

Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks

Sykdomsutvikling - Agens - Epidemiologi



Kardiomyopatisyndrom (CMS) hos laks

Sykdomsutvikling - Agens - Epidemiologi

Innhold

Introduksjon	2
Kardiomyopatisyndrom - sykdomstegn, patologiske funn og vertsrespons	3
Piscint myokarditt virus - PMCV	7
Epidemiologi - forekomst, risikofaktorer og smitteveier	11
Sykdomskontroll og - bekjempelse	15
Produksjonstap	19
Sammendrag	20
Takksigelser	22
Informasjon om CMS-Epi prosjektet	22
Referanser	23

Forfattere

Åse Helen Garseth, Julie Svendsen, Camilla Fritsvold og Aase B. Mikalsen

Redaktør

Åse Helen Garseth

Prosjektleder:

Britt Bang Jensen, Veterinærinstituttet

ISSN 1890-3290©

Veterinærinstituttet 2017

Oppdragsgiver: FHF (Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond)

Samarbeidspartnere:

Marine Harvest ASA, SalMar ASA, Cermaq Group AS, Pharmaq Analytiq AS, Lerøy Seafood Group ASA,

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Stor og fin fisk død av CMS fotografert av T.T. Poppe

Introduksjon

I likhet med andre intensive husdyrproduksjoner representerte etableringen av storskala oppdrett av laks en endring i smittestoffenes mulighet for oppformering og spredning til nye individer. Dette har resultert i fremvekst av en rekke infeksjonssykdommer i næringen [1, 2]. Samtidig representerte hold av fisk i fangenskap en mulighet til å observere og beskrive infeksjonssykdommer hos fisk [3]. I fiskehelseperspektiv er 1980-tallet først og fremst forbundet med fremvekst av ulike bakteriesykdommer. Flere av disse ble utover 1990-tallet kontrollert gjennom bruk av vaksiner. De største sykdomsproblemene i dagens oppdrett er, foruten lakselus forårsaket av virus: pankreassjuka (PD), infeksjøs lakseanemi (ILA), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), infeksjøs pankreasnekrose (IPN) og kardiomyopatisyndrom (CMS).

Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en alvorlig hjertelidelse som først ble omtalt fra oppdrett av laks på Nordmøre i 1985. Sykdommen skilte seg fra andre infeksjonssykdommer ved at det primært var stor, hurtigvoksende fisk som ble rammet (jmfør forsidefoto). Hos disse var blod i hjertesekken, og til tider også bukhulen, et hyppig funn. Dette skyldes at sykdommen svekket muskulaturen i hjertets forkammer og tilhørende blodkar slik at veggen revnet, - derav navnet «hjertesprekk» [4]. Den første vitenskapelige beskrivelsen av CMS hos norsk laks kom i 1988 [5], og i de påfølgende årene ble sykdommen også påvist på Færøyene (1992)[6, 7], i Skottland (1995) [8] og Irland (2012) [9]. En CMS-lignende hjertelidelse er også beskrevet fra hold av laks i Canada (2001) [10].

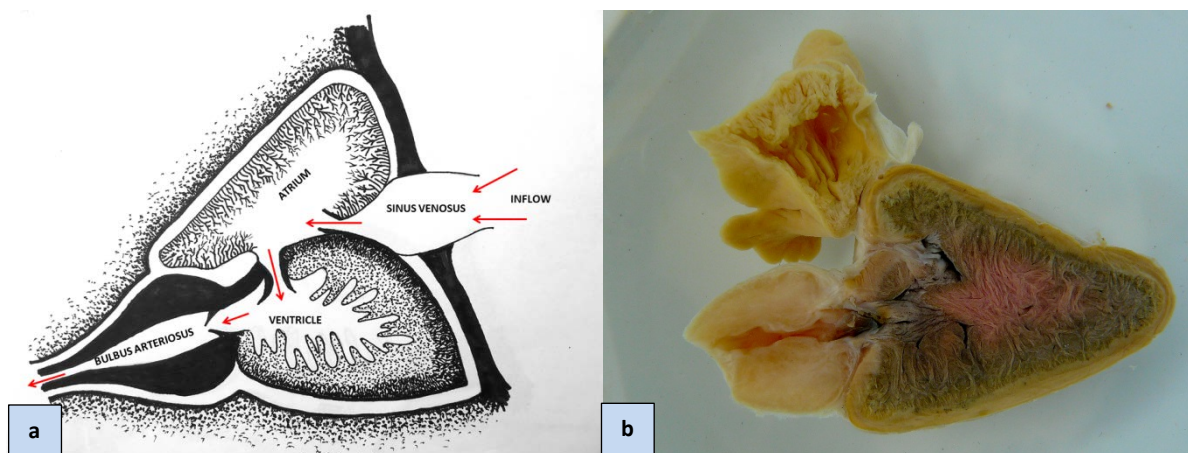
CMS forekommer i dag hos oppdrettslaks langs hele norskekysten, og er en av de viktigste og mest tapsbringende sykdommene i vår oppdrettsnæring. En samlet innsats fra næringen, fiskehelsetjenester og forskningsinstitusjoner har bidratt til kunnskap om sykdommen, herunder hvordan den opptrer, risikofaktorer og økonomiske betydning. I denne sammenheng er det også tidligere publisert kunnskapssammenstillinger [4, 11, 12]. Årsaken til CMS var imidlertid lenge ukjent og gjenstand for betydelig diskusjon. Både genetikk, ernæring, miljøfaktorer og anatomiske forhold er trukket frem som mulige faktorer[13]. Troen på et smittsomt agens har likevel holdt seg og da særlig mistanken om at sykdommen skyldtes et virus. Allerede i den første beskrivelsen av CMS ble det vist til funn av intranukleære inklusjonslegemer som tegn på virusinfeksjon [5]. Senere har både noda-lignende virus [14] og infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV) blitt assosiert med sykdommen [15], men uten at et direkte årsaksforhold ble funnet. I 2009 ble det vist at sykdommen kunne overføres med vev fra CMS-syk laks og dermed skyldtes et smittsomt agens [16, 17]. I 2010 og 2011 påviste to ulike forskergrupper et virus - piscint myokarditt virus (PMCV) i tilknytning til CMS [18, 19].

Karakteriseringen av viruset markerte et viktig tidsskille i kunnskapsutviklingen om CMS. Nye metoder og verktøy ble tilgjengelig og et betydelig antall studier ble igangsatt og gjennomført. Med dette som bakgrunn ble også det treårige FHF-finansierte forskningsprosjektet «Epidemiologisk studie av kardiomyopatisyndrom (CMS): Spredning, risikofaktorer og sykdomsforløp i norsk lakseoppdrett» lansert i 2015 (FHF prosjekt 901118). Dette forskningsprosjektet har som overordnet mål å øke kunnskapen om spredning av PMCV og faktorer som påvirker utviklingen av klinisk CMS. Kunnskapsformidling er et viktig delmål i prosjektet, og i den forbindelse er publisert og upublisert viten om CMS og PMCV gjennomgått og sammenstilt i denne rapporten. Rapporten er dermed en leveranse i Arbeidspakke 4 i prosjektet og gir en helhetlig fremstilling av kunnskapsstatus, med størst fokus på sykdomsutvikling, agens og epidemiologi. Rapporten vil bli oppdatert med ny kunnskap i sluttfasen av prosjektet.

Kardiomyopatisyndrom - sykdomstegn, patologiske funn og vertsrespons

Kardiomyopatisyndrom (CMS) er en kronisk sykdom i hjertet hos atlantisk laks. CMS opptrer oftest hos fisk med god vekst og i normalt hold andre året i sjø. Dødeligheten utvikler seg langsomt, men med episoder av forhøyet dødelighet i forbindelse med stressende håndtering, ugunstige miljøforhold eller generelt sykdomsstress. Diagnosen CMS stilles på grunnlag av kliniske symptomer, funn ved obduksjon og histopatologisk undersøkelse. Obduksjonsfunnene er sirkulasjonsforstyrrelser og blødning til hjertesekken. Histopatologiske funn er betennelse og nekrose i hjertemuskelceller og i hjertets indre, svampaktige muskellag (spongiøst myokard). Skadene opptrer først i forkammeret (atriet), før de brer seg videre til hjertekammeret (ventrikkelen).

Hjertets normale anatomi og funksjon

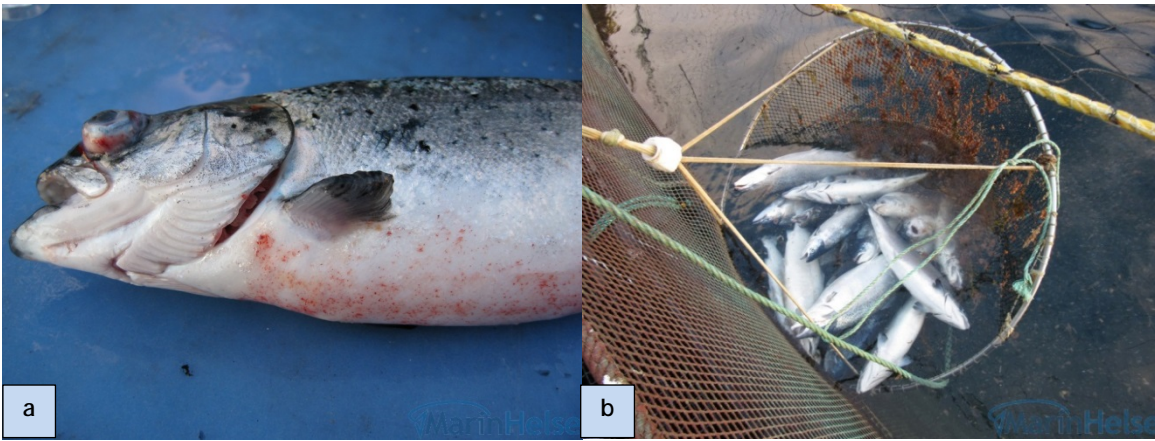


Figur 1: Normal anatomi for laksehjertet (gjennomskåret), skjematisk tegning og foto. 1a) Viser blodets retning gjennom de fire hjertekamrene *sinus venosus*, *atrium* (forkammer), *ventrikkel* (hjertekammer) og *bulbus arteriosus* (røde piler). 1b) Viser et villakshjerte (formalinfiksert). Foto og skjematisk tegning. T.T. Poppe.

Hjertets funksjon er å pumpe oksygenfattig blod gjennom gjellene. I gjellene tar blodet opp oksygen før det føres videre til kroppens muskulatur og indre organer. Det oksygenfattige, venøse blodet returnerer deretter til hjertets *sinus venosus* og forkammer før det pumpes videre fra hjertekammeret via *bulbus arteriosus* og inn i gjellene igjen (Figur 1). *Bulbus arteriosus* sin funksjon er å gi et jevnt trykk i blodstrømmen gjennom gjellene [20].

Sykdomstegn på fiskegruppe og individnivå

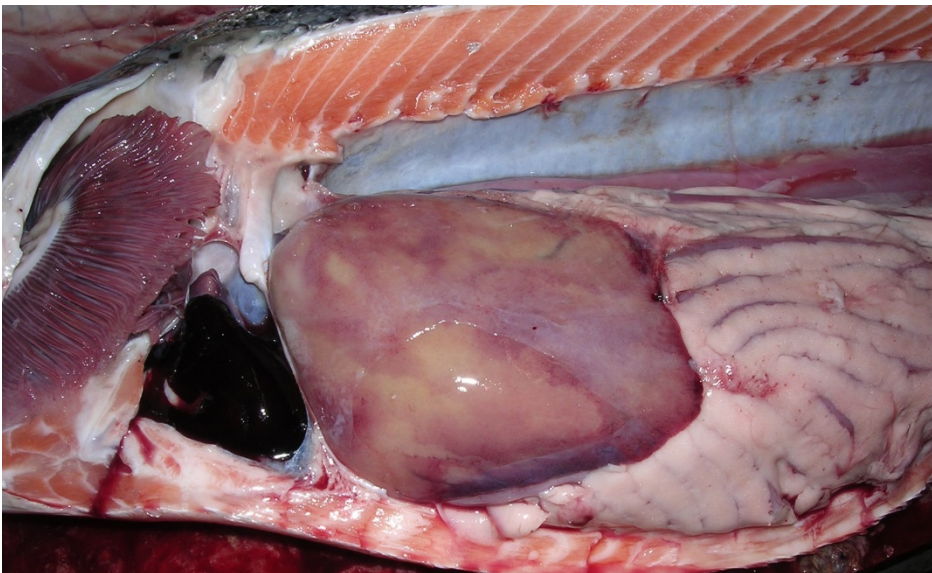
CMS-diagnosen settes på grunnlag av funnene man gjør i fisken ved klinisk undersøkelse, obduksjon og påfølgende histopatologisk undersøkelse. Det er uvanlig å finne svimere med CMS, og dødfisk med CMS er vanligvis i normalt eller godt hold. Fisk med CMS kan således dø brått uten kliniske symptomer, for eksempel i forbindelse med fôring, håndtering eller andre stressende omstendigheter. Alternativt kan de vise klare tegn til sirkulasjonsforstyrrelser noen dager før døden inntreffer. I slike tilfeller er de typiske kliniske symptomene sløvheter, nedsatt appetitt, skjellommeødem, utstående øyne og utspilt buk med blødninger i huden (Figur 2a). Skjellommeødemet gir fisken et grålig, rufsete preg i merden [4, 6]. På gruppenivå gir CMS oftest lav til moderat forhøyet dødelighet over flere uker og måneder. Akutt høy dødelighet sees sjelden, men episoder med uvær, algeoppblomstring eller generelt sykdomsstress kan gi slik forbigående forhøyet dødelighet avløst av en periode med redusert dødelighet [4] (Figur 2b).



Figur 2: 2a) Laks med CMS og alvorlige sirkulasjonsforstyrrelser. Buken er utspilt på grunn av væske i bukhulen (ascites), det observeres også små, punktformede blødninger i huden (petecchier) og utstående øyne (exophthalmia). 2b) Ofte er det et misforhold mellom observert antall svimere (få fisk) og funn i dødfiskhoven (mange fisk).
Foto: Per Anton Sæther, MarinHelse AS

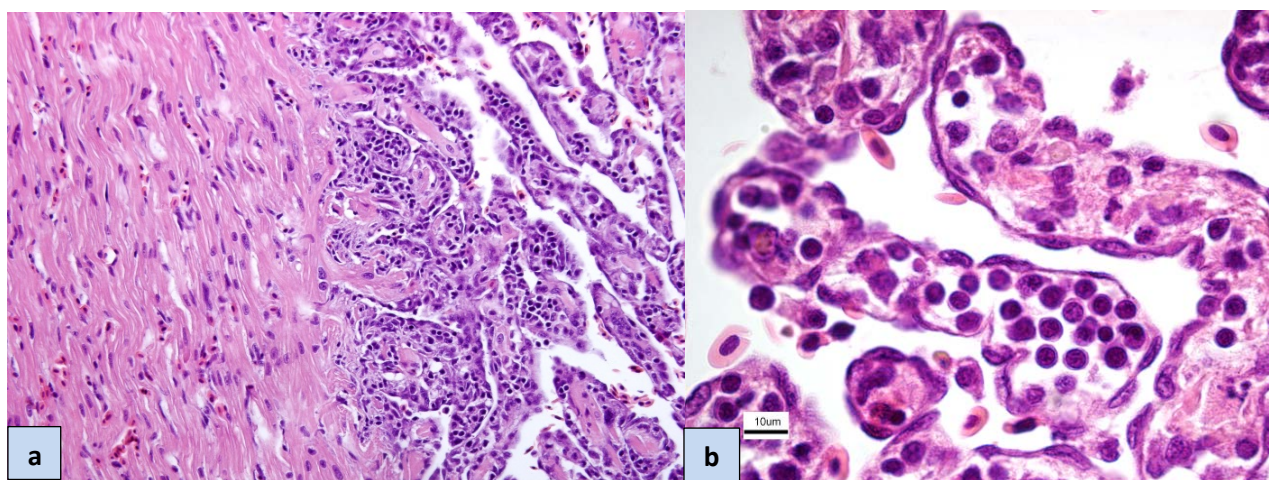
Patologiske forandringer

Fisk med CMS kan ha både makroskopiske og mikroskopiske tegn på alvorlig sirkulasjonsforstyrrelse (Figur 3). Vanlige obduksjonsfunn i fisk med CMS er blødninger i hud (særlig under buken), skjellommeødem og utstående øyne (exophthalmia). Mørkfarget lever, væske i bukhulen (ascites) og fibrinøst belegg på leveroverflaten er også vanlig å finne. Hjertets atrium (forkammeret) og *sinus venosus* er som oftest forstørret og utspilt. Noen ganger er dette så ekstremt at forkammer har revnet, med blod eller blodkoagler i hjertesekken som resultat [21]. Dødfisk kan også være helt uten makroskopiske funn, men allikevel ha alvorlige histopatologiske CMS-forandringer i hjertet.



Figur 3: Laks med typiske CMS-relaterte obduksjonsfunn. Blodkoagel i hjertesekken (hjertetamponade), væske i bukhule, skjoldet lever med fibrinløser. Fisken er ellers feit og fin. Foto: Brit Tørud.

Histopatologisk karakteriseres CMS av betennelse og fortykket endokard (cellelaget som kler hjertets innside) og nekrose i muskelceller i spongjøst myokard (hjertets indre, svampaktige muskellag). Forandringene sees først i atriet (forkammeret), før de brer seg videre til ventrikkelen (hertekammeret) [22] (Figur 4). Betennelsescellene er hovedsaklig mononukleære celler, sannsynligvis lymfocytter og makrofager, som først påvises subendokardialt (rett under endokardlaget på hjertes indre muskeloverflater) før også muskellaget innenfor infiltreres. I alvorlige tilfeller av CMS kan det utvikles en cellerik epikarditt (betennelse) på hjertets ytterflate. Hjerterventrikkelenes kompakte muskellag (kompaktum) er som regel uten betennelsesforandringer, men betennelsesceller fra en epikarditt kan bre seg innover i kompaktum langs større blodkar i tilfeller med uttalte CMS-forandringer [23]. Kraftige betennelsesforandringene er årsaken til at forkammerveggen og/eller veggen i sinus venosus blir svekket og kan bryte, med blod i hjertesekken (hertetamponade) og brå død som resultat. Forkammerforandringene er som regel mer uttalte enn forandringene i hertekammeret, og hertesvikten med påfølgende alvorlig stuvning kan gi CMS-relaterte forandringer også i andre indre organer som lever og milt.



Figur 4: Typiske histopatologiske funn ved CMS: Figur 4a) viser den tydelige forskjellen mellom normalt vev i hjerterventrikkelenes kompakte muskellag (mot venstre i bildet) og uttalte CMS-forandringer med riklig infiltrasjon av betennelsesceller i det indre, spongjøse muskellaget (mot høyre i bildet). Figur 4b) Høy forstørrelse av langt framskredne, klassiske CMS-forandringer i spongjøs hjertemuskel. Noen steder kun betennelsesceller innenfor endotelcellelaget som kler muskeloverflaten, og andre steder kun rester av hjertemuskulaturen (lys rosa) igjen, iblandet betennelsesceller. Foto. T.T. Poppe.

Differensialdiagnoser

Hjerteforandringene ved CMS kan likne de man finner ved de to viktige differensialdiagnosene pankreassjuka (pancreas disease - PD) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), men typiske tilfeller av disse tre sykdommene lar seg lett skille histopatologisk [24-26]. Både PD og HSMB fører til hjerteforandringer med alvorlig betennelse og til dels nekroser i hjertemuskulatur, i tillegg til de sykdomstypiske forandringene i eksokrin pankreas (PD) og skjelettmuskulatur (både PD og HSMB). Utypiske tilfeller eller samtidig forekomst av to eller alle tre av disse sykdommene i ett og samme individ er ikke uvanlig, og kan gjøre den histopatologiske diagnostiseringen vanskeligere [27].

Vertrespons

Det er ikke kjent hvor lang tid det tar før fisk i sjø som utsettes for smitte utvikler CMS-forandringer. Gjentatte prøveuttak viser imidlertid at PMCV kan være tilstede i et anlegg i lang tid uten at klinisk CMS påvises i fiskegruppa [28]. I smitteforsøk finner man tidlige histopatologiske forandringer omtrent 6 uker etter smitte, avhengig av smittemodell [16, 17]. Tidligere erfaring fra felt og forsøk antyder at CMS hovedsakelig er en kronisk sykdom som utvikler seg gradvis over flere måneder, kanskje år, før fisken viser kliniske forandringer og/eller dør [12, 16, 19, 23, 29], men i de siste årene har det vært et økende antall tilfeller der sjøsatte fisk så små som 100-300g også har CMS-forandringer og dør av CMS (pers. obs. C. Fritsvold). Laksens hjerte- og sirkulasjonssystem ser ut til å ha en betydelig reservekapasitet, slik at kliniske symptomer kun utvikles i endestadiene av sykdommen. Ut ifra de histopatologiske endringene i hjerte, kan man utlede det patofysiologisk forløpet til sykdommen [4]. Forandringene i for- og hjertekammer reduserer hjertets pumpeevne. Etter hvert vil blod hope seg opp på venøs side. Denne blodstuvningen er trolig årsaken til væskeopphopning i bukhule (ascites) og i skjellommer, og til blødningene på buken. Som beskrevet tidligere, kan svekkelsen og trykket i enkelte tilfeller medføre at forkammeret, som har den tynneste veggen, brister [4].

I smitteforsøk påvises de histopatologiske endringene fra 6 uker etter smitte, og når en topp 9-10 uker etter smitte [19, 29]. Virus oppformerer i flere organer og kan påvises fra fire uker etter smitte. Det er god korrelasjon mellom virusmengde og vevskader i hjerte, et tegn på at celledød som oppstår i forbindelse med virusoppformering har betydning for utvikling av vevsskade i hjertet [19, 29]. Det er også god overensstemmelse mellom høyeste nivå av virusbelastning og hjertepatologi, og induksjon av immunforsvar i form av hjertespesifikk T-cellerespons og aktivering av komplementsystemet i milt. Dette skjer forut for en reduksjon i virusbelastning og patologiutviklingen, hvilket tyder på at responsen er viktig for rekonvalesensen [29]. I smitteforsøk kan infeksjonen forløpe ulikt hos enkeltindivider. En studie har vist at såkalte High responders (HR) har en høyere virusbelastning og mer alvorlig patologi seks uker etter infeksjon enn såkalte Low responders (LR). Low responders ser ut til å kunne tolerere samme infeksjonsnivå (her målt i mengde virus transkripter) uten å utvikle hjertepatologi, muligens forårsaket av en tidligere aktivering av immunforsvaret og/eller dempet utvikling av T-lymfocytære og inflammatoriske responser, slik at de raskere reduserer virusbelastningen og patologi. Hos HR er responsen senere og i form av et sterkt og vedvarende uttrykk av gener som er involvert i cellulær immunrespons [30, 31].

Kunnskapshull

- Hvilket organ bruker viruset som innfallsport?
- Hvordan spres viruset i fisken?
- Kan viruset gi persistent infeksjon, evt. med base i et annet organ enn hjertet?
 - Hva utløser i så fall sykdom?
- Kan smittet fisk kvitte seg med viruset?
 - Uten å bli syk?
 - Etter at den har utviklet vevsforandringer? Hvor lang tid tar dette?
- Er det ulike sykdomsforløp i ung fisk som infiseres av viruset tidlig og i større fisk som infiseres seinere?

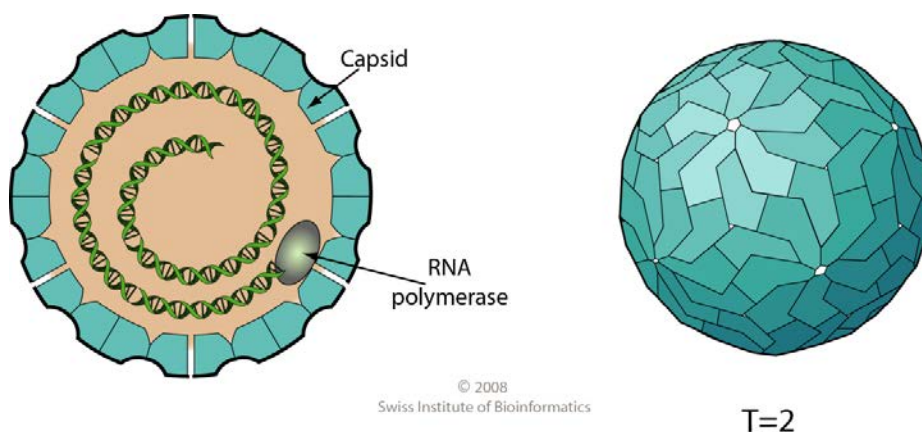
Piscint myokarditt virus - PMCV

CMS ble i 2010 vist å være forårsaket av et virus, piscint myokarditt virus (PMCV). Viruset er relativt lite og enkelt oppbygget med et kappeprotein som omslutter et RNA arvestoff. Virusets hovedinfeksjonsmål er laksens hjertemuskelceller. Det er mulig å detektere både virusets arvestoff og dets kappeprotein i infisert vev og celler. Viruset finnes hovedsakelig i CMS-syk laks i oppdrett. De genetiske forskjellene mellom virusisolater er små.

Virusklassifisering

CMS forårsakes av piscint myokarditt virus (PMCV) [19]. Arvestoffet til PMCV har mange likheter med virus i familien *Totiviridae*, en familie bestående av fem genus med virus som gir persistent infeksjon i parasitter og sopp. I tillegg til PMCV har flere andre virus med likheter til *Totiviridae* blitt funnet i senere tid. Alle disse «toti-lignende» virusene har egenskaper som tyder på at de er mer komplekse enn de registrerte totivirusene [32-35]. PMCV er det første toti-lignende viruset som er vist å ha evne til å infisere et virveldyr. Det siste året har imidlertid to nye toti-lignende virus blitt påvist i karpefiskene Golden shiner i USA [36, 37]. Ingen av de toti-lignende virusene har så langt blitt inkludert som medlemmer av familien *Totiviridae*.

Mens de registrerte medlemmene i totivirus-familien overføres til nye celler gjennom celledeling eller cellefusjon, blir de toti-lignende virusene overført mellom celler via cellenes omgivelser (ekstracellulære omgivelser). Alle de toti-lignende virusene har også ekstra gener og protein-kodende arvestoff som man antar kan knyttes til evnen til å skille ut viruset fra en celle og/eller ta opp viruset fra omgivelsene [19, 38].

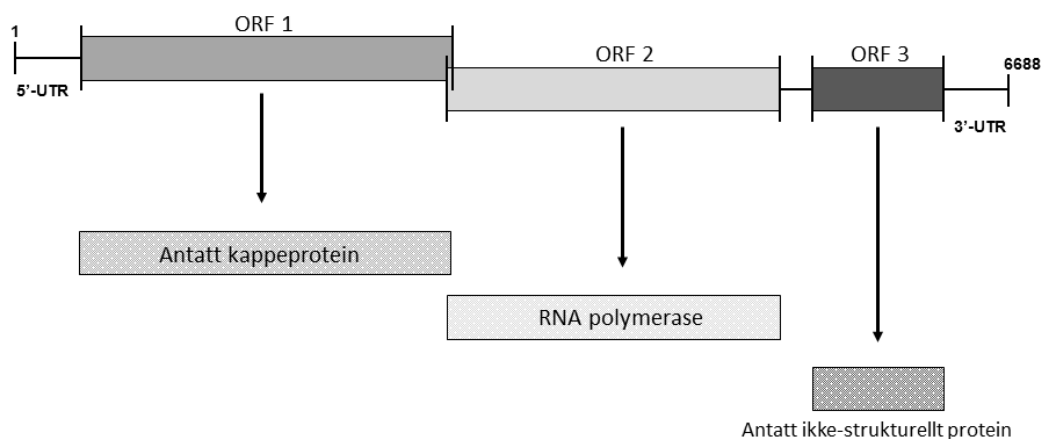


Figur 5: Figuren viser hvordan virus i familien *Totiviridae* er oppbygd. Arvemateriale, i form av ett segment med dobbeltrådet RNA er pakket inn i et enkelt proteinskall. Proteinskallet er sannsynligvis oppbygd av flerfoldige kopier av et kappeprotein. Gjengitt med tillatelse fra Swiss Institute of Bioinformatics [39].

Struktur og oppbygning

PMCV partikler er runde i form med en diameter på ca. 50 nm. Partiklene antas å være enkelt oppbygget uten ytre membran og med bare et enkelt proteinskall som pakker inn RNA arvestoffet, tilsvarende som sett hos totivirus [19] (Figur 5).

Genetiske likheter med totivirusene indikerer at proteinskallet sannsynligvis er bygget opp av flerfoldige kopier av et kappeprotein [40]. Viruskappen omslutter arvestoffet som består av et enkelt segment dobbeltrådet RNA med størrelse 6,7 kilobaser som inkluderer tre gener; ORF1, ORF2 og ORF3 [19] (Figur 6). ORF1 koder for et protein bestående av 861 aminosyrer med beregnet molekylær masse på 91,8 kilodalton og som antas å være kappeprotein, tilsvarende som hos totivirusene [19]. ORF2 koder for et protein på 726 aminosyrer (83,1 kilodalton). Aminosyresekvensen viser likheter med RNA avhengig RNA polymerase og plasseringen av genet i arvestoffet, i *Totiviridae*-familien, og antas dermed å være polymerase-genet [19].



Figur 6: Figuren viser en oversikt over arvestoffet hos PMCV. (Illustrasjon Aase B. Mikalsen, NMBU)

PMCV og det PMCV-lignende viruset som er påvist hos Golden shiner skiller seg både fra de øvrige tott-lignende virusene og de registrerte tottivirusene ved at det finnes et tredje gen i virusets arvestoff [36]. Genet koder for et protein med lengde 302 aminosyrer og antatt molekylær masse på 33,4 kilodalton. Det er ikke funnet noe likhet med proteiner fra tottivirus eller andre virus og organismer, men en mindre del av proteinet viser noe likhet med en tilsvarende mindre del av et signalprotein (kjemokin) som produseres ved en immunrespons [19]. Proteinets rolle i virusets infeksjonssyklus er fremdeles ikke forstått, men forskning pågår. Det er foreslått at slike ekstra gener eller genfragmenter har sammenheng med virusenes evne til å infisere nye celler via cellenes omgivelser [41]. For PMCV har det blitt foreslått at ORF3-genet koder for et protein i selve viruskappen [19, 41], men nylig forskning indikerer at proteinet hovedsakelig har en rolle i de infiserte cellene (pers. obs. Aase B. Mikalsen, innsendt manuskript). Flere roller er mulig, f.eks. i forbindelse med frigivelse av viruspartikler fra infiserte celler og proteinet kan mulig også settes i sammenheng med skadene man ser i hjertets muskelceller. Det har også blitt foreslått å ha en rolle for å påvirke betennelsesreaksjonen man ser ved CMS, basert på likheten deler av proteinet har med signalproteiner i immunresponser [19].

Infeksjonsrute og -mekanisme

Smitteforsøk viser at viruset infiserer atlantisk laks og oppformerer til økende virusmengder over tid og resulterer i en systemisk infeksjon hvor man finner viruset i hjerte, nyre, lever, gjeller, muskel, blodceller og - serum ([29] og pers. med. Tove Hansen og Øyvind Haugland, Pharmaq). I et smitteforsøk kunne virus detekteres i nyre og milt en uke etter smitte. Sammen med gjeller hadde disse organene høyest viruskonsentrasjon også etter to uker. Etter fire uker nådde konsentrasjonen i hjertet samme nivå (pers. med. T. Hansen og Ø. Haugland, Pharmaq). Hjertet antas å være hovedorganet for virusoppformering [19, 29] og man finner store mengder av virusets arvestoff i ødelagte, døende hjertemuskelceller [19]. Smitteforsøk har også vist at infisert fisk frigir virus fra cellene, som deretter blir skilt ut til fiskens omgivelser og kan overføres via vannet til frisk fisk, som dermed oppformerer viruset og utvikler hjerteforandringer typisk for CMS [19]. I et forsøk på å optimalisere en kohabitasjons-smittemodell ble vann fra ip-injisert shedder-fisk overført til kohabitant-fisk når shedderne hadde høyest virusnivåer i hjerte og milt, men det ble ikke påvist virus i kohabitantene 4-15 uker etter vannbåren smitte (pers. obs. Sven Martin Jørgensen, Nofima). Forsøket ble utført på både parr (ferskvann) og smolt (saltvann) med samme negative resultat, og kan muligens antyde at PMCV utskilles til vannet i en begrenset periode under infeksjonen (pers.med. Sven Martin Jørgensen, Nofima). Viruset kan også til en viss grad oppformerer i fiskeceller i kultur i laboratoriet og også her frigis viruset til cellenes omgivelser (supernatanten). Dette skiller PMCV fra de registrerte tottivirusene som spres uten å forlate cellene. Detaljene i mekanismene viruset bruker for å infisere en celle, kopiere seg selv og frigis fra cellene er ikke kjent. Man antar at likhetene virusets arvestoff har med tottivirusene indikerer bruk av lignende mekanismer, men tilstedeværelsen av det ekstra genet hos PMCV og det at viruset spres via cellenes omgivelser peker også mot enkelte forskjeller i infeksjons-, oppformerings- og spredningsmekanismene.

Diagnostiske metoder og verktøy for virusdeteksjon

Som beskrevet tidligere blir CMS-diagnosen basert på histomorfologiske undersøkelser av hjertevev under lysmikroskopi. Når dette kombineres med molekylær deteksjon av PMCV arvestoff (real-time PCR) på parallelle hjerteprøver, kan man bekrefte viruset som årsak til diagnosen [19]. I CMS-syk fisk er det en klar sammenheng mellom nivået av virusets arvestoff og graden av skade i hjertevevet [19, 29] og man kan også finne arvestoffet i en rekke andre organer og blodkomponenter ([29] og pers. obs.). De høyeste nivåene av arvestoffet finner man i hjerte, milt og nyre, både i tidlige og sene stadier av infeksjonsforløpet [29] og disse organene er dermed de foretrukne organ for bruk i molekylær diagnostikk og screening av virusets tilstedeværelse. Virusets arvestoff har også blitt påvist i direkte relasjon med CMS-relaterte hjertevevsskader ved bruk av *in situ* hybridisering [19], men denne metoden brukes ikke i rutinediagnostikk. En lignende metode der proteinene som virusets gener koder for kan detekteres direkte i hjertevevet i forbindelse med skader (immunhistokjemi) er til en viss grad mulig. Metoden er egnet til bruk i diagnostikk, men brukes ikke rutinemessig da tilgjengeligheten av pålitelige antistoff mot virusproteiner enda ikke er optimal.

Flere forsøk har blitt gjort for å kunne dyrke viruset i fiskeceller i kultur i laboratoriet, men til tross for at det er vist at viruset replikerer noe i cellene og skilles ut, har man ikke oppnådd en effektiv oppformering av viruset som gir en tydelig nok effekt på cellekulturene [19]. Bruk av cellekulturer for virusdeteksjon og -isolering er dermed enda ikke et anvendelig diagnostisk verktøy.

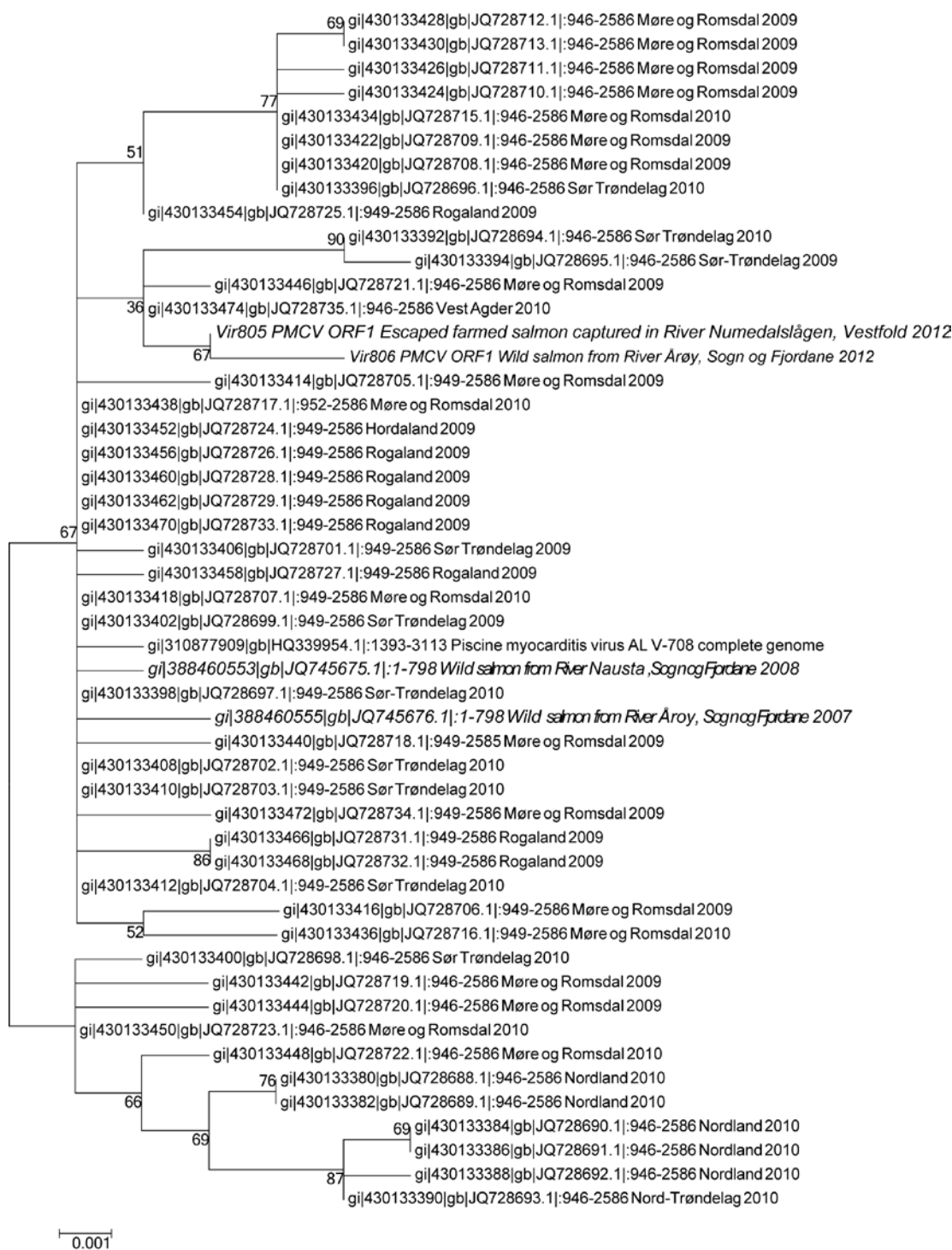
Genetisk variasjon og virulensfaktorer

En studie, som omfattet oppdrettslaks fra et stort antall geografiske områder i Norge, viste at PMCV har lite genetisk variasjon og sannsynligvis tilhører samme genetiske gruppe [42]. Den begrensede variasjonen kan også indikere at viruset nylig har blitt introdusert til laks i oppdrett og dermed hatt kort tid til å utvikle seg til virusvarianter med mer genetisk variasjon. Studien viste at virusisolatene med størst forskjeller hadde 98,6 % likhet i nukleotidsammensetningen av det 6688 nukleotider lange arvestoffet. Med basis i de forskjellene man fant, viste virusisolatene noe geografisk gruppering. Blant annet viste isolat fra de tre nordligste anleggene større likhet og tilsvarende ble også sett for alle isolater fra Rogaland og Hordaland fylke. Tilfeller hvor isolater fra geografisk spredte anlegg viste likheter ble imidlertid også funnet [42]. I tillegg fant man også relativt store forskjeller mellom arvestoffet fra virus isolert fra enkeltindivider hentet samtidig fra samme anlegg. En mindre studie på isolater fra to irske oppdrettsanlegg viste at de irske isolatene ligner de norske. Også her så man noe variasjon i arvestoffet til virus isolert fra enkeltindivider fra samme anlegg [9].

I Norge har PMCV også blitt funnet i noen få villaks. Også disse isolatene viste liten forandring i arvestoffet sammenlignet med isolater fra oppdrettslaks (Figur 7). I tillegg til villaks er det også funnet PMCV i vassild. Dette isolatet viste relativt store forskjeller (86 % identiske nukleotider) til arvestoffet for PMCV funnet i vill og oppdrettet laks, men få av disse forskjellene gir forandringer i proteinene som genene koder for [43, 44].

Proteinet som ORF3-genet koder for har noe mer variasjon mellom virusisolatene sammenlignet med kappeproteinet (ORF1-genet)[9, 42]. Kombinasjonen av aminosyrer i ORF3-proteinet i posisjon 84, 87 og 97, har blitt foreslått som motiv for virusets virulens, det vil si evne til å gi sykdom og vertsdødelighet, siden man utelukkende enten ser en IKR aminosyrekombinasjon eller VQQ [9, 42]. Det har imidlertid ikke vært mulig å relatere disse til alvorlighetsgraden i sykdomsutbrudd da pålitelige data for dødeligheten ikke var tilgjengelig.

Figur 7 (neste side): Dette slektskapstreet av PMCV ORF1 inkluderer virussekvenser fra både vill og oppdrettet laks fra Norge og viser at det er lite genetisk variasjon mellom sekvensene. Alle tilhører samme genogruppe [42, 45]. Virussekvenser fra tre villaks og en rømt oppdrettslaks i kursiv.



Kunnskapshull

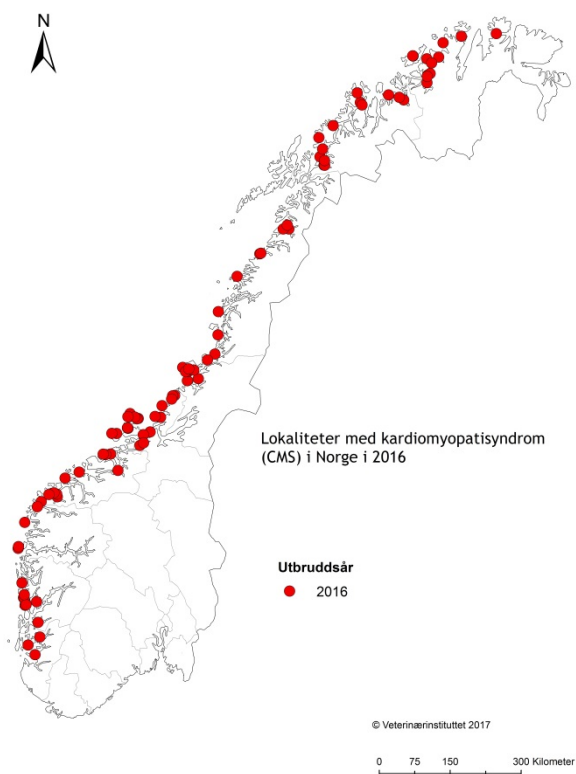
- Karakteristikk av proteinene som virusets arvestoff koder for
 - Rolle i oppbygging av viruspartikkel, for virulens og/eller i infeksjonssyklus
 - Proteinstruktur
 - Antigenisitet i vaksinesammenheng
- Genetiske virulensfaktorer og markører for sporing av virus
- Infeksjons- og replikasjonsmekanismer i verten, inkludert celletype i målorgan
- Cellelinje for oppformering av PMCV i laboratoriet mangler per i dag
- Antistoff mot virale proteiner for bruk i diagnostikk og forskning

Epidemiologi – forekomst, risikofaktorer og smitteveier

Oppdrettet atlantisk laks i sjø er det viktigste kjente reservoaret for PMCV. CMS opptrer sent i sjøfasen og er ikke påvist i settefiskanlegg. Lang oppholdstid i sjø, store utsett, CMS i tidligere utsett og smittepress fra omkringliggende anlegg er risikofaktorer knyttet til CMS-utbrudd. Horizontal PMCV smitte er bekreftet og en mulig vertikal smittevei er gjenstand for pågående forskning.

Geografisk utbredelse

CMS er påvist i Norge, Irland [9], Skottland [8] og Færøyene [6]. En CMS-lignende hjertelidelse er også beskrevet hos atlantisk laks i Canada [10]. I Chile har systematisk screening pågått siden 2013 uten funn av PMCV [46]. I Norge er virus og sykdom tilstede langs hele kysten, men over tid har en hovedandel av de innrapporterte tilfellene av CMS stammet fra Midt-Norge (Figur 8 og 9) [11].



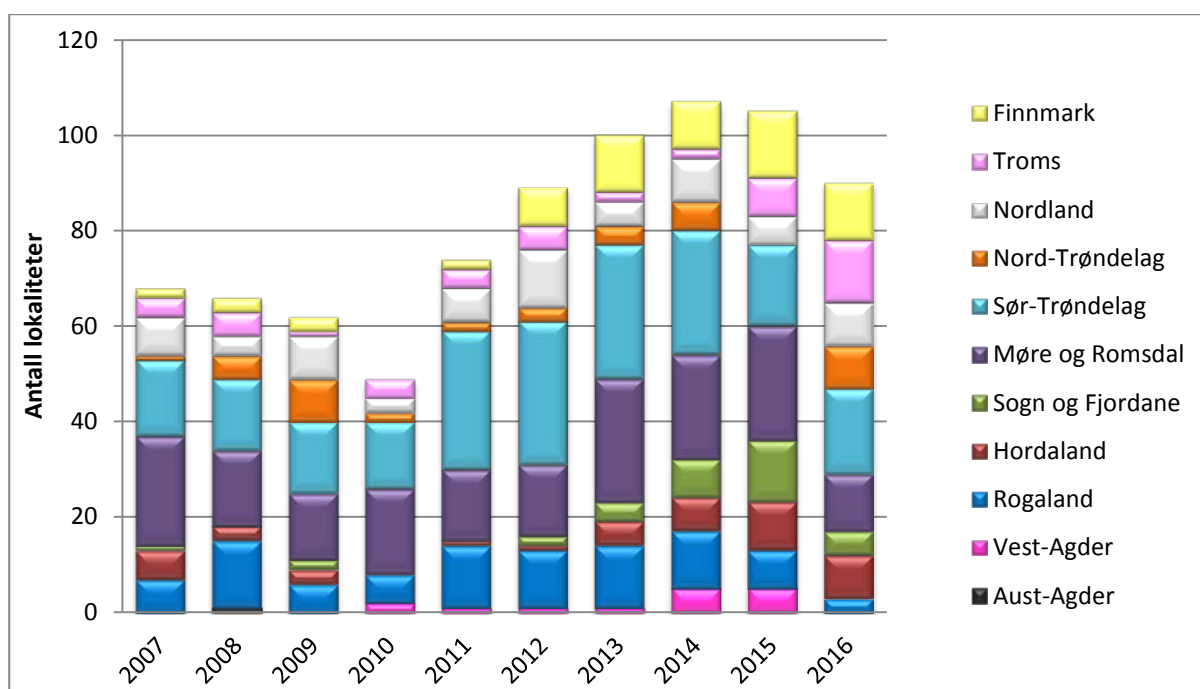
Figur 8: Kartet viser den geografiske utbredelsen av sjøanlegg som fikk diagnosen CMS av Veterinærinstituttet i 2016 (Illustrasjon Mona Dverdal Jansen, Veterinærinstituttet).

CMS og PMCV i ferskvannsfasen

CMS-utbrudd og CMS-relatert patologi er ikke beskrevet fra settefiskanlegg. Viruset PMCV blir imidlertid påvist i form av positive PCR resultat i denne fasen. I en studie som undersøkte prevalensen av viralt RNA fra piscine orthoreovirus (PRV) og PMCV i stamfisk og avkom ble RNA-sekvenser av PMCV funnet i prøver av hjerte og milt hos hovedandelen av stamfisk i både sjø- og ferskvann [28]. Viruset ble også påvist i om lag 17 % av de fertiliserte eggene, så vel som i 25 % av nylig klekket yngel. Selve virusmengden som ble påvist var derimot lav (høye Ct-verdier), og ved startföring ble viruset ikke lengre påvist. I studien ble det konkludert at «det er mulig at RNA fra PMCV overføres fra stamfisk til avkom, men hvorvidt arvematerialet blir overført som infeksjose viruspartikler er ikke kjent». Resultatene fra denne studien bekrefter dermed tilstedeværelsen av PMCV i tidlige stadier av produksjonssyklusen, men hvorvidt dette kan tilskrives en ekte, vertikal overføring eller er et resultat av kontaminering med viralt RNA gjenstår å avklare.

CMS og PMCV i sjøfasen

CMS utbrudd har så langt bare blitt observert i anlegg med atlantisk laks. Det er dermed ingen kjente tilfeller av sykdommen hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Historisk sett forekommer sykdommen sent i produksjonssyklus, typisk i det andre året fisken står i sjø [15, 47]. I senere år har det blitt rapportert tilfeller hvor sykdommen opptrer betydelig tidligere, og i en nylig gjennomført studie ble det rapportert om sykdom allerede 5 måneder etter utsett i sjø [27]. I 2016 ble 90 tilfeller av CMS diagnostisert ved Veterinærinstituttet, og 108 tilfeller ved private laboratorier (Fiskehelse rapporten 2016). Trolig er det en del overlapp mellom disse påvisningene. Som vist i Figur 9 har antallet tilfeller variert betydelig siden 2006, med laveste antall i 2010. Etter 2010 har antall tilfeller økt betydelig, men det er ikke utenkelig at en del av disse kan tilskrives tilgang på bedre diagnostiske verktøy etter at PMCV ble beskrevet. Figuren illustrerer også den geografiske fordelingen av tilfeller, der en stor andel av tilfellene fortsatt er fra Midt-Norge, mens en økende andel registreres i de tre nordligste fylkene og i Hordaland. I en studie fra 2003 ble CMS funnet hos 14,6 % av vårutsatt fisk og 13,3 % av høstutsatt fisk [15]. Dette gir en pekepinn på forekomsten av sykdommen på landsbasis på dette tidspunktet. Det er lite variasjon i antall påvisninger gjennom året, men noe økning av tilfeller på våren og høsten er registrert [11]. Med en generell økning i den norske produksjonen av oppdrettslaks, er det tenkelig at en konsekvens kan bli et forøket smittepress og økt antall tilfeller av både CMS og andre agens. CMS er heller ikke en meldepliktig sykdom i Norge, og kan derfor være underrapportert.



Figur 9: Figuren viser en årlig oversikt over diagnostiserte CMS-tilfeller ved Veterinærinstituttet i perioden 2006-2016 fordelt på fylker (Illustrasjon Mona Dverdal Jansen, Veterinærinstituttet).

Reservoarer

Det har blitt gjort noen få studier for å avdekke mulige reservoarer for PMCV. Studiene omfatter villaks, noen marine fiskearter og miljøprøver. CMS-relatert patologi er beskrevet hos vill atlantisk laks fra to områder i Norge [7]. Det er også gjennomført to PCR-baserte studier der viruset forekom i henholdsvis 0,25 % og 0,22 % av de undersøkte stamfiskene av villaks [48-50]. I alt er PMCV funnet hos tre villaks, alle fra Sogn og Fjordane. PMCV ble også påvist hos en rømt oppdrettslaks i Numedalslågen. Mengden virus i villaksen var moderat (*Ct*-verdier mellom 24,9 og 29,2), mens virusmengden hos den rømte oppdrettslaksen var høy (*Ct*-verdi 15). Som beskrevet under kapittelet om PMCV, viser slektskapsstudier at det er lite genetisk variasjon mellom PMCV hos oppdrettet og vill laks. Dette kan tyde på smitteutveksling mellom disse populasjonene (Figur 7) [45]. Den lave forekomsten hos villaks tyder likevel på at disse ikke utgjør en vesentlig smittekilde for oppdrettet fisk.

I en PCR-basert studie av 32 marine fiskearter ble viruset funnet i 6,6 % av prøvene fra vassild (*Argentina silus*). Antallet prøver per art for de øvrige artene i studien var ganske lavt (10 eller mindre for 14 av artene). Dette innebærer at studiedesignet kun var egnet til å fange opp en svært høy forekomst av virus i marin fisk [43]. Vassild blir brukt i fiskefôr, og det blir spekulert i om dette kan være en mulig kilde til smitte [43]. Virusisolatet som ble funnet i vassild er imidlertid ikke nært beslektet med PMCV hos laks. Dette reduserer muligheten for at vassild i fiskefôr er en kilde til PMCV hos laks [44].

Miljøet til en vert vil alltid være i fokus når en etterforsker mulige smittereservoar. I 2014 ble forekomsten av PMCV i sediment, plankton, biofilm, bunnlevende, fastsittende og frittlevende organismer undersøkt på en oppdrettslokalitet under et pågående CMS-utbrudd. Prøvematerialet omfattet også slim, feces og lakselus fra laks, og virus ble kun påvist i de prøvene som stammet fra laksen selv [51]. Dette gir en indikasjon om at miljøet spiller en mindre viktig rolle som reservoar for PMCV. En kan dermed konkludere med at atlantisk laks i oppdrett er det viktigste kjente reservoaret for PMCV. PMCV forekommer primært i sjøfasen, men det pågår forskning for å avdekke utbredelse og betydning av PMCV i ferskvannsfasen.

Smitteveier

Horisontal overføring

I smitteforsøk er PMCV overført fra laksesmolt injisert med virus til kohabitanter i samme tank. Smitte ble her bekreftet ved at begge fiskegruppene utviklet CMS-relatert patologi i hjertet [19]. Sannsynligheten for at PMCV overføres horisontalt støttes også av at virusisolat kan gruppere seg geografisk i slektskapsstudier [42].

Vertikal overføring

Vertikal overføring hos fisk er kjent for IPNV, *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium psychrophilum* og *Piscirickettsia salmonis* [52], og vertikal overføring av PMCV kan heller ikke utelukkes. PMCV finnes hos en stor andel av stamfisk og hos enkelte av disse kan viralt RNA også påvises i små mengder i melke og rognvæske [53]. I en tidligere studie ble også små mengder virus/viralt RNA påvist i befruktete egg og plommeseckkyngel fra stamfisk som testet positivt for PMCV. Ved startfôring ble virus/viralt RNA ikke lengre påvist. [28]. Utvalgsstørrelsen for plommeseckkyngel og startfôringsyngel (n=20) har i teorien kun mulighet til å fange opp en PMCV forekomst på ~14 % eller høyere [54]. I tillegg til utvalgsstørrelsen vil et sentralt spørsmål i tolkningen av disse dataene være om det er virus eller viralt RNA som påvises, med andre ord, hvor raskt brytes viralt RNA ned og dermed hvor lenge etter kontamineringen kan viralt RNA påvises? Videre er det relevant å vite hvor lang latensperiode viruset kan ha før det oppformerer og gir sykdom? Og, om det er sannsynlig at virus som overføres fra foreldre til avkom har betydning for sykdomsbildet vi ser i sjø? Infeksiøst myonekrose virus (IMNV) er et annet tott-lignende virus som i likhet med PMCV er noe mer komplekst enn de typiske medlemmene av *Totiviridae*-familien. IMNV infiserer reker, og kan føre til sykdomsutbrudd med brå og høy dødelighet. Vertikal overføring av dette viruset er ikke bekreftet, men ansees som sannsynlig [55]. Dersom en får ytterligere funn som peker mot at PMCV er vertikalt overførbar vil det også være interessant å avklare hvorvidt denne smitten er "ekte" vertikal (lokalisert inne i selve egget) eller kan tilskrives kontaminering på eggets overflate.



Figur 10: Å avdekke om viruset overføres vertikalt fra stamfisk til avkom er et av hovedmålene i CMS-Epi prosjektet. Foto Håvard Lo, Veterinærinstituttet.

Risikofaktorer for smitteintroduksjon og sykdomsutbrudd

Risiko for smitteintroduksjon

Atlantisk laks i sjøoppdrett er det viktigste kjente reservoaret for PMCV. Hvordan PMCV introduseres i den enkelte fiskegruppe og til den enkelte lokalitet er tema for pågående forskning. I CMS-Epi prosjektet undersøker en spesifikt betydningen av vertikal overføring (fra stamfisk til avkom) og videre betydningen av smitteoverføring med settefisk til sjøanlegg. Øvrige medlemmene av familien *Totiviridae* har hovedsakelig en livsstrategi med persistent infeksjon av encellede parasitter og sopp som spres med celledeling. PMCV er utypisk for denne familien fordi det infiserer en vertebrat vert. Det er dermed vanskelig å overføre kunnskap om infeksjon og sykdomsforløp fra andre vert-agens forhold i familien.

Risiko for sykdomsutbrudd

Sannsynligheten for å utvikle CMS øker med lengden på tiden fisken har stått i sjø, økende størrelse på utsett, samt smittepress fra naboanlegg (en funksjon av smittestatus i og sjøavstand til naboanlegg) [47]. CMS i tidligere utsett er også identifisert som en risikofaktor [47]. Det spekuleres i om den sistnevnte faktoren kan knyttes til overlevelse av viruset i miljøet [47-49]. Som beskrevet under avsnittet om reservoarer er PMCV ikke påvist i miljøprøver i forbindelse med CMS-utbrudd. Smitte fra vill marin fisk og laksefisk synes også å utgjøre en minimal risiko. En mer sannsynlig hypotese er at risikofaktoren er driftsrelatert, deriblant settefisk med samme opphav. HSMB i tidligere utsett er en risikofaktor, men sammenhengen mellom HSMB og CMS kan også reflektere lignende forhold. Dødeligheten under et CMS-utbrudd kan øke dersom fisken blir utsatt for stress [4]. Andre forhold som rask vekst, miljøfaktorer, ernæring og mangel på fysisk aktivitet har også blitt utpekt som mulige risikofaktorer [18].

CMS og andre virusinfeksjoner

Årlig diagnostiserer Veterinærinstituttet i overkant av 400 tilfeller av virussykdommer fordelt på om lag 570 aktive sjølokaliteter [56]. PMCV-infeksjon, CMS og CMS-utbrudd kan forekomme samtidig med andre virusinfeksjoner og -agens, både på anleggs- og individnivå. En nylig studie som så på sammenhengen mellom infeksjoner med PMCV, salmonid alphavirus (SAV), piscine orthoreovirus (PRV) og Atlantic salmon calicivirus (ASCV) fant ingen korrelasjon mellom nivå av PRV, PMCV og ASCV, men en negativ korrelasjon mellom nivå av PMCV og SAV. [27]. Basert på funnene i studiet sitt foreslo Wiik-Nielsen et al den negative korrelasjonen mellom PMCV og SAV muligens kunne tilskrives at vertsresponsen mot en infeksjon undertrykket den påfølgende infeksjonen [27]. I en annen studie der det ble utført en eksperimentell ko-infeksjon med PRV og SAV, ble det vist at PRV-infeksjonen beskyttet mot pankreassjuka (PD) [57]. PRV er svært utbredt, og et vanlig funn sammen med PMCV. Det er tenkelig at de to agensene kan dra fordel av en ko-infeksjon, men det er ingen sikker kunnskap om dette [28]. Tidligere utbrudd av infeksjøs pankreasnekrose (IPN) er statistisk assosiert med utbrudd av CMS. I en studie ble det funnet at fiskegrupper med CMS hadde en historikk med IPN utbrudd fire ganger oftere enn fiskegrupper uten CMS [15]. Det er imidlertid ingen direkte årsakssammenheng mellom IPN-virus infeksjon og utvikling av CMS, da CMS også utvikles i fravær av IPNV [17]. Det er da mulig at tidligere utbrudd med IPNV kan predisponere for CMS, så vel som for andre sykdommer.

Kunnskapshull

- Overføres PMCV vertikalt?
 - Ekte vertikal overføring, dvs. at viruset er inne i egget?
 - Som kontaminering på utsiden av egget?
- Finnes PMCV i andre reservoarer enn atlantisk laks?
- Hvilke risikofaktorer bidrar til å utløse klinisk sykdom hos PMCV positive individ?
- Hvordan utfolder et typisk infeksjonsforløp seg i sjø?
 - Når påvises smitten?
 - Hvor lang tid går det mellom smittepåvisning og sykdomsutbrudd i felt?
 - Er gjentatte utbrudd relatert til lokalitet eller settefiskopphav?

Sykdomskontroll og - bekjempelse

CMS er en smittsom sykdom og kontrolleres først og fremst ved å blokkere virusets smitteveier [58]. Som tidligere beskrevet smitter PMCV horisontalt, men muligens også vertikalt. Samtidig vet vi at forhold ved fisk og miljø påvirker utfallet av infeksjonen. Sykdomskontroll og bekjempelse av CMS er derfor en sammensatt oppgave der biosikkerhet, styrking av fiskens forsvarsevne og driftsrutiner spiller viktige roller.

Kontroll med horisontal smitteoverføring

Horisontal smitte regnes som den kvantitativt viktigste smitteveien for PMCV. Generelt introduseres virus og andre patogener til anlegg primært ved inntak av fisk og gjennom vann. I tillegg kan introduksjonen skje ved kontaminering på vektorer som utstyr, personell og skadedyr.

Virusets biofysiske egenskaper

De biofysiske egenskapene til et virus står sentralt i etableringen av smittebarrierer og valg av biosikkerhetsstrategi fordi disse egenskapene er avgjørende for virusets overlevelse utenfor verten. Lite er kjent om hvor resistent PMCV er mot biologiske, kjemiske og fysiske påvirkninger. Forskning på disse egenskapene hemmes også i dag av mangel på cellekulturer for dyrking av virus. PMCV er imidlertid et nakent virus, og det er grunn til å tro at det i likhet med andre nakne virus (infeksiøs pankreas nekrosevirus og nodavirus) er bestandig mot ytre påvirkning. Dette bør en derfor ta høyde for i design av biosikkerhetstiltak.

Biosikkerhet i settefiskfasen

Viktige elementer i biosikkerhetsstrategien i settefiskfasen er at kun smittefri rogn og yngel tas inn i anlegget. Videre bør ferskvannskilden til klekkeri og settefiskanlegg være trygg. Her er det av spesiell interesse å avklare om det er oppgang av villaks i vannkilden. Desinfeksjon av inntaksvann er påkrevd for sjøvann og ferskvann fra anadrom strekning, men det er fortsatt ubeskrevet om dette har effekt mot PMCV. Bruk av sjøvann i produksjonen er en risiko. Generelt anbefales det å etablere skille i tid og rom mellom generasjoner og å beskytte fisk mot skadedyr, sjøsprut og øvrige vektorer.



Figur 11: Helsekontrollen skal sikre en rask diagnose slik at tiltak kan iverksettes for å redusere smittespredning og begrense økonomiske tap. Foto Torunn Taksdal, Veterinærinstituttet.

Biosikkerhet i sjøfasen

Viktige elementer i biosikkerhetsstrategien i sjøfasen er kunnskap om settefiskens smittestatus. Generelt vil bruk av flere settefiskleverandører øke risikoen for introduksjon av smitte [59, 60]. I dag er det mulig å screene settefisk for konkrete agens. Videre bør en skille i tid og rom mellom generasjoner (alt inn-alt ut prinsippet og brakklegging). Kunnskap om lokalt smittepress er også av verdi, dvs. hva er smittestatus i og avstand til naboanlegg [47]. Avstand til annen produksjon og transportruter i sjø er også av betydning, likeså rutiner rundt bruk av brønnbåt og deling av servicebåter, utstyr og personell.

Kontroll med vertikal smitte

Som beskrevet tidligere kan vertikal smitte med PMCV ikke utelukkes [28, 53]. Foreløpig vet en ikke om vertikal smitte forekommer, og i så fall om er det er en ekte vertikal smitteoverføring eller om viruset overføres som kontaminering på overflaten av egget. Generelt kan strategier mot vertikal overføring bestå av biosikkerhetstiltak ulikt omfang.

Tiltak for å eliminere kontaminering på overflaten av egget

Desinfeksjon av rogn med jodoforopløsning (100 ppm i 10 minutter) er et minstekrav og et etablert grunnleggende tiltak mot smitteoverføring i form av kontaminering på eggets overflate [61]. Tiltaket har likevel ikke effekt ved ekte vertikal overføring, dvs. når viruset befinner seg inne i egget. Hvor effektivt dette tiltaket er mot PMCV er foreløpig ikke beskrevet.

Screening og eliminering av rogn og melke fra smittet stamfisk

Et tiltak mot vertikal smitte er å teste stamfisken for et gitt agens og deretter kassere rogn og melke fra agens-positiv fisk. En forutsetning for denne strategien er at man etter screeningen har stamfisk å velge imellom. Den høye forekomsten av PMCV i stamfiskpopulasjonen synes derfor å begrense gjennomførbarheten av dette tiltaket [28]. Salmobreed oppgir likevel at de tilbyr rogn fra PMCV testet stamfisk på forespørsel fra kunder (pers. med. Rudi Ripman Seim).

I CMS-Epi prosjektet er det et mål å vurdere hvilke vev som kan støtte oppformering av nye viruspartikler. I den forbindelse er det vist at PMCV kan påvises i rognvæske og melke [53]. Rognvæske og melke kan utsettes for kontaminering under strykeprosessen og det uvisst om screening på disse vevene er tilstrekkelig for å avdekke relevante virusbærere.

Beskytte stamfisk mot horisontal og vertikal smitte i ferskvann og sjø

Avlskjernen og stamfisk utgjør de øverste nivåene i produksjonspyramiden og bør i størst mulig grad beskyttes mot smitte [62]. Standarden for biosikkerhet gjennom ferskvanns- og sjøfasen må derfor være på et høyere nivå enn i de øvrige produksjonsleddene. Viktige elementer i biosikkerhetsstrategien er å unngå introduksjon av smitte via inntak av fisk (rogn) og vann i ferskvannsfasen. Her er bruk av sjøvann en spesiell risiko. I sjøfasen bør stamfisk i størst mulig grad isoleres fra andre ledd i produksjonskjeden. Videre bør det være strenge restriksjoner på bruk og deling av brønnbåter, servicebåter, utstyr og personell.

Spesifikk patogenfri stamfisk - landbasert oppdrett i ferskvann

Hold av spesifikk patogenfri (SPF) stamfisk i smittesikre fasiliteter gir det høyeste nivået av kontroll med vertikalt overførbare patogener. Dette er et effektiv, framtidsrettet, men også ressurskrevende tiltak.

Dette prinsippet danner i dag grunnlaget for drift av de levende genbankene for vill laks [63], og krever streng kontroll med materiale som tas inn i fasilitetene - både i form av kontroll med fiskemateriale som tas inn, vannkilder, fôr, varer, tjenester og personell. Det tas kun desinfisert rogn fra spesifikt patogenfrie stamfisk inn i fasilitetene, stamfiskrekruttene holdes i ferskvann fra ikke-lakseførende vannkilde gjennom hele livsløpet og det benyttes ikke sjøvannstilsetning i produksjonen. Det er etablert interne smitteskiller der laksestammer og årganger holdes adskilt og kontrollrutiner for å oppdage og håndtere smitte internt.

Valg av kontrollstrategi og biosikkerhetsnivå

Valg av biosikkerhetsnivå og kontrollstrategi krever kunnskap om smitteveier, men er også et spørsmål om næringsstruktur, ledelse, tilgang på og prioritering av ressurser. Generelt er tilgangen på ferskvannsressurser en begrensende faktor for hele næringen og dermed også for etablering av SPF stamfiskhold i Norge. For sykdommen CMS, vil som nevnt den høye forekomsten av PMCV i stamfiskpopulasjonene legge begrensninger for valg av kontrollstrategi på kort sikt. Enkeltaktører innen rognproduksjon kan likevel gjøre strategiske valg om å sikre stamfisken mot smitte. Dette vil kreve oppbygging av SPF populasjoner over tid. På Færøyene erfarte man at CMS ble eliminert i forbindelse med reorganiseringen av næringen etter ILA epidemien tidlig på 2000-tallet. Her trekkes synkronisert brakklegging og landbasert stamfiskhold frem som viktige biosikkerhetstiltak. Etter dette er CMS med sikkerhet påvist kun i ett anlegg (pers. med. Debes H. Christensen, Faroese Food and Veterinary Authority, og Peter S. Østergård, Aquamed).

Stressreducerende tiltak for å forebygge CMS-utbrudd

Det finnes ingen behandling mot CMS. Erfaringer er imidlertid at ulike former for stress kan fremskynde, utløse eller forverre sykdommens symptomer [4], og et generelt råd er å behandle fisken skånsomt. Dette er et råd som er viktig å gi, men som er utfordrende å etterleve i praksis fordi hold av fisk, i likhet med alt annet husdyrhold, innebærer ulike former for nødvendig håndtering. En av de store utfordringene ved oppdrett av laks i sjø er lakselus og resistens mot ulike behandlingsmidler. Dette har medført at en lang rekke mekaniske, ikke-medikamentelle behandlingsmetoder er tatt i bruk. Metodene innebærer utstrakt håndtering av fisken med stress og økt oksygenbehov som resultat. Det er ikke uvanlig at slik behandling medfører dødelighet som skyldes sirkulasjonssvikt, deriblant hos fisk med CMS [56]. Også andre helsemessige utfordringer har potensial til å påvirke et CMS forløp i negativ retning direkte eller indirekte. Gjellelidelser er en av de største helseutfordringene ved oppdrett i sjø og det er rimelig å anta at dårlig gjellehelse alene eller i kombinasjon med fysisk stress kan fremskynde, utløse eller forverre en CMS utvikling. En har for eksempel erfart at CMS-relatert dødelighet ble redusert etter at en tok i bruk rutinemessig formalinbehandling mot gjelleparasitter og sopp ved overføring av stamfisk til ferskvann (pers. med. Brit Tørud, Veterinærinstituttet). I et kontrollert CMS smitteforsøk ble det likevel ikke funnet noen negative effekter av behandling med fluktuerende hypoksi (50-60 % O₂ gitt 5-9 uker etter ip-smitte Timmerhaus *et al*, manus in prep.). Gjennom screening kan en fastslå smittestatus i en fiskegruppe, og ut over dette bør en helhetlig vurdering av helse gjennomføres før fiskegruppa utsettes for stressende håndtering.

Bedre hjertehelse gjennom fysisk aktivitet

Både infeksjøs og ikke-infeksjøs hjertelidelse hos laksefisk i oppdrett har de siste to tiårene fått stor oppmerksomhet [20]. En stiller seg spørsmålet om hjerte- og sirkulasjonssvikt hos fisk gjenspeiler en trend som tidligere er sett i intensiv landdyrbasert kjøttproduksjon, eksempelvis slaktekyllingproduksjonen [64]. Økt veksthastighet og kjøttfylde (demand tissues) stiller økte krav til respirasjons- og sirkulasjonssystemenes (support tissues) funksjon og kapasitet. Ulike former for strømsetting og aerob trening synes å øke fiskens hjertekapasitet og generelle robusthet [65]. Det er blant annet vist at trening gir lavere dødelighet i smitteforsøk med salmonid alpha virus (SAV) [66]. Hvorvidt dette kan påvirke utviklingen av CMS og dermed utfallet ved en PMCV infeksjon er i liten grad undersøkt. I et kontrollert CMS smitteforsøk ble det imidlertid ikke funnet noen negative effekter av behandling med fluktuerende hypoksi (50-60 % O₂ gitt 5-9 uker etter ip-smitte; Timmerhaus *et al*, manus in prep.).

Vaksine mot PMCV infeksjon

Vaksinasjon er et av de viktigste verktøyene ved forebygging og bekjempelse av infeksjonssykdommer. I samarbeid med NMBU arbeider Pharmaq med å utvikle en vaksine mot PMCV-infeksjon. De avgjørende fremskrittene i denne forskningen hindres imidlertid av at en ikke har tilgjengelige cellekulturer for effektiv virusoppformering (pers. med. Øyvind Haugland, Pharmaq). Hittil er det påvist lite genetisk variasjon blant de norske PMCV isolatene [42]. Dette regnes som gunstig for den pågående vaksineutviklingen.

Avl for økt motstandskraft mot CMS

Som for andre produksjonsdyr er en betydelig del av fiskens naturlige motstandskraft mot infeksjoner arvelig betinget [67, 68]. Sykdomsresistens som avlsmål ble innført fra 1993 og den første lakserogna selektert for økt resistens mot ILA og furunkulose kom på markedet i 1995 (www.aquagen.no). De siste årene har avlsselskapene beveget seg fra ren familiebasert seleksjon til markørassistert avl (QTL-seleksjon) [69] og genomseleksjon. Med markør assistert avl kan de beste kandidatene innen de beste laksefamilier selekteres. Dermed blir både genetiske variasjon innen og mellom familier (familiebasert avl) utnyttet i avlsarbeidet. Avlsselskapet AquaGen markedsfører QTL-selektert rogn for økt motstandskraft mot CMS [70]. I produktokumentasjonen argumenteres det for at rognen gir redusert virusmengde i hjertet, mindre hjerteskatte og dermed lavere dødelighet under CMS utbrudd. Det forventes at økt genetisk motstandskraft mot CMS vil gi fisk som tåler transport og håndtering bedre i sluttfasen av produksjonen. Det brukes også helseøkonomiske beregninger i denne argumentasjonen. Hos andre rognleverandører er det per i dag et mer generelt fokus på hjertehelse i avlsarbeidet (pers. med. Rudi Ripman Seim, Salmobreed). Det forventes imidlertid at spesifikk motstandskraft mot CMS vil bli inkludert i avlsarbeidet (pers. med. Harald Takle, Marine Harvest).

Funksjonelt fôr mot CMS

Funksjonelt fôr er utviklet og formulert for å ha en helsefremmende effekt i tillegg til å dekke næringsbehovet [71]. Den helsefremmende effekten oppnås ved å endre mengde eller forhold mellom eksisterende ingredienser eller ved å tilsette nye ingredienser. I 2014 ble det publisert en studie der to funksjonelle fôr ble testet mot et referansefôr. De funksjonelle førene hadde lavere lipidinnhold (~18 % mot ~31 %) og et høyere Ω -3 / Ω -6 forhold (flerumettede fettsyrer) enn i referanseføret (~4 mot ~1,4). I tillegg var det ene føret tilsatt økt mengde histidin fordi denne aminosyren innehar viktige roller som buffer og antioksidant i muskelceller. Studien konkluderte med at lipidinnhold og sammensetning kan ha en immunmodulerende effekt slik at immunresponsen blir mildere og forsinket. Som en følge av dette ble skadeomfanget av CMS signifikant redusert. Tilsetning av histidin hadde imidlertid ingen effekt på CMS-relaterte skader.

Offentlig bekjempelse og meldeplikt

CMS er ikke, og har aldri vært en meldepliktig sykdom. CMS ble omtalt første gangen i en tid da fiskehelselovreguleringen i Norge var umoden og kun omfattet ferskvannsfisk. I 1990 ble en midlertidig sykdomslov, som også omfattet marin fisk vedtatt med ett klart formål - å hindre spredning av smitte. Den nye loven gjaldt dermed kun sykdommer med kjent infeksjons årsak [72]. I 2008 ble CMS vurdert listeført, men kunnskapen om etiologisk agens og smitteveier var fortsatt utilstrekkelig (pers. med. Stian Johnsen, Mattilsynet).

Kunnskapshull

- Hvor motstandsdyktig er PMCV mot biologiske, kjemiske og fysiske påvirkninger?
 - Betydning for virusets «overlevelse» utenfor verten og spredning
- Hvilke muligheter har vi for å iverksette tiltak mot en eventuell vertikal overføring?
- Kan det utvikles en effektiv vaksine mot PMCV?
- Kan avstiltak forhindre utvikling av CMS eller redusere CMS-relaterte tap?

Produksjonstap

CMS diagnostiseres hovedsakelig sent i produksjonssyklus når størstedelen av produksjonskostnadene er påløpt (Figur 12). Dette resulterer i betydelige økonomiske tap på fiskegruppenivå. Ved Veterinærinstituttet har CMS i lange perioder vært en av de hyppigst diagnostiserte sykdommene hos oppdrettslaks (Figur 9). Siden denne sykdommen ikke er meldepliktig er det ikke krav om innsendelse av diagnostisk materiale til Veterinærinstituttet. Det er derfor rimelig å anta at Veterinærinstituttets oversikt gjengir et minimum av antall lokaliteter med CMS. I 2003 ble de årlige direkte kostnadene ved CMS beregnet til å ligge mellom 33,5 og 66,3 millioner norske kroner for industrien som helhet [15]. I tillegg til de direkte økonomiske tapene på grunn av tapt biomasse, vil utbrudd av CMS på kort sikt medføre ekstraordinære arbeidsoperasjoner med reallokering av mannskap og utstyr. Dødelighet i avlskjernen og stamfiskpopulasjoner kan medføre tap av verdifull genetikk. I 2007 presenterte Marine Harvest Norge et CMS-relatert biomassetap på 1200 tonn for første halvdel samme år. Basert på at Marine Harvest stod for om lag 25 % av lakseproduksjonen i Norge, representerte CMS et estimert økonomisk tap for næringen på mer enn 200 millioner kroner dette året [73].

Etter 2007 er det ikke gjort tilsvarende helseøkonomiske beregninger. Samtidig har både den totale produksjonskostnaden og lakseprisen økt og antall CMS tilfeller registrert hos Veterinærinstituttet og private laboratorier har gått fra under 70 til over 100 per år. CMS er derfor uomtvistelig en av de største tapsfaktorene i norsk oppdrettsnæring og en faktor med betydelig helseøkonomisk potensiale forutsatt at effektive tiltak iverksettes.



Figur 12: CMS kan gi betydelig dødelighet, enten over tid eller som her i episoder med akutt dødelighet.
Foto Per Anton Sæther, MarinHelse AS

Sammendrag

Sykdommen kardiomyopatisyndrom (CMS) ble beskrevet hos oppdrettslaks midt på 1980-tallet. Årsaken var lenge ukjent, men det ble tidlig mistenkt at et virus var ansvarlig. I 2010 ble dette bekreftet da viruset, med det foreløpige navnet *piscint myokarditt virus* (PMCV) ble beskrevet og knyttet til sykdommen. Det ble vist en klar sammenheng mellom tilstedeværelse og mengde av PMCV og utvikling av de karakteristiske CMS-relaterte patologiske endringene i hjerte.

CMS opptrer typisk hos stor fisk det andre året av sjøfasen, men de siste årene har trenden vært sykdomsutbrudd også tidligere i sjøfasen. CMS er ikke beskrevet hos settefisk.

CMS opptrer langs hele norskekysten med Midt-Norge som tyngdepunkt. Den siste tre år er det registrert i overkant av 100 CMS tilfeller per år. Det er rimelig å anta at det reelle antallet ligger høyere siden sykdommen ikke er meldepliktig. I tillegg til Norge, er CMS påvist i Irland, Skottland og på Færøyene. CMS-lignende patologi er også beskrevet hos laks i Canada.

PMCV smitter horisontalt mellom fisk og vertikal overføring ikke kan utelukkes. Å avdekke om viruset overføres vertikalt fra stamfisk til avkom er et av hovedmålene i CMS Epi prosjektet. Så langt vet vi at virus i små mengder er utbredt hos stamfisk, og kan påvises i både melke og rognvæske. I tillegg er virus-RNA gjenfunnet i befruktet rogn og yngel fra PMCV-positiv stamfisk i en tidligere studie. Det er usikkert om den vertikale overføringen er «ekte», dvs. at virus befinner seg inne i rognkornet eller om overføringen skjer ved kontaminering av eggets overflate.

Reservoarer for PMCV er liten grad undersøkt. Utover oppdrettslaksen selv er det per i dag få andre kjente reservoarer for viruset. PMCV er funnet hos en liten andel vill stamlaks (< 0,25 %) og hos vassild (*Argentina silus*). PMCV fra vassild er imidlertid ikke nært beslektet med virus fra vill og oppdrettet laks (kun 86 % likhet). Per i dag antas derfor hverken villaks eller vassild å representere noen stor smittekilde til oppdrettslaksen.

Risikoen for sykdomsutbrudd i oppdrettslaks øker med tiden fisken har stått i sjø, med økende størrelse på utsett, samt med økt smittepress i form av smittestatus i og nærhet til omkringliggende anlegg. CMS i tidligere utsett er også identifisert som en risikofaktor, det samme er tidligere tilfeller med HSMB. Det er usikkert om faktoren *CMS i tidligere utsett* er en risiko på grunn av reell overlevelse av virus i miljø og villfisk, eller om risikoen representerer likheter i driftsrutiner, herunder samme settefiskeleverandør, kontaktnett osv.

Dødeligheten under et CMS-utbrudd kan øke dersom fisken blir utsatt for stress. Andre faktorer som rask vekst, miljøfaktorer, ernæring og mangel på fysisk aktivitet har også blitt utpekt som mulige risikofaktorer.

CMS er en smittsom sykdom og forebygges primært ved å blokkere virusets smitteveier. Horisontal smitteoverføring med fisk og gjennom vann regnes som de kvantitativt viktigste smitteveiene. Viruset er nakent og trolig relativt stabilt i miljø slik at det også kan forbli infeksiosøst og overføres med utstyr, personell og skadedyr. Muligheten for å etablere og opprettholde smittefrie fiskegrupper er forskjellig for ulike trinn i produksjonspyramiden. Kjennskap til smittestatus ved inntak av biologisk materiale er en forutsetning for dette og mulig gjennom screening. Viktige tiltak er dermed å bryte smitteveier i tid og rom mellom generasjoner og fiskegrupper. Tidlig utslakting ved utbrudd av CMS vil redusere smittepress lokalt og redusere økonomiske tap.

Det mest anvendte prinsippet for å blokkere vertikal smitte er å kassere melke og rogn fra smittede stamfisk. Per i dag synes dette tiltaket urealistisk i kommersielt oppdrett fordi forekomsten av PMCV i stamfisk er for høy. Desinfeksjon av rogn med jodoforer er en etablert og lovpålagt praksis som vil bidra til redusere kontaminering på overflaten av rognkornene. Tiltaket har imidlertid ingen effekt ved ekte vertikal smitteoverføring. Oppbygging av spesifikt patogenfrie (SPF) stamfiskpopulasjoner er et fremtidsrettet og allment biosikkerhetstiltak. Tiltaket vil være tidkrevende og utfordrende fordi det krever ferskvannsressurser som allerede i dag er en mangelvare.

Det finnes ingen effektiv behandling mot CMS, men en rekke tiltak er under utvikling for å styrke fiskens generelle motstandskraft mot virus og for å moderere utfallet av virusinfeksjonen. Ved hjelp av markørassistert avl (QTL) er det utviklet rogn som skal gi økt motstandskraft mot CMS. Funksjonelt for med redusert lipidinnhold og økt $\Omega 3:6$ -forhold ser ut til å moderere vertsreaksjonene ved utvikling av CMS slik at forløpet blir mildere. Arbeidet med å utvikle en vaksine mot CMS er i gang men hindres foreløpig av at en ikke har tilgjengelige cellekulturer for oppformering av virus. Det er et generelt fokus på styrket hjertehelse gjennom fysisk aktivitet, gjerne i kombinasjon med avlsarbeid. Tiltaket har gitt lovende resultater i smitteforsøk med SAV, mens det foreløpig ikke er prøvd ut i forsøk med CMS.

CMS er et betydelig fiskevelferdsproblem fordi den gjør fisken skjør og lite tolerant for nødvendig håndtering og transport. I kombinasjon med andre, og ofte behandlingskrevende helseutfordringer, deriblant gjellesykdom og lakselus, blir dette bildet forsterket.

CMS er en av de vanligste virussykdommene i norsk oppdrettslaks og gir primært dødelighet hos laks sent i produksjonssyklus når det meste av kostnader er påløpt. Dermed gir CMS store økonomiske tap for det enkelte selskap og for næringen som helhet. I tillegg til de direkte økonomiske tapene på grunn av tapt biomasse, vil utbrudd av CMS på kort sikt medføre ekstraordinære arbeidsoperasjoner med reallokering av mannskap og utstyr. Dødelighet i avlskjerne og stamfiskpopulasjoner vil i tillegg medføre tap av verdifull genetik. Sykdommen påvirker langsiktige driftsstrategier og planlegging i oppdrettsselskap fordi omfanget av tapene fremtvinger løsninger som tilrettelegging for framskyndet slakting, og slakting ved merdkanter («stun and bleed at site»). I et fremtidsperspektiv kan denne konkrete sykdommen trolig også medvirke til at enkeltstående gjør strategiske valg for å beskytte stamfiskholdet mot smitte. Dette er krevende omlegginger både tidsmessig og ressursmessig.

Veien videre: Karakteriseringen av PMCV har lagt til rette for en viktig taktøkning i utviklingen av kunnskap om CMS. Noen viktige spørsmål som gjenstår å besvare er; hvor viruset kommer fra, om det finnes reservoarer i miljøet, når viruset blir introdusert i en populasjon, hvor lenge fisken kan være bærer av viruset, om fisken kan bli frisk igjen, samt hvilke faktorer som fører til sykdomsutvikling i verten. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) har igangsatt det treårige CMS-Epi prosjektet for å besvare noen av disse spørsmålene.

Takksigelser

Det rettes en stor takk til alle som har bidratt til utarbeidelsen av rapporten. Takk til referansegruppa ved Torkjel Bruheim (Aquagen), Øyvind Haugland (Pharmaq) og Aase B. Mikalsen (NMBU). Takk til styringsgruppa ved Siri Vike og Stian Nylund (Pharmaq), Harald Takle (Marine Harvest), Arne Guttvik (Salmar), Julia Fossberg (Lerøy Seafood) og Henrik Duesund (Cermaq). Takk til Øystein Evensen (NMBU) og Sven Martin Jørgensen (Nofima) for grundig gjennomlesing og innspill. En spesiell takk rettes til Per Anton Sæter (MarinHelse), Trygve T. Poppe (Pharmaq), Håvard Lo, Torunn Taksdal, Brit Tørud og Mona Dverdal Janssen (Veterinærinstituttet) som har bidratt med foto og illustrasjoner.

Informasjon om CMS-Epi prosjektet

I 2015 opprettet FHF prosjektet «Epidemiologisk studie av kardiomyopatisyndrom (CMS): Spredning, risikofaktorer og sykdomsforløp i norsk lakseoppdrett» (FHF prosjekt 901118). Prosjektets overordnede mål er å øke kunnskapen om spredning av PMCV og faktorer som påvirker utviklingen av klinisk CMS. Prosjektet løper fra september 2015 og ut desember 2018.

Prosjektet har følgende delmål:

- Finne ut om PMCV overføres vertikalt fra stamfisk til matfisk under vanlige produksjonsforhold
- Kartlegge forløpet av PMCV infeksjon i sjø
- Identifisere risikofaktorer for infeksjon med PMCV
- Identifisere risikofaktorer for utvikling av klinisk CMS
- Finne ut hvorfor noen lokaliteter oftere får CMS enn andre
- Å gi en samlet fremstilling av publisert og upublisert viten om CMS og PMCV, med fokus på epidemiologi og sykdomsutvikling.
- Gi en samlet vurdering av tilgjengelige muligheter for å begrense spredning av PMCV og kliniske utbrudd av CMS - Både for enkelte anlegg og for næringen som helhet

Prosjektleder ved Veterinærinstituttet:

Britt Bang Jensen

Samarbeidspartnere:

Marine Harvest ASA
SalMar ASA
Cermaq Group AS
Pharmaq Analytiq AS
Lerøy Seafood Group ASA

Les mer: <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901118>

Samarbeidende prosjekt

Prosjektet «Kardiomyopatisyndrom (CMS) - påvisning av egenskaper hos piscint myokardittvirus som forklarer opptreden av klinisk sykdom i ulike faser av lakseproduksjonen (FHF prosjekt 901179) vil ved samordning og nært samarbeid CMS-Epi-prosjektet gi bedre kunnskap om virulensfaktorer i arvestoffet som bestemmer utvikling av skade på hjertemuskulaturen og klinisk sykdom. Et spesielt fokus blir lagt på ORF3-proteinets rolle for virusets virulens.

Referanser

1. Rimstad E: Examples of emerging virus diseases in salmonid aquaculture. *Aquaculture Research* 2011, 42:86-89.
2. Murray AG, Peeler EJ: A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 2005, 67(2-3):223-235.
3. Bergh O: The dual myths of the healthy wild fish and the unhealthy farmed fish. *Diseases of aquatic organisms* 2007, 75(2):159-164.
4. Skrudland A, Poppe TT, Jarp J, Brun E: Hjertesprekk hos norsk oppdrettslaks. En feltundersøkelse. In.: Veterinærinstituttet (Norwegian); 2002.
5. Amin A, Trasti J: Endomyocarditis in Atlantic salmon in Norwegian seafarms. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1988, 8.
6. Poppe TT, Sande RD: Cardiomyopathy in farmed Atlantic salmon: a review, introducing an ultrasound technique for clinical examination. Oslo: Norwegian School of Veterinary Science; 1994.
7. Poppe TT, Seierstad SL: First description of cardiomyopathy syndrome (CMS)-related lesions in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. *Dis Aquat Organ* 2003, 56(1):87-88.
8. Rodger H, Turnbull T: Cardiomyopathy syndrome in farmed Scottish salmon. *Vet Rec* 2000, 146.
9. Rodger HD, McCleary SJ, Ruane NM: Clinical cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 2014, 37(10):935-939.
10. Brocklebank J, Raverty S: Sudden mortality caused by cardiac deformities following seining of preharvest farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and by cardiomyopathy of postintra-peritoneally vaccinated Atlantic salmon parr in British Columbia. *Can Vet J* 2002, 43(2):129-130.
11. Kongtorp R, Taksdal T, Lillehaug A: Cardiomyopathy syndrome (CMS): a literature review. . In. Oslo, Norway: Norwegian Veterinary Institute; 2005.
12. Kongtorp R, Brun E, Taksdal T, Lillehaug A: Kardiomyopatisyndrom (CMS) i Norge. In., vol. Vol 2. Oslo, Norway: Norwegian Veterinary Institute; 2006.
13. Poppe TT: Kardiomyopati (endomyokarditt, cardiac myopathy syndrome (CMS)). In: *Fiskehelse - sykdommer, behandling, forebygging*. Edited by Poppe TT, 1 edn. Bergen, Norway: John Grieg Forlag AS; 1990: 307-308.
14. Grotmol S, Totland GK, Kryvi H: Detection of a nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Diseases of Aquatic Organisms* 1997, 29:79-84
15. Brun E, Poppe T, Skrudland A, Jarp J: Cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: occurrence and direct financial losses for Norwegian aquaculture. *Dis Aquat Organ* 2003, 56(3):241-247.
16. Fritsvold C, Kongtorp RT, Taksdal T, Orpetveit I, Heum M, Poppe TT: Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 2009, 87(3):225-234.
17. Bruno DW, Noguera PA: Comparative experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 2009, 87(3):235-242.
18. Lovoll M, Wiik-Nielsen J, Grove S, Wiik-Nielsen CR, Kristoffersen AB, Faller R, Poppe T, Jung J, Pedomallu CS, Nederbragt AJ *et al*: A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). *Virology Journal* 2010, 7.
19. Haugland O, Mikalsen AB, Nilsen P, Lindmo K, Thu BJ, Eliassen TM, Roos N, Rode M, Evensen O: Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *J Virol* 2011, 85(11):5275-5286.
20. Tørud B, Hillestad M, Poppe T, Johansen R, Sverdrup A, Helle KB, Kongtorp RT, Kroghdal Å, Storset A, Bæverfjord G *et al*: Hjerterapporten 2004 - rapport om hjertelidelser hos laks og regnbueørret. In. Edited by Tørud B, Hillestad M; 2005.
21. Bruno DW, Poppe T: Diseases of uncertain aetiology. Cardiomyopathy syndrome. In: *A color atlas of salmonid diseases*. Edited by Bruno DW, Poppe T. London, UK: Academic Press; 1996: pp. 140-141.
22. Bruno DW, Noguera PA, Poppe T: A color Atlas of Salmonid Diseases, Second edition edn: Springer; 2013.
23. Ferguson HW, Poppe T, Speare DJ: Cardiomyopathy in Farmed Norwegian Salmon. *Diseases of Aquatic Organisms* 1990, 8(3):225-231.
24. Kongtorp RT, Taksdal T, Lyngoy A: Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms* 2004, 59(3):217-224.
25. McLoughlin MF, Graham DA: Alphavirus infections in salmonids - a review. *Journal of Fish Diseases* 2007, 30(9):511-531.
26. Kongtorp R, Halse M, Taksdal T, Falk K: Longitudinal study of a natural outbreak of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 2006, 29.
27. Wiik-Nielsen J, Alarcon M, Jensen BB, Haugland O, Mikalsen AB: Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *J Fish Dis* 2016.
28. Wiik-Nielsen CR, Ski PMR, Aunsmo A, Lovoll M: Prevalence of viral RNA from piscine reovirus and piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish and progeny. *Journal of Fish Diseases* 2012, 35(2):169-171.
29. Timmerhaus G, Krasnov A, Nilsen P, Alarcon M, Afanasyev S, Rode M, Takle H, Jorgensen SM: Transcriptome profiling of immune responses to cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon. *BMC genomics* 2011, 12:459.
30. Timmerhaus G: Cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: functional genomic studies of host-pathogen responses and disease markers. Ås Norway: Norwegian University of Life Science; 2012.

31. Timmerhaus G, Krasnov A, Takle H, Afanasyev S, Nilsen P, Rode M, Jorgensen SM: Comparison of Atlantic salmon individuals with different outcomes of cardiomyopathy syndrome (CMS). *BMC genomics* 2012, 13:205.
32. Koyama S, Urayama S, Ohmatsu T, Sassa Y, Sakai C, Takata M, Hayashi S, Nagai M, Furuya T, Moriyama H *et al*: Identification, characterization and full-length sequence analysis of a novel dsRNA virus isolated from the arboreal ant *Camponotus yamaokai*. *J Gen Virol* 2015, 96(Pt 7):1930-1937.
33. Poulos BT, Tang KF, Pantoja CR, Bonami JR, Lightner DV: Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J Gen Virol* 2006, 87(Pt 4):987-996.
34. Wu Q, Luo Y, Lu R, Lau N, Lai EC, Li WX, Ding SW: Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(4):1606-1611.
35. Zhai Y, Attoui H, Mohd Jaafar F, Wang HQ, Cao YX, Fan SP, Sun YX, Liu LD, Mertens PP, Meng WS *et al*: Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family *Totiviridae*. *J Gen Virol* 2010, 91(Pt 11):2836-2845.
36. Mor SK, Phelps NB: Detection and molecular characterization of a novel piscine-myocarditis-like virus from baitfish in the USA. *Arch Virol* 2016, 161(7):1925-1931.
37. Mor SK, Phelps NB: Molecular detection of a novel totivirus from golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) baitfish in the USA. *Arch Virol* 2016, 161(8):2227-2234.
38. Dantas MD, Cavalcante GH, Oliveira RA, Lanza DC: New insights about ORF1 coding regions support the proposition of a new genus comprising arthropod viruses in the family *Totiviridae*. *Virus Res* 2016, 211:159-164.
39. Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoc A, Xenarios I, Le Mercier P: ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. In: *Nucleic Acid Res.*; 2011.
40. Janssen ME, Takagi Y, Parent KN, Cardone G, Nibert ML, Baker TS: Three-dimensional structure of a protozoal double-stranded RNA virus that infects the enteric pathogen *Giardia lamblia*. *J Virol* 2015, 89(2):1182-1194.
41. Nibert ML, Takagi Y: Fibers come and go: differences in cell-entry components among related dsRNA viruses. *Curr Opin Virol* 2013, 3(1):20-26.
42. Wiik-Nielsen J, Alarcon M, Fineid B, Rode M, Haugland O: Genetic variation in Norwegian piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 2013, 36(2):129-139.
43. Bockerman I, Wiik-Nielsen CR, Sindre H, Johansen R, Tengs T: Prevalence of piscine myocarditis virus (PMCV) in marine fish species. *Journal of Fish Diseases* 2011, 34(12):955-957.
44. Tengs T, Bockerman I: A strain of piscine myocarditis virus infecting Atlantic argentine, *Argentina silus* (Ascanius). *J Fish Dis* 2012, 35(7):545-547.
45. Madhun AS, Garseth AH, Einen ACB, Fiksdal I, Sindre H, Karlsson S, Biering E, Barlaup BT, Karlsbakk E: Annual report on health monitoring of wild anadromous salmonids in Norway. In: *Veterinærinstituttets rapportserie 7-2016*. www.vetinst.no, www.imr.no: Veterinærinstituttet; 2016: 27.
46. Lara M: Alphavirus, PRV and PMCV situation in Chile. In: *Trination meeting Trondheim*. trination.org 2014: 17.
47. Bang Jensen B, Brun E, Fineid B, Larssen RB, Kristoffersen AB: Risk factors for cardiomyopathy syndrome (CMS) in Norwegian salmon farming. *Dis Aquat Organ* 2013, 107(2):141-150.
48. Garseth AH, Biering E, Tengs T: Piscine myocarditis virus (PMCV) in wild Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 2012, 102(2):157-161.
49. Garseth AH, Biering E, Tengs T: Corrigendum: Piscine myocarditis virus (PMCV) in wild Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 2013, 104(3):(3).
50. Biering E, Madhun AS, Isachsen CH, Omdal LM, Bårdsgjære Einen AC, Garseth ÅH, Bjørn PA, Nilsen R, Egil K: Annual report on health monitoring of wild anadromous salmonids in Norway. In: www.vetinst.no: Norwegian Veterinary Institute and Institute of Marine research; 2013.
51. Hellebø A, Stene A, Asphaug V: Potensielle reservoarer for SAV og PMCV på marine akvakulturanlegg. In: *Møreforskning og Høgskolen i Ålesund*; 2014.
52. Bovo G, Håstein T, Hill B, LaPatra S, Michel C, Olesen NJ, Shchelkanov MY, Storset A, Wolffrom T, Midtlyng PJ: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents. In: *Fish Egg Trade*. VESO; 2005.
53. Viruset som forårsaker hjertesprekk hos laks er tilstede i rognvæske og melke [https://www.pharmaq-analytiq.com/kunnskap/kunnskapsbank/hjertesprekk-PMCV/]
54. Cameron AR, Baldock FR: A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Preventive Veterinary Medicine* 1998, 34:1-17.
55. Infeksiøst myonekrose virus (IMNV) [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_infections_myonecrosis.htm]
56. Anonymous: Fiskehelse rapporten 2015. In: www.vetinst.no: Veterinærinstituttet; 2016.
57. Lund M, Rosaeg MV, Krasnov A, Timmerhaus G, Nyman IB, Aspehaug V, Rimstad E, Dahle MK: Experimental Piscine orthoreovirus infection mediates protection against pancreas disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet Res* 2016, 47(1):107.
58. Aunsmo A, Garseth AH, Midtlyng PJ: Bekjempelse av virussjukdommer-kunnskapsstatus og tiltak. In: Trondheim, Norge: VESO Fiskero og havbruksnæringens landsforening; 2006.
59. Jarp J, Gjevne AG, Olsen AB, Bruheim T: Risk-Factors for Furunculosis, Infectious Pancreatic Necrosis and Mortality in Post-Smolt of Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L. *Journal of Fish Diseases* 1995, 18(1):67-78.
60. Jarp J, Karlsten E: Infectious salmon anaemia (ISA) risk factors in sea-cultured Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms* 1997, 28(2):79-86.
61. Bovo G, Hill B, Husby A, Håstein T, Michel C, Midtlyng PJ, Olesen NJ, Storset A: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection. In: *Fish Egg Trade*. 2005.

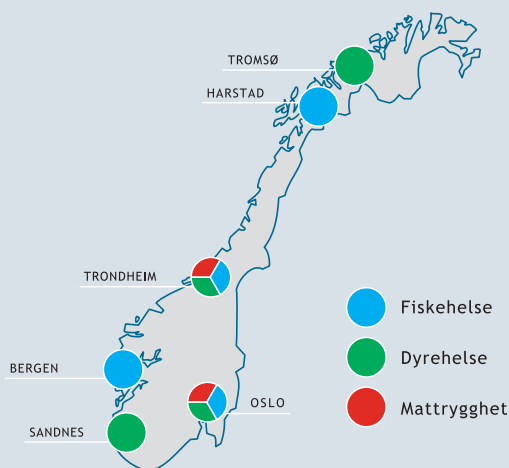
62. Aunsmo A, Garseth AH, Midtlyng PJ: Bekjempelse av virussjukdommer-kunnskapsstatus og tiltak. In. Edited by VESO F-ohlo. Oslo: VESO; 2006.
63. Bjoru B, Garseth Å H: Biosecurity strategy of the live gene bank programme for wild Atlantic salmon in Norway. In. International Aquaculture Biosecurity Conference: National Veterinary Institute; 2009.
64. Garseth AH: Seleksjon for robusthet - Kartlegging av metoder for måling av hjerte- og sirkulasjonskapasitet In.: Rapport fra VESO Trondheim; 2005: 16pp.
65. Claireaux G, McKenzie DJ, Genge AG, Chatelier A, Aubin J, Farrell AP: Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J Exp Biol* 2005, 208(Pt 10):1775-1784.
66. Castro V, Grisdale-Helland B, Jørgensen SM, Helgerud J, Claireaux G, Farrell AP, Krasnov A, Helland SJ, Takle H: Disease resistance is related to inherent swimming performance in Atlantic salmon. *BMC Physiology* 2013, 13(1).
67. Holm H, Santi N, Kjøglum S, Perisic N, Skugor S, Evensen O: Difference in skin immune responses to infection with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of families selected for resistance and susceptibility. *Fish Shellfish Immunol* 2015, 42(2):384-394.
68. Kjøglum S, Henryon M, Aasmundstad T, Korsgaard I: Selective breeding can increase resistance of Atlantic salmon to furunculosis, infectious salmon anaemia and infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture Research* 2008, 39(5):498-505.
69. Moen T, Torgersen J, Santi N, Davidson WS, Baranski M, Odegard J, Kjøglum S, Velle B, Kent M, Lubieniecki KP *et al*: Epithelial Cadherin Determines Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon. *Genetics* 2015, 200(4):1313-1326.
70. Anonymous: Beskyttelse mot CMS-bedre hjertehelse. In. Edited by AS A: AquaGen AS; 2015.
71. Martinez-Rubio L, Evensen O, Krasnov A, Jørgensen SM, Wadsworth S, Ruohonen K, Vecino JL, Tocher DR: Effects of functional feeds on the lipid composition, transcriptomic responses and pathology in heart of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) before and after experimental challenge with Piscine Myocarditis Virus (PMCV). *BMC genomics* 2014, 15:462.
72. Midtlyng PJ: Fiskesykdomslovgivningen. In: *Fiskehelse - sykdommer, behandling, forebygging*. Edited by Poppe TT. Bergen, Norway: Kystnæringens forlag og informasjonskontor AS; 1990.
73. Cardiomyopathy Syndrome: A Multi-task Approach to Reduce Losses and Improve Knowledge [<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900261>]

Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute