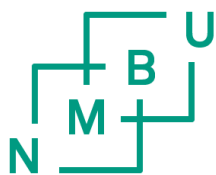
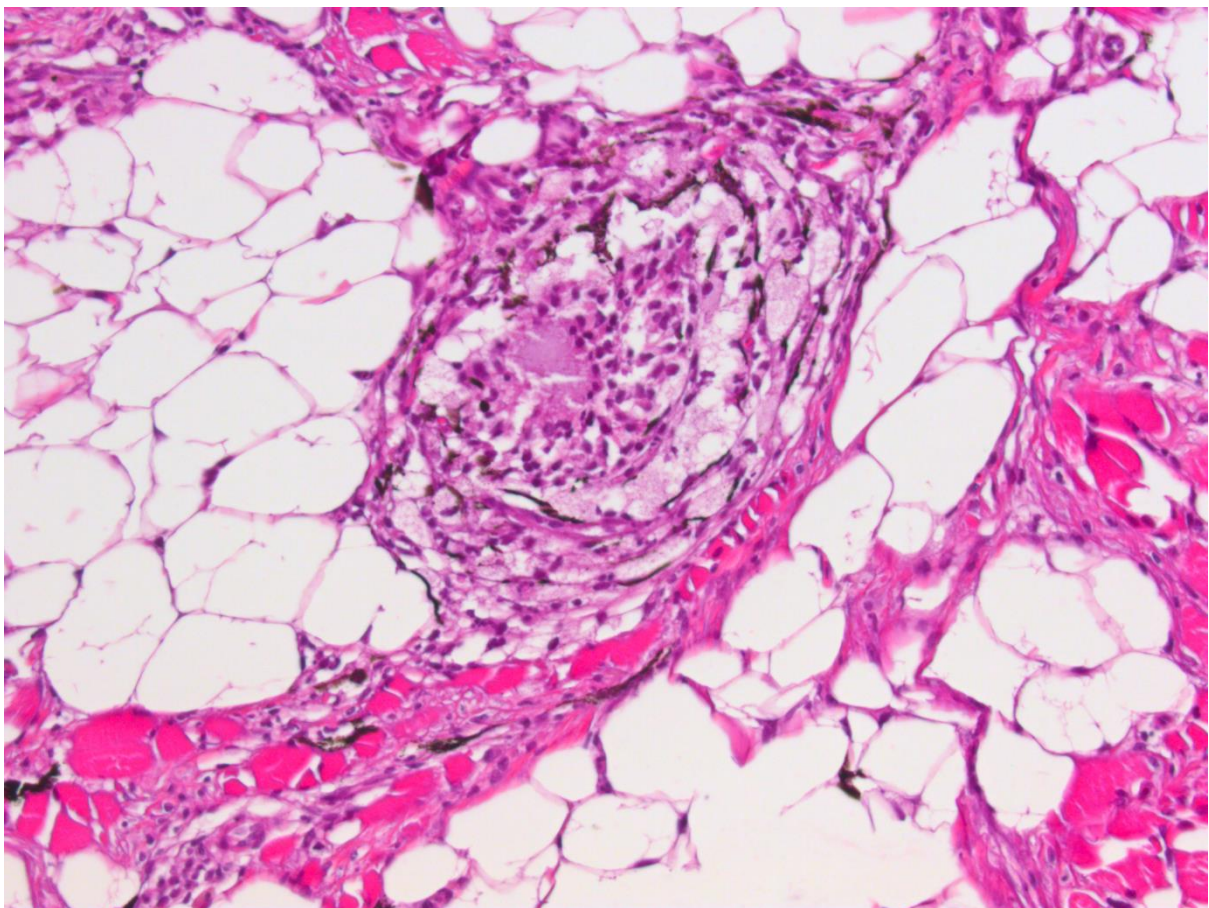


Avklaring av PRV-viruset sin rolle i utviklingen av røde og mørke flekker i laksefilét



Norwegian University
of Life Sciences

Avklaring av PRV-viruset sin rolle i utviklingen av røde og mørke flekker i laksefilét

Faglig sluttrapport (FHF#901221), Dato 06.04.2018

Innhold

1. Sammendrag	3
2. Innledning	5
3. Problemstilling og formål	7
Hovedmål	7
Delmål	7
4. Prosjektgjennomføring - materiale og metoder.	8
5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	11
Makroskopiske undersøkelser	11
Prevalens og ulike grader	11
Anatomisk lokalisering av flekkene	11
Mikroskopiske undersøkelser	11
Røde forandringer	11
Svarte forandringer	12
Fett	13
Andre organer	13
Spesialfarging og immunohistokjemi	14
RT-qPCR	14
Forsøk på å etablere en eksperimentell modell i laks for utvikling av melaninflekker.	15
Illumina sekvensering (NGS analyse)	15
Oppsummering og konklusjoner	16
6. Referanser	19

Forfattere

Håvard Bjørgen, Randi Haldorsen, Odd Medhus, Øyvind Oaland, Øystein Wessel, Espen Rimstad og Erling Olaf Koppang

Oppdragsgiver: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)

Samarbeidspartnere:

NMBU Vet. og Marine Harvest ASA

Foto forside: Håvard Bjørgen

1. Sammendrag

I dette prosjektet har vi fulgt en populasjon produksjonsfisk fra utsett i sjø til slakt med en rekke uttak og registreringer gjennom produksjonsfasen. Hensikten var å kartlegge utviklingen og forekomsten av røde og svarte flekker i denne perioden og infeksjon av *Piscine orthoreovirus* (PRV) sin betydning for utviklingen av disse forandringene. I utgangspunktet var fisken PRV-negativ ved utsett, men ble infisert i løpet av perioden i sjø. Det ble foretatt syv hoveduttak i sjøfaseperioden fordelt fra utsett til slakt, og ved hvert uttak ble det obduert minst 600 fisk der flekker ble registrert og karakterisert, og det ble foretatt prøveuttak for videre analyser av et utvalg fra disse fiskene. Det fantes røde og svarte flekker i fisken gjennom hele sjøfasen uavhengig av fiskens PRV-status. Forekomsten av røde flekker var lav og relativt konstant, men viste noe histologisk variasjon i hele perioden. Felles for alle røde forandringer var blødninger og nekrose. De svarte flekkene endret markant histologisk karakter gjennom sjøfasen. I begynnelsen av sjøfaseperioden, mens fisken var PRV negativ, var forandringene beskjedne og uten betennelse. Etter hvert endret de svarte flekkene karakter og ble mer uttalte og alvorlige både observert ved obduksjon av fisken og i mikroskop. I slike forandringer fantes tilstedeværelse av PRV. Fritt fett ble funnet i både røde og svarte flekker. For øvrig ble det ikke gjort funn av noen andre antigen/infeksiøse agens. I et forsøk ble fisk infisert med PRV og andre antigen, men det ble ikke registrert noen flekker i denne fisken. Prosjektet har vist at røde og svarte flekker kan utvikles uten påvisbar PRV-infeksjon, men at svarte flekker har høyst ulik karakter, og i de alvorligste formene fant vi alltid PRV. PRV-infeksjon er alene ikke nok til å initiere dannelsen av svarte flekker, men synes å forklare en større andel av de mer uttalte former av svarte flekker. Røde flekker synes i overveiende grad å gi opphav til svarte flekker, og årsaken til dannelsen av røde flekker er fremdeles ikke avklart.

Summary

In this project, we have followed a population of salmon from sea-water transfer to slaughter with a series of registrations and samplings throughout the production period. The purpose of these investigations was to register the development and occurrence of red and black muscle lesions and to reveal the impact of *Piscine orthoreovirus* (PRV) infection to these conditions. The fish were from the start PRV negative, but throughout the sea-water period, it got infected. Seven main samplings were performed, distributed from sea-water transfer to slaughter. At each sampling, at least 600 fish were autopsied, lesions were registered and samples were taken. Red and black lesions were present regardless of PRV status. The occurrence of red lesions was low and stable throughout the period. Histologically, the red lesions were diverse regardless of point of sampling, this is contrast to the black spots which changed character. At the onset of the experimental period, when the fish still were PRV negative, the microscopic and macroscopic changes were slight to moderate. Over time, the spots changed in character, becoming more severe, as also observed in the microscope. Such changes were always PRV positive. Free lipids (fat not confined to adipocytes) were detected both in red and black spots. Apart from PRV and free fat, there were no identification of other antigens/infectious agents. Fish were experimentally infected with PRV and other antigens,

but no spots of any kind could be detected as a result of this exposure. This project has shown that red and black spots may occur in salmon without any detectable PRV infection. The black spots are highly diverse in their character, and in the most serious forms with granulomatous inflammation, PRV was always present. PRV-infection is in itself not sufficient to instigate red and black spots, but appears to explain the development of the more severe black spots. Red spots seem to proceed black spots, but the case of the red spots has not been revealed.

2. Innledning

Fokale melaniserte forandringer (populært kalt svarte/mørke flekker) i laksefilét representerer et betydelig problem i norsk og internasjonal lakseproduksjon. I 2015 lå forekomsten i Norge på 19% (Mørkøre *et al.*, 2015). Etiologien har vært komplisert og omdiskutert. Koppang *et al.* (2005) tilskrev forandringene som en uønsket effekt som følge av vaksinerings. På det tidspunktet ble det ikke skilt mellom forekomst i ulike anatomiske lokaliseringer av muskulaturen, og det var velkjent at vaksinerings kunne skape store melaniserte betennelsesreaksjoner i bukhole med overgang til nærliggende viscerale organer (Poppe and Breck, 1997). Det var derfor ikke unaturlig å tenke seg at slike forandringer også kunne manifestere seg i muskulatur. Imidlertid viste det seg at også uvaksinert fisk kunne affiseres i like sterk grad (Berg *et al.*, 2012; Larsen *et al.*, 2014). I etterpåklokskapens lys vil man kunne se fra bildene i artikkelen fra 2005 at melaninforekomsten i muskulaturen har varierende lokalisering. Noen er assosiert med bukhinnen, og vi antar disse er assosiert med vaksinedeposering, mens andre ligger dypere i muskulaturen. Dette er en viktig observasjon. Melanisering kommer som følge av en betennelsesreaksjon, og betennelse kan ha ulike årsaker – så også betennelse i muskulatur.

Hos fisk syntetiseres melanin ikke bare i huden av celler av ektodermal opprinnelse, men også av celler av mesenchymal opprinnelse populært kalt melanomakrofager. Melanomakrofager forekommer naturlig i ulike organer hos fisk (Agius and Roberts, 2003) og finnes i rikelige mengder i nyrevev og milt hos frisk fisk og i forskjellige betennelsestilstander hos syk fisk. Tradisjonelt har pigmentproduserende celler vært kalt melanocytter, og det var lenge trodd at bare celler av ektodermal opprinnelse – altså celler i hud og nervevev - kunne produsere melanin (Schartl *et al.*, 2016). Men oppdagelsene av melaninsyntetisering i Kupfferske celler hos frosk foranlediget at Sichel og medarbeidere foreslo et nytt klassifiseringssystem for pigmentproduserende celler – der også leukocyttpopulasjoner hos vekselvarme dyr ble inkludert (Sichel *et al.*, 1997). I tråd med disse funnene ble det oppdaget at en makrofag-liknende cellelinje (SHK-1 cellelinjen) isolert fra hodenyre hos laks (Dannevig *et al.*, 1997) produserte melanin og uttrykte gen spesifikke for melanocytter (Haugarvoll *et al.*, 2006). Undersøkelser viste videre at uttrykket av slike gen var proporsjonalt med forekomsten av melanomakrofager som ble observert histologisk i ulike vev (Thorsen *et al.*, 2006).

Disse eksperimentene muliggjorde at svarte flekker hos oppdrettslaks kunne undersøkes og forstås på helt nye måter. Larsen *et al.* foretok en omfattende patologisk karakterisering av svarte flekker og viste at forandringene var dominert av kroniske betennelser med tilstedeværelse av melanomakrofager (Larsen *et al.*, 2012). Forandringene var ofte polyfasiske ved at det ble observert både muskelnekroser og muskelregenerasjon i de samme forandringene, og transkripsjonsanalyser viste videre uttrykk av gen i tyrosinase gen-familien som er spesifikke for enzymer involvert i melanogenese. Dette indikerte at ikke bare var melanomakrofager til stede i forandringene, men at de også produserte melanin. Noe infeksiøst agens ble ikke funnet i denne undersøkelsen. Forandringene indikerte en aktiv og ikke inaktiv prosess. Hadde det siste vært tilfelle, ville det ikke ha vært funn av både muskeldegenerasjon og muskelregenerasjon på samme tid. Det ble undersøkt både vaksinert og uvaksinert fisk, og funnene var konforme ovennevnte beskrivelse i begge gruppene.

Imidlertid ble bare velutviklede forandringer undersøkt. Små svarte flekker og skyggeaktige manifestasjoner ble ikke innbefattet i undersøkelsen.

Fra industrien kom det observasjoner som indikerte at svarte flekker utviklet seg fra røde flekker i muskulaturen. Dersom dette stemte, ville dette være en svært viktig faktor i forståelsen av problemstillingen. Bjørgen et al. samlet inn materiale fra ulike populasjoner av fisk, og her ble både røde og svarte flekker inkludert i undersøkelsene (Bjørgen *et al.*, 2015). I noen tilfeller ble det funnet overgangsfaser mellom røde og svarte flekker. De røde flekkene var dominert av myocyttdegenerasjon/nekrose og uttalte blødninger i vevet, noe som forklarte den makroskopiske manifestasjonen. I de svarte flekkene fantes det melanomakrofager i sammenheng med granulomatøse betennelsesforandringer slik som tidligere beskrevet (Larsen *et al.*, 2012). I mellomtiden hadde man utviklet flere polyklonale antistoffer mot ulike PRV proteiner, og en immunhistokjemisk metode for påvisning av PRV i histologiske snitt ved hjelp av anti-sigma 1 (tilheftingsproteinet) var blitt utviklet (Finstad *et al.*, 2012). Immunhistokjemiske undersøkelser viste at virus var til stede i makrofag-liknende celler i både røde og svarte flekker (Bjørgen *et al.*, 2015). I de svarte flekkene fantes virus også lokalisert i sentrum av granulomer. Dette indikerte at fiskens immunsystem ikke var i stand til å nedkjempe virus, selv i kroniske granulomatøse forandringer. Dette er analogt med granulomdannelse i forbindelse med for eksempel mycobakterieinfeksjon. Noen annen forklaring på fenomenet «svarte flekker» ble ikke funnet. Også dette arbeidet, som også i Larsen et al. (2012), var det flekker av betydelig alvorlighetsgrad som ble undersøkt. Videre ble det inkludert en liten gruppe villfisk i undersøkelsen. Den var PRV negativ og hadde heller ikke noen svarte flekker i muskulaturen. Mer interessant ble det også inkludert 80 fisk – vaksinert og uvaksinert – fra fisk som gikk i kar på land ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre. Denne fisken var sterkt PRV-positiv som observert ved RT-qPCR fra blod, men uten svarte eller røde flekker. Tilsvarende fisk som gikk i merder i sjøen på Matre var også sterkt positive for PRV og hadde i tillegg høy prevalens av klassiske svarte flekker. Sett sammen konkluderte Bjørgen et al. (2015) med at PRV var en premiss for dannelsen av alvorlige svarte flekker, men at PRV infeksjon alene ikke var nok til å initiere tilstanden. Dette er i tråd med all patogeneseforskning som tilsier at utviklingen av et sykdomsbilde ved infeksjon er en funksjon mellom vertsdyr, miljø og infeksjøsstagens. Miljø – og fôrpåvirkninger har da også vært vist å influere på prevalensen av svarte flekker (Mørkøre *et al.*, 2016; Mørkøre *et al.*, 2015).

3. Problemstilling og formål

I dette prosjektet var arbeidshypotesen at PRV er en forutsetning for utviklingen av røde og svarte flekker, og at røde flekker utvikler seg videre til svarte flekker. For å adressere denne hypotesen, ble det formulert et hovedmål og derpå følgende delmål:

Hovedmål

Å avklare hvorvidt PRV har en primærfunksjon ved utvikling av røde og svarte/mørke flekker i laksefilet.

Delmål

- a. Bekreft betydningen av PRV i utvikling av melanin-flekker. Utvikler PRV-fri laks røde og svarte flekker? Og hvis ja, divergerer disse på noen måte fra dem som finnes hos PRV-positiv fisk? (**Arbeidspakke 1**).
- b. Undersøke andre årsaker eller delårsaker til melanisering samt sikre materiale til slike analyser (**Arbeidspakke 2**) i tillegg til de som gjøres i Arbeidspakke 1. Dette materialet skal brukes til å gjennomføre andre undersøkelser der målet er å kartlegge årsaker til melaninflekker utover PRV samt kartlegge hvilke faktorer som spiller inn. Viktig i denne sammenhengen blir å besvare eller gjennomføre:
 - a. Et generelt studie av litteratur og innsamling av kunnskap fra andre dyrearter og menneske på hva som kan føre til blødninger, muskelnekroser og kroniske betennelsesforandringer i muskulatur.
 - b. Hvordan oppstår røde flekker? Så langt har histologiske undersøkelser vist både muskelnekrose og blødninger. Men hva kommer først? Dette er meget viktig å få fastslått for å vite om dette dreier seg om a) en primær karskade eller b) en primær muskelskade (som følge av f.eks. virusinfeksjon).
 - c. Hvordan blir røde flekker til mørke melanin flekker?
 - d. Kan ernæringsmessige forhold (antioksidanter) ha en innvirkning på forekomst og patogenese?
- c. PRVs effekt på cellers funksjon i melaninflekker, eksperimentell modell for utvikling av melaninflekker (**Arbeidspakke 3**).
 - a. Makrofagers betydning for utvikling av flekker. Analysere for eventuell dysfunksjon av makrofager i melaninflekker.
 - b. Etablere en eksperimentell modell i laks for utvikling av melaninflekker.

4. Prosjektgjennomføring - materiale og metoder.

Prosjektet ble organisert i arbeidspakker i forhold til målene (se over). I Arbeidspakke 1 var hensikten å bekrefte PRV sin betydning i utviklingen av svarte flekker. Til denne undersøkelsen ble det brukt fisk fra Marine Harvest sitt anlegg på lokaliteten Svåsand i Hardanger. Høsten 2015 ble det satt ut smolt (Herand settefisk, Mowi-stamme, vaksinert med Aquavet PD 7) på Svåsand som ble bekreftet PRV-fri ved hjelp av RT-qPCR. Målet var å følge denne fisken med registreringer for røde og svarte flekker samt uttak av prøvemateriale frem til slaktestørrelse i håp om at den forble PRV-fri i anlegget under hele perioden.

Det ble gjennomført syv hoveduttak (I til VII) der et minimum på 600 fisk fra populasjonen ble fanget med håv, bedøvet og obdusert. Fra de 60 første individene ble det før obduksjon tatt blodprøver for RT-qPCR med henblikk på påvisning av PRV, videre ble det fra de samme individene tatt gjelleprøver med samme formål. Denne fisken ble så obdusert og flekker i muskulaturen ble registrert etter anatomisk lokalisasjon. Røde og svarte flekker og også overgangsflekker (både røde og svarte) ble registrert etter en skala fra 1 til 3. Etter registrering av eventuelle flekker ble det tatt prøver av flekkene på RNA later, glutaraldehyd og formalin. I enkelte tilfeller ble det også frosset ned materiale på flytende nitrogen. Uaffisert muskulatur fra motsvarende side av fisken og på samme lokalitet som forandringen ble tatt ut som kontroll. Det var ingen tilfeller der det var synlige forandringer i dette motsvarende kontrollområdet. Ved hvert uttak ble det i tillegg samlet inn prøver fra minst seks kontrollfisk (ingen påvisbare flekker). I disse tilfellene ble det tatt ut muskelprøver fra CV og MV som er predileksjonsstedet for forandringene (**Fig. 1**).



Videre ble det tatt prøver av milt på RNA later og formalin, og ellers ble prøver fra gjeller, hjerte, rød/hvit muskulatur, lever, hodenyre og pankreas på formalin både av fisk med påvisbare forandringer samt kontrollfisk. Etter at de 60 første fiskene var behandlet på denne måten, fortsatte obduksjonen, registrering og prøveuttak, men da uten først å samle inn heparinisert blod eller gjeller på RNA later. I alt ble det ved hvert uttak undersøkt minst 600 fisk ved hver obduksjon, og fra disse ble det samlet inn et representativt materiale fra minimum 30 fisk per uttak. I de første uttakene var forandringene små, kun melaninflekker med Grad 1 og Grad 2 var tilgjengelige. I de senere uttakene var det også melaninflekker av Grad 3. Dette vil vi komme tilbake til i detalj under resultater, men nevnes her for å forklare seleksjonskriteriene. Fra denne fisken ble også nevnte viscerale organer samlet.

I tillegg til hoveduttakene ble det gjort seks ekstrauttak (E1 til E6). I disse ekstrauttakene ble det tatt blodprøver fra tilfeldig fisk med et minimum på 59 fisk med henblikk på påvisning av PRV ved hjelp av RT-qPCR. Tre ekstrauttak ble gjennomført tidlig sjøfasen, mens E4 ble utført i perioden hvor fisken var i ferd med å bli PRV-positiv.

Prøver tatt ut på PCR later ble sendt til PatoGen Analyse AS for påvisning av PRV. Prøver tatt ut på formalin ble rutinemessig behandlet og fremført og innstøpt i parafinblokker. Fra disse ble det skåret snitt som ble farget med haematoxylin og eosin og så undersøkt i mikroskop. Fra utvalgte prøver ble det videre gjort immunhistokjemiske farginger for PRV (Bjørge *et al.*, 2015), og videre Gram og Giemsa-farginger for bakterier og parasitter. Resultatene fra disse undersøkelsene danner grunnlag for målene i Arbeidspakke 2.

I tillegg til fisken på Svåsand ble det tatt ut prøver fra en fiskegruppe ved lokaliteten Oksebåsen. Denne fiskegruppen ble sjøsatt i oktober 2015 (samme generasjon som Svåsand). Denne fisken ble screenet for PRV i settefiskanlegget før utsett i sjø, og var 100 % PRV-positiv. Det ble tatt ut fulle uttak av denne fisken 11/11-2015 og 05/10-2016 etter prosedyre som beskrevet i hoveduttakene for Svåsand.

Forsøk på å etablere en eksperimentell modell i laks for utvikling av melaninflekker.

En eksperimentell modell ble forsøkt etablert ved VESO- Vikan (Arbeidspakke 3). En fullstendig forsøksprotokoll er vedlagt. De klassiske melaninflekkene i muskulatur er bare beskrevet fra sjøfasen, derfor ble det benyttet smoltifisert laks. Fisken var i utgangspunktet PRV-fri.

Det var to tanker med fisk. I den ene tanken var fisken PRV-infisert, den andre ikke. Varigheten på forsøket var 18 uker. Det var 42 fisk i hver gruppe (totalt 378 fisk). Ut fra informasjonen fra andre arbeidspakker i prosjektet hadde vi indikasjoner på at flekker kommer ikke så lenge etter infeksjon med PRV, derfor burde 18 uker være tilstrekkelig. På den annen side så indikerte resultatene fra Bjørge *et al.* (2015), hvor fisken som hadde vært inne i kar på Havforskningsinstituttet (Matre), ikke utviklet flekker, og at det derfor ville være vanskelig å etablere en eksperimentell modell basert på fisk i kar.

Oversikt – grupper

Kar 1

Gruppe 1. Injeksjon intraperitonealt av standard VESO PRV smittemateriale. Denne gruppen ble bedøvd etter tre uker etter smitte (wpc). Det ble tatt blodprøve (ca 0.1. ml) som umiddelbart etterpå ble injisert intramuskulært i samme individ. Hensikten med dette var å simulere blødning i muskulatur hos PRV positiv fisk. Siden blod ble inokulert i samme individ som blodet var hentet fra unngikk man immunologisk problemer som følge av vevsuforlikelighet o.l. Fisken ble deretter umiddelbart satt tilbake til karet. Alle fiskene overlevde behandlingen.

Gruppe 2. Intramuskulær injeksjon av rensert PRV. Viruset ble levert fra viruslaboratoriet ved Veterinærhøgskolen NMBU. Rester av celler og eventuelle andre agens ble fjernet. Denne gruppen simulerte PRV infisert fisk.

Gruppe 3. Negativ kontroll. Intramuskulær injeksjon av PBS. Denne gruppen simulerte også PRV-infisert fisk, men infeksjonen kom her naturlig vei over slimhinner som følge av at gruppene 1 og 2 skilte ut virus (co-habitantgruppe).

Gruppe 4. Negativ kontroll. Ingen behandling. Denne gruppen simulerte også PRV infisert fisk, men infeksjonen kom her naturlig vei over slimhinner som følge av at gruppene 1 og 2 skilte ut virus (co-habitantgruppe).

Kar 2

Gruppe 5. Kontroll for Gruppe 1. Intramuskulær injeksjon med PRV-infiserte erythrocytter, som på forhånd var blitt varmeinaktivert 85 C i 25 min. Inokulatet ble levert av Veterinærhøgskolen NMBU. Inokulatet inneholdt alt som finnes i en blødning i muskulatur hos PRV positiv fisk, men infektiviteten er ødelagt (av varmebehandlingen) - viruset replikerer ikke.

Gruppe 6. Kontroll for Gruppe 2. Intramuskulær injeksjon av rensset PRV, varmeinaktivert, 85 C i 25 min. Inokulatet ble levert av Veterinærhøgskolen NMBU. Inokulatet inneholdt alt som finnes i en blødning i muskulatur hos PRV positiv fisk, men infektiviteten er ødelagt (av varmebehandlingen) - viruset replikerer ikke.

Gruppe 7. Injeksjon i.m. av varmeinaktiverte renibakterier, 85C i 25 min. Renibakterium gir bakteriell nyreesyke, BKD, som er blant annet karakterisert av granulomer i nyre. Renibakterier er tungt nedbrytbare bakterier. Hensikten med gruppen var å se om tunbgt nedbrytbare (ikke infektive bakterier) biologisk materiale i muskulatur alene ville indusere melanisering.

Gruppe 8. Kontroll. Intramuskulær injeksjon med PBS.

Gruppe 9. Kontroll. Ingen behandling.

I Kar A vil det være noen grupper injisert med infeksjons PRV (Gruppe 1 og 2). I Kar B vil det ikke være infeksjons PRV.

Analyse av makrofagers betydning for utvikling av flekker.

En forutsetning for å komme fram til en fornuftig analyse var at det eksperimentelle forsøket var vellykket. Da ville man ha prøver som var synkroniserte med hensyn til infeksjon, utviklingsstadium av flekker og liknende. Analyse materialet vil være mRNA transkriptanalyse for å undersøke aktiveringsstadiet til cellene. Vi klarte ikke å framprovosere flekker eksperimentelt. Derfor ble materiale fra felt samlet inn i prosjektet undersøkt ved hjelp av Illumina sekvensering (en form for next generation sequencing = NGS, også kalt dypsekvensering, i dag oppgis gjerne teknikken som ble brukt. Her var det Illumina). Vi innså etterhvert at materiale som var samlet inn fra ulike flekker hvor det histologisk bilde besto av både degenerative og reparasjonstilstander ikke kunne gi fornuftig informasjon vedrørende aktiveringstilstand av makrofager. Ved oppstart av prosjektet var det kommet publikasjoner som indikerte at DNA fra en rekke ulike bakteriegrupper kunne påvises i svarte flekker (Krasnov *et al.*, 2016). Hovedhensikten vår ble derfor å undersøke hva finnes av genetisk materiale av «ikke-laks» i svarte flekker.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Makroskopiske undersøkelser

Prevalens og ulike grader

I alle syv hoveduttak ble muskelforandringer registrert og gradert i henhold til skalaen beskrevet i materiale & metoder. Prevalensen av røde flekker (**Figur 2**) var relativt stabil gjennom hele forsøksperioden med et gjennomsnitt på 3,7 %. Alle grader røde flekker var tilstede fra første uttak, og det ble ikke registrert noe mønster mellom ulike grader av disse flekkene i forhold til PRV-status eller makroskopisk utseende. Milde (Grad I) til mer uttalte (Grad III) flekker var til stede i samtlige uttak og uavhengig PRV-status til fisken.



Figur 2. Rød flekk.

Prevalensen av svarte flekker (**Figur 3**) hadde en økende trend gjennom forsøket, fra 4 % i uttak I til 29 % i uttak VII. Tallene omfatter samtlige grader av melanisering (grad I til III). I uttak I var prevalensen 4 %. Denne økte til hele 9 % i uttak II. Økningen skyldes hovedsakelig økning i forekomsten av forandringer med grad I. Deretter gikk prevalensen ned igjen til 7 % i uttak III. Fra uttak IV til og med Uttak VII gikk prevalensen gradvis opp og i siste uttak hadde hele 29 % av fisken svarte flekker i muskulaturen.

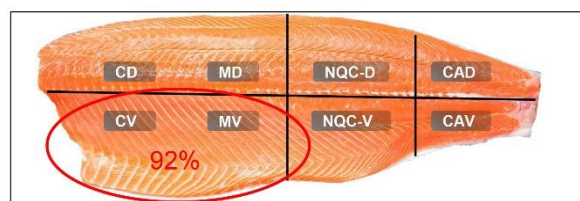


Figur 3. Svart flekk.

Alvorlighetsgraden (Grad I til III) av de svarte forandringene varierte fra uttak til uttak. I de fire første uttakene ble det kun registrert forandringer av grad I og II. Andelen grad I-forandringer var til enhver tid høyest. Grad III-forandringer ble utelukkende funnet sent i sjøfasen. Prevalensen av samtlige grader steg totalt sett gjennom forsøket (**Figur 6**).

Anatomisk lokalisering av flekkene

Forekomsten av flekker i ulike områder av fileten ble registrert i alle syv uttak. Totalt sett forekom 92 % av alle flekker enten i den cranio-ventrale (CV) eller i den midtre ventrale (MV) delen.



Figur 4. Anatomisk lokalisering av flekker. >90 % av flekkene forekom i de cranio-ventrale og midtre ventrale delene av fileten.

Mikroskopiske undersøkelser

Røde forandringer

Røde forandringer fra alle uttak og med alle forskjellige grader (grad I, II eller III) hadde flere fellestrekk, blant annet blødninger og nekroser. Dette har tidligere blitt beskrevet av Bjørge et al. 2015. Det var dog histologiske variasjoner med henblikk på alvorlighetsgrad og betennelse, uten at det histologiske bildet kunne direkte relateres til den makroskopiske

graderingen. Noen forandringer var dominert av blodopphopninger og spredte døde muskelceller. I andre forandringer var det en total vevsdød med store blodopphopninger. Her var det helt fravær av normalt vev.

Svarte forandringer

Tidligere karakterisering av svarte flekker har fokusert på velutviklede manifestasjoner som vi nå oppfatter som forandringer med endestadiumspatologi. Her fantes velutviklede granulomer, store mengder melano-makrofager og bindevevsdannelse. I det nåværende studiet ble det ved mikroskopi klart at det er en stor variasjon av vevsforandringer innen kategorien «svarte flekker», alt fra upåviselige forandringer til kraftige betennelsesforandringer som vi har beskrevet før. Forandringene kunne finnes med og uten pigmenterte celler. Dette viser at noe som man tror er en melaninflekk ikke nødvendigvis er det. Tvert imot kunne slike flekker bare inneholde gammelt bindevev og ikke være gjenstand for noen betennelse. Da er det trolig at lysbrytninger i bindevevet kan medføre at man oppfatter det som en melaninflekk mens det i virkeligheten er gammel arrvev.

Ved å kombinere den observerbare graderingen med de mikroskopiske analysene, ble det tydelig at de langvarige og aktive betennelsene bare ble observert i velutviklede flekker. Derimot var det stor variasjon i svakt synlige forandringer. Her var det av og til ingen mulighet til å finne noen forklaring i vev som ble undersøkt i mikroskopet. Men her var det også gammelt arrvev, eller det kunne være relativt ferske betennelser. Men de langvarige og aktive betennelsene ble ikke funnet i slike flekker.

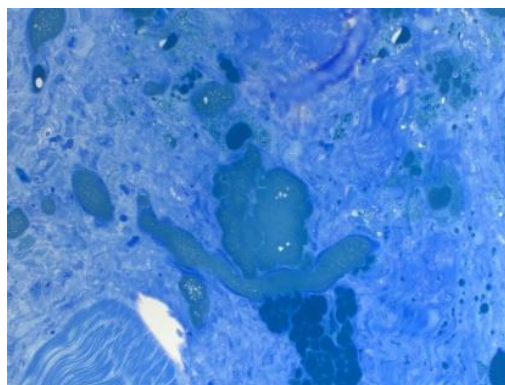
Graden av betennelse i forandringene varierte også mellom uttakene. I de første tre uttakene var forandringene hovedsakelig ikke-inflammatoriske med flere registreringer av melano-makrofager mellom intakte myocytter. Aktiv granulomatøs betennelse ble først sett i uttak V. Her var fisken gjennominfisert av PRV. Grad III-forandringer ble ikke sett før i uttak V.

Fisk fra Oksebåsen hadde i første uttak svarte flekker av makroskopisk grad 1 og 2 med betennesceller og melano-makrofager, og i områder der rød muskulatur var inndratt i forandringene var det også tegn til langvarig betennelse med melano-makrofager. Slike forandringer ble ikke observert i tidlige uttak på Svåsand. I andre uttak ble det registrert svarte flekker også av makroskopisk grad 3 med aktiv betennelse. Denne fisken var i utgangspunktet med som en kontroll med PRV-positiv fisk i tilfelle fisk fra Svåsand ville holde seg PRV-fri gjennom hele det eksperimentelle forløpet. Når den ikke gjorde det, så vi ikke som hensiktsmessig å foreta noen inngående analyser av fisken fra Oksebåsen bortsett fra å registrere at det var svarte flekker både med og uten betennelsesforandringer i begge uttak.

Kontrollfisk som ble tatt ut på Svåsand ved hvert uttak viste aldri histologisk påvisbare forandringer i muskulatur fra predileksjonssted. Videre fant vi heller aldri noen histologisk påvisbare forandringer i kontrollmuskulatur fra affisert fisk (muskel tatt ut fra tilsvarende sted som forandring på motsvarende filet).

Fett

Det har tidligere vært observert fettvakuoler i forbindelse med svarte flekker. Koppang et al. (2005) tok disse observasjonene som tegn på tilstedeværelse av vaksineadjuvans, også fordi dette fettene kunne være omgitt av betennelsesceller (Koppang et al., 2005). Men de samme funnene ble også gjort av Larsen et al. på uvaksinert fisk (Larsen et al., 2014). I materialet vi har undersøkt fra Svåsand er tilstedeværelse av fett utenom fettceller igjen påfallende, og det finnes både i røde og svarte flekker. Tilsvarende funn ble ikke gjort i kontrollmuskel. I de svarte flekkene finnes fett ofte omgitt av betennelsesceller med enkelte melanomakrofager (**Figur 5**). I de røde flekkene er det vanskeligere å gi en nøyaktig beskrivelse av hvor det



Figur 5. Tynnskiktssnitt av svart flekk. Fett (gulgrønt amorft materiale) finnes i støtte og mindre ansamlinger i vevet og lokalisert utenfor fettceller.

frie fettene finnes. Det kan være indikasjoner på at det finnes i blodkar, men også myocytter synes å kunne inneholde påvisbart fritt fett, og vi oppfatter dette som en unormal tilstand. Fettets betydning i patogenesen for tilstanden er opplagt et spor å følge videre, men på det nåværende tidspunkt skal vi ikke spekulere mer utover disse funnene enn å registrere at vi finner fett på steder der det ikke normalt skal forekomme.

Andre organer

Ved samtlige 7 hoveduttak fra Svåsand fantes det ingen histologisk detekterbare forandringer i lever, milt eller hodenyre. I histologisnitt av pancreasvev/blindsekker ble det ved uttak 1 og 2 funnet moderat peritonitt i de fleste undersøkte fiskene. Noen få fisk hadde en kraftig peritonitt, mens et fåtall hadde noe peritonitt. Det ble ikke funnet noen fisk uten peritonitt. Frekvensen og alvorlighetsgraden av peritonitt ble deretter redusert i de påfølgende uttakene og ved sluttuttaket var den ubetydelig med bare noen få fisk med anmerkninger. Disse forandringene er forenlige med en vaksineindusert reaksjon.

Snitt av myocard (her ses atrium og ventrikel med *pars compactum* og *pars spongiosum* under ett) ga ingen histologiske funn i uttak I. I uttak II fantes det betennelsesinfiltrater i 3 av 35 undersøkte individer. Ved sluttuttak var det 11 av 30 individer der det fantes betennelsesinfiltrater i myocard. Hjerteforandringene kunne ikke relateres til forekomst av røde og svarte flekker. For fisk med makroskopisk flekk av grad 3 (både rød og svart) kunne det finnes individer både med og uten affisert hjerte.

I histologisnitt fra muskulatur med hud og sidelinje og tydelig inndeling i rød og hvit skjelettmuskulatur var det ved første uttak noen få fokale betennelsesinfiltrater i rød

muskulatur hos to av totalt 35 undersøkte individer (uttak I). Det var ingen affeksjon av hvit skjelettmuskulatur. Ved sluttuttak fantes 11 av 30 individer med betennelsesinfiltrater i rød skjelettmuskulatur. I fire tilfeller var det ikke samtidig betennelse i hjerte og i rød muskulatur.

Som konklusjon av disse undersøkelsene kan vi trekke at de negative effektene av vaksinerings (peritonitt) var moderate i populasjonen. En moderat peritonitt vil opplagt kunne la seg observere makroskopisk, og det ble da også observert en forøket tilstedeværelse av mørke flekker av grad 1 ved uttak 2. Imidlertid var det mange av disse flekkene der det ikke kunne finnes noen forklaring histologisk (uten anmerkninger). Dette samsvarer med en ikke dyptgripende peritonitt (ikke ned i muskulatur), men med tilstedeværelse av melano-makrofager i peritoneum. Graden av peritonitt avtok etter hvert og dette samsvarer med et fall i antall registrerte flekker av Grad 1 i Uttak 3. Det er dermed rimelig å anta at de svarte flekkene kan ha ulik etiologi – svarte flekker som oppstår av vaksinerings og svarte flekker som oppstår fra en overgang fra røde flekker. Det kan synes som om de svarte flekkene som oppstår som følge av vaksinerings kun er til stede mens bivirkningene av vaksinerings er høy og at de siden forsvinner. Dette kan forklare fallet i frekvensen fra uttak 2 til uttak 3.

Frekvensen og alvorlighetsgraden av betennelse i rød muskulatur og myocard øke etter hvert som populasjonen ble gjennominfisert med PRV. Dette samsvarer med en reaksjon på infeksjonen.

I andre organer var det ingen sikre histologiske funn. Tilstedeværelse av røde og svarte flekker kan dermed ikke korreleres til noen annen observert organforandring i vårt materiale.

Spesialfarging og immunohistokjemi

Spesialfarginger for bakterier, sopp og parasitter var alle negative i røde og svarte muskelforandringer. Alle langvarige betennelsesforandringer var positive for PRV. Andre histologiske manifestasjoner kunne både være positive og negative for PRV.

RT-qPCR

Ved uttak I var gjeller og blod (60 første fisk) og milt (fisk som ble selektert for undersøkelser) negative for PRV. Ved uttak II fantes de første funn av PRV-positiv fisk, men da bare i gjeller. Ved uttak III begynte infeksjonen å etablere seg, og det var fisk som var PRV-positiv ikke bare i gjeller, men også i organer og muskel. I de senere uttakene ble en tiltakende del av fisken PRV-positiv. For å summere disse funnene og trekke de store linjene var fisken i utgangspunktet PRV negativ. Imidlertid etablerte det seg en infeksjon, og den ble først observert ved viruspåvisning i gjellene. Dette er en naturlig smittevei for PRV, og etter hvert ble både blod og organer gjennominfisert av virus. Dette er i tråd med tradisjonell utvikling av infeksjonen. PatoGen Analyse AS har ikke akkrediterte analyser for disse vevene, og man skal være litt varsom med å trekke for bastante konklusjoner når det gjelder infeksjonsstatus

og sammenlikninger mellom ulike organ. Likevel er det påfallende at hos fisken som ble selektert for forandringer var det høyere prevalens av viruspåvisning (milt) sammenlignet med blod i de uttakene III, IV og V. Dette kan indikere at fisk selektert for analyser (altså med røde og svarte flekker) hadde en høyere prevalens av virusinfeksjon enn dem uten. Det er derfor grunnlag for å undersøke dette forholdet igjen i nye studier.

Forsøk på å etablere en eksperimentell modell i laks for utvikling av melaninflekker.

Resultater: Enkelte blødninger ble observert ved injeksjonsstedet (**Figur 6**), og det ble observert noe massive blødninger distalt i hale partiet (**Fig 7**). En antar at det siste er et resultat av blodprøvetagning. Det ble ikke påvist klassiske svarte flekker.



Figur 6. Fokale blødninger ved injeksjonssted.



Figur 7. Store blødninger i haleregionen.

Et viktig bifunn er at det ikke ble påvist PRV-infeksjon i kar 2. Det vil si at PRV inaktiveres av 85°C i 25 min. (Prosesseringskravet som Mattilsynet anbefaler som trygt for både bruk av ubehandlede biprodukter fra oppdrettsfisk er for partikkelstørrelse <10mm oppvarming i >85 °C i >25 min).

Illumina sekvensering (NGS analyse)

Materiale fra ulike flekker samlet inn fra Svåsand, fiksert på RNAlater ble undersøkt. Det ble påvist RNA fra PRV, ingen andre virus, men RNA fra mange ulike bakterier. Bakteriene ble karakterisert som typiske miljøbakterier. Prøvene blir ikke tatt ut under sterile forhold i felt, og vil derfor kunne kontamineres ved prøvetakingen. Alternativet er at det til enhver tid er miljøbakterier til stede i laksens muskulatur, noe som ikke er i overensstemmelse med vanlig oppfatning av at indre organer hos dyr er sterile, og at inntrengende mikroorganismer bekjempes med immunrespons. Bakterier som kan leve i indre organer må ha andre egenskaper enn miljøbakterier da de leve under helt andre betingelser. For å rydde opp i dette ble det tatt ut prøver av muskulatur under sterile betingelser, meget nøye med skifte av utstyr når det var påkrevd. Materialet ble undersøkt med qPCR, dyrking for bakterier, Illumina sekvensering. Ingen bakterier ble påvist. Konklusjon: Av «ikke-laks» i flekker er det PRV som

påvises. Vi poengterer likevel at korrelasjon mellom flekker og tilstedeværelse av PRV ikke er det samme som årsakssammenheng.

Oppsummering og konklusjoner

I denne undersøkelsen har vi avklart at røde og svarte flekker i laksens muskulatur kan oppstå i PRV-negativ fisk. Frekvensen og manifestasjon av de røde flekkene var konstant under hele forsøksperioden, både når fisken var PRV-negativ og PRV-positiv. Vi kan dermed konkludere med at fiskens PRV-status ikke har innflytelse på forekomst og manifestasjon av røde flekker.

Det ble i hovedsak brukt RT-qPCR utført av PatoGen Analyse AS til overvåkning av PRV-status i populasjonen. Til dette formål ble det tatt ut gjeller, blod og milt. Ved det første uttaket var all undersøkt fisk negativ for PRV, men på det andre uttaket ble det påvist PRV i gjeller et fåtall individer. I de senere uttakene økte prevalensen av PRV, da ble også blod og milt funnet positive. Ved det fjerde fulle uttaket i april 2016 (Uttak IV) var vel halvparten av de undersøkte fiskene PRV-positive, og ved det femte og de påfølgende uttakene var populasjonen gjennominfisert.

Svarte flekker var også til stede under hele forsøksperioden. Derimot viste det seg at de svarte flekkene histologisk var meget heterogene og at denne heterogeniteten til en stor grad hadde sammenheng med deres makroskopiske manifestasjon. Andelen av svarte flekker med alvorlig makroskopiske manifestasjoner (grad 2 og 3) økte frem mot slaktestørrelse, men interessant nok var likevel den største gruppen ved slakt karakterisert som grad 1. Basert på de histologiske funnene ble forandringene beskrevet og relatert til den makroskopiske manifestasjonen. Patologiske forandringer følger ikke matematiske lover, og overgangene mellom ulike former er ofte glidende. Dette vil si at det kan være tvilstilfeller om en forandring skal klassifiseres slik eller slik. Videre er histologien av en slik art at vi ser en todimensjonal fremstilling av en tredimensjonal virkelighet. Dette gir ytterligere rom for tolkninger av det man observerer. Enhver leser med kjennskap til morfologiske analyser vil kjenne seg igjen i dette problemet. På tross av disse svakhetene er likevel patologisk diagnostikk en grunnpilar i enhver sykdomsforskning, og i vårt materiale var det mulig å gruppere forandringene i kategorier som bringer til veie verdifull ny informasjon. Før dette prosjektet var vi ikke klare over at svarte flekker kunne finnes uten funn av betennelsesinfiltrater (f. eks. melano-makrofager mellom tilsynelatende uaffiserte myocyttter). Slike funn er gjort i flekker observert som grad 1 og 2 makroskopisk, men i samme grads flekker (grad 2) ble det også gjort funn av langvarige betennelsesreaksjoner. Ser man på disse to ekstremitetene i histologisk klassifisering, er det ingen tvil om at forskjellene er store og radikale – her er det ingen glidende overgang. Men kunnskapen om at slike to helt fundamentalt forskjellige forandringer kan fremstå som umulige å skille med det blotte øyet er ny. Disse funnene viser at beskrivelser og registreringer av svarte flekker alltid må følges av en histologisk karakterisering. Det gir svært liten grad av meningsfull informasjon å undersøke svarte flekker f.eks. med RT-qPCR differensiert kun på makroskopisk utseende når de kan være til de grader forskjellige i cellulær oppbygning.

I fisk med negativ PRV-status fantes mørke flekker med makroskopisk manifestasjon gradert til 1 og 2. Mikroskopisk viste disse forandringene i stor grad enten ingen påvisbare forandringer eller forekomst av melano-makrofager mellom intakte muskelceller. Det var ikke

mikroskopisk påvisbare betennelsesrelaterte forandringer til stede i disse tidlige uttakene. På senere uttak, når fisken ble og var blitt PRV positiv, kom det også til stede makroskopiske forandringer av grad 3. Disse forandringene kunne i hovedsak klassifiseres som aktive og kroniske betennelser med tilstedeværelse av melano-makrofager. I alle tilfeller fantes betennelse og PRV-tilstedeværelse.

Spesialfargninger av materiale for bakterier, sopp og parasitter ga ingen funn. Her må igjen bemerkes at histologiske metoder ikke er særlig sensitive til påvisning av infeksjøs agens – det må være veldig mye til stede for at agens skal kunne detekteres. I denne sammenheng er det da bemerkelsesverdig at med immunhistokjemi har det aldri vært problemer å detektere PRV i granulomatøse betennelser. Når virus så lett lar seg påvise, tilsier det at det er svært rikelige mengder antigen i forandringene. En mer sensitiv metode for å påvise forskjellige typer bakterier, sopp og virus er NGS-analyser, og slike analyser ble da også utført på feltmateriale. Resultatene herfra ga funn av PRV, samt uspesifikke miljøbakterier. Vi oppfatter funnet av de uspesifikke miljøbakteriene som et utslag av sannsynlig kontaminering under prøveuttak. Prøver av muskulatur tatt ut under nitide hygieniske betingelser var negative for alt annet enn PRV. Vi kan ikke utelukke at andre mikroorganismer enn PRV bidrar til utviklingen av svarte flekker og da trolig i tidlige stadier av forandringene, men vi har ikke vært i stand til å påvise noen med de metodene vi hittil har benyttet. Det eneste infeksjøs agenset vi så langt kan knytte til svarte flekker med betennelse er PRV.

I svarte flekker av grad 1 og 2 som var PRV-negative fant vi ofte melano-makrofager mellom intakte muskelceller. Vi har ingen forklaring på disse funnene, kun teorier. Dersom en rød flekk dannes vil det foreligge en blødning. Vi vet at røde flekker oppstår med og uten PRV-infeksjon. Normalt vil en blødning ryddes opp av makrofager og dersom det også har vært en vevsskade, vil en reparasjonsprosess ha en komponent av fibrosering/arrdannelse. Vi kan anta dette er det vi observerer i denne typen flekker, og at melano-makrofagene er en del av denne reparasjonsprosessen. Det er trolig at de også etter hvert vil forsvinne fra området når helingsprosessen er under avslutning. Hvis derimot blødningen inneholder PRV, kan det være at makrofagene ikke evner å rydde opp blødningen. Virus vil persistere i forandringen og det kan utvikles en permanent betennelsestilstand – en granulomatøs betennelse. Utfallet av denne kan muligvis være at virus kan persistere videre eller at virus elimineres. Her kreves en ytterligere forskningsinnsats for å klargjøre disse forholdene.

Et gjennomgående funn i røde og svarte flekker uavhengig infeksjonsstatus var tilstedeværelse av fett utenom fettceller. Dette fettet kunne være innkapslet av melano-makrofager. Vi har ingen forklaring på disse observasjonene eller deres betydning for utviklingen av tilstanden.

Det ble videre undersøkt om infeksjon med PRV i et smitteforsøk kunne gi røde og svarte flekker. Disse forsøkene ble utført i kar ved VESO Vikan forsøksstasjon, Namsos. Det ble også gjort forsøk med flere andre potensielle antigen som kunne tenkes å initiere slike forandringer, mest aktuelt i så måte var bakterien *Renibacterium salmoninarum* som gir BKD og er kjent for granulomdannelse i nyrevev. Det har vært antydning at denne bakterien kunne spille en rolle i utviklingen av svarte flekker, denne teorien ble imidlertid tilbakevist i løpet av forsøksperioden (Bjørgen og medarbeidere, upublisert). I forsøket som ble gjennomført ble det ikke påvist hverken røde eller svarte flekker i noen fisk, og dette er kanskje ikke så merkelig all den tid PRV-positiv fisk i kar innomhus på Matre forsøksstasjon var uten noen

observerbare forandringer (Bjørge et al. 2015). Mer overraskende var det at heller ikke *Renibacterium salmoninarum* induierte noen observerbare forandringer.

Undersøkelser som er gjort av oss og av andre har funnet at PRV er svært utbredt i sjøfasen, og at tilnærmet all laks blir infisert før slakt. Populasjonen som ble fulgt på Svåsand hadde akkurat dette mønsteret; en viss tid etter sjøsetting ble populasjonen PRV-infisert og etter hvert ble nesten alle individer som ble undersøkt positive for PRV ved PCR. Fisk som går i merd langs norskekysten blir PRV-infisert i løpet av produksjonssyklus. Resultatene våre indikerer at de mest alvorlige granulomatøse flekkene utvikles kun med virus til stede, men årsaken til røde flekker ser tilsynelatende ikke ut til å ha direkte sammenheng med PRV-infeksjon. Men ikke alle fisk har melaninflekker ved slakt selv om de er PRV infisert. Altså er ikke PRV infeksjon i seg selv tilstrekkelig til å gi melaninflekker. Dette er ikke en uvanlig situasjon ved persistente infeksjoner. De gir langt ifra alltid sykdom hos infiserte individer. For eksempel regner man med at bortimot alle mennesker i Norge blir infisert med Epstein Barr virus, en infeksjon man har livet ut oftest uten særlige symptomer, men noen utvikler mononukleose, som kan være alvorlig.

Årsakene til at noen utvikler de granulomatøse flekkene kan skyldes egenskaper ved virus, fisken eller miljøet, eller da helst kombinasjoner av disse. Vi har ikke undersøkt miljøfaktorer eller driftsforhold, så det kommenteres ikke. Man kan spekulere i om egenskaper ved virus som gjør noen stammer bedre egnet enn andre til å replikere i betennelsescellene i flekkene kombinert med vertsspesifikke egenskaper hos cellene kan være medvirkende faktorer. Vi har ikke funnet de initielle årsaksfaktorene. Det kan være flere, det kan være kombinasjoner, men den relativt regelmessige anatomiske plasseringen av flertallet av flekkene henter mot én årsak. Et fokus på de tidlige faser i den videre forskning er derfor naturlig.

Sammenfattet har disse undersøkelsene vist:

- Røde og svarte flekker kan oppstå uten at fisken påvisbart er infisert med PRV
- Svarte flekker er en heterogen gruppe muskelforandringer
- Svarte flekker kan opptre både med og uten betennelse
- I kronisk betennelse finner vi alltid tilstedeværelse av PRV
- Røde flekker gir opphav til svarte flekker, men milde former av svarte flekker, trolig som følge av vaksinerings, kan òg finnes
- Prevalensen av røde flekker i populasjonen synes konstant, mens frekvensen av svarte flekker er økende
- Frem mot slaktestørrelse finnes alle kategorier av svarte flekker
- Fritt fett finnes både i røde og svarte flekker
- For øvrig finnes intet annet antigen bortsett fra PRV som vi har klart å påvise i disse undersøkelsene
- Infeksjon av PRV alene er ikke nok til å gi røde og svarte flekker

6. Referanser

- Agius, C. and Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis*, **26**, 499-509.
- Berg, A., Yurtseva, A., Hansen, T., Lajus, D. and Fjelldal, P. (2012). Vaccinated farmed Atlantic salmon are susceptible to spinal and skull deformities. *Journal of Applied Ichthyology*, **28**, 446-452.
- Bjørngen, H., Wessel, Ø., Fjelldal, P. G., Hansen, T., Sveier, H., Saebø, H. R., Enger, K. B., Monsen, E., Kvellestad, A., Rimstad, E. and Koppang, E. O. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet Res*, **46**, 89.
- Dannevig, B. H., Brudeseth, B. E., Gjøl, T., Rode, M., Wergeland, H. I., Evensen, Ø. and Press, C. M. (1997). Characterisation of a long-term cell line (SHK-1) developed from the head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.). *Fish Shellfish Immunol*, **7**, 213-226.
- Finstad, Ø. W., Falk, K., Løvoll, M., Evensen, Ø. and Rimstad, E. (2012). Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res*, **43**, 27.
- Haugarvoll, E., Thorsen, J., Laane, M., Huang, Q. and Koppang, E. O. (2006). Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83 teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res*, **19**, 214-225.
- Koppang, E. O., Haugarvoll, E., Hordvik, I., Aune, L. and Poppe, T. T. (2005). Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *J Fish Dis*, **28**, 13-22.
- Krasnov, A., Moghadam, H., Larsson, T., Afanasyev, S. and Mørkøre, T. (2016). Gene expression profiling in melanised sites of Atlantic salmon fillets. *Fish Shellfish Immunol*, **55**, 56-63.
- Larsen, H. A., Austbo, L., Nodtvedt, A., Fraser, T. W., Rimstad, E., Fjelldal, P. G., Hansen, T. and Koppang, E. O. (2014). The effect of vaccination, ploidy and smolt production regime on pathological melanin depositions in muscle tissue of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, **37**, 327-340.
- Larsen, H. A., L., A., Mørkøre, T., Thorsen, J., Hordvik, I., Fischer, U., Jirillo, E., Rimstad, E. and Koppang, E. O. (2012). Pigment-producing granulomatous myopathy in Atlantic salmon: a novel inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol*, **33**, 277-285.
- Mørkøre, T., Dessen, J.-E., Jimenez, R. and Rørvik, K.-A. (2016). Effekt av fôr på melaninflekker i laks infisert med både PRV og SAV.
- Mørkøre, T., Larsson, T., Kvellestad, A. S., Koppang, E. O., Åsli, M., Krasnov, A., Dessen, J.-E., Moreno, H. M., Valen, E. C., Gannestad, K. H., Gjerde, B., Taksdal, T., Bæverfjord, G., Meng, Y., Heia, K., Wold, J. P., Borderias, A. J., Moghadam, H., Romarheim, O. H. and Rørvik, K.-A. (2015). Mørke flekker i laksefilet. Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget, NOFIMA, Rapport 34/2015.
- Poppe, T. T. and Breck, O. (1997). *Pathology of Atlantic salmon Salmo salar intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report.* pp. 219-226.
- Schartl, M., Larue, L., Goda, M., Bosenberg, M. W., Hashimoto, H. and Kelsh, R. N. (2016). What is a vertebrate pigment cell? *Pigment Cell Melanoma Res*, **29**, 8-14.
- Sichel, G., Scalia, M., Mondio, F. and Corsaro, C. (1997). The amphibian kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Res*, **10**, 271-287.
- Thorsen, J., Høyheim, B. and Koppang, E. O. (2006). Isolation of the Atlantic salmon tyrosinase gene family reveals heterogenous transcripts in a leukocyte cell line. *Pigment Cell Res*, **19**, 327-336.