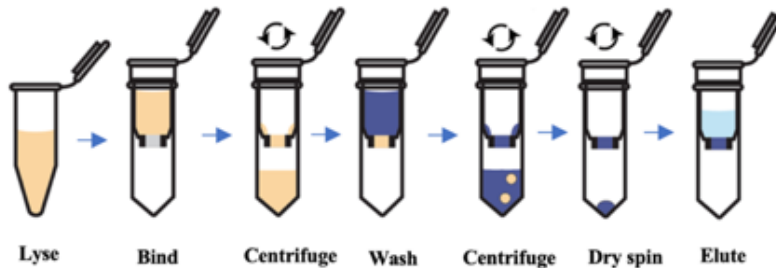
Organene ble delt i to og lagt i hvert sitt rør. Prøvene sto i kjøleskap i et døgn, før de ble satt i fryser ved -20°C.



Figur 17: Bilde av parr og rørene fra patogen med RNA-later. Bilde er tatt rett før prøvetaking.

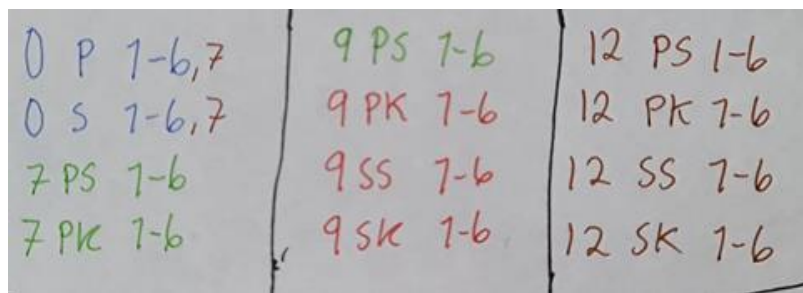
RNA-isolering

Til RNA-isolering ble det brukt Qiagen sitt RNeasy Mini Kit, og protokollen som fulgte med. Det ble brukt hansker ved all håndtering, og alt foregikk i avtrekksskap. Prosessen for RNA-isolering vises i figur 18 nedenfor.



Figur 18: Viser hva som ble gjort under RNA-isolering [33]

For å holde orden på alle rørene, ble hvert rør merket med merkesystemet vist i figur 19. Fargene i figur 19 viser hvilke som ble tatt i samme runde.



Figur 19: Merkesystem av rør - RNA-isolering. De første tallene beskriver hvilken uke etter smitte prøvene ble tatt. Bokstavene forteller om det var parr eller smolt, og om det var shedder eller kohabitant. Tallene til sist forteller hvilke individer det ble tatt prøver av. Fargene indikerer bare at de forskjellige prøvene ble gjort ved forskjellige runder.

Til vaskebufferen Buffer RPE ble det tilsatt 260 ml absolute ethanol (fire ganger volum av RPE (65 ml)). Det ble tilsatt 20 μ l 2M DTT (Ditiotreitol) per 1 ml Buffer RLT. DTT fungerte ved at det stabiliserte enzymer og proteiner, beskyttet tiolgrupper, og reduserte disulfidbindinger i peptider, proteiner og til sulfhydrylgrupper [34]. RLT inneholdt guanidine isothiocyanate som styrket bindingen RNA hadde til membranen i kolonnen (silica membrane) [35].

I første runde ble det tilsatt 950 μ l med ferdigblandet DTT og RLT over Qiagen 2 ml prøverør med kule, mens i de andre rundene ble det tilsatt 750 μ l. Endringene ble gjort fordi homogeniseringen i andre runde fungerte like bra med mindre buffer.

I hvert prøverør med RNA-later var det hjertespiiss delt i to. Med en kanylenål ble en av de to bitene lirket opp av røret, og tilsatt prøverørene med kule. Mellom hvert PCR-rør ble det byttet nål. Prøverørene med organbiten ble homogenisert ved 25 frekvens i to minutter i TissueLyser II, og deretter sentrifugert i 3 minutter ved 13000 rpm/16000 g i Biofuge.

Det ble pipettert 750 µl 70% etanol i 1,5 ml eppendorfrør i første runde, og deretter ble volumet redusert til 700 µl de andre rundene. Det ble pipettert 750 µl fra prøverørene med kule til eppendorfrør i første runde, og 700 µl i de andre rundene. Under selve pipetteringen ble løsningen blandet litt ekstra.

Fra eppendorfrør til kolonne med oppsamlingsrør ble det pipettert 700 µl, og spiss ble byttet mellom hver prøve. Rørene ble sentrifugert i 15 sekunder ved 9200 rpm, og restene tømt ut i første runde, men i de andre rundene ble oppsamlingsrøret byttet. Dette steget ble gjentatt.

Videre i prosessen ble restene tømt i en beholder for hvert steg i første runde, mens i de andre rundene ble oppsamlingsrørene byttet for å unngå forurensning. Det ble tilsatt 700 µl Buffer RW1 i kolonnen, og kolonnene ble spunnet i 15 sekunder ved 9200 rpm/8000 g. Buffer RW1 inneholdt guanidine-salt og etanol, og dermed vasket vekk biomolekyler som karbohydrater, fettsyrer og proteiner [36].

Det ble tilsatt 500 µl Buffer RPE, og kolonnene ble spunnet i 15 sekunder ved 9200 rpm, og oppsamlingsrør tømt/byttet. Deretter ble det på nytt tilsatt 500µl Buffer RPE, og spunnet i 2 minutter ved 9200 rpm. Buffer RPE fjernet alle saltrestene fra tidligere buffere. Oppsamlingsrør ble tømt/skiftet. Kolonnene ble så spunnet i ett minutt ved 13000 rpm, og oppsamlingsrør skiftet.

30 µl destillert vann (dH₂O) ble tilsatt kolonnene for å løse RNAet fra membranen. Kolonnene sto i ett minutt før de ble spunnet i ett minutt ved 9200 rpm for eluering. I første runde ble oppsamlingsrørene byttet, mens i de andre rundene ble det eluerte RNAet pipettert tilbake i kolonnen uten å skifte oppsamlingsrør. Kolonnene fikk igjen stå i ett minutt, før de ble spunnet i ett minutt ved 9200rpm.

RNAet (30 µl) ble pipettert fra oppsamlingsrør og over til eppendorfrør. Rørene ble en etter en satt på is, og deretter ble RNAet satt i en biofryser (-80°C). I første runde ble det målt konsentrasjon på to av rørene før frysing, for å sjekke at konsentrasjon og renhet var som forventet.

cDNA-syntese

cDNA-syntesekitet som ble brukt var QuantiTect Reverse Transcription Kit.

RNAet ble tatt opp og satt på is for å tine. Konsentrasjonen av RNAet ble målt i nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). Dette ble gjort ved først å tørke forsiktig av nanodrop med et linsepapir, og deretter pipettere en dråpe vann på 2 μ l. Vandråpen ble tørket av og det ble pipettert nye 2 μ l for å lage en blank prøve. Da den blanke prøven var stilt inn, ble det pipettert en dråpe på 2 μ l med RNA. Ved å se på forholdet $A_{260/280}$, kunne man sjekke om prøvene var rene nok. Verdier mellom 1,8 og 2,1 brukes å ansees som rent RNA, og en verdi rundt 2 er det man helst vil ha. Hos prøvene i denne oppgaven var $A_{260/280}$ mellom 1,95 og 2,17.

Konsentrasjonene for hver prøve ble ført inn i et regneark og deretter kunne man regne ut hvor mye RNA som skulle bli tilsatt cDNA, og hvor mye dH₂O. Totalt skulle det være 400ng, og et volum på totalt 12 μ l i hvert rør. Konsentrasjonen i RNAet ble vist som μ l/ng. For å regne ut inputen til cDNA-et ble formel 2 brukt.

Formel 2: Input til cDNA

$$\text{Input RNA} = \frac{\text{RNA konsentrasjon } (\mu\text{l/ng})}{400 \text{ ng}}$$

For å regne ut hvor mye dH₂O som skulle tilføres i hvert rør, ble formel 3 som vist under brukt.

Formel 3: Input dH₂O

$$\text{Input dH}_2\text{O} = 12 \mu\text{l dH}_2\text{O} - \text{Input RNA } (\mu\text{l})$$

Under viser figur 20 konsentrasjonene, inputene av RNA og dH₂O til alle prøvene.

PCR	Individ	Input							
		RNA cons. (ng/μl)	RNA (μl)	Vann (μl)					
UKE 0 P	1	51,2	7,8	4,2	UKE 12 PS	1	306,1	1,3	10,7
	2	52,2	7,7	4,3		2	327,0	1,2	10,8
	3	52,7	7,6	4,4		3	112,8	3,5	8,5
	4	119,7	3,3	8,7		4	126,8	3,2	8,8
	5	65,9	6,1	5,9		5	150,0	2,7	9,3
	6	74,6	5,4	6,6		6	193,9	2,1	9,9
UKE 0 S	1	48,4	8,3	3,7	UKE 12 PK	1	95,8	4,2	7,8
	2	246,3	1,6	10,4		2	116,8	3,4	8,6
	3	26,3	15,2	-3,2		3	54,8	7,3	4,7
	4	263,0	1,5	10,5		4	214,3	1,9	10,1
	5	418,7	1,0	11,0		5	105,0	3,8	8,2
	6	194,0	2,1	9,9		6	209,2	1,9	10,1
UKE 7 PS	1	97,8	4,1	7,9	UKE 12 SS	1	725,7	0,6	11,4
	2	109,1	3,7	8,3		2	446,1	0,9	11,1
	3	118,3	3,4	8,6		3	284,7	1,4	10,6
	4	121,4	3,3	8,7		4	563,0	0,7	11,3
	5	97,7	4,1	7,9		5	420,5	1,0	11,0
	6	44,3	9,0	3,0		6	165,8	2,4	9,6
UKE 7 PK	1	78,2	5,1	6,9	UKE 12 SK	1	243,5	1,6	10,4
	2	63,9	6,3	5,7		2	442,2	0,9	11,1
	3	40,9	9,8	2,2		3	510,9	0,8	11,2
	4	317,6	1,3	10,7		4	521,4	0,8	11,2
	5	131,1	3,1	8,9		5	429,2	0,9	11,1
	6	180,4	2,2	9,8		6	138,1	2,9	9,1
UKE 9 PS	1	65,0	6,2	5,8	UKE 0 P	7	45,6	8,8	3,2
	2	115,4	3,5	8,5	UKE 0 S	7	107,8	3,7	8,3
	3	74,0	5,4	6,6					
	4	116,6	3,4	8,6	Input:	400 ng			
	5	120,5	3,3	8,7	Total volum:	12 μl			
	6	139,4	2,9	9,1					
UKE 9 PK	1	114,81	3,5	8,5	gDNA wipeout buffer: 2 ul per prøve				
	2	166,35	2,4	9,6					
	3	62,94	6,4	5,6					
	4	172,74	2,3	9,7	cDNA syntese mastermix:	Antall prøver			
	5	172,12	2,3	9,7		μl	30		
	6	80,36	5,0	7,0	QS RT	1	30		
UKE 9 SS	1	200,47	2,0	10,0	QS RT buffer	4	120		
	2	205,23	1,9	10,1	RT primer mix	1	30		
	3	151,23	2,6	9,4					
	4	272,37	1,5	10,5	Totalt:	6	180		
	5	211,65	1,9	10,1					
	6	456,65	0,9	11,1	Minus RT:	Antall prøver			
UKE 9 SK	1	182,98	2,2	9,8		μl	2		
	2	139,85	2,9	9,1	H2O	1	2		
	3	262,23	1,5	10,5	QS RT buffer	4	8		
	4	273,24	1,5	10,5	RT primer mix	1	2		
	5	232,68	1,7	10,3					
	6	154,7	2,6	9,4	Totalt	6	12		

Figur 20: Regneark - input av RNA og dH₂O

Rett volum med dH₂O ble pipettert til alle rørene i stripsene, og deretter ble rett volum RNA pipettert til rett rør. Ved pipettering av RNA ble spiss byttet mellom hver prøve. Stripsene sto på is mellom hvert steg under hele prosessen. Det ble deretter tilsatt 2 μl gDNA wipeout buffer for å fjerne genomisk DNA. Stripsene ble raskt spunnet, og deretter inkubert i to minutter ved 42°C i en PCR-maskin.

Det ble laget en mastermix som besto av 1/6 del QS (Quantiscript) RT (enzym), 4/6 deler QS RT buffer og 1/6 del RT primer mix. Rørene med buffer og primer ble vortexet og spunnet raskt før pipettering, mens enzymet ble tatt rett fra fryseren. Mastermixen ble vortexet og spunnet raskt, før 6 μl ble tilsatt hvert rør i stripsene. Det ble også laget to rør hvor det ble tilsatt dH₂O i stedet for QS RT i mastermixen. Dette ble gjort for å teste forurensning med genomisk DNA i prøvematerialet. Stripsene ble spunnet og deretter satt i PCR-maskinen hvor de ble inkubert i 15 min ved 42°C, 3 min ved 95°C og holdt på 4°C tilslutt. Stripsene ble satt i fryser ved -20°C fram til kjøring av qPCR.

qPCR

Prøvene med cDNA ble fortynnet 1:5 med ultrarent vann. Det ble brukt en 96-brønners plate til kjøring av qPCR. Primerne og proben ble hentet fra VESO's tidligere forsøk, og hadde sekvensene:

PMCV-F: TTCCAAACAATTCGAGAAGCG


PMCV-R: ACCTGCCATTTTCCCCTCTT

PMCV probe: [6FAM]CCGGGTAAAGTATTTGCGTC[BHQ1]

Som fargestoff ble det brukt **TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG**, Applied Biosystems™ fra Thermo Fisher Scientific. I hver brønn ble det tilsatt en mastermix med innhold:

TaqMan Fast PCR master mix:	10 µl
Primer PMCV-F (10 µM):	0,80 µl
Primer PMCV-R (10 µM):	0,80 µl
PMCV probe (10 µM):	0,60 µl
RNase fritt vann:	3,80 µl

Tilsammen ble dette 16 µl mastermix. Totalvolumet per brønn skulle være 20 µl, det ble derfor tilført 4 µl cDNA. Alle prøvene ble gjort i dubletter, altså to brønner per prøve. Platene ble forseglet med film før de ble spunnet ned for at mastermixen og cDNA skulle samles nederst i brønnen. Deretter ble platene satt inn i maskinen. Ved bruk av 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) ble prøvene analysert med disse betingelsene (pilen viser at denaturering etterfulgt av annealing ble gjort i 40 sykluser):

Denaturering	1x	95°C	20sek
Denaturering	40x	95°C	3sek
Annealing		60°C	30sek

I tillegg til prøvene ble det testet noen som var laget uten revers transkriptase (-RT prøver), som negative kontroller for å sjekke om det var genomisk DNA i prøvene. Det ble også i noen prøver brukt rent vann i stedet for cDNA, som negativ kontroll for å sjekke om det var forurensning i reagenser eller vann.

Dataene ble eksportert til excel-format, hvor Ct var hvilken syklus genet ble detektert på, Ct mean var gjennomsnittet av de to dublettene, og Ct SD var standardavviket.

Resultater

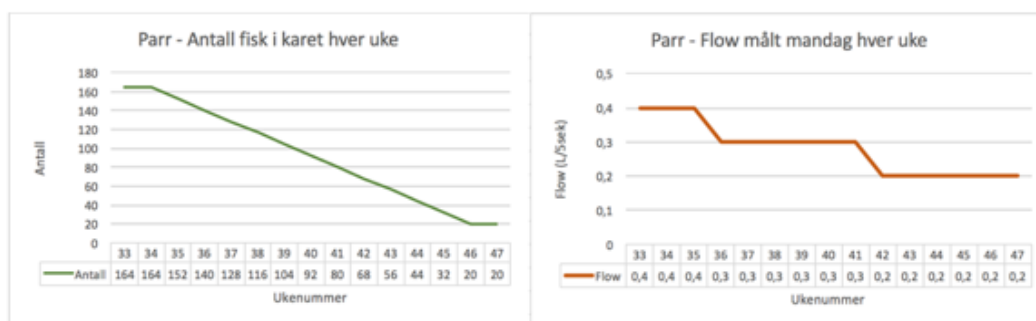
Forsøket besto av et kar med parr og et kar med smolt, hvor startantallet i begge karene var 174 stk. individer. Mengde fôr, flow og snittvekt ble beregnet til enhver tid i et dataprogram kalt Didre. Ved dødelighet eller uttak til prøver ble det registrert i Didre. Faktorer som blant annet antall individer i karet, temperatur og salinitet bidro til beregning av fôrmengde, flow og snittvekt av fisken. Hver dag ble adferden til fisken observert og adferd utenom det normale ble registrert. Ved prøveuttak ble det stort sett sjekket for ytre og indre skader av fisken. Vevsstrukturen ble sjekket ved bruk av mikroskop, og virusmengden ble sjekket ved qPCR.

5.1 Parr

Forsøket med parr ble startet litt tidligere enn forsøket med smolt. Dette fordi det allerede var parr på Vikan, mens smolten ble klar senere. Forsøket med parr ble kjørt i 14 uker, med prøveuttak hver uke, bortsett fra uke 13 etter smitte. Dette var på grunn av at det ikke var nok fisk til et uttak i uke 13.

5.1.1 Vekt og karmiljø

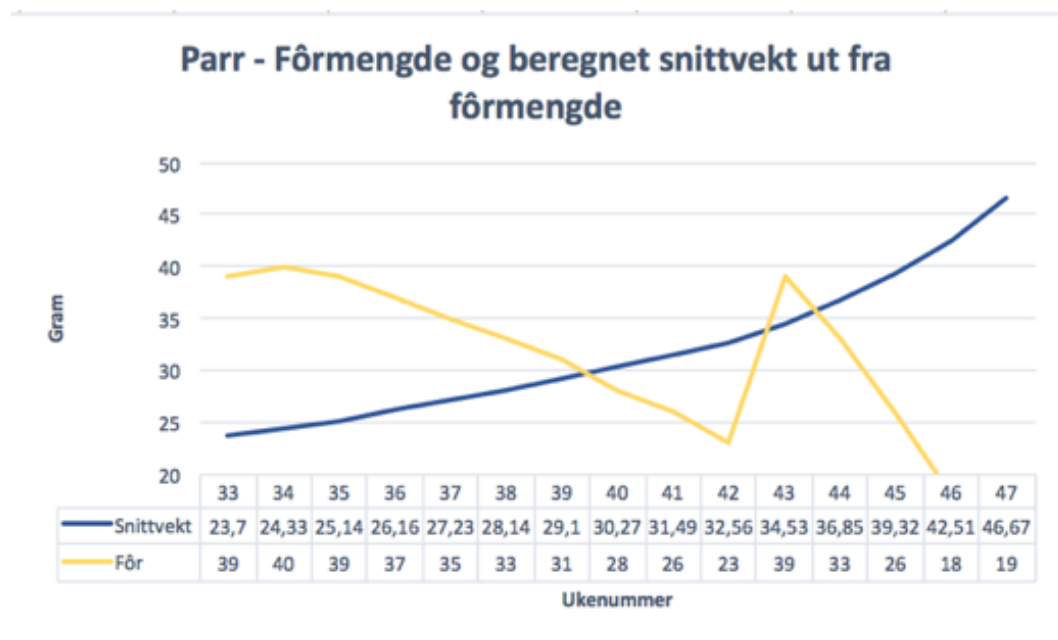
For å kunne beregne rett fôrmengde hver dag, måtte det registeres hvis det døde fisk, eller det ble tatt ut fisk til prøvetaking. Antall fisk som var i karet med parr hver uke vises i bilde til venstre i figur 21 under. I tillegg vises det en graf over hvor mange liter per fem sekunder med vann som kom inn i karet til enhver tid (rød graf – figur 21). Dette ble beregnet ut fra biomasse med fisk i karet.



Figur 21: Graf over antall fisk (parr) i karet gjennom forsøket (venstre), og graf over mengde flow inn i karet hver uke (høyre).

I figur 21 ser man at startantallet var 164 etter at nullprøvene var tatt, og det var 20 fisk igjen i karet før siste uttak/avslutning. Grafen viser at antall fisk i karet med parr ble redusert med 12 stk. hver uke. Resultatene i figur 21 over viser at flowen var stilt inn på 0,4 l/5 s de første tre ukene, deretter stilt ned til 0,3 l/5 s, og tilslutt stilt ned til 0,2 l/5 s i uke 42.

For å kunne ha en oversikt over snittvekten i karet med parr til en hver tid, ble det laget en graf (gul graf – figur 22) over fôrmengden i gram som ble utgitt hver uke fra uke 33 til 47, og en graf over beregnet snittvekt (blå graf – figur 22) i gram ut fra fôrmengden.



Figur 22: Grafer over beregnet snittvekt av parr ut fra fôrmengde, og fôrmengde.

I figur 22 ser man at den beregnede snittvekten økte gradvis fra 23,7 i uke 39, til 46,67 i uke 47. Mengde fôr ble redusert parallelt med antall fisk i karet (grønn graf – figur 21). I uke 43 ser man en endring, hvor fôrmengden ble økt.

5.1.2 Dødelighet og observasjoner

Det var ingen dødelighet i forsøket med parr. Det var heller ingen kliniske tegn til sykdom – verken ytre eller indre. Under i figur 23 ser man tre utvalgte fisk fra 6, 8 og 10 uker etter smitte (wpc). Alle er parr, hvor de på øverste og nederste bilde er sheddere og den i midten er kohabitant.



Figur 23: Fiskens utseende 6, 8 og 10 (wpc) - parr

I figur 23 med tre parr fra forskjellige uker og grupper, ser man at størrelsen var forskjellig, hvor den tidligste fisken var minst. Den nederste er mørkere enn de to andre. Det ble ikke registrert noen store størrelsesforskjeller mellom sheddere og kohabitanter, siden det ikke ble tatt vekt og lengde ved prøveuttak.

I motsetning til figur 23, viser figur 24 fiskens indre organer fra 2, 7 og 10 wpc. Alle tre er fortsatt parr, men gruppene er ukjente.



Figur 24: Fiskens indre organer 2,7 og 10 (wpc) - parr

I figur 24 ser man de fleste indre organene til tre parr. Organene så normale ut, men leveren til den nederste fisken (parr-10wpc) hadde en lys flekk. Ellers var det fôr i tarmen, og fett i hele bukhula.

5.1.3 Histologi

Det ble laget snitt av hjerte, milt og lever fra individer fra 0, 3, 6, 7, 8, 9, 12 og 14 uker etter smitte (wpc).

Hjerte

Det ble laget snitt av seks individer fra før smitte (0 wpc) og disse ble mikroskopert. Det ble også snitt fra tre individer fra 3, 7, 8, 9, 12 og 14 wpc fra parr kohabitant, og fra 3, 6, 7, 9, 12 og 14 wpc fra parr shedder. Tabellene 7 og 8 viser en oversikt over hvilke parr som hadde patologiske forandringer i atrium og spongiosum i ventrikkel.

Tabell 7: Oversikt over patologiske forandringer i hjerte hos parr kohabitant (UM). Patologiske forandringer vises med et scoringssystem fra –(0) til 2, basert på tabell 6. Grå ruter viser at det ikke er snitt fra disse individene.

Gruppe:	Parr kohabitant (UM)					
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	-	-	-	-	-	-
3 wpc	-	-	-			
7 wpc	-	-	-			
8 wpc	-	-	0,5			
9 wpc	-	-	-			
12 wpc	1	0,5	-	1	-	0,5
14 wpc	-	0,5	0,5-1			

Resultatene i tabell 7 viser at det ikke var synlige patologiske forandringer i individene som det ble tatt prøver av før smitte (kontrollfiskene). Individ 3 fra 8 wpc hadde en score på 0,5, sammen med individ 2 og 9 fra 12 wpc, og 2 fra 14 wpc. Individ 1 og 4 fra 12 wpc hadde score 1, mens individ 3 fra 14wpc lå mellom 0,5 og 1 i score.

Tabell 8: Oversikt over patologiske forandringer i hjerte hos parr shedder (FF). Patologiske forandringer vises med et scoringssystem fra –(0) til 2, basert på tabell 6. Grå ruter viser at det ikke er snitt fra disse individene.

Gruppe: Parr shedder (FF)						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
3 wpc	-	-	-			
6 wpc	0,5	-	0,5			
7 wpc	0,5	0,5	-			
9 wpc	-	0,5	-			
12 wpc	1	2	-	1	1	-
14 wpc	1	-	1			

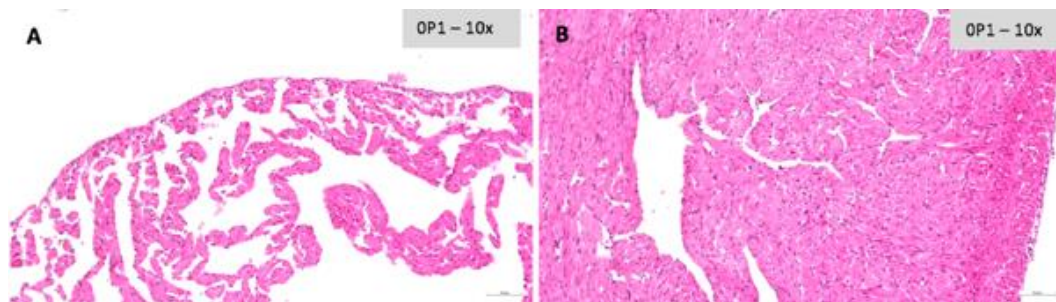
Resultatene i tabell 8 viser at det var patologiske forandringer i hjertet hos alle fiskene i alle ukene etter smitte bortsett fra 3 wpc. Fram til 12 wpc var scoren på 0,5, mens 12 wpc hadde tre individer en score på 1, og en hadde 2, men 14 wpc var det score 1 hos to av tre individer. For å se sammenhengen mellom sheddere og kohabitanter, viser tabell 9 under hvor mange av individene i ukene som hadde patologiske forandringer i hjerte hos parren.

Tabell 9: Antall individer med histopatologiske forandringer i hjerte – parr. Viser for begge gruppene – shedder og kohabitant.

Parr	WPC							
	0	3	6	7	8	9	12	14
Shedder/i.p.		0/0	2/3	2/3		1/3	4/6	2/3
Kohabitant	0/6	0/0		0/3	1/3	0/3	4/6	2/3

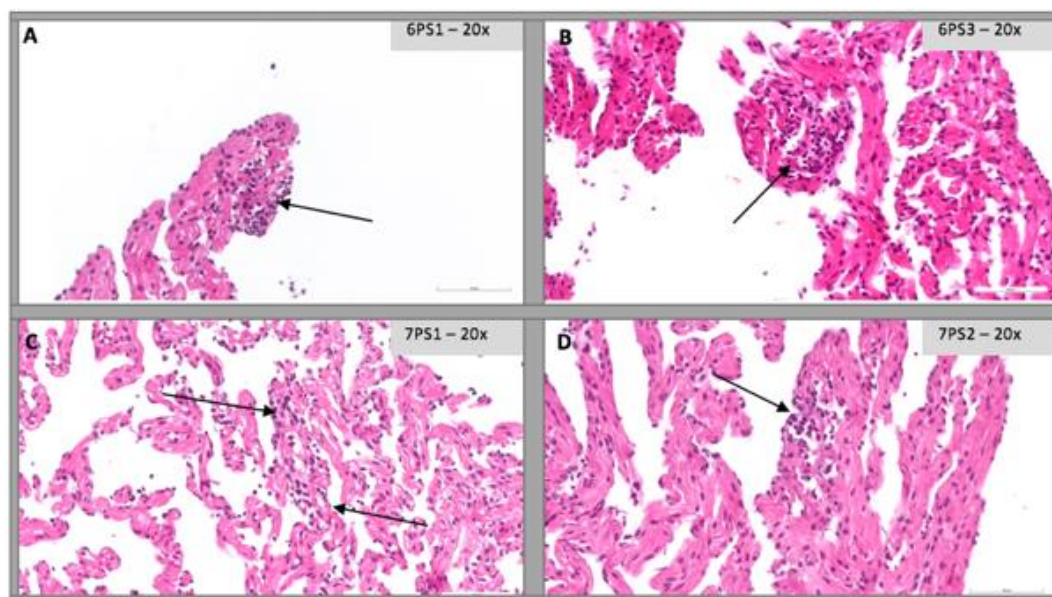
Ut fra de ukene hvor hjertet var mikroskopert, kan man i tabell 9 se at hos shedderne ble første påvisning gjort 6 wpc, mens 8 wpc hos kohabitantene. Shedderne hadde flere individer med forandringer enn kohabitantene frem til 12 wpc. Deretter ble antallet likt. 11/21 sheddere hadde forandringer, og 7/21 kohabitanter. Det ble ikke funnet skader i spongiosum ventrikkel uten at det var skader i atrium.

Figur 25 til 28 viser histologiske bilder av hjerte med de ulike scorene (0, 0,5, 1 og 2). Det vises ikke bilde av score 1,5 da ingen parr hadde denne scoren.



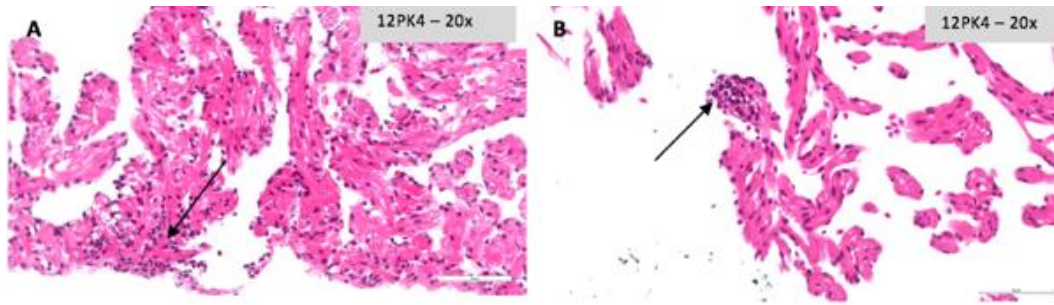
Figur 25: Bilde av hjerte til OP1 med forstørrelse på 10x, og histopatologisk score 0. Bilde **A** viser atrium, mens bilde **B** viser ventrikkel med epikard, compactum og spongiosum. 0 står for nullprøver, P står for parr og 1 står for individ 4.

I figur 25 ser man normalt hjertevev, hvor atrium med trabekler vises i bilde A og ventrikkel i bilde B. Kjernene i hjertemuskulaturen ligger langs endokardet og i muskelcellene.



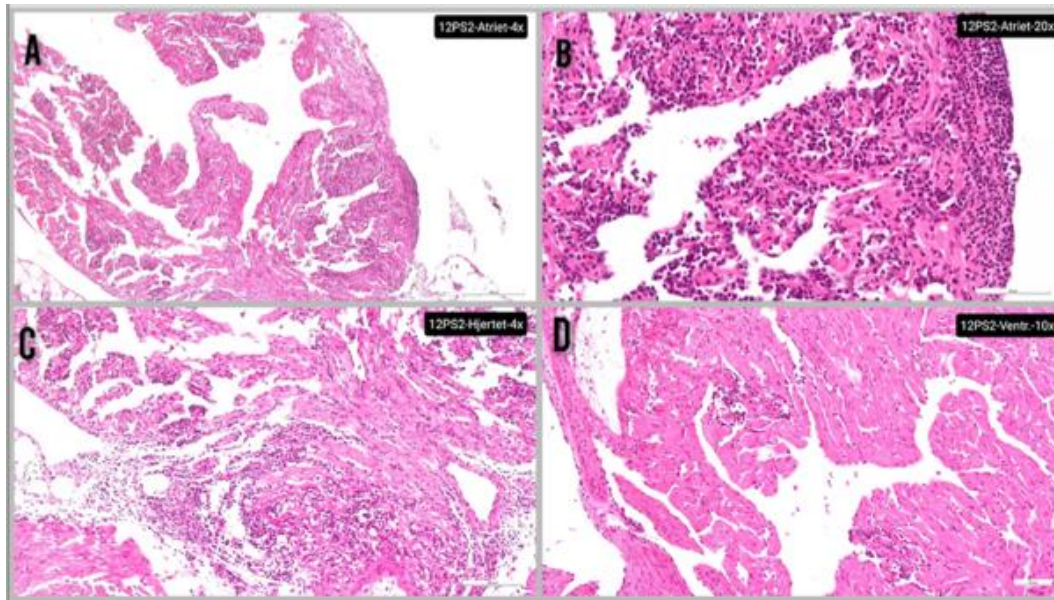
Figur 26: Alle de fire bildene har en histopatologisk score på 0,5, og de svarte pilene peker mot betennelsesceller (BC). Alle bildene vises i en forstørrelse på 20x. **A** viser BC i atrium hos 6PS. **B** viser BC i atriet hos 6PS3. **C** viser spredte BC hos 7PS1. **D** viser BC i atriet hos 7PS2. Første tallet viser antall uker etter smitte, PS = parr shedder, og siste tallet viser hvilket individ det var.

Bilde A i figur 26 viser BC fokalt i atriet, mens bilde B viser det samme i et annet individ i samme gruppe (shedder) og samme uke (6 wpc). Bilde C og D viser to forskjellige individer i samme gruppe (shedder) og samme uke (7 wpc), men i bilde D er BC litt mer spredt i vevet.



Figur 27: Viser to bilder av samme individ (12PK4) ved 20x forstørrelse, og en score på 1. **A** viser et litt mer spredt område med BC, mens **B** viser et mer fokalt område. 12 = tolv uker etter smitte, PK = parr kohabitant, 4 = individ 4.

Med en score på 1 viser figur 27 et bilde A med spredte BC i atrium og bilde B med en BC fokalt.



Figur 28: Viser fire bilder fra atriet og ventrikkelen til 12PS2 i ulike mikroskopiske forstørrelser, og en score 2. Bilde **A** viser betennelse i atrium ved 4x forstørrelse. **B** viser også betennelse, men ved 20x forstørrelse. **C** viser BC i overgangen mellom atriet og ventrikkel ved 4x forstørrelse. **D** viser fokale BC i ventrikkel ved 10x forstørrelse. 12 = tolv uker etter smitte, PS = parr shedder, 2 = individ 2.

Individet 12PS2 (figur 28) hadde en massiv betennelse i hjertet. I bilde A og B i figur 28 ser man at vevet i atriet var nedbrutt (nekrose) og erstattet med mengder BC. I C ser man store mengder av BC i overgangen mellom atriet og ventrikkel. D viser fokale deler med BC i ventrikkelen.

Milt

Milten til de forskjellige individene i delforsøket med parr ble mikroskopert, og sjekket for pseudolobuleringer, men det ble kun observert forandringer som stuvninger og blødninger.

Tabell 10 og 11 viser om det ble funnet forandringer (+) i milten eller ikke (-) hos kohabitanter og sheddere. Grått felt viser at det ikke ble laget snitt av de individene.

Bokstaven B står for "bringebærmilt", som er utposninger av blod i miltens kapsel.

Tabell 10: Oversikt over forandringer (+) i milt, i form av stuvninger og/eller blødninger – parr kohabitant (UM).

Gruppe:	Parr kohabitant (UM)					
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	-	+B	-	-	+	+
3 wpc	-	-	-			
7 wpc	-	-	-			
8 wpc	-	-	+			
9 wpc	-	+	-			
12 wpc	+	-	+	-	+	-
14 wpc	-	-	+			

Resultatene i tabell 10 viser at det allerede i kontrollfisken (0wpc) ble sett

blødninger/stuvninger ved flere individer, i tillegg hadde et individ "bringebærmilt". Man ser også at individ 3 fra 8 wpc, 2 fra 9 wpc, 1, 3 og 5 fra 12 wpc og individ 3 fra 14 wpc hadde blødninger/stuvninger i milten.

Tabell 11: Oversikt over forandringer (+) i milt, i form av stuvninger og/eller blødninger - parr shedder (FF)

Gruppe: Parr shedder (FF)						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
3 wpc	-	-	+B			
6 wpc	+	-	-			
7 wpc	-	+	-			
9 wpc	+B	+	+B			
12 wpc	-	-	+	-	-	+
14 wpc	-	-	+B			

Resultatene i tabell 11 viser at det i gruppen med sheddere ble sett blødninger/stuvninger allerede ved 3 wpc. I denne gruppen var det fire individer som hadde "bringebermilt". Det ble sett blødninger/stuvninger i et individ fra 6 wpc, et fra 7 wpc, alle fra 9 wpc, to fra 12 wpc og et fra 14 wpc.

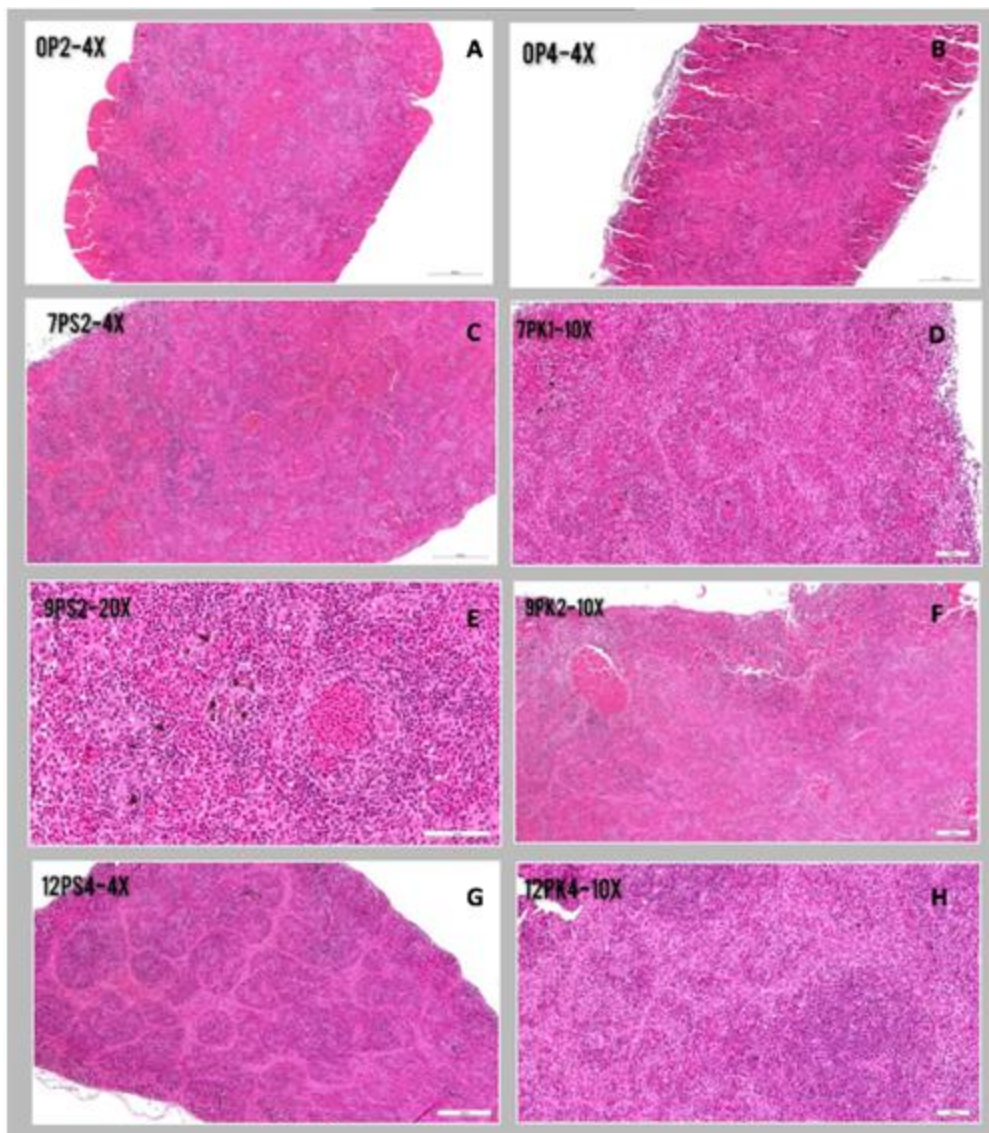
For å se sammenhengen mellom sheddere og kohabitanter viser tabell 12 under hvor mange av individene i ukene som hadde blødninger/stuvninger i milten hos parren.

Tabell 12: Antall individer med blødninger/stuvninger i milten – parr. Viser for begge gruppene – shedder og kohabitant.

Parr	WPC							
	0	3	6	7	8	9	12	14
Shedder/i.p.		1/3	1/3	1/3		3/3	2/6	1/3
Kohabitant	3/6	0/3		0/3	1/3	1/3	3/6	1/3

Tabell 12 viser at milten til halvparten av kontrollfiskene hadde blødninger/stuvninger. Shedderne hadde tidligere påvisning enn kohabitantene, ved 3 wpc. Sammenlagt hadde flere individer hos shedderne forandringer i vevet. Ved 9 wpc var det flest individer hos shedderne, og 12 wpc hos kohabitantene. 9/21 sheddere og 6/21 kohabitanter i parrforsøket hadde blødninger/stuvninger, og 3/6 fra kontrollgruppen.

For å vise miltene til noen av individene i forsøket med parr, er bilder fra åtte forskjellige individer lagt til i figur 29 under.



Figur 29: Bilder av åtte milter til åtte forskjellige individer i forsøket med parr. **A** og **B** viser milt fra individ 2 og 4 fra kontrollfisk, i 4x forstørrelse. **C** viser milt fra 7PS2 ved 4x forstørrelse. **D** viser milt fra 7PK1 ved 10x forstørrelse. **E** viser milt fra 9PS2 ved 20x forstørrelse. **F** viser milt fra 9PK2 ved 10x forstørrelse. **G** viser milt fra 12PS4 ved 4x forstørrelse. **H** viser milt fra 12PK4 ved 10x forstørrelse. Første tallet viser antall uker etter smitte, P = parr, PS = parr shedder, PK = parr kohabitant. Siste tallet viser hvilket individ det var.

Figur 29 viser forskjellige resultat, hvor noen individer hadde blødninger/stuvninger, mens andre ikke. Fra kontrollfiskene ser man at individ 2 hadde en "bringebærmilt", med utposninger av blod i kapselen, mens individ 4 hadde en fin milt. I alle bildene ser man tydelig rød og hvit pulpa. I bilde C (7PS2) ser man en liten stuvning, mens i bilde D (7PK1) ser miltene ganske normale ut. Bilde E (9PS2) og F (9PK2) hadde begge stuvninger i milten, men E hadde i tillegg litt blødninger og melanomakrofager. Bilde G (12PS4) og H (12PK4) er begge normale milter.

Lever

I levera til de ulike individene ble det sjekket for vevsforandringer. Det ble ikke funnet stuvninger, eller nekrose. Det som ble oppdaget, var noe som så ut som vakuoler i vevet. På grunn av at dette gjentok seg i flere individer over flere uker, ble det tatt med i resultatene for å se om det hadde noe patologisk sammenheng. Det ble også lagt merke til noe annet. Uten at det var nekrose rundt, så man en forekomst av fargevarianter av hepatocytterne i noen individer, hvor de som lå rundt blodkarene hadde en mørkere farge enn resten av vevet.

Tabell 13 og 14 viser en oversikt med + (positivt) og – (negativt) over hvilke individer som hadde vakuoler i levera. De grå feltene viser at det ikke ble laget snitt av disse individene.

Tabell 13: Oversikt over hvilke individer som hadde vakuoler i vevet - parr kohabitant (UM)

Gruppe: Parr kohabitant (UM)						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	+	+	+	-	+	-
3 wpc	+	+	+			
7 wpc	+	+	+			
8 wpc	+	+	-			
9 wpc	+	+	-			
12 wpc	+	+	-	-	+	-
14 wpc	+	-	+			

Resultatene i tabell 13 viser at flertallet av kontrollfiskene (0wpc) hadde vakuoler. Av parr kohabitant hadde alle individene fra 3 og 7 wpc vakuoler. 8, 9 og 14 wpc hadde to individer med vakuoler, mens 12 wpc hadde tre individer.

Tabell 14: Oversikt over hvilke individer som hadde vakuoler i vevet - parr shedder (FF)

Gruppe:	Parr shedder (FF)					
Fisk:	1	2	3	4	5	6
3 wpc	+	+	+			
6 wpc	+	-	+			
7 wpc	+	+	+			
9 wpc	-	+	+			
12 wpc	+	+	+	+	-	+
14 wpc	+	-	+			

Resultatene i tabell 14 over viser at alle individene 3 og 7 wpc av parr shedder, hadde vakuoler i levra. 6, 9 og 14 wpc hadde to individer vakuoler. 12 wpc hadde hele fem av seks individer vakuoler.

For å sammenligne gruppene med sheddere og kohabitanter i forsøket med parr, ble tabell 15 under laget.

Tabell 15: Antall individer med vakuoler i lever. Viser for sheddere og kohabitanter i forsøket med parr.

Parr-Lever-Vakuoler	WPC							
	0	3	6	7	8	9	12	14
Shedder/i.p.		3/3	2/3	3/3		2/3	5/6	2/3
Kohabitant	4/6	3/3		3/3	2/3	2/3	3/6	2/3

I tabell 15 ser man at fire av seks kontrollfisk hadde vakuoler. Antall individer med vakuoler var ganske likt for begge gruppene. Shedderne hadde to flere individer ved 12 wpc. Det var ikke et økende eller reduserende mønster i antall individer per uke per gruppe med vakuoler. 17/21 sheddere og 15/21 kohabitanter fra parrforsøket hadde vakuoler i levra.

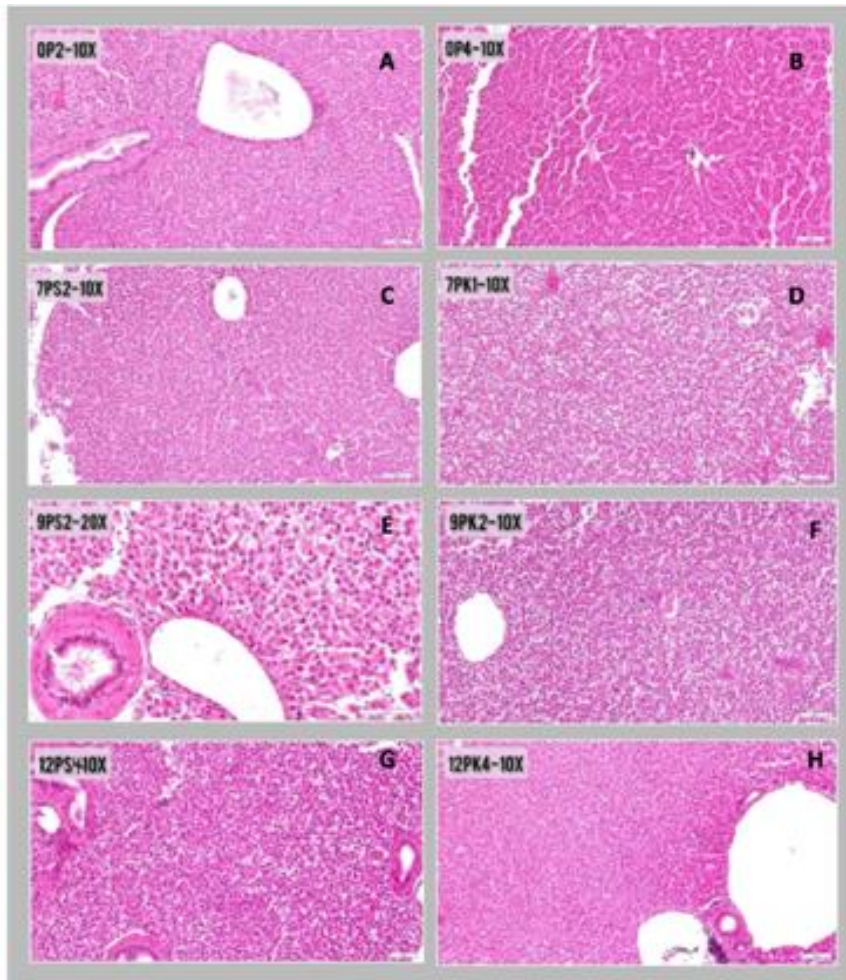
Det ble også laget en tabell med oversikt over hvor mange individer i hver gruppe som hadde forekomst av fargeforandringer rundt vener (tabell 16).

Tabell 16: Antall individer i gruppene shedder og kohabitant i parrforsøk, med mørkere hepatocytter rundt vene.

Parr-Lever-Fargeforandring	WPC							
	0	3	6	7	8	9	12	14
Shedder		3/3	1/3	1/3		1/3	3/6	0/3
Kohabitant	2/6	0/3		2/3	0/3	1/3	3/6	0/3

I tabell 16 ser man at det varierte hvor mange individer i hver gruppe for hver uke som hadde en mørkere ring (hepatocytter) rundt vener. To av seks kontrollfisk hadde det, mens ingen fra 14 wpc synes å ha det. 9/21 sheddere og 6/21 kohabitanter hadde fargeforandringer i levra.

For å vise hvordan levra til noen individer i forsøket med parr så ut, ble det tatt bilder av åtte forskjellige levre, og satt sammen i figur 30 under.

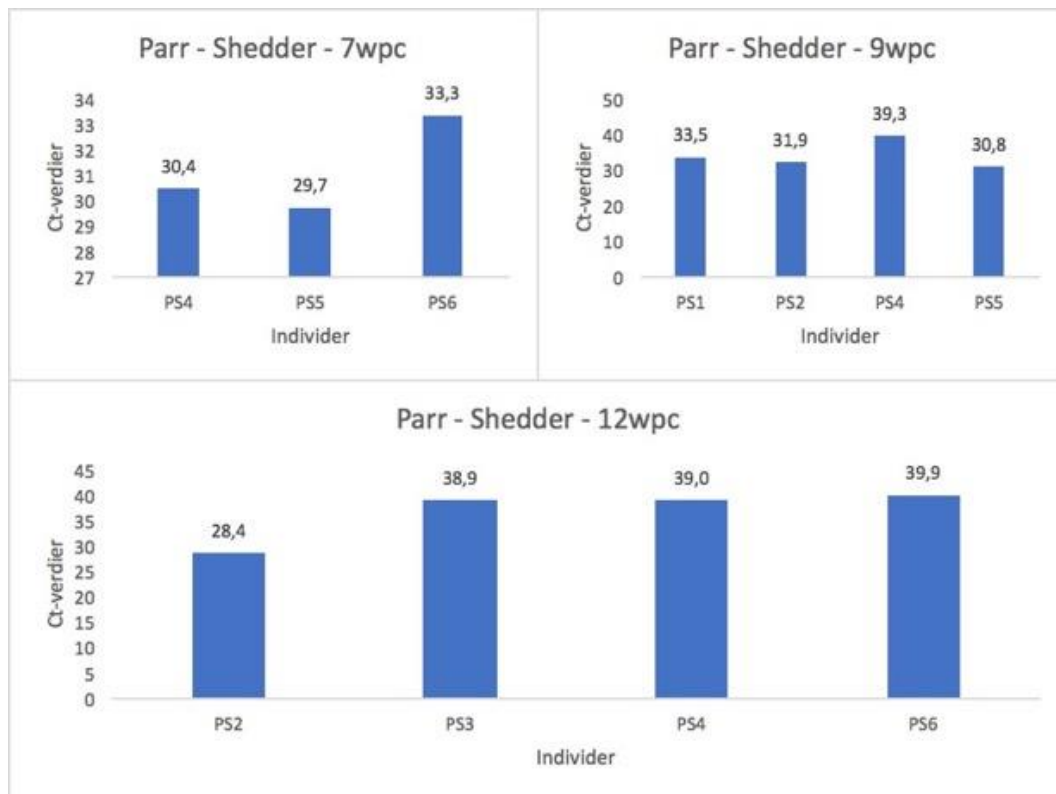


Figur 30: Bilder av åtte lever til åtte forskjellige individer i forsøket med parr. **A** og **B** viser lever fra individ 2 og 4 fra kontrollfisk, i 10x forstørrelse. **C** viser lever fra 7PS2 ved 10x forstørrelse. **D** viser lever fra 7PK1 ved 10x forstørrelse. **E** viser lever fra 9PS2 ved 20x forstørrelse. **F** viser lever fra 9PK2 ved 10x forstørrelse. **G** viser lever fra 12PS4 ved 10x forstørrelse. **H** viser lever fra 12PK4 ved 10x forstørrelse. Første tallet viser antall uker etter smitte, P = parr, PS = parr shedder, PK = parr kohabitant, og siste tallet viser hvilket individ det var.

Bilde A i figur 30 viser en gallegang, vene og vakuoler fra individ 2 av kontrollfisk. Bilde B ser man også en kontrollfisk, med sprekker i vevet, ellers fin og uten vakuoler. I både bilde C (7PS2) og D (7PK1) viser vakuoler, og i bilde C ser man også to vener. Bilde E (9PS2) viser en gallegang, vene og vakuoler. På bilde G (12PS4) ser man vakuoler, men ikke på bilde H (12PK4). På H ser man også at hepatocytene rundt venen har en mørkere farge enn resten av vevet.

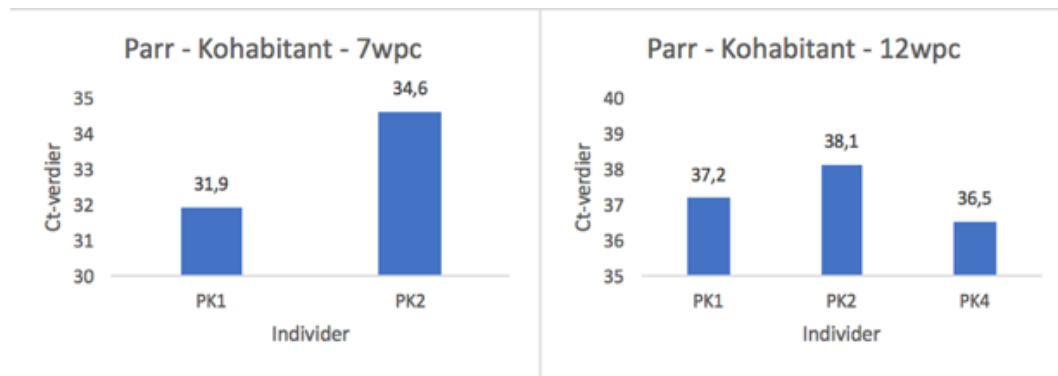
2.2.3 qPCR

Genuttrykk av PMCV ble undersøkt med qPCR. Halve hjertespiessen fra sju individer fra kontrollgruppen (0wpc), og alle individene fra 7, 9 og 12 uker etter smitte (wpc) ble undersøkt. Det ble ikke påvist PMCV i kontrollfiskene, og heller ikke i kohabitantgruppen for 9 wpc. De individene som fikk påvist PMCV vises med Ct-verdier i figur 31 og 32.



Figur 31: Bilde av tre stolpediagrammer som viser Ct-verdiene til sheddergruppene i parrforsøket. Tre individer fra 7 wpc (øverst til venstre), fire individer fra 9 wpc (øverst til høyre), og fire individer fra 12 wpc. PS = parr shedder, og siste tallet viser hvilket individ det var.

I bilde øverst til venstre i figur 31 ser man at Ct-verdien varierte fra 29,7 (PS5) til 33,3 (PS6). Siden det kun vises verdier for tre individer, betyr det at de tre andre individene i gruppa ikke ga utslag på PMCV. I bilde øverst til høyre hadde alle fire individene en verdi på over 30, og to individer ga ikke utslag. I det nederste bilde vises fire av seks individer, hvor et individ skilte seg ut med en verdi på 28,4 (PS2). De tre andre hadde verdier fra 38,9 til 39,9. 11/18 sheddere i parrforsøket fikk påvist PMCV ved qPCR.



Figur 32: Bilde av to stolpediagrammer som viser Ct-verdiene til kohabitantgruppene i parrforsøket. To individer fra 7 wpc (venstre), og tre individer fra 12 wpc (høyre). PK = parr kohabitant, og siste tallet viser hvilket individ det var.

Ct-verdiene i bilde til venstre (7wpc) i figur 32 lå på 31,9 hos PK1 og 34,6 hos PK2. I bilde til høyre (12wpc) var verdiene til de tre individene alle høyere enn de fra 7wpc. Dette betyr at det var mindre virusmengde ved 12 wpc, enn 7 wpc. Samtidig ser man at ved 12 wpc var det påvist PMCV i tre av seks individer, mens 7 wpc var det bare påvist i to av seks individer.

5/18 kohabitanter i parrforsøket fikk påvist PMCV ved qPCR

Gjennomsnitt og standardavvik:

Parr shedder 7 wpc:	31,1	(±1,6)
Parr shedder 9 wpc:	33,9	(±3,3)
Parr shedder 12 wpc:	36,6	(±4,7)
Parr kohabitant 7 wpc:	33,3	(±1,4)
Parr kohabitant 12 wpc:	37,3	(±0,7)

5.2 Smolt

Forsøket med smolt ble kjørt over tolv uker, før avsluttende prøveuttak. I motsetning til parr ble det målt vekt og lengde av fisken ved siste prøveuttak (12 wpc). Det ble også målt oksygen i vannet hver uke, i stedet for flow.

5.2.1 Vekt og karmiljø

Vekt og lengde av seks individer fra sheddergruppen og seks fra kohabitantgruppen er vist i tabell 17. For å vise et eksempel på vektøkning igjennom forsøket, er start- og sluttvekt for shedder og kohabitant vist som snittvekt i tabell 18.

Tabell 17: Vekt og lengde av tolv individer fra avsluttende prøveuttak (12 wpc). FF står for fettfinneklipt (shedder), mens UM står for umerket (kohabitant)

Fisk nr.	Vekt (g)	Lengde (cm)
FF1	213,3	26,5
FF2	239,6	26,5
FF3	216,0	26,0
FF4	175,6	24,0
FF5	244,0	28,0
FF6	214,4	25,5
Snittvekt shedder	217,2	26,1
UM1	241,1	28,0
UM2	179,1	25,5
UM3	303,0	29,5
UM4	241,9	28,0
UM5	218,6	27,0
UM6	208,2	26,5
Snittvekt kohabitant	232,0	27,4

Tabell 18: Snittvekt av smolt fra start og slutt av forsøket.

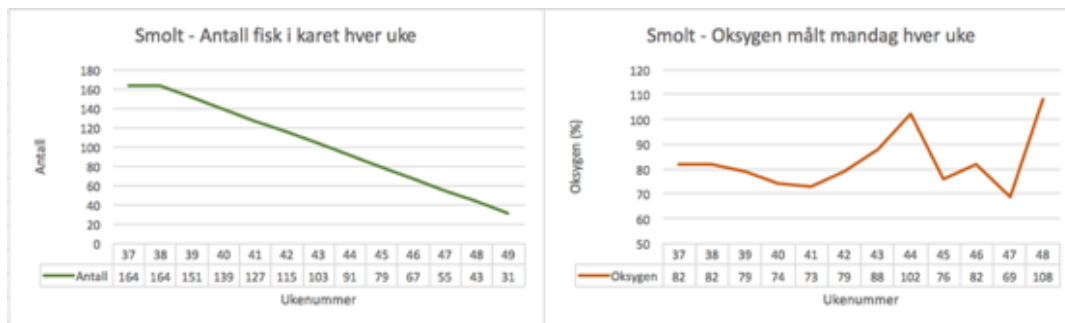
	0 wpc	12 wpc
Smolt FF	110,6g	217,2g
Smolt UM	110,6g	232,0g

I tabell 17 ser man at den minste fisken i sheddergruppen var FF4 med 175,6 g og 24 cm lang, og den største var FF5 med 244 g og 28 cm lang. I kohabitantgruppen var den minste (UM2) 179,1 g og 25,5 cm lange, mens den største (UM4) var 241,9 g og 28 cm lang.

Kohabitantene var i snitt lengst av disse to gruppene.

Snittevekten i tabell 18 viser at kohabitantene som bare fikk sheddersmitte veide i snitt mest med 232 g, mens snittvekten til shedderne som fikk i.p.-smitte var 217,2 g.

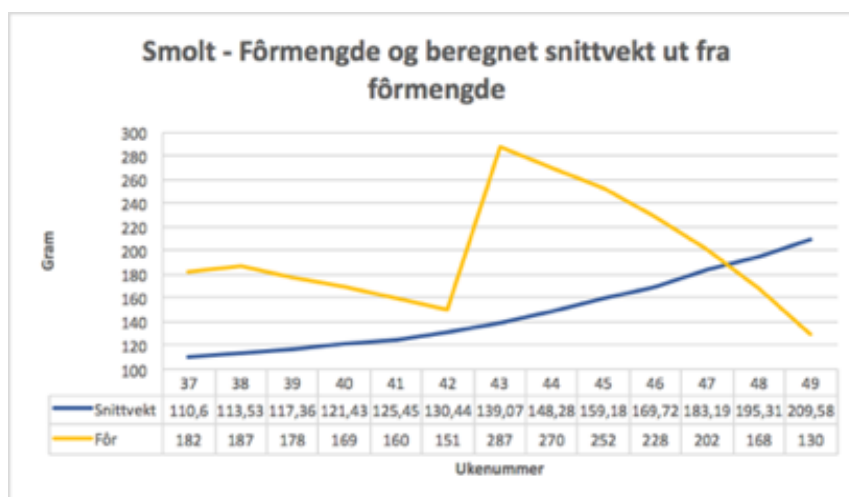
For å kunne beregne rett fôrmengde hver dag, måtte det registerets hvis det døde fisk, eller at det ble tatt ut fisk til prøvetaking. Antall fisk som var i karet med parr hver uke vises i bilde til venstre i figur 33 under. I tillegg vises det en graf over oksygenivået i prosent, som ble målt hver uke.



Figur 33: Graf over antall fisk (smolt) i karet gjennom forsøket (venstre), og graf over oksygenivå i karet hver uke (høyre).

I figur 33 i grafen til venstre ser man at ved uke 37 og 38 var 164 stk. smolt. Hver uke ble antallet redusert med 12 stk. (prøveuttak), bortsett fra mellom uke 38 og 29 hvor en fisk døde. Ved uke 49 og avsluttende uke var det 31 fisk igjen. 12 av disse ble tatt ut til prøveuttak, og resten ble avlivet og destruert.

Også for smolten ble det beregnet snittvekt og fôrmengde hver uke fra uke 37 til 49. Dette vises i figur 34 under.



Figur 34: Grafer over beregnet snittvekt av smolt ut fra fôrmengde, og fôrmengde.

I figur 34 ser man at den beregnede snittvekten (blå graf – figur 34) økte gradvis fra 110,6 g i uke 37, til 209,58 g i uke 49. Mengde fôr (gul graf – figur 34) ble redusert parallelt med antall fisk i karet (grønn graf – figur 33). I uke 43 ser man en endring, hvor fôrmengden ble økt.

5.2.2 Dødelighet og observasjoner

Under forsøket med smolt var det en UM (kohabitant) som døde. Den døde 18.09.20, men det var ikke tegn til ytre skader. Det ble tatt bakteriologi av fisken, med utstryk på blodskål med salt ved 15°C. Det var ingen vekst på skålen.

Ved ytre og indre observasjoner av fiskene under prøveuttak, ble det ikke registrert noe utenom normalen. Figur 35 viser bilder av tre ulike individer ved 7 uker etter smitte (wpc), og figur 36 viser tre smolt med åpen buk. Individene i figur er fra 2, 4 og 7 wpc.



Figur 35: Fiskens utseende 7 wpc. To fra sheddergruppen (7SS2 og 7SS5) og en kohabitant (7SK4).

I figur 35 over ser man at fisken i midten (7SS5) var den slankeste, og det kan se ut som at kohabitanten var den største. Dette er vanskelig å si når man ikke har tatt vekt og lengde av dem. Fiskene så ellers smoltifisert og blanke ut, med noe skjelltap.



Figur 36: Bilde av tre fisk med buken åpen. Alle smolt, men fra forskjellige uker etter smitte.

I figur 36 over ser man nesten alle de indre organene til tre forskjellige smolt. Smolten fra 2 wpc var litt blekere enn de andre og normalt, i tillegg hadde den litt gul feces. Alle fiskene hadde bra med fett langs nyra. Smolten fra 7 wpc så ikke mer syk ut enn den fra 4 wpc.

5.2.3 Histologi

Det ble laget snitt fra hjerte, milt og lever fra smolt før smitte, og 3, 6, 7, 8, 9 og 12 uker etter smitte (wpc). Ved 6 wpc ble det bare laget snitt fra sheddere, siden det ut i fra teorien er da forandringene kan begynne å komme. Ved 8wpc ble det bare laget snitt fra kohabitanter, av samme grunn. Både i hjerte, milt og lever ble det sjekket for vevsforandringer.

Hjerte

Det ble laget snitt av seks individer fra før smitte (0 wpc) og disse ble mikroskopert. Det ble også laget snitt fra tre individer fra 3, 7, 8, 9 og 12 wpc fra kohabitant, og fra 3, 6, 7, 9 og 12 wpc fra shedder. Det ble oppdaget det som så ut som betennelsesceller (BC) i flere av individene, men det ble ikke observert store deler med nekrose. Tabellene 19 og 20 viser om det er patologiske forandringer i atrium og spongiosum i ventrikkel for hvert individ som ble mikroskopert.

Tabell 19: Oversikt over patologiske forandringer i hjerte hos smolt kohabitant (UM) og shedder (FF). Patologiske forandringer vises med et scoringssystem fra –(0) til 2, basert på tabell 6. Grå ruter viser at det ikke er snitt fra disse individene.

Smolt - Hjerte						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	-	-	-	-	-	-
Gruppe:	<u>Smolt kohabitant (UM)</u>			<u>Smolt shedder (FF)</u>		
Fisk:	1	2	3	1	2	3
3 wpc	-	-	-	-	-	-
6 wpc				-	-	0,5
7 wpc	1	-	-	-	-	1,5
8 wpc	0,5	-	0,5			
9 wpc	1	1	1	1,5	0,5	1
12 wpc	1	0,5	-	1,5	1,5	1

Resultatene i tabell 19 viser at det ikke var patologiske forandringer hos kontrollfisken (0wpc). Hos kohabitantene var det ikke synlig forandringer før 7 wpc, hvor et individ hadde score 1. To individer hadde score 0,5 ved 8 wpc, og ved 9 wpc hadde alle tre individene 1 i score. Ved 12 wpc var det en færre med forandringer enn ved 9 wpc.

Ved sheddergruppen var det synlige forandringer hos et individ ved 6 wpc med score 0,5. Hos 7, 9 og 12 wpc var det individ med 1,5 i score. Det var ingen som hadde 2 i score.

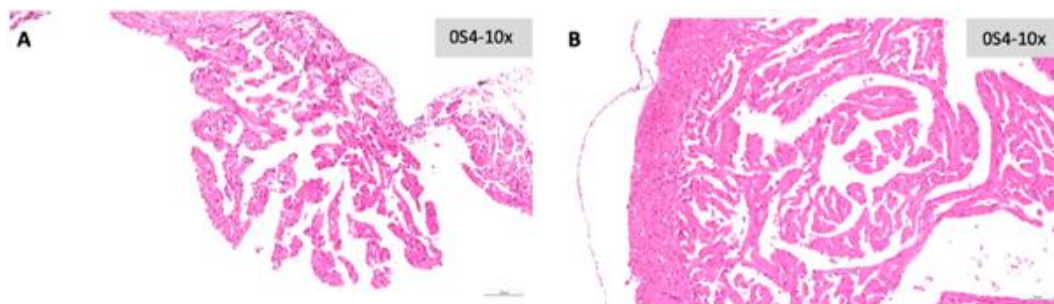
For å sammenligne sheddere og kohabitanter viser tabell 20 under en samlet oversikt over antall individer med patologiske forandring, av totalt mikroskoperte.

Tabell 20: Antall individer med patologiske forandringer i hjerte hos smolt. Viser begge gruppene - shedder og kohabitant

Smolt	WPC						
	0	3	6	7	8	9	12
Shedder/i.p.		0/3	1/3	1/3	-	3/3	3/3
Kohabitant	0/6	0/3		1/3	2/3	3/3	2/3

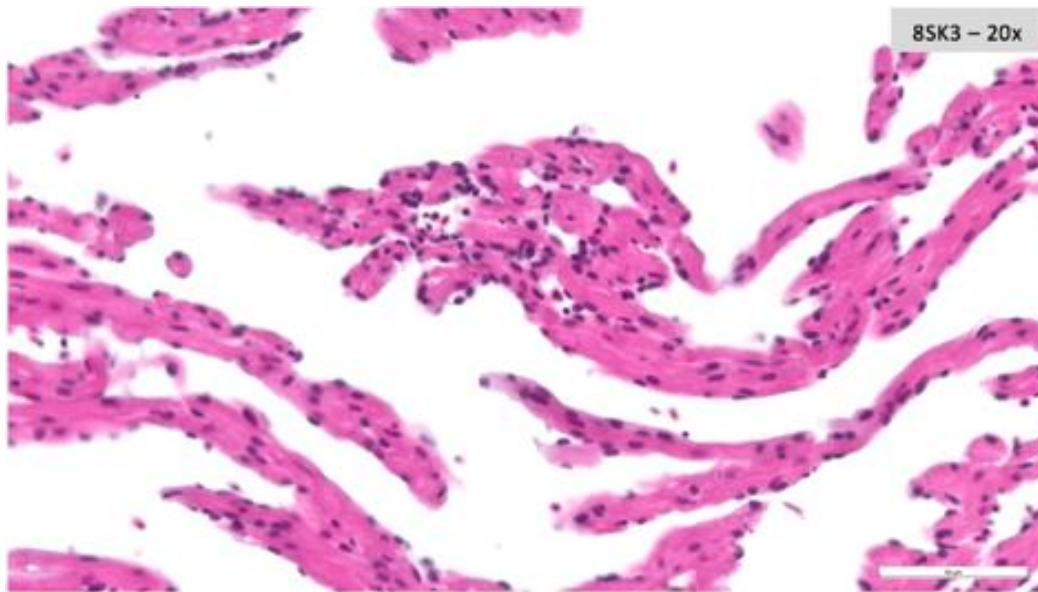
Antall individer med patologisk forandring, hvis man ser bort fra score, er ganske likt hos både sheddergruppene og kohabitantgruppene (tabell 20). Det var et individ mer i sheddergruppen ved 12 wpc enn i kohabitantgruppen. 8/15 sheddere og 8/15 kohabitanter i smoltforsøket hadde forandringer i hjertet.

Figur 37 til 40 under viser bilder av hjertet med score til forskjellige smolt ved ulike uker etter smitte. Det ble brukt det samme scoringssystemet for smolt, som ble brukt for parr.



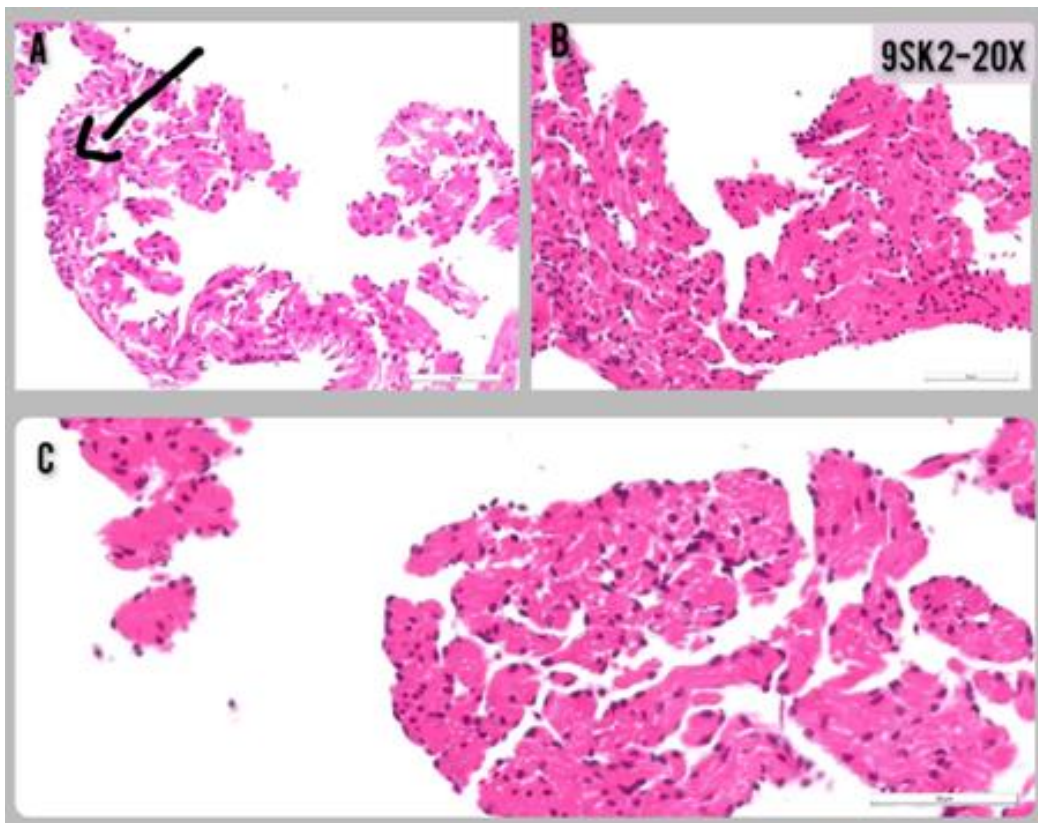
Figur 37: Bilde av hjerte til individet 0S4 ved 10x forstørrelse. **A:** Atrium. **B:** Ventrikkel. 0 står for nullprøver, S står for smolt og 4 står for individ 4.

På bilde A i figur 37 ser man trabekler i atrium, mens på bilde B ser man ventrikkelen med epikard, compactum og spongiosum. Begge delene av hjertet så normale ut, og har derfor fått en score 0.



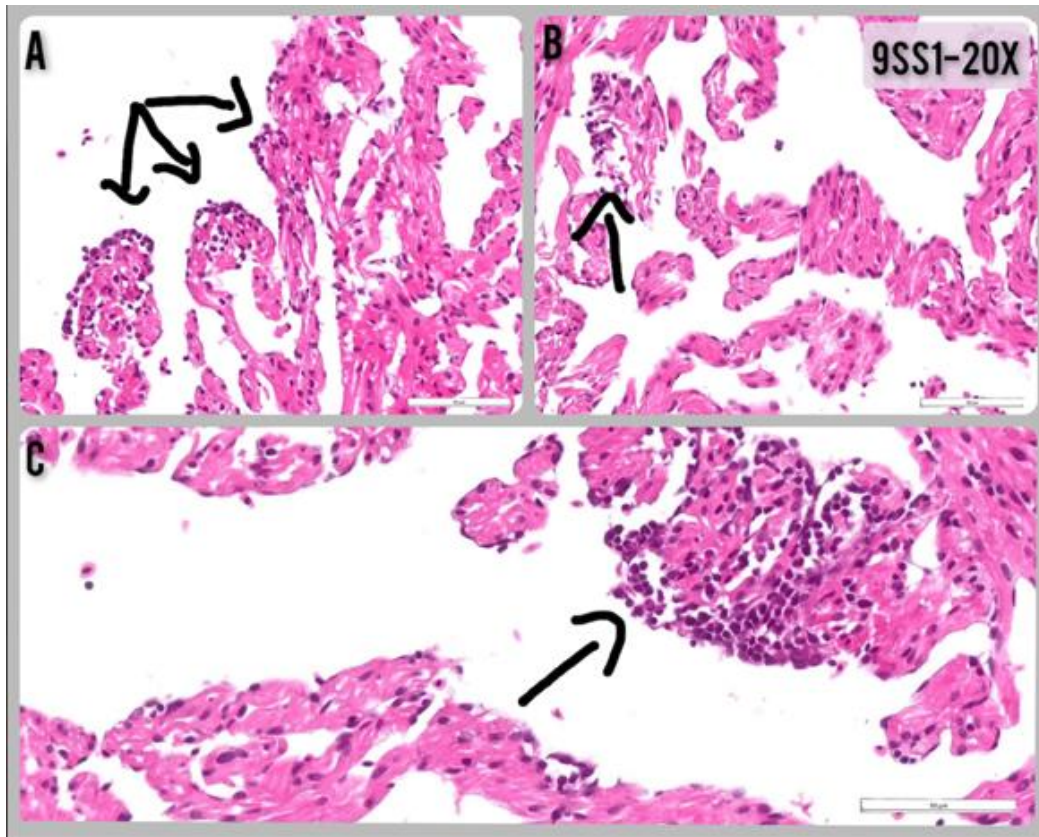
Figur 38: Bilde av atriet til individ 8SK3 ved 20x forstørrelse. Score 0,5. 8 = åtte uker etter smitte, SK = smolt kohabitant, 3 = individ 3.

På grunn av betennescellene (BC) som holdt seg fokalt, som man ser midt i figur 38, får individ 8SK3 en score på 0,5. Det var kun ett slikt fokalt område med BC.



Figur 39: Bilde av atriet til individ 9SK2 ved 20x forstørrelse. Viser tre forskjellige områder i atriet (A-C) med betennelse, og score 1. 9 = ni uker etter smitte, SK = smolt kohabitant, 2 = individ 2.

Individ 9SK2 som man ser bilde av i figur 39, hadde fått score 1. Dette på grunn av det fokale området med BC i bilde A, og de spredte BC som man ser på de to forskjellige områdene i bilde B og C.



Figur 40: Bilde av atriet til individ 9SS1 ved 20x forstørrelse. Viser tre forskjellige områder i atriet (A-C) med betennelse og score 1,5. 9 = ni uker etter smitte, SS = smolt shedder, 1 = individ 1.

Individet 9SS1 i figur 40 hadde fokale områder med BC. I bilde A ser man BC liggende fokalt langs endokardet. I bilde B ser man også et fokalt område med BC og nedbrutt vev som tegn på nekrose. Bilde C viser et fokalt område med en større mengde BC. På grunn av flere fokale områder med BC, og nekrose fikk dette individet en score på 1,5.

Milt

Milten til de forskjellige individene i smoltforsøket ble også mikroskopert, og sjekket for patologiske forandringer, og stuvninger og blødninger. Tabell 21 viser om det er funnet forandringer i form av blødninger/stuvninger (+) i milten eller ikke (-) hos smolt kohabitanter og sheddere. Grått felt viser at det ikke ble laget snitt av de individene. Bokstaven B står for "bringebermilt", som er utposninger av blod i miltens kapsel.

Tabell 21: Oversikt over forandringer (+) i milt, i form av stuvninger og/eller blødninger – smolt kohabitant (UM) og shedder (FF). B står for "bringebermilt".

Smolt – Milt						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	-	+B	-	-	-	-
Gruppe:	<u>Smolt kohabitant (UM)</u>			<u>Smolt shedder (FF)</u>		
Fisk:	1	2	3	1	2	3
3 wpc	+	-	+	-	+	+B
6 wpc				-	+	-
7 wpc	-	-	-	-	+	-
8 wpc	+	+	-			
9 wpc	-	-	+	-	-	+
12 wpc	+	+	+	+	-	-

Resultatene i tabell 21 viser at det var et individ blant kontrollfiskene (0wpc) som hadde både blødninger og "bringebermilt". I gruppen med kohabitanter var det to individer ved 3 wpc, ingen ved 7 wpc, to ved 8 wpc og tre ved 12 wpc. For både sheddere og kohabitanter var det et individ med blødninger/stuvninger ved 9 wpc. I gruppen med sheddere var det også to individer ved 3 wpc, hvor den ene hadde "bringebermilt". 6, 7 og 12 wpc var det bare et individ med forandringer.

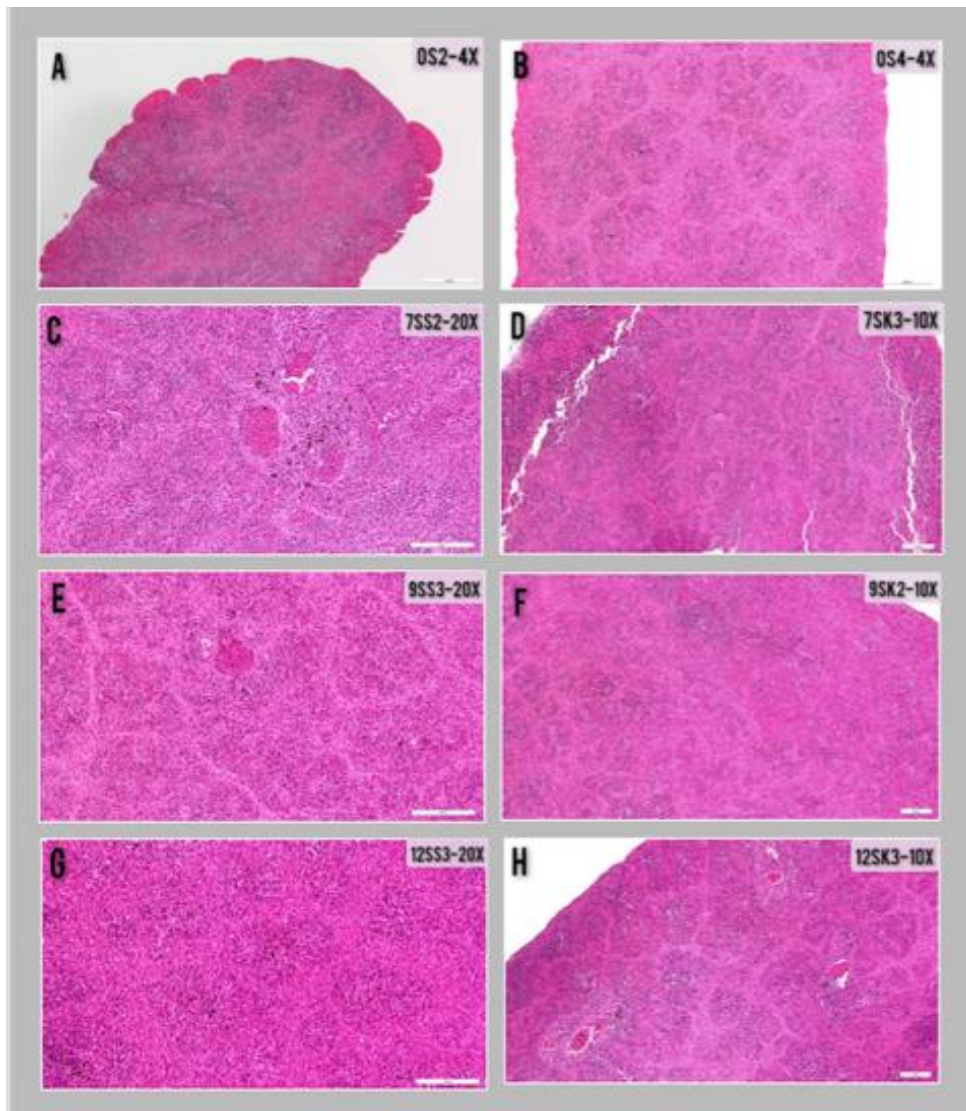
Tabell 22 under viser en sammenligning av individer med blødninger/stuvninger blant det totale antallet, mellom sheddergruppene og kohabitantgruppene.

Tabell 22: Oversikt over antall individer i hver gruppe ved de forskjellige ukene etter smitte, som hadde blødninger/stuvninger i milt hos smolt.

Smolt-milt	WPC						
	0	3	6	7	8	9	12
Shedder/i.p.		2/3	1/3	1/3		1/3	1/3
Kohabitant	1/6	2/3		0/3	2/3	1/3	3/3

I tabell 22 ser man at det var flest kohabitanter som hadde blødninger/stuvninger i milten. En av seks av kontrollfiskene hadde blødninger/stuvninger. Ved 7 wpc hos kohabitantene så alle miltene normale ut, mens ved 12 wpc så ingen normale ut. 9/21 sheddere og 6/21 kohabitanter hadde fargeforandringer i levra.

For å vise miltene til noen av individene i forsøket med parr, er bilder fra åtte forskjellige individer lagt til i figur 41 under.



Figur 41: Bilder av åtte milter til åtte forskjellige individer i forsøket med smolt, hvor det er fire fra sheddergruppen, og fire fra kohabitantgruppen. **A** og **B** viser milt fra individ 2 og 4 fra kontrollfisk, i 4x forstørrelse. **C** viser milt fra 7SS2 ved 20x forstørrelse. **D** viser milt fra 7SK3 ved 10x forstørrelse. **E** viser milt fra 9SS3 ved 20x forstørrelse. **F** viser milt fra 9SK2 ved 10x forstørrelse. **G** viser milt fra 12SS3 ved 20x forstørrelse. **H** viser milt fra 12SK3 ved 10x forstørrelse. Første tallet viser antall uker etter smitte, S = smolt, SS = smolt shedder, SK = smolt kohabitant. Siste tallet viser hvilket individ det var.

Figur 41 viser forskjellige resultat, hvor fire individer hadde blødninger/stuvninger, mens fire ikke. Fra kontrollfiskene ser man at individ 2 hadde en "bringebermilt", med utposninger av blod i kapselen, mens individ 4 hadde en fin milt. I alle bildene ser man tydelig rød og hvit pulpa. I bilde C (7SS2) ser man blødning, stuvning og melanomakrofager, mens i bilde D (7SK3) så milten ganske normal ut. Bilde E (9SS3) hadde en blødning, mens bilde F (9SK2) var normal. Bilde G (12SS3) var normal, mens i bilde H (12SK3) var det tre små stuvninger.

Lever

Som i parrforsøket ble det også i smoltforsøket funnet noe som så ut som vakuoler i levercellene, men ikke nekrose eller blødninger. Det ble i tillegg også sett fargeforandringer i hepatocytene i levera. Det var der hvor hepatocytene rundt blodkar i flere individer var mørkere enn resten av vevet. Dette var uten at det var nekrose rundt. Tabell 23 under viser hvilke individer som hadde vakuoler i levera, mens tabell 24 og 25 viser antall individer i hver gruppe for de ulike ukene, som hadde vakuoler og fargeforandringer.

Tabell 23: Oversikt over hvilke individer som hadde vakuoler i levervevet - smolt

Smolt – Lever-Vakuoler						
Fisk:	1	2	3	4	5	6
0 wpc	-	+	-	-	-	-
Gruppe:	<u>Smolt kohabitant (UM)</u>			<u>Smolt shedder (FF)</u>		
Fisk:	1	2	3	1	2	3
3 wpc	-	+	+	+	-	+
6 wpc				-	-	-
7 wpc	-	+	-	+	+	-
8 wpc	-	-	-			
9 wpc	-	-	-	-	-	+
12 wpc	-	-	-	-	+	+

I tabell 24 ser man at et individ av kontrollfisken (0wpc) hadde vakuoler i vevet. I gruppen med kohabitanter var det to individer ved 3 wpc, et ved 7 wpc, ingen ved 8, 9 og 12 wpc. Ved gruppen med sheddere var det også to individer ved 3 wpc, ingen ved 6wpc, to ved 7 og 12 wpc, og et ved 9 wpc.

For å sammenligne de to gruppene i smoltforsøket viser tabell 24 under hvor mange individer som hadde vakuoler, av totalt antall individer ved de ulike ukene.

Tabell 24: Antall individer med vakuoler i lever. Viser for shedder og kohabitant i smoltforsøk.

	Smolt-Lever-Vakuoler		WPC				
	0	3	6	7	8	9	12
Shedder/i.p.		2/3	0/3	2/3		1/3	2/3
Kohabitant	1/6	2/3		1/3	0/3	0/3	0/3

Tabell 24 gir en bedre oversikt over antall individer i hver gruppe i de ulike ukene, som hadde vakuoler i vevet. Det var totalt flere i sheddergruppen som hadde vakuoler, enn i kohabitantgruppen. En av kontrollfiskene hadde vakuoler. I kohabitantgruppen 12 wpc var det ingen individer med vakuoler. 7/15 sheddere og 3/15 kohabitanter i smoltforsøket hadde vakuoler i levra.

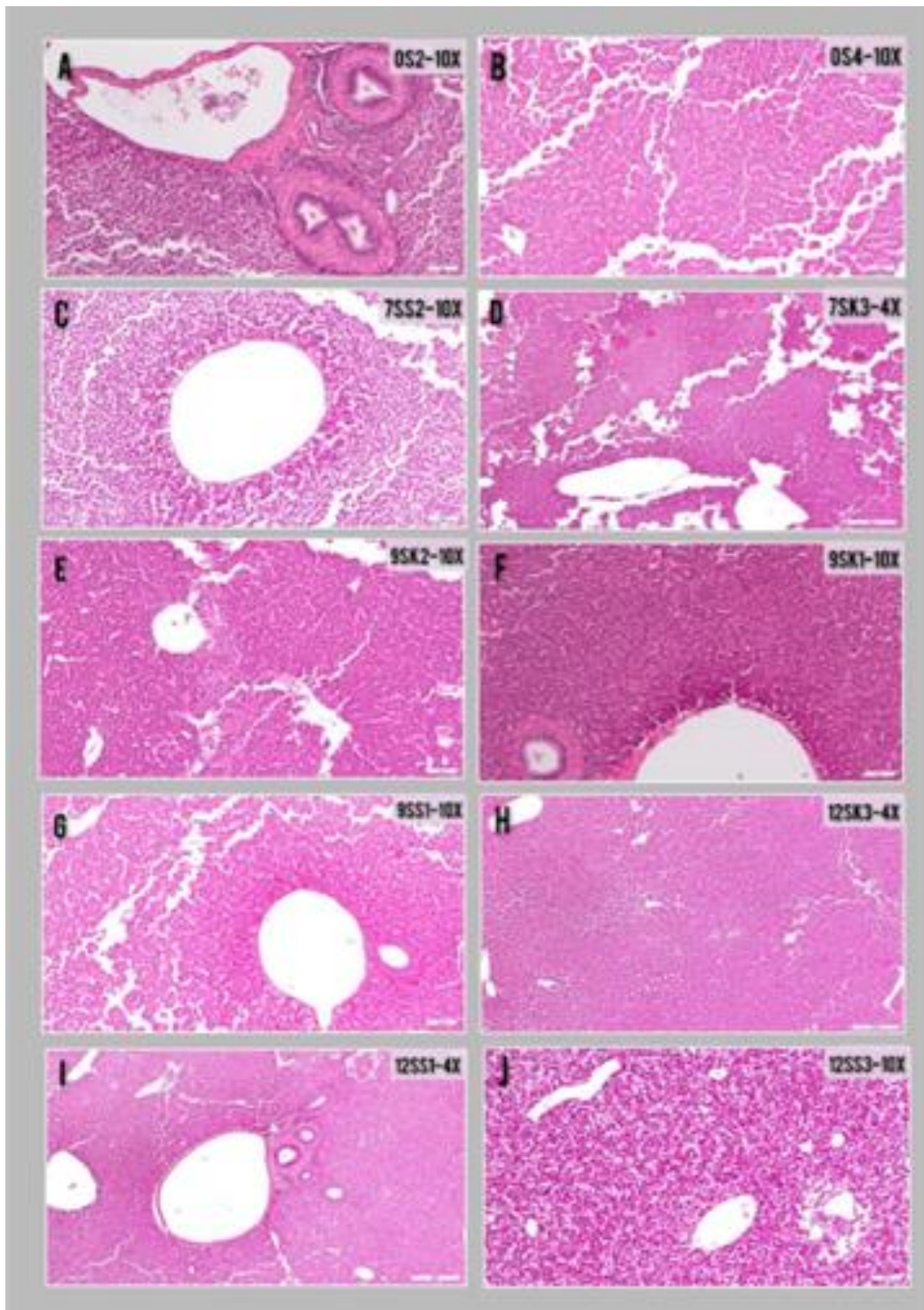
For å vise hvor mange individer av hver gruppe som hadde mørkere hepatocytter rundt blodkar, er tabell 25 under laget.

Tabell 25: Antall individer i gruppene shedder og kohabitant i smoltforsøket, med mørkere hepatocytter rundt blodkar i lever.

	Smolt-Lever-Fargeforandringer		WPC				
	0	3	6	7	8	9	12
Shedder		2/3	1/3	1/3		2/3	2/3
Kohabitant	2/6	2/3		1/3	1/3	1/3	1/3

Totalt sett ser man i tabell 25 over at det var like mange individer i begge gruppene som hadde mørkere hepatocytter rundt vener. 3 wpc var det like mange i begge gruppene, dette gjaldt også 7 wpc. Både 9 og 12 wpc, er det flere individer med fargeforandringer i sheddergruppen enn i kohabitantgruppen. Noen av individene vises i figur 42 under. 8/15 sheddere og 6/15 kohabitanter fra smoltforsøket hadde fargeforandringer i levra.

For å vise hvordan levra til noen individer i forsøket med smolt var, ble det tatt bilder av ti forskjellige levre, og satt sammen i figur 42 under.

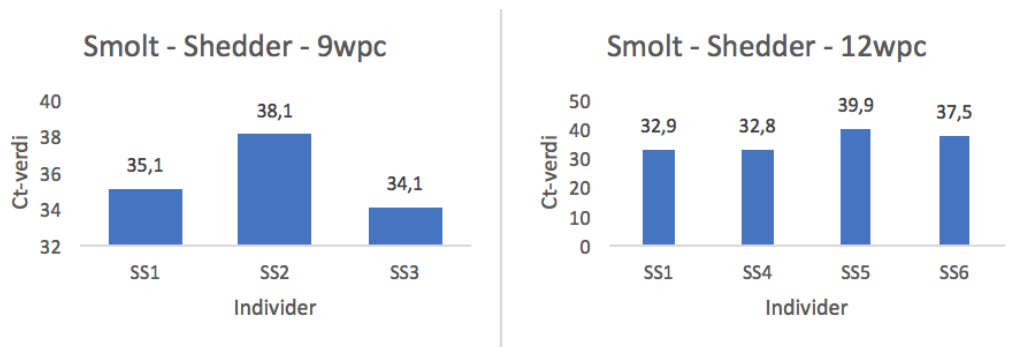


Figur 42: Bilder av ti lever til ti forskjellige individer i forsøket med smolt. **A** og **B** viser lever fra individ 2 og 4 fra kontrollfisk, i 10x forstørrelse. **C** viser lever fra 7SS2 ved 10x forstørrelse. **D** viser lever fra 7SK3 ved 4x forstørrelse. **E** viser lever fra 9SK2 ved 10x forstørrelse. **F** viser lever fra 9SK1 ved 10x forstørrelse. **G** viser lever fra 9SS1 ved 10x forstørrelse. **H** viser lever fra 12SK3 ved 4x forstørrelse. **I** viser lever fra 12SS1 ved 4x forstørrelse. **J** viser lever fra 12SS3 ved 10x forstørrelse. Første tallet viser antall uker etter smitte, S = smolt, SS = smolt shedder, SK = smolt kohabitant. Siste tallet viser hvilket individ det var.

Bilde A (0S2) og B(0S4) i figur 42 viser normale levre med normale hepatocytter, men det var sprekker i vevet i bilde B. Bilde C (7SS2) viser mørkere vev akkurat rundt en vene, og dette gjentar seg rundt de fleste venene i dette snittet. I bilde D (7SK3) var det lyse områder, og i disse var det områder som kunne se litt ut som nekrose, men hadde noe struktur. Bildet viser sprekker i vevet. Bilde E (PSK2) viser også sprekker i vevet, og en lys stripe langs sprekken som kan ligne på nekrose, men hadde struktur. På bilde F (9SK1) ser man det samme som på bilde C, at det var mørkere rundt venen. Dette gjentar seg også i bilde G (9SS1) og bilde I (12SS1). I bilde H (12SK3) ser man et normalt levervev, mens i bilde J (12SS3) ser man store mengder vakuoler.

5.2.4 qPCR

Genuttrykk av PMCV ble undersøkt med qPCR. Halve hjertespiessen fra sju individer fra kontrollgruppen (0 wpc), og alle individene fra 9 og 12 uker etter smitte (wpc) ble undersøkt. Det ble ikke påvist en virusmengde i kontrollfiskene, og heller ikke i kohabitantgruppen for verken 9 wpc eller 12 wpc. De individene som fikk påvist PMCV vises med Ct-verdier i figur 43.



Figur 43: Bilde av to stolpediagrammer som viser Ct-verdiene til sheddergruppene i smoltforsøket. Tre individer fra 9wpc (venstre), og fire individer fra 12wpc (høyre). SS = smolt shedder, og siste tallet viser hvilket individ det var.

Ct-verdiene i bilde til venstre (9 wpc) i figur 43 ligger på 34,1 hos SS3, 35,1 hos SS1 og 38,1 hos SS2. Det ble ikke påvist virus hos de tre andre individene (SS4-SS6). I bilde til høyre (12wpc) er verdiene til de fire individene både lavere og høyere enn de fra 9 wpc. SS1 og SS4 hos 12 wpc hadde høyere virusmengde enn individene fra 9 wpc. SS5 hadde derimot lavere mengde virus. Det ble påvist PMCV i et mer individ hos 12 wpc, enn i 9 wpc. 7/12 sheddere i smoltforsøket fikk påvist PMCV ved qPCR.

Gjennomsnitt og standardavvik:

Smolt shedder 9 wpc:	35,8	(±1,7)
Smolt shedder 12 wpc:	35,8	(±3,1)

Diskusjon

Kardiomyopatisyndrom (CMS) har utviklet seg til å bli en av Norges mest tapsbringende sykdommer i oppdrettsnæringen, og forekommer hos oppdrettslaks langs hele norskekysten [13]. Hovedproblemet med sykdommen er at den rammer slakteklar fisk, uten at det trenger å forekomme kliniske symptomer [22]. Dette gjør det vanskelig å diagnostisere og forebygge før en eventuell plutselig massedød, og rask nedgang i økonomien [3]. Det har blitt rapportert påvisning av PMCV i tidligere fase i produksjonen [13]. Forekomst av CMS gjennom store deler av produksjonssyklusen, kan gi konsekvenser for drift og økonomi [15]. Ved blant annet vaksineutvikling og tidligere diagnostisering av CMS oppdrettslaks, er forskning en stor del av en slik prosess. For å kunne utføre forsøk med blant annet PMCV i Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), er det behov for velfungerende smitte modeller. VESO selger i dag smitte modell med PMCV på smolt. For å kunne redusere vannforbruket, karplass og tid, var dem interessert i en smitte modell med PMCV på parr. Ut fra tidligere forsøk har dem fått bekreftet at kohabitasjonssmitte med PMCV på smolt fungerer, og trenger derfor å få gjennomført en kohabitasjonssmitte på parr. Dette vil også vise om lakseparr er mottakelig for PMCV. Som et internforsøk ble det utført en smitte med PMCV i parr, og en i smolt som en sammenlignbar kontroll.

Ved utvikling av smitte modell for PMCV i smolt, har VESO kjørt ett par pilotforsøk med smitte materialet for å utelukke PRV (piscine orthoreovirus). Ved første pilotforsøk var det PRV-positive individer, mens ved det andre pilotforsøket var alle individene PRV-negative. Det ble da kjørt et forsøk med kohabitantsmitte, for å se forskjeller på smitte med intraperitoneal injeksjon (i.p.) og intramuskulær injeksjon (i.m.). Det viste seg at det var flere smittede individer med i.m.-smitte, men mindre infiserte. Det var ingen kliniske tegn hos noen av kohabitantene. Et fjerde forsøk ble så gjennomført, med en varighet på 24 uker. Dette inneholdt smolt i 12°C sjøvann, og som var 50-200 g, uvaksinert og patogenfri. Det var 12 i.p.-smittede fisk (sheddere) og 36 kohabitanter. 9, 10 og 12 wpc hadde Ct-verdier: 30,9, 27,12, og 22,99. Ved 24 wpc var 13/24 fisk PMCV-positive. Den laveste Ct-verdien var 20,52 og histoscore 1, den høyeste var 34,62 og histoscore 0,25, mens gjennomsnittsverdien var 23,78. Det ble brukt smitte materiale fra det andre forsøket, i både tredje og fjerde forsøk [37].

Senere kjørte VESO et forsøk med PMCV i sjøvann og ferskvann. I sjøvann var det smolt fra 80-100 g, og vanlig kohabitasjonssmitte. I ferskvann var det modifisert kohabitasjonssmitte, hvor shedderne (parr ca. 30 g) var i et eget kar, og vannet i det karet ble sendt til et annet kar med kohabitantene (yngel ca. 1 g). I sjøvannsforsøket var ca. 30-50 % av kohabitanter PMCV-positiv ved 9-10 wpc, og hadde ingen kliniske tegn. Ved histologi hadde i.p-smittet fisk betennelse i atriet, og en score på 1,5 ved 8wpc. Kohabitanter ved 24 wpc hadde milde, fokale inflammatoriske forandringer i ventrikkel, og en score på 1. I ferskvannsforsøket var 2/6 sheddere PMCV-positive ved 9 wpc, og 6/6 ved 14 wpc. Ca. 50% av kohabitanter var positive ved både 9 og 14 wpc. Shedder ved 9 wpc hadde mild betennelse i atriet, mens shedder ved 14 wpc hadde uttalt betennelse [30].

Det ble utført en studie fra 2015-2018 i fisk ved utsett i sjø, hvor utvikling av infeksjon med PMCV, og utvikling av CMS i oppdrettslaks fra tolv steder i Norge ble undersøkt. Virus ble detektert på alle stedene, men kliniske tegn ble bare observert på seks steder. Fra utsett til PMCV+ varierte tidspunktet fra 1-7 måneder, og fra PMCV+ til CMS+ (kliniske tegn) tok det 3-13 måneder. Av de seks som var CMS+, ble PMCV detektert ved 3-5 måneder etter utsett. Det var lavest Ct-verdi hos dødfisk, i forhold til frisk fisk. CMS+ fisk hadde også lavere Ct-verdier enn CMS-. Det var en median tid på 10 måneder fra utsett til klinisk CMS. Lesjoner (lokaliserte skader) synes å utvikle seg først i atrium og deretter i ventrikkelen. Derfor blir det trodd at det beste vevet for detektering av PMCV vil være i atrium. Ved praktisering er det mest vanlig, og enklest å bruke spissen til ventrikkelen. Detektering i alle merdene i dette studiet indikerte enten at viruset spredde seg effektivt mellom merder på en plass, eller at det var et element av vertikal overføring/smitte [38].

Ut fra tidligere forsøk i VESO og smoltmodell var det ikke forventet dødelighet eller ytre/indre symptomer på CMS i dette forsøket. Man kunne forvente histopatologiske forandringer som betennesceller og nekrose i spongiosum i atrium og eventuelt ventrikkel, fra ca. 8 wpc. Som sekundærskade har det blitt observert pseudolobulering i milt ved fisk i sjø [21], og nekrose i lever hos smolt. Det var forventet at PMCV ble detektert med qPCR fra ca. 9 wpc, at Ct-verdiene minket ved økende antall uker etter smitte, ga mer virusmengde i shedder enn kohabitant, og mer i smolt enn i parr. Ved forsøk med PMCV kan histopatologiske forandringer i hjertevev vises ved 6 wpc, med en peak ved 9 wpc. Ved bruk av qPCR kan virusmengden ha en peak ved 6-7 wpc, men ofte har virusdetekteringen peak rundt 2 uker før histopatologiske forandringer [18].

6.1.1 Vekt og karmiljø

Vekst blir ofte brukt som en velferdsindikator, og er knyttet til fôring og ernæringsmessige behov. Ved mangel på fiskens behov, kan dette vises ved dårlig vekstytelse. Vekstraten kan påvises av blant annet appetitt, vannkvalitet og sykdom. For å få et helhetsbilde av fiskens vekst og velferd, er regelmessige veiinger en metode. Appetitt blir også brukt som en velferdsindikator, og rett mengde fôr er viktig. Underfôring kan føre til blant annet økt konkurranse, stress og aggresjon [39]. Antall individer i en tetthet påvirker flere faktorer, som blant annet konkurranse, biomasse, appetitt, og oksygennivå. Hvis oksygenmetningen blir for lav, kan dette føre til at appetitten til fisken blir redusert og aerob metabolisme kan ikke opprettholdes. Nedre grense for oksygenmetning som ikke påvirker appetitt hos parr ligger på 39 % ved 12,5°C, og hos smolt ligger den på 33 % ved 11°C [40]. Daglig/ukentlig ble det registrert antall fisk, fôrmengde og oksygen. Ut fra dette kunne programmet Didre beregne snittvekt, biomasse og flow.

Regelmessige veiinger ble ikke foretatt i dette forsøket, på grunn av at hovedmålet var påvisning av PMCV. I smoltforsøket ble det tatt vekt og lengde ved avslutning (tabell 17), som ble sammenlignet med beregnet snittvekt (blå graf – figur 34).

Ved forsøkets start ble det tatt en snittveiging av både parr og smolt, for å kunne beregne biomasse, fôrmengde og snittvekt underveis i delforsøkene. Ved en sammenligning mellom figur 34 og tabell 18 for smolt, så man at snittvekten var høyere på den virkelige vekten, og at shedderne var lettere enn kohabitantene. Dette kan stemme da shedderne i teorien hadde mer virus i kroppen enn kohabitantene [41]. Den beregnede snittvekten for både parr (blå graf – figur 22) og smolt hadde en moderat økning. Det var forventet at snittvekten økte med økende antall uker etter smitte, siden fisken kan ha god appetitt helt fram til en eventuell død [6]. Dette stemmer også overens med voksen laks i sjø, hvor fisken har normal vekstkurve fram til en eventuell død [3].

Grafene som viste fôrmengden var lik for både parr (gul graf – figur 22) og smolt (gul graf – figur 34). Fôrmengden ble ukentlig redusert på grunn av at det var mindre fisk i karet. Det ble foretatt en økning i uke 42 på grunn av observasjoner av finneslitasjer, og økt appetitt. Fôrprosenten ble dermed økt til 2 %, for å unngå underfôring (punkt 4.1.2) [42].

Grafene som viste antall fisk i karet ble likt redusert for både parr (grønn graf – figur 21) og smolt (grønn graf – figur 33), bortsett fra en dødfisk i smoltforsøket. Grafene ble reduserte som følge av uttak av totalt 12 fisk i hvert delforsøk ved hvert prøveuttak (punkt 4.2). Som følge av mindre fisk i karet ble mengde flow (rød graf – figur 21) også redusert, for å holde et stabilt oksygenivå. Biomassen i karet bestemmer mengde inntak av vann til enhver tid i karet [43], dette gjør at en reduisering i flow var forventet siden biomassen ble redusert ved uttak av fisk fra karet. I forhold til parr, ble det hos smolten målt oksygen. Dette var kun fordi fôrliste med flow-beregning ble laget for 12°C ferskvann i sin tid. Sjøvann må man ha mer forbruk av, siden det inneholder mindre oksygen. Oksygenivået i smoltforsøket (rød graf – figur 33) varierte mellom 69 % og 108 %. Ut fra fiskens trivsel vil man at oksygenet skal ligge på 100 %, men på grunn av penger og at laksen tåler et nivå på > 70 %, prøvde man å holde det på rundt 70-80 % ved 5-15 °C [44]. Hadde det vært snakk om produksjon av laks, hadde dette vært for lavt nivå av oksygen, men siden fisken ikke skulle vokse mye på kort tid, gikk det greit med et nivå på rundt 70-80 % [45]. Oksygenivået i smoltforsøket (rød graf – figur 33) varierte. Nedgang/økning kan ha indikert at vannflowen ble stilt ned/opp, for å redusere/øke oksygenivået i karet, siden mer vannstrøm og vannmengde gir mer oksygen [40].

Temperaturen skal ha vært stabil under hele forsøket, så temperaturforskjeller var lite trolig en påvirkningsfaktor på varierende oksygenivåer. Økningen av oksygen som skjedde fra uke 41 kan ha hatt noe med at antall fisk i karet ble redusert, uten at flowen ble redusert.

Oksygenivået kan variere ut fra hvor og når metningen er målt [40].

6.1.2 Dødelighet og observasjoner

CMS hos voksen og slakteklar laks i sjø kan opptre med plutselig dødelighet uten kliniske symptomer, men også kronisk med moderat økning av dødelighet [23]. Ved utbrudd med kliniske symptomer kan det forekomme tilfeller av skjelltap, blødninger, exophthalmia, forstørret atrium og *sinus venosus*, blodkoagel i hjertehulen, ascites og mørk/misfarget lever med eventuelt et fibrinlag over [46]. I forsøket beskrevet i referansen [46] var det to individer med fibrinlag, og fra 12 wpc hadde 14 individer misfarget lever. Videre i forsøket hadde flere individer skjelltap, blødninger og skader på finner. Ved tidligere smitteforsøk med parr og smolt, har ikke det vært dødelighet [41]. I forsøket med referanse [47] var det heller ikke observert dødelighet eller kliniske symptomer på PMCV.

Det forekom ikke dødelighet i parrforsøket, men ett tilfelle i smoltforsøket. Av den døde fisken ble det tatt bakteriologi på blodskål med salt, men prøven var negativ. Dette kan bety at fisken døde av andre årsaker, som f.eks. håndtering eller at den var en taper [48]. Hadde det blitt tatt bilde av den, eller vekt og lengde, kunne man ha hatt mer informasjon om hvorfor den døde. Det ble ikke observert unormal adferd, eller utseende forbundet med CMS [46]. Av innvendige symptomer ble det kun observert en lys flekk på levra hos en parr ved 10 wpc (figur 24), uvisst om det forekom hos flere individer eller om det var et tilfelle. Hadde man notert hvilket individ parren ved 10 wpc var, kunne man ha laget snitt av 10 wpc ved en senere anledning for å sammenligne levra. Det burde ha blitt laget obduseringsskjema for alle individene, slik at man kunne hatt en full oversikt over mulige symptomer. Figur 24 viste ellers at det var fôr i tarmene til parren, og fett i bukhulen. Fôr i tarmen kan tyde på for kort tid med sulting, siden den tydelig har spist. Fettet rundt organene kan tyde på at fisken har fått og spist næringsrik mat, siden fet fisk lagrer fett rundt innvollene og under huden, i tillegg til i muskelen [49].

6.1.3 Histologi

Histologiske undersøkelser av blant annet hjertevev kan ikke alene påvise PMCV, men er i tillegg til qPCR en av analysemetodene [13]. Ved en studie ble det påvist milde skader i atrium ved 6 wpc, og antall infiserte individer økte ved 9 wpc. Grad 4 som tilsvarer 2+ i denne oppgaven, ble funnet i fisk ved 24 wpc [46]. I en artikkel fra BMC genomics står det at hos post-smolt ble det funnet histopatologiske forandringer fra 6 wpc [47]. Også i en rapport fra Veterinærinstituttet står det om et smitteforsøk i sjø hvor det oppsto histopatologiske endringer ved 6 wpc, og nådde en topp ved 9-10 wpc [13]. Det er vist at fisk som er smitte med intraperitoneal og intramuskulær injeksjon transporterer PMCV via vannet og over til kohabitantene, som utvikler samme symptomer og histopatologiske forandringer som injisert fisk [18].

Fra tidligere forsøk viser det seg at sheddere får histologiske forandringer tidligere enn kohabitantene. Dette fordi shedderne var smittet med i.p., mens kohabitantene var smittet av agenset via vannet som shedderne hadde sluppet ut [41]. Ved dødelighet og obduksjon av voksen laks, er det vanlig å se signifikante forandringer i spongiosum i både atrium og ventrikkel. Dette vises som alt fra milde til multifokale og massive skader [50]. Det tyder også på at det er mer nekrose i voksen fisk, enn i parr og smolt [50]. Det står i [46] at fiskens størrelse kan beskrive hvorfor større fisk har flere infiserte individer, enn mindre fisk. Dette kan være fordi forholdet mellom hjerte og kroppsvolum minker ved økende fiskestørrelse. Større fisk vil derfor kunne ha en lavere hjertekapasitet enn mindre fisk.

I tillegg til betennelsesceller og nekrose i atrium og spongiosum i ventrikkel, har tidligere forsøk påvist pseudolobulering i milt, og nekroser i lever (punkt 2.2.2) som sekundærskader [23]. Et forsøk fikk dermed ikke påvist forandringer i levra [41].

Under lysmikroskopi ble hjertet, milt og lever undersøkt. Hos kontrollgruppa i parrforsøket (0 wpc) ble det som forventet ikke observert forandringer, siden disse fiskene ikke var smittet. Sheddergruppen (tabell 8) hos parr hadde totalt flere infiserte individer, og en gjennomsnittlig høyere score enn kohabitantgruppen (tabell 7). I parrforsøket hadde sheddergruppen første observerte histopatologiske forandring ved 6 wpc, mens kohabitantgruppen ved 8 wpc. I smoltforsøket hadde shedder- og kohabitantgruppen (tabell 19) like mange infiserte individer, men sheddergruppen hadde en gjennomsnittlig høyere score. Første observerte histopatologiske forandring ble gjort ved 6 wpc i sheddergruppen, og ved 7 wpc i kohabitantgruppen.

Scorene og antall positive individer tyder på at fisken kan være infisert med PMCV. I denne oppgaven var peak for histopatologiske forandringer ved 12 wpc, bortsett fra smolt kohabitant som hadde peak ved 9 wpc. I andre studier har peak vist seg å være ved 9 wpc [18].

Det nevnes i flere tidligere forsøk at virusmengde blir detektert i milt [47], men det står lite om histopatologiske forandringer i milt. Det ble ikke observert pseudolobulering i milt ved lysmikroskopi, men det ble laget tabell over hvilke individer som hadde blødninger/stuvninger i milten (tabell 10 og 11), siden dette ble observert gjentatte ganger. Sheddergruppen i parrforsøket (tabell 11) hadde flere individer med blødninger/stuvninger enn kohabitantgruppen (tabell 10). Seks fisk (8PK3, 12PK1, 14PK3, 6PS1, 9PS2, 14PS3) som hadde tegn til betennelse i hjertet og blødninger i milt. I smoltforsøket hadde totalt sett kohabitantgruppen flere individer med blødninger/stuvninger enn sheddergruppen (tabell 21). Sammenlignet med tabell 19 hadde seks individer (8SK1, 9SK3, 12SK1/2, 9SS3 og 12SS1), blødninger og stuvninger, og forandringer i hjerte. Det var også tilfeller av "bringebermilt" (figur 29 – bilde A) i både parr- og smoltforsøket, noe som viste seg ved mikroskopering å være utposninger av blod (erythrocytter). Ved hjertesvikt eller skade på milt kan det oppstå en blødning eller samling av blod (stuvning). På grunn av kapselen rundt milten, kan det se ut som at blodet utvidet kapselen, og dannet små poser [51]. Hvis blødningene var forårsaket av patologi, burde ikke kontrollfiskene vært berørte, siden disse ikke var smittet.

På grunn av sirkulasjonssvikt kan levra bli berørt av sekundære skader [23]. Ved fibrinlag over levra, kan dette vises ved lysmikroskopering [46]. Prøver av lever til histopatologisk undersøkelse blir i de fleste forsøk tatt ut [38], [50], [46], men det står lite om histopatologiske funn knyttet til PMCV. Det ble ikke observert nekrose i lever ved lysmikroskopi, men det ble notert hvilke individer som hadde vakuoler og mørkere hepatocytter (fargeforandringer) rundt blodkar. Vakuoler og fargeforandringer ble observert hos kontrollfisk (0 wpc) ved både parr og smolt. Hos parr hadde shedderne flere individer med vakuoler (tabell 15) og fargeforandringer (tabell 16), enn kohabitantene. Også i smoltforsøket hadde shedderne flere individer med vakuoler (tabell 24) og fargeforandringer (tabell 25), enn kohabitantene. I prosessen av å lage histologisnitt hvor framføring av vevet skjedde, ble lipider fjernet fra vevet, og dette etterlatte runde vakuoler hvor lipidene var [52]. På grunn av lite system i resultatene, og at man i figur 24 så at fisken hadde en del fett i buken, kan det tyde på at vakuolene ikke var knyttet til infeksjon. Nekroser vil ligge rundt vener, men med intakte hepatocytter som en mørk ring rundt vener (punkt 2.2.2). I dette forsøket ble det som nevnt ikke sett nekrose, slik som man ofte ser i voksen laks [50].

Det ble sett noen lyse områder, men med kjerner og strukturer, noe som gjorde det vanskelig å definere det som nekrose. Det ble spurt litt rundt, og forslagene var at det kanskje kunne være små forskjeller i pH som gjorde at cellene nærmest venene tok med seg basofil farge fra hematoxylin fra fargingen av snittene. Et annet forslag var på grunn av at hepatocytene ofte ligger annerledes rundt blodkar, og det finnes mer sinusoider lengre bort fra blodkar.

6.1.4 qPCR

Flere studier har vist at PMCV infiserer fisk ved i.p. og kohabitant-smitte [41]. Viruset replikerer og forårsaker systemisk infeksjon i hjerte, nyre, lever, milt, gjeller, serum i plasma, og hvite og røde blodceller [23]. Viruset kan dermed detekteres fra flere organer ved 4wpc [13]. Ved bruk av qPCR sammen med histologiske undersøkelser, kan man bekrefte at PMCV er årsaken til CMS. Detektering av viruset uten histopatologiske undersøkelser, kan ikke bekrefte PMCV [38]. Nivået av virusmengde og graden av skade i hjertevev har en klar sammenheng i fisk som er syk av CMS [23]. Av totalt 797 villaks (stamfisk) fikk to individer påvist PMCV, med Ct-verdier på 24,9 og 29,2 [53]. Ved virusdetektering av voksen dødfisk (laks) sto det i denne referansen [18] at det ble påvist PMCV ved 2 wpc, med en peak ved 6 wpc. I et annet forsøkt med i.p.-smitte hos post-smolt ble det detektert virus tidligst ved 4 wpc, med en peak ved 8 wpc [47]. Ved et forsøk med kohabitantsmitte ble den første kohabitanten positiv ved 9 wpc, og ved 10 wpc var flere positive. Etter 24 uker var 54% av kohabitantene PMCV-positive ved qPCR [41].

Ved qPCR i denne oppgaven ble det for parr detektert PMCV-positive individer tidligst ved 7 wpc i både sheddergruppen (figur 31) og kohabitantgruppen (figur 32). I både sheddergruppen og kohabitantgruppen var det kun 3/11 som i tillegg til Ct-verdi hadde histologiske forandringer. Ct-verdiene og antall positive individer økte med antall uker etter smitte, i både parr- og smoltforsøket. Antall individer med påvist PMCV i smoltforsøket økte fra 9 wpc til 12 wpc i sheddergruppen, mens i kohabitantgruppene ble det ikke påvist PMCV i noen av fiskene. 9SS3 og 12SS1 hadde begge histologiske forandringer i hjertet, og en score på 1 og 1,5. Dette kan indikere at individene var infiserte. I forsøket med smolt var gjennomsnittsverdien den samme for sheddergruppen ved 9 og 12 wpc (35,8). Ct-verdi på mindre enn eller lik 36 antyder påvisning, mens 37-40 kan være et tegn på tidlig infeksjon eller forurensning [24].

De fleste snittverdiene lå under 36, noe som tydet på at fisken var infisert med PMCV. Det ble ikke detektert virus i kohabitantgruppen for smolt, noe som ikke stemmer med teorien [41].

For alle prøvene ble det brukt samme betingelser for å minimere forskjeller. Forskjellene i uttrykk av PMCV kan bety at det var ulik virusmengde i de ulike individene. Ct-verdiene ble ikke normalisert med et referansegene i denne oppgaven. Hadde det blitt gjort hadde prøvene blitt normalisert, og man kunne ha utelukket eventuelle pipetteringsfeil i cDNA-syntese [54]. Forskjeller i Ct-verdiene kan bety at det er forskjeller i virusmengde, men det kan også være forskjeller som følge av f.eks. pipetteringsfeil.

Tanker til videre arbeid

I Tromsø befinner resten av prøvene seg. Det er vannprøver, serum, og prøver som ble tatt til histologi og qPCR. Skal man gå videre med forsøkene i denne oppgaven, kan man:

- Sjekke vannprøvene for virusmengde.
- Ta ELISA av serumprøvene.
- Snitte hjertet hos flere individer ved flere uker etter smitte, eventuelt også lage snitt av de andre organene.
- Kjøre qPCR av flere individer ved flere uker etter smitte.

Hadde man kjørt qPCR av individer fra tidligere uker etter smitte, kan det hende at man hadde detektert PMCV tidligere enn ved 7 wpc, med tanke på at det ble funnet histologiske forandringer der. Det kunne ha vært lurt å lage snitt av resterende individene i 7 wpc og 9 wpc, for å ha sett om det var histologiske forandringer hos individene 4-6.

Konklusjon

- Det oppsto ingen dødelighet som følge av PMCV i parr- og smoltforsøket. Det ble heller ikke observert unormal adferd eller utseende.
- Histologiske forandringer i form av infiltrasjon av betennelsesceller i atrium ble påvist i shedder- og kohabitantgruppene i parr- og smoltforsøket.
- I både parr- og smoltforsøket ble det lavere virusmengde i hjertet og flere infiserte individer ved økende antall uker etter smitte. Det ble ikke detektert PMCV i smolt kohabitant.

Alt i alt kan det tyde på at lakseparr kan være mottakelig for PMCV i kohabitant smittemodell, ved bruk av analysemetodene histologi og qPCR.

Referanseliste

- [1] Helsedirektoratet, «Kostråd om fisk og sjømat,» 20 November 2018. [Internett]. Available: <https://www.helsenorge.no/kosthold-og-ernaring/kostrad/spis-fisk-oftere>. [Funnet 18 November 2020].
- [2] C. Fritsvold og B. B. Jensen, *Hjertesprekk eller kardiomyopatisyndrom (CMS)*, Veterinærinstituttet, 2019, pp. 52-55.
- [3] E. Brun, T. Poppe, A. Skrudland og J. Jarp, «Cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: occurrence and direct financial losses for Norwegian aquaculture,» *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, nr. 56, pp. 241-247, 24 Oktober 2003.
- [4] Veterinærinstituttet, «Kardiomyopatisyndrom,» [Internett]. Available: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/kardiomyopatisyndrom-cms>. [Funnet 11 November 2019].
- [5] VESO, «Challenge models,» [Internett]. Available: <https://www.veso.no/challenge-models?parent=10012>. [Funnet 22 April 2021].
- [6] T. Poppe, *Fiskehelse og fiskesykdommer*, Oslo: Universitetsforlaget, 2019.
- [7] A. Vøllestad, «Laks,» 2 Oktober 2019. [Internett]. Available: <https://snl.no/laks>. [Funnet 28 Mars 2021].
- [8] T. A. Steinset, «Frå attåtnering til milliardindustri,» 13 Februar 2017. [Internett]. Available: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/fra-attatnaering-til-milliardindustri>. [Funnet 24 Februar 2021].
- [9] R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre og Ø. Lie, «Utviklingen av oppdrettsarter globalt,» i *Fiskeernæring*, Bergen, Kystnæringen Forlag og Bokklubb AS, 2001, pp. 323-339.
- [10] Mattilsynet, «Forsøksdyr: Supersmolt benchmark,» 21 Februar 2020. [Internett]. Available: https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrevelferd/forsoksdyr/forsoksdysoknader/supersmolt_benchmark.37756. [Funnet 28 Mars 2021].
- [11] C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic og K. Gismervik, *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*, Tromsø: Nofima, 2018.
- [12] A. Stene, L. Gansel og M. D. Jansen, «Strategier for å begrense spredning av virus mellom sjølokaliteter med laksefisk,» NTNU, 2018.

- [13] Å. H. Garseth, J. Svendsen, C. Fritsvold og A. B. Mikalse, «Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks,» Veterinærinstituttet, 2017.
- [14] Å. H. Garseth og C. Fritsvold, «Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks,» [Internett]. Available: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/kardiomyopatisyndrom-cms-hos-laks>. [Funnet 19 November 2020].
- [15] C. Fritsvold og B. B. Jensen, «Fiskehelsesrapporten 2019,» Veterinærinstituttet, 2020.
- [16] B. B. Jensen, Å. H. Garseth og J. C. Svendsen, «Sluttrapport: «Epidemiologisk studie av Kardiomyopatisyndrom (CMS): Spredning, risikofaktorer og sykdomsforløp i norsk lakseoppdrett (CMS-Epi)»(901118),» Veterinærinstituttet, 2019.
- [17] C. Fritsvold og B. B. Jensen, «Fiskehelsesrapporten 2020,» Veterinærinstituttet, 2021.
- [18] Ø. Haugland, A. B. Mikalsen, P. Nilsen, K. Lindmo, B. J. Thu, T. M. Eliassen, N. Roos, M. Rode og Ø. Evensen, «Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the Totiviridae Family,» Juni 2011. [Internett]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>. [Funnet 13 Mai 2021].
- [19] H. Kryvi og T. Poppe, Fiskeanatomy, Bergen: Fagbokforlaget, 2016.
- [20] A. B. Amin, L. Mortensen og T. Poppe, Histologisk Atlas - Normalstruktur hos laksefisk, Bodø: Akvapatologisk laboratorium AS, 1991.
- [21] R. T. Kongtorp, E. Brun, T. Taksdal og A. Lillehaug, «Kardiomyopatisyndrom (CMS) i Norge,» Veterinærinstituttets, 2006.
- [22] R. T. Kogntorp, T. Taksdal og A. Lillehaug, «Cardiomyopathy syndrome (CMS): a literature review,» Veterinærinstituttet, 2005.
- [23] Å. H. Garseth, C. Fritsvold, J. C. Svendsen, B. B. Jense og A. B. Mikalsen, «Cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: A review of the current state of knowledge,» Journal of Fish Diseases, Oslo, 2017.
- [24] Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory, «What does CT mean?,» 25 April 2018. [Internett]. Available: <https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2018/05/What-does-CTmeanfinahandoutJanuary2014.pdf>. [Funnet 21 April 2021].
- [25] Benchmark Genetics, «SALMOBREED MED GENETIKK SOM VIRKEMIDDEL MOT KARDIOMYOPATI SYNDROM (CMS),» [Internett]. Available: <https://salmobreed.no/articles/nyhet-genomisk-seleksjon-for-cms/>. [Funnet 20 April 2021].
- [26] Biomar, «OM HSMB OG CMS,» [Internett]. Available: <https://www.biomar.com/no/norway/arkiv/produkt/qardio/om-hsmb-og-cms/>. [Funnet 21 April 2021].

- [27] P. Holck, «Histologi,» 26 Juni 2020. [Internett]. Available: <https://sml.snl.no/histologi>. [Funnet 29 Mars 2021].
- [28] G. S. Johansson, «Protokoll normal histologi,» Universitetet i Tromsø.
- [29] F. A. Winger, «Morphological and gene expressional effects of a 30 second warmwater treatment on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.),» Universitetet i Tromsø , 2020.
- [30] M. Inami, M. Løvoll og E. Rimstad, «Utvikling av smittemodell for kardiomyopatisyndrom (CMS),» VESO Vikan, 2019.
- [31] I. f. biovitenskap, «PCR,» 21 Desember 2020. [Internett]. Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>. [Funnet 16 April 2021].
- [32] Thermo Fisher Scientific, «Introduction to Gene Expression,» Thermo Fisher Scientific, 2018.
- [33] S. Samant, E. Hamdeh og C. Lee, «Viral RNA Isolation Methods Reviewed: Spin vs. Magnetic,» 22 Mai 2020. [Internett]. Available: <https://www.kbdna.com/publishinglab/viral-RNA-isolation-methods-reviewed-spin-vs-magnetic>. [Funnet 15 Mars 2021].
- [34] sigmaaldrich, «DTT,» 2021. [Internett]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/dttro?lang=en®ion=NO>. [Funnet 15 Mars 2021].
- [35] Qiagen, «What is the composition of Buffer RLT?,» [Internett]. Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=2acb974c-4cca-4744-a2cf-60b5f483339b&lang=en>. [Funnet 15 Mars 2021].
- [36] Qiagen, «What is the composition of Buffer RW1?,» [Internett]. Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=f1993258-73ac-4c5d-929a-528459328e5f&lang=en>. [Funnet 15 Mars 2021].
- [37] M. Inami, M. Løvoll og E. Rimstad, *Development of CMS challenge models*, Bergen: VESO, 2018, p. 18.
- [38] J. C. Svendsen, S. Nylund, A. B. Kristoffersen, H. Takle og J. F. J. B. B. Buhaug, «Monitoring infection with Piscine myocarditis virus and development of cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway,» 26 Februar 2019. [Internett]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfd.12974>. [Funnet 24 April 2021].
- [39] C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic og K. Gismervik, «3.1 Gruppebaserte velferdsindikatorer,» i *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*, Tromsø, Nofima, 2018, pp. 28-43.

- [40] C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic og K. Gismervik, «4.1 Vannkvalitetsbaserte velferdsindikatorer,» i *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*, Tromsø, Nofima, 2018, pp. 83-94.
- [41] H. Su, A. von Eerde, H. S. Steen, I. Heldal, S. Haugslie, I. Ørpetveit, S. C. Wüstner, M. Inami, M. Løvoll, E. Rimstad og J. L. Clarke, «Establishment of a piscine myocarditis virus (PMCV) challenge model and testing of a plant-produced subunit vaccine candidate against cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*,» *Aquaculture*, p. 10, 20 April 2021.
- [42] R. A. Lund, L. P. Hansen og T. Järvi, «Finnene røper oppdrettslaksen,» [Internett]. Available: https://www.nina.no/archive/nina/PppBasePdf/fakta%5C1989_1.pdf. [Funnet 10 Mai 2021].
- [43] A. Kittelsen, T. Rosten, Y. Ulgenes, J. R. Selvik og H. Alne, «Tilgjengelige ferskvannsressurser til fremtidig produksjon av settefisk av laks og ørret,» FHL Havbruk, 2006.
- [44] T. W. Rosten, «Oksygen i vann - hva er det beste for sken?,» 2009. [Internett]. Available: https://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2009_794726.pdf. [Funnet 10 Mai 2021].
- [45] Biomarine, «Effektiv tilsetning og kontroll med oksygen i lukkede merder,» 2020. [Internett]. Available: <https://www.biomarine.no/effektiv-tilsetning-og-kontroll-av-oksygen-i-lukkede-merder/>. [Funnet 10 Mai 2021].
- [46] C. Fritsvold, R. T. Kongtorp, T. Taksdal, I. Ørpetveit, M. Heum og T. T. Poppe, «Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*,» *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, nr. 87, pp. 225-234, 3 Desember 2009.
- [47] G. Timmerhaus, A. Krasnov, P. Nilsen, M. Alarcon, S. Afanasyev, M. Rode, H. Takle og S. M. Jørgensen, «Transcriptome profiling of immune responses to cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon,» 23 September 2011. [Internett]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/459>. [Funnet 19 April 2021].
- [48] C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic og K. Gismervik, «3.2 Individbaserte velferdsindikatorer,» i *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*, Tromsø, Nofima, 2018, pp. 44-82.
- [49] B. E. Torstensen, L. Frøyland og Ø. Lie, «Lipider,» i *Fiskeernæring*, Bergen, Kystnæringen Forlag & bokklubb AS, 2001, pp. 58-66.
- [50] H. W. Ferguson, T. Poppe og D. J. Speare, «Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon,» *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, nr. 8, pp. 225-231, 12 Juli 1990.
- [51] NHI, «Miltskade,» 27 Mars 2019. [Internett]. Available: <https://nhi.no/sykdommer/kirurgi/skader/miltskade/>. [Funnet 10 Mai 2021].

- [52] J. Cullen, «Hepatic Toxicology,» 2010. [Internett]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/haematoxylin>. [Funnet 10 Mai 2021].
- [53] Å. H. Garseth, E. Biering og T. Tengs, «Piscine myocarditis virus (PMCV) in wild Atlantic salmon *Salmo salar*,» *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, pp. 157-161, 27 Desember 2012.
- [54] S. S. Machiedo, «Referansegen i qPCR-analyser av humane endotelceller fra koronararterier (HCAEC),» Universitetet i Tromsø, Tromsø, 2014.
- [55] R. Jakobsen, «Smoltifisering hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.): Betydning av stress, temperatur og akklimering,» 2013.
- [56] S. Chatterjee, «Artefacts in histopathology,» 18 September 2014. [Internett]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211218/>. [Funnet 10 Mai 2021].

