HØGSKOLEN I ÅLESUND

Aalesund University College

Bacheloroppgave

BI301305 Bacheloroppgave

Utvikling av patologisk påvisningsmetode av *Neoparamoeba perurans* og *Paranucleospora theridion* i gjellevev fra *Salmo salar* og *Paranucleospora theridion* i *Lepeophtheirus salmonis*.

Kandidatnummer 2, 5 og 10

Totalt antall sider inkludert forsiden: 58

Innlevert Ålesund, 29.05.15

HØGSKOLEN I ÅLESUND

Aalesund University College

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar**.

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	**Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.**	☒
2.	**Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen:** • ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands. • ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt. • ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt. • har alle referansene oppgitt i litteraturlisten. • ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	☒
3.	**Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å betrakte som fusk og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen §§30 og 31.**	☒
4.	**Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver**	☒
5.	**Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter høgskolens studieforskrift §30**	☒
6.	**Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider**	☒

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veiledere: Helene Fjørtoft og Ann-Kristin Tveten

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten (Åndsverkloven §2).
Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage HiÅ med forfatter(ne)s godkjennelse.
Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved Høgskolen i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering: ☒ja ☐nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)? ☐ja ☒nei
(Båndleggingsavtale må fylles ut)
- Hvis ja:
Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over? ☐ja ☐nei

Er oppgaven unntatt offentlighet? ☐ja ☒nei
(inneholder taushetsbelagt informasjon. Jfr. Offl. §13/Fvl. §13)

Dato: 29.05.15

Forord

Dette er en bacheloroppgave som ble skrevet av tre bioingeniørstudenter som så etter en utfordring. Oppgaven krevde mye praktisk arbeid, noe som også var en av grunnene for valget. Det var også spennende å velge et tema som vi ikke har hatt lite erfaring med i studiet.

Vi vil takke våre veiledere Helene Fjørtoft og Ann-Kristin Tveten for hjelpen gjennom oppgaven.

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å utarbeide en patologisk undersøkelsesmetode for påvisning av AGD (forårsaket av *Neoparamoeba perurans* i gjellevevet til *Salmo salar)* og *Paranucleospora theridion* i både gjellevev og i lakselus *(Lepeophtheirus salmonis).* Vi forandret på allerede eksisterende prosedyrer i et forsøk på å finne den optimale prosedyren. Vi tok for oss alle trinn, fra oppbevaring til mikroskopering av prøven. Vi prøvde ut forskjellige fikseringsvæsker, tykkelser på snitt, og farget preparatene med HE, PAS og FISH. FISH probene var spesifikke for *Neoparamoeba perurans* eller *Paranucleospora theridion.* Vi lykkes med å utvikle en tilfredsstillende metode for patologisk undersøkelse av lakselus og gjellevev.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning 1
1.1 Problemstilling 1
1.1.1 Hva skal gjøres 1
1.1.2 Hvordan skal oppgaven gjennomføres 2
2. Teori 3
2.1 Biologisk materiale 3
2.1.1 *Salmo salar* 3
2.1.2 Lakselus 3
2.1.3 Amoebic Gill Disease 5
2.1.4 *Paranucleospora theridion* 6
2.2 Prosessering av vevsprøver 7
2.2.1 Fiksering 7
2.2.2 Framføring: 8
2.2.3 Innstøping 10
2.2.4 Snitting 10
2.2.5 Fluorescens in situ hybridisering (FISH) 11
2.2.6 Eosin 11
2.2.7 Hematoxylin 12
2.2.8 Hematolxylin og eosin 13
2.2.9 PAS 14
2.3 Maskinell 14
2.3.1 Innstøpingsmaskin og kuldeplate 14
2.3.2 Mikrotom 15
2.3.3 Vannbad 15
2.3.4 Lysmikroskop 15
2.3.5 Fluorescensmikroskop 15
3. Materialer 17
3.1 Prøvematerialer 17
3.1.1 *Lepeophtheirus salmonis* 17
3.1.2 Gjellevev 17
3.2 Utstyr og reagenser 17
4. Metode 20

4.1 Inndeling av prøver 20
4.2 Fiksering 20
4.3 Framføring 20
4.4 Innstøpning 21
4.5 Snitting 21
4.6 Farging 22
4.6.1 Deparafinering 22
4.6.2 Hematoxylin – Erytrosin (HE) 23
4.6.2 PAS 23
4.6.3 FISH 24
4.7 Mikroskopering 27
5.0 Resultat 28
5.1 Oppbevaringsmedium 28
5.1.1 Gjellevev 28
5.1.2 Lakselus 29
5.2 Fikseringsmiddel 30
5.3 Tykkelse 31
5.4 Varmeskap før dehydrering 34
5.5 Farging 35
5.5.1 HE, PAS, og FISH fargede gjelleprøver 35
5.5.2 HE, PAS, og FISH fargede lakselus 37
5.5.3 FISH farging, med og uten proteinase 38
5.5.4 FISH probe 39
5.6 Tilstedeværelse av patogen 41
5.6.1 AGD i gjellevev 41
5.6.2 *P. theridion* i lakselus 41
6.0 Diskusjon 42
6.1 Oppbevaringsmedium 42
6.2 Fikseringsløsning 43
6.3 Framføringsmetode 44
6.4 Innstøpning og snitting 44
6.5 Deparafinering og farging 45
6.5.1 HE 45
6.5.2 PAS 45

6.5.3 FISH 46
6.6 Mikroskopering 46
7. Konklusjon 47
Referanser 49

1. Innledning

I store deler av verden har produksjonen av atlantisk laks (*Salmo salar)* gjennom flere år måtte tåle store tap av fisk grunnet flere forskjellige sykdommer. Vi vil fokusere på sykdommene forårsaket av mikrosporidien *Paranucleospora theridion* og amøben *Neoparamoeba perurans* og deres sammenheng med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis).* Oppgaven er en del av et større prosjekt der en skal undersøke lakselusen sin rolle som vektor for sykdommer både på villfisk og oppdrettsfisk. Ved å utvikle en patologisk metode vil vi gjøre det mulig å studere sykdomsbildet ved disse parasittene, både i gjellevev og i selve lakselusen. Denne problemstillingen vil være viktig for å påvise lokalisasjonen til de forskjellige parasittene og dermed hjelpe med å avkrefte/bekrefte lakselusen som en vektor.

Patologifaget er en stor del av bioingeniøryrket og veldig sentralt i helsevesenet. Det blir gjort undersøkelser på pasientens egne celler, vev og organer for å si noe om sykdomsbildet. Ved mange patologiske forandringer i kroppen vil det skje strukturendringer som er typiske for spesielle sykdommer. Disse forandringene kan undersøkes mikroskopisk på celle-nivå, eller makroskopisk i vev eller organer. De mikroskopiske undersøkelsene blir delt i to hovedgrupper: cytologi og histologi. Cytologi er studiet av celler, der mottatt materiale fikseres, farges og undersøkes under et lysmikroskop. Histologi er studiet om vev. Framføringsprosessen er mer komplisert enn ved cytologi. Her må vevet fikseres, framføres innstøpes, skjæres, farges og undersøkes. Denne prosessen vil forklares mer i detalj i teoridelen.

1.1 Problemstilling

Lage metode for påvisning/patologisk undersøkelse av *Paranucleospora theridion* og AGD i gjellevev og i lakselus.

1.1.1 Hva skal gjøres

Utarbeide metode for undersøkelse av gjellevev og lakselus, for å påvise *Paranuclespora theridion* og AGD. Eventuelt si noe om lokaliseringen av infeksjonene i forhold til utbrudd.

1.1.2 Hvordan skal oppgaven gjennomføres

- Ved å prøve ut forskjellige oppbevaring, innstøpnings-, fikserings- og fargeteknikker.
- Finne ut hva som fungerer best for påvisning, og også hva som bevarer vevet best. Får materiale fra Helene og Ann Kristin

2. Teori

2.1 Biologisk materiale

2.1.1 *Salmo salar*

Atlantisk laks (Salmo Salar) er en anadrom laksefisk, som betyr at denne arten gyter i ferskvann, men utfører mesteparten av sin vekst i havet. Denne arten befinner seg i tempererte og subarktiske regioner i Nord-Atlanteren. Yngelen lever i ferskvann i ett til åtte år før den migrerer til sjøen. Avhengig av alder og modning vil atlantisk laks befinne seg ute i havet i ett til fem år før den vender tilbake med høy presisjon til elven hvor den selv hadde sitt opphav for å gyte. Noen individer dør etter gyting, men en betydelig andel kan overleve og returnere til havet, og deretter gyte for andre gang. I noen bestander av atlantisk laks blir hele livssyklusen til laksen utført i ferskvann. Dette er vanligere I Nord-Amerika enn i europeiske elver (1 s. 5).

Siden 1970 har det vært en nedgang i antall villaks. Noe av denne nedgangen kan være grunnet degradering av ferskvannshabitater, økning og spredning av parasitter som lakselus (hovedsakelig *Lepeophtheirus salmonis* men også *Caligus elongatus*) og flatormen *Gyrodactylus salaris*, og eventuelle negative virkninger av rømt oppdrettslaks på villaksen. Disse negative virkningene er blant annet konkurranse om ressurser, genetisk blanding, og spredning av smittsomme sykdommer. Videre har studier knyttet endring i sjøens temperatur til overlevelse av laks i post-smolt stadiene (1 s. 5-6).

2.1.2 Lakselus

Lakselus er en art i gruppen hoppekreps, og lever som parasitt på laksefisker. Lusene spiser laksens ytre hudlag men kan også forsyne seg av vevet under. Lakselusen påfører laksefisk skade ved å spise av slim, blod og skinn. Dette kan føre til andre infeksjoner fra bakterier og sopp og det kan også innvirke på den osmotiske saltbalansen til fisken (2). Kroppsformen gjør den svært god til å få fatt i og henge seg på verten. Lusen «fødes» fra en av moderlusas eggstrenger, og med eggeplomme i magen har den næring å svømme på. Larven finner seg en vert ved hjelp av vannstrømmen. Den kan havne på villfisk eller i et oppdrettsanlegg, avhengig av hvor strømmene fører den. Som voksen har lusen form som en flyvinge med sugekopp. Jo raskere laksen svømmer, desto bedre sitter lusen. Lusen kan

bevege seg hurtig over korte avstander på verten, men den er en dårlig svømmer i de frie vannmasser (3).

Som mange andre fiskeparasitter, bruker den en «livline» som den fester dypt i fiskehuden, slik at den kan slippe tak og skifte skall uten å falle av. Larvene kan føle at laksen komme og da henger de seg på den når den passerer. De er knapt en millimeter lange, men har følsomme antenner som kan fange opp trykkbølger i vannet. Lakselusen sikter seg inn mot fiskens hode og kropp. Mens lakselusen venter på å finne en vert, beveger den seg opp og ned i vannet etter lyset, et instinkt den har til felles med annet plankton (3).

Lakselushannen blir voksen før hunnen, og beveger seg rundt på fisken på jakt etter en make. Han vil helst ha unge voksne hunner han kan pare seg med straks, men finner han ikke det, tar han plass bak yngre hunner og venter til de blir klare til parring. Hunnen kan få hele 11 kull av doble eggstrenger ut av én parring, så lakselusa er tilpasset et liv der den kan overleve selv når sannsynligheten er liten for at paringsdyktige hanner og hunner skal møtes (3).

I tidligere undersøkelser har forskerne prøvd å begrense spredningen av parasitten lakselus. Man snakker gjerne om tre metoder for å bekjempe lakselus; avlusning med legemidler, biologisk avlusning og vaksinasjon. Avlusning med legemidler er mest utbredt, men problemet er at lusen blir resistent mot midlene (4).

Metode nummer to er biologisk avlusing som vil si at man bruker andre arter fisk som spiser opp lusen. Leppefisken berggylta ser imidlertid ut til å kunne være en biologisk luseknekker. En tredje metode er en vaksine mot lakselus. Dette arbeidet er fortsatt på utviklingsstadiet (4).

Det er også påpekt at lakselus kan være en vektor for AGD i atlantisk laks. (5)

2.1.3 Amoebic Gill Disease

AGD (amoebic gill disease) er en ektoparasittisk infeksjon av gjellene som forårsaker mange problemer ved oppdrett av laks. AGD er en av de mest alvorlige problemene ved produksjonen av atlantisk laks (*Salmo salar*) og noen kilder oppgir over 50% mortalitet hvis fiskene ikke blir behandlet. Den nåværende behandlingen for AGD består av ferskvanns behandling der de infiserte fiskene bader to til fire timer i ferskvann. Dette er en dyr behandling som kan være så høy som 20% av totalkostnadene til et oppdrettsanlegg (6).

Etiologien til AGD har vært usikker og *Neoparamoeba pemaquidensis* var lenge betraktet som årsak til AGD. I senere år ble *Neoparamoeba brachiphila* og *Neoparamoeba perurans* identifisert som mulige årsaker til AGD (7). *Neoparamoeba perurans* er den amøben som nå er bekreftet som årsak (6). Denne amøben har også vist seg til å ha evnen til å infisere andre fiskearter som regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), brunørret (*Salmo trutta*), piggvar (*Psetta psetta*), berggylte (*Labrus bergylta*), og flere. Effekten av denne patogenen har vært observert i Tasmania, Australia siden 1980-tallet (8).

I senere tid har sykdommen spredt seg til andre områder som Chile, Irland, Japan, New Zealand, Norge, USA, Skottland, og Spania. Gjellevevet til en fisk som er rammet av AGD vil vise makroskopiske hvite flekker på gjellene, som fører til overflødig slimproduksjon og respiratoriske plager. Histologisk er AGD forbundet med akutt nekrose og filamentøs epitelcelle hyperplasi i gjellevev. Denne hyperplasien fører til at gjellens funksjonelle overflate reduseres og opphopning av slim hemmer karbondioksidutskillelsen gjennom gjellen. Dette fører da til respiratorisk acidose. Det kan også skje en kardiovaskulær svekkelse som fører til hypertensjon, kollaps av det sirkulatoriske systemet og til slutt død. Fisk som er preget av stress vil være mer utsatt for disse forandringene (8).

I 2012 ble det undersøkt om in vitro-dyrket *Neoparamoeba perurans* kunne forårsake AGD i atlantisk laks. En klon av *Neoparamoeba perurans* infiserte fiskene og ble deretter re-isolert fra laksen. Diagnosen ble bekreftet ved histologi og amøben identifisert ved PCR og in situ hybridisering. Denne undersøkelsen beviste da at *Neoparamoeba perurans* er den utløsende agent for AGD (9).

2.1.4 *Paranucleospora theridion*

Paranucleospora theridion, også kalt *Desmozoon lepeophtherii*, er en mikrosporidie. Mikrosporidia er en stor gruppe av obligate intracellulære parasitter av eukaryoter. Før var de klassifisert som protister, men er nå klassifisert som sopp. Mikrosporidia består av ca. 150 slekter og over 1200 beskrevne arter (10 s. 6). Mikrosporidier er karakterisert av formasjonen av sporer og tilstedeværelsen av unike organell som «extrusion apparatus». I motsetning til andre eukaryoter så mangler mikrosporidiene mitokondrier, typisk golgiapparat og «microbody-type» organeller (10 s. 7).

P. theridion har tre beskrevne utviklingssykluser i to forskjellige verter. Laksefisk er vert for de første to utviklingssyklusene. Stadiene har blitt beskrevet fra atlantisk laks (*Salmo salar*). Man tror at sporene produsert i første utviklingssyklus infiserer automatisk og vil spre seg og infisere andre celler når vertens celler degenereres. Sporene som produseres i andre utviklingssyklus produseres i nukleus av epitelcellene i skinnet og i gjellene, og det er trolig at her de infiserer lakselus mens den spiser på de epidermale cellene. Det siste steget i utviklingen er blitt beskrevet fra lakselus (10 s. 10).

P.theridion er diplokaryotisk gjennom alle utviklingssyklusene i laksen og derfor er det sannsynlig at utviklingen er haplofasisk. I lakselusen skjer utviklingen alternativt både i diplokaryotisk og i monokaryotisk fase. Ut ifra det kan man trekke konklusjonen at formeringsprosessen finner sted i lakselusa. Basert på denne informasjonen har laksefisken blitt definert som en intermediær vert og lakselusa blitt definert som en definitiv vert (10 s. 10).

Kliniske tegn på en *P. theridion* infeksjon i atlantisk laks kan være litt bleke gjeller med økt slimproduksjon, blødninger i huden og tap av skjell. Histopatologisk hypertrofi og hyperplasi av gjellenes epitel er observert. Det er observert en invasjon av leukocytter i gjeller, nyre, hjertet, milt, tarmsystem og eksokrin pankreas (10 s. 12).

I en masteroppgave skrevet i 2012 ble det forsket på utviklingen og på hvilke sykdommer som er forårsaket av *P. theridion* i lakselus. Her brukes det i hovedsak RT – PCR, men det ble også sett i lysmikroskop, samt TEM (Transmission Electron Microscopy), for å se på den patologiske og morfologiske utviklingen i *P. theridion* (10 s. 13).

2.2 Prosessering av vevsprøver

2.2.1 Fiksering

Fiksering er det første og viktigste trinnet i prosesseringen av vevsprøver. Ved fiksering av vev menes en kjemisk behandling som har som formål å immobilisere og stabilisere vevet og cellens bestanddeler (11 s.84). Når vevet fjernes fra kroppen, vil det påvirkes av indre og ytre faktorer. Det første som hender er at cellenes enzym frigjøres og løser opp vevet og bakterier vil trenge inn i preparatet. Dersom det blir liggende i romtemperatur, vil det tørke og endre form, volum og utseende. Ved hjelp av fiksering unngår man dette. Fikseringen gjør også vevet mer mottakelig for videre prosessering (11 s. 53-54). Fiksering blir oppdelt i to metoder; fysisk og kjemisk. Ved fysisk fiksering holdes vevskomponentene mekanisk på plass ved hjelp av nedfrysing og ved kjemisk fiksering holdes vevskomponentene fast ved hjelp av kjemiske bindinger som oppstår mellom reaktive grupper i vevet, spesielt mellom vevsproteinene og fikseringsmiddelet (11 s. 54).

Formaldehyd (formalin) er et additivt gelerende fiksativ som virker reversibelt stabiliserende på vevsproteiner sin tertiære struktur (11 s. 56-58). Det tilfører kovalent reaktive grupper til vevet som kan indusere kryssbindinger mellom protein, mellom funksjonelle grupper inne i et protein, inne i nukleinsyrer og mellom nukleinsyrer og proteiner. I vandig løsning danner formalin metylenhydrat, en metylenglycol som det første steg i fikseringen ($H_2C=O + H_2O \rightarrow HOCH_2OH$). Metylenhydrat reagerer med flere sidegrupper i proteiner og danner reaktive hydroxymetylsidegrupper ($-CH_2-OH$). De reaktive gruppene som dannes reagerer med hydrogengrupper, eller med hverandre og danner metylenbroer. Når formalin vaskes bort, kan de reaktive gruppene gå tilbake til deres opprinnelige tilstand mens metylenbroene vil bestå (11 s.56).

<u>Håndtering av formalin</u>

Ved fortynning må man alltid ha sterk syre opp i den svakere og ikke omvendt, da man kan få varmeutvikling og fare for spruting. Ifølge R-setningene er formaldehyd giftig ved innånding, hudkontakt og svelging. Dersom man får stoffet på huden skal man etter S-setningene vaske rikelig med vann. Ved illebefinnende kontakt lege, vis etiketten om mulig. Får man stoffet i øynene, skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege. Som vernetiltak skal man alltid arbeide i avtrekk og ha på seg øyevern og hansker. Søl dekkes med $NaHCO_3$ eller Na_2CO_3, bland godt og fortynn med vann før utslipp, og

skyll etter med mye vann. Rester fortynnes med vann og nøytraliseres før utslipp til avløpsrør (12 nr. 154).

Dehydrerende koagulerende fiksativ

De mest vanlige dehydrerende koagulerende fiksativene i bruk er metanol, etanol og aceton. Metanol har en molekylærstruktur som er mer lik strukturen til vann enn det etanol har. Etanol konkurrerer derfor sterkere enn metanol i samspillet med de hydrofobe områdene til molekyler. Det koagulerende fiksativ begynner med en konsentrasjon på 50-60% for etanol, men for metanol kreves en konsentrasjon på 80% eller mer. Fjerning og utskifting av fritt vann fra vev ved bruk av en av disse fiksativene har flere potensielle virkninger på proteiner i vevet (11 s.55).

Vannmolekyler omringer de hydrofobe områdene til proteiner, og ved frastøtning tvinger hydrofobe kjemiske grupper tettere sammen, og dermed stabiliserer de hydrofobe bindingene. Vannmolekyler bidrar med hydrogenbindinger i de hydrofile områdene av proteiner, dermed vil fjerning av vann destabilisere disse hydrogenbindingene. Sammen vil disse endre proteinets tertiære struktur. Etter koagulerende fiksering vil de fleste proteiner forbli uløselige selv om prøven settes tilbake til et vandig miljø. Ødeleggelse av den tertiære strukturen av proteiner skjer under denaturering, dette kan forårsake forandringer av de fysiske egenskapene, uløselighet og at proteinet mister sin funksjon (11 s. 55-56).

Håndtering av etanol

Med etanol må man passe på at det kan reagere med oksidasjonsmidler. Ifølge R-setningene er det meget brannfarlig og farlig ved innånding. S-setningene sier at emballasjen skal holdes tett lukket og holdes vekk fra antennelseskilder. Har man ikke tilgang til tilstrekkelig ventilasjon, skal man bruke egnet åndedrettsvern. Annet påbudt verneutstyr er øyevern. Store rester må samles og leveres til brenning, mens små rester kan fortynnes med vann og helles i avløp. Skyll da etter med mye vann (12 nr. 209).

2.2.2 Framføring:

Framføring har som mål å gjøre vevsbitene klare til å innstøpning i et fast medium slik at de kan snittes uten at vevstrukturene blir skadet. Framføring innebærer dehydrering, klaring og parafinimpregnering. Framføringen kan foregå i en framføringsmaskin, men kan også gjøres manuelt. Man finner ulike typer framføringsmaskiner med samme

prinsipp, og skjer ved hjelp av diffusjon av væsker (11 s.84). Maskinen består av flere reagensbeholdere, og ved vakuum/trykk – basert framføringsmaskin suges reagens fra disse beholderne inn i prøvekammeret etter en bestemt rekkefølge (11. s. 88).

Dehydrering

Dehydrering er en del av prosessen før vevet kan støpes inn i et hydrofobt innstøpningsmiddel. Dehydrering går ut på å fjerne vann og fikseringsløsning fra vevet og erstatte dette med et organisk løsningsmiddel. Dette gjøres slik at vevet kan støpes inn i et hydrofobt innstøpingsmiddel. Dersom konsentrasjonsgradienten mellom væsken på innsiden og utsiden av vevet er stor, vil diffusjon gjennom cellemembranen under væskeutveskling øke risikoen for celleskade. Prøven vil derfor alltid behandles i en økende konsentrasjon av dehydreringsmiddel. Man må passe på at prosessen er gjort på en skikkelig måte ettersom forlenget dehydrering kan føre til at vevet blir hardt, sprøtt og innskrumpet. Det vil også oppstå problemer ved ufullstendig dehydrering, det vil hindre klaringsvæsken i å trenge gjennom vevet og dermed vil det bli mykt og uimottakelig for infiltrering (11 s.84-85). Dehydrering utføres oftest ved etanol (C_2H_5OH) som er et klart, fargeløst og brennbart dehydreringsmiddel (13 s. 87). Det er hydrofilt og blandbart med vann og andre organiske løsninger (13 s. 85).

Klaring

Få dehydreringsmidler kan blandes med parafinvoks, derfor erstattes dehydreringsmidler med et klaringsmiddel som er løselig i både dehydreringsmiddelet og parafin, og fungerer dermed som et bindeledd mellom disse. De fleste klaringsvæskene er hydrokarboner med samme brytningsindeks som proteiner. Dette gjør at vevet får et klart og gjennomsiktig utseende ved å erstatte dehydreringsmiddelet med klaringsvæsken (11 s. 85-86). For lang tid i klaringsvæsken kan gjøre vevet sprøtt og skjørt slik at det blir vanskelig å snitte (11 s. 86).

Klaringsmiddelet er oftest xylen, som er løselig i de fleste organiske løsemiddel og i parafin. Det er et upolart hydrofobt oppløsningsmiddel med kokepunkt på 130˚C- 140˚C. Xylen trenger inn i vevet raskt og passer godt til å bruke på preparat som er mindre enn 5 mm tykke (12 nr. 158).

Håndtering av xylen

Gir kraftig reaksjon med HSO_3Cl, HNO_3, H_2SO_4/SO_3, og med sterke oksidasjonsmidler. Ifølge R-setningene er xylen brannfarlig og farlig ved innånding. S-setningene sier at en skal unngå kontakt med huden og øyene. Hvis effektiv ventilasjon ikke er mulig, må det brukes egnet åndedrettsvern som trykkluft- eller friskluftmaske. Man skal arbeide i avtrekk, bruke øyevern og hansker og unngå tennkilder. Dekk søl med $NaHSO_3$, tilsett så vann og bland godt. Overfør til et stort kar og la det stå en time. Rester fortynnes med mye vann før utslipp i avløp. Er xylenen en blanding av flere isomerer er det tryggest å samle opp spill og rester i flasker for å sende det til destruering ved brenning (12 nr. 158).

Parafinimpregnering

Vevet er klart til innstøping når klaringsvæsken erstattes av flytende parafinvoks. Kokepunktet og viskositeten på klaringsvæsken gir en indikasjon på hvor lang tid smeltet parafinvoks vil bruke på å erstatte den. Klaringsvæsker med lavt kokepunkt erstattes ofte raskere (11 s. 86-87). Parafinvoks er det vanligste innstøpningsmiddelet for histologiske prøver fordi det er billig og lett å håndtere (13 s. 89). Det er en blanding av hydrokarboner med ulikt antall C-atomer i molekylene og egenskapene varierer, smeltepunktet kan være mellom 40-70°C. Vokser med høyt smeltepunkt er hardere enn de med lavt smeltepunkt (11 s. 87)

2.2.3 Innstøping

Vevet skal støpes inn i et fast medium slik at det skal kunne snittes uten at vevstrukturene skades. Det er viktig å tenke på orienteringen av vevsbiten i støpeformen, preparatets snittflate blir den delen som vender ned mot bunnen av formen. Innstøpningsmediet må infiltrere alle komponentene av en vevsbit, og bør gi en elastisitet samtidig som at strukturen må være fast nok til å kunne skjæres. De fleste laboratorier bruker innstøpningsmaskiner med tre moduler; en parafindispenser, kuldeplate og en varmeskuffe for å oppbevare formene og vevskassettene før støpning (11 s. 87)

2.2.4 Snitting

Ved hjelp av en mikrotom kan vevsblokkene snittes og overføres til et objektglass (11 s.93). Snittene skal ikke være mer enn et cellelag tykke når de skal mikroskoperes. Det krever erfaring for å skjære tynne, jevne vevssnitt (11 s. 94).

2.2.5 Fluorescens in situ hybridisering (FISH)

Fluorescens er brukt til å visualisere prøvemateriale som fluoriserer, dvs. emitterer lys i en farge når en annen farge skinner på den. Fluorescens kan skje på grunn av tilstedeværelsen av naturlige fluoriserende substanser inne i cellene, som for eksempel klorofyll eller andre fluoriserende komponenter (autofluorescens). En annen grunn til fluorescens er at cellene har blir behandlet med et fluoriserende fargestoff. DAPI (diamidino – 2 –phenylindole) er et mye brukt fluoriserende fargestoff, og gir cellene en lyseblå farge (14 s. 59).

FISH er en cytogenisk teknikk brukt til å detektere tilstedeværelsen samt lokalisasjonen av spesifikke gensekvenser. Teknikken kan visualisere spesifikke cytogenetiske abnormaliteter som kromosomal sletting, forsterking og translokasjon. FISH bruker bindingen, eller «annealing», av fluorescensmerkede, spesifikke nukleinsyre prober til deres komplimentere DNA eller RNA sekvenser og den påfølgende visualiseringen av disse probene inne i cellene i vevet av interesse (15).

Hver fluorescensmerkede probe som hybridiseres til en cellekjerne i vevet av interesse, fremstår som et tydelig fluoriserende lyssignal. Hvert enkelt lyssignal identifiserer en kopi av det kromosomale lokus med en homolog DNA sekvens. Et av problemene med å bruke FISH er at man på forhånd må vite hva man ser etter. Resultatet av FISH blir enten positivt eller negativt ved å se etter en spesifikk kromosomal region (15).

2.2.6 Eosin

Eosin er den mest egnede fargen til å kombinere med aluminium-hematoxylin for å demonstrere den generelle histologiske arkitekturen av vev. Eosinfargen har en spesielt god evne til å differensiere mellom cytoplasma av forskjellige typer celler, og mellom forskjellige typer bindevevsfiber og matriser. Dette skjer ved at disse blir farget i forskjellige nyanser av rød og rosa. Eosinfargen er et xanten fargestoff og den mest kommersielt brukte eosinfargen er Eosin Y (11 s.126).

Eosin Y, som også kalles vannløselig eosin, er også løselig i alkohol til tross for navnet. Som cytoplasmafarge blir Eosin Y vanligvis brukt som en 0,5 eller 1,0 prosent løsning i destillert vann med tilsatt tymol for å hemme vekst av sopp. Det er sagt at å tilsette litt eddiksyre (0,5ml til 1000ml farge) gjør fargen skarpere. Differensiering av eosinfargen skjer ved påfølgende vask i springvann, og videre differensiering skjer ved dehydrering i

alkoholløsninger. Intensiteten av eosinfarging og differensieringsgraden påkrevd er stort sett et spørsmål om individuell smak (11 s.126).

Etyl Eosin, Eosin B og Erytrosin B er nå sjelden i bruk, men noen eldre metoder spesifiserer fortsatt bruken av disse, for eksempel Harris stain og Negri bodies. Noen alternative røde fargestoffer nevnes som erstatning for eosin, som «phloxine», «Biebrich», etc. Selv om disse fargestoffene farger vevet med en mer intens rødfarge, er de ikke like egnet til å vise små forskjeller i vevet som eosin, og er generelt mindre verdifulle (11 s.126).

2.2.7 Hematoxylin

Hematoxylin ekstraheres fra barken av «blåtre» (*haematoxylon campecianum*) som finnes i syd- og Mellom-Amerika. Hematoxylin blir brukt som kjernefarge, men det er ikke hematoxylin som er fargestoffet. Hematein er fargestoffet som dannes ved oksidasjon av hematoxylin. Omdanningen av hematoxylin til hematein er reversibel, men ved overoksidasjon blir det dannet oxyhematein (oransje-gul forbindelse), og denne prosessen er irreversibel. Kun hematein er anvendelig som histologisk fargestoff (11 s.121).

Hematein kan produseres fra hematoxylin på forskjellige måter. Ved å ha en reserve av ikke-oksidert hematoxylin i fargeoppløsningen, tillates en langsom oksidasjon til hematein. Dette kalles naturlig oksidasjon, og gir løsningen en lang holdbarhet. Ehrlich's og Delafield's hematoxylin løsninger fremstilles ved denne typen oksidasjon. Den andre metoden for å fremstille hematein er kjemisk oksidasjon, her blir hematoxylin omdannet til hematein nesten umiddelbart. Denne oksidasjonen gir kortere holdbarhet enn naturlig oksidasjon. Mayer's hematoxylin og Harris' hematoxylin er eksempler hvor kjemiske oksidasjonsmidler er brukt (11 s. 121 -122).

Hematoxylin er oppløselig i både vann og alkohol mens hematein kun er litt løselig i vann og alkohol. Hemateinet i seg selv er negativt ladd og for å kunne binde seg til negativt ladde nukleinsyrer i DNA, trengs et bindeledd. Dette kan for eksempel være aluminium. Aluminium-hematoxylin kan dermed brukes til å farge kjerner fordi det er uavhengig av elektrostatisk frastøtning. Aluminium-hematein vil farge den totale mengde nukleinsyrer, kjernen får en rød farge som blir mørk blå når vevssnittet skylles i springvann. Denne fargeforandringen skjer sannsynligvis på grunn av dissosiasjon av H^+-ioner fra hematein

på grunn av det basiske springvannet. Man finner flere forskjellige hematoxylin-løsninger som gir gode resultater. En av disse er Harris' hematoxylin (11 s. 121 -122).

Harris' hematoxylin

Harris' hematoxylin er et aluminium-hematoxylin. Tradisjonelt ble denne fargen kjemisk modnet ved hjelp av kvikksølvoksid. Siden kvikksølvoksid er toksisk, lite miljøvennlig, og kan ha skadelige, etsende langtidseffekter på noen automatiske fargemaskiner, blir natrium- og kaliumjodat oftere brukt til oksidasjon. Harris' hematoxylin gir en spesielt tydelig kjernefarging, og har derfor blitt en mye brukt progressiv farge i diagnostisk eksfoliativ cytologi. I rutinemessige histologiske undersøkelser blir den vanligvis brukt regressivt men kan også være brukbar progressivt (13 s. 127).

Når en farger med Harris' hematoxylin progressivt er eddiksyre/etanolvask en mer kontrollert metode for fjerning av overflødig farge fra vevskomponenter og objektglass. Den tradisjonelle saltsyre/alkoholvasken virker veldig raskt og er vanskeligere å kontrollere. En 5-10% løsning av eddiksyre i 70-95% løsning av alkohol fjerner fargemolekylene fra cytoplasma samtidig som den beholder nukleinsyrekompleksene intakte. Som ved de fleste hematoxylinfarger blir kvaliteten av fargingen svekket etter få måneder. Dette kan merkes ved at det dannes presipitat i den lagrede fargeløsningen. Ved dette stadiet kan fargen filtreres og fargetiden økes for bedre resultat. For best resultat er det lurt å lage ny fargeløsning hver måned (13 s. 127).

2.2.8 Hematolxylin og eosin

Hematoxylin-eosin fargemetoden er kanskje den mest brukte fargemetoden i histologi. Den er blitt veldig populær grunnet sin enkle sammenligningsegenskap og at den har evnen til å tydelig påvise veldig mange forskjellige vevsstrukturer. Hematoxylinkomponenten farger cellekjerner blå/svart, med bra intranukleær detalj. Eosin farger cellens cytoplasma og de fleste fiber i bindevev med varierende nyanser av rosa, oransje, og rød. Hematoxylin har imidlertid mange flere bruksområder enn i hematoxylin-eosin kombinasjonen (13 s.125). En kan også bruke hematoxylin-erytrosin kombinasjonen, men denne er mindre brukt.

2.2.9 PAS

Periodic acid Shiff (PAS) er en fargeteknikk som påviser karbohydrater i vev. Av vevskarbohydrater bestemmes homoglykaner, heteroglykaner, og oligosakkarider bundet til proteiner. Homoglykaner finnes i pattedyr som glykogen og i planter som stivelse (amylose og amylopektin). Heteroglykaner er karbohydrater som har en komponent som ikke består av karbohydrat. For eksempel er et karbohydrat med proteinkomponent en proteoglykan. Sammen med visse glykoproteiner betegnes de som mukosubstanser (16 s.293).

Homoglykaner, alle glykoproteiner og nøytrale proteoglykaner vil gi positiv PAS-reaksjon. Sure proteoglykaner er PAS-negative. Dette skyldes sannsynligvis elektrostatisk frastøtning av perjodsyren slik at C2-C3 glykolgruppene ikke blir oksidert (16 s.133). Påvisning av glykogen og mucin kan være aktuelt ved undersøkelser av basalmembranen, nyrevev ved mistanke om glomerulonefritt, påvisning av slimproduserende svulster, kvantifisering av glykogen i lever, og påvisning av sopp. I PAS reaksjonen vil perjodsyren føre til oksidasjon av hydroksylgruppene (1,2 glykol gruppene). Resultatet er spaltning av karbon-karbon bindingen, og at det dannes dialdehyd (11 s. 168). Perjodsyren fungerer godt som oksidant siden den ikke har tendens til overoksidering av aldehyder til karboksylsyrer, noe som gir svekket farging ved tilsetning av Shiff's reagens (11 s.170).

Shiff's reagens er en løsning av det røde fargestoffet, Basic fuchsin. De kromofore eller fargebærende gruppene i fargestoffet blir brutt ved hjelp av svoveldioksid, og løsningen blir da fargeløs. Aldehyder kan da reagere med det fargeløse Shiff's reagenset. Skylling i vann fjerner overskuddet av Shiff's reagens og SO_3^- fjernes slik at kinonringen gjendannes. Det dannes en magentarød fargeforbindelse der Shiff's reagens har reagert (11 s. 171).

2.3 Maskinell

2.3.1 Innstøpingsmaskin og kuldeplate

En innstøpingsmaskin bør bestå av tre moduler; en voksdispenser, en varmeplate og en kuldeplate (11 s. 89).

2.3.2 Mikrotom

En mikrotom brukes til å skjære vevssnitt. Vevsblokken monteres på mikrotomen og snittes med et knivblad som er festet i en knivholder. Det finnes ulike typer mikrotomer som rotasjonsmikrotom og sledemikrotom. Ved et rotasjonsmikrotom skjæres vevssnitt så tynne som 3 µm og det kan håndtere hardt vev (11 s. 94).

2.3.3 Vannbad

Det brukes et vannbad hvor temperaturen kan kontrolleres. Det er anbefalt at vannet skal være omtrent 10˚C under smeltepunktet på parafinvoksen som er benyttet (11 s. 94).

2.3.4 Lysmikroskop

Grunnen til at vi bruker mikroskop skyldes det menneskelige øyets begrensing til å se de små detaljene (11 s.33). Prinsippet på lysmikroskop er oppbygd på en lyskilde, oftest hvitt lys. Man definerer hvitt lys som en blanding av lys som inneholder flere bølgelengder fra alle de synlige deler av det elektromagnetiske spektrum (11 s.33). Lysmikroskopet består av en kondensor, objektbord, objektiv, hovedrør og et okular (11 s.37-39).

2.3.5 Fluorescensmikroskop

Lyskilde

Fluorescensmikroskop bruker oftest høytrykk gasslamper som kvikksølvdamp- og xenongasslamper. Valg av lyskilde kommer an på hva som skal undersøkes, og for rutineundersøkelser er det kvikksølvlampen som er mest brukt. De to lampene har forskjellige emisjonskurver. Emisjonskurven til kvikksølv er veldig spiss, mens xenon har en avrundet og mer kontinuerlig kurve. Heldigvis så har mange av de mest brukte fluorokromene eksitasjonsbølgelengde på de samme bølgelengder som kvikksølvlampen har sine emisjonstopper (11 s. 48-49).

Tidligere brukte alle fluorescenssystemer den samme transmitterte lysvei som det normale lysmikroskopet. Nå blir «incident lightfluorescens» mer brukt. Dette vil si at lyskilder belyser preparatet ovenifra, i motsetning til normale lysmikroskop der preparatet blir belyst nedenifra (11 s. 48-50).

Filtre

I forberedelsen av preparatet før mikroskopering kan det fluorescerende reagenset inneholde flere fluorescerende materialer enn det vi er interessert i. For å unngå forvirring er det derfor viktig å filtrere ut alle eksitasjonsbølgelengder bortsett fra den spesifikke bølgelengden vi er etter. Ved å gjøre dette blokkerer vi ut den uspesifikke fluorescensen. Det finnes forskjellige typer filter, som «Dyed in the glass» filter. Det er et bredbåndfilter, som slipper gjennom et bredt utvalg bølgelengder. Ser man bort fra nonspesifikke og auto-fluorescens er der materialer som er eksitert ved mer enn en eksitasjonsbølgelengde, og her vil det være bedre å bruke filter med et smalere transmisjonsbånd, og som har sine transmisjonstopper nærmere fluorokromens eksitasjonsmaksimum (11 s. 49).

«Barrier or Suppression» filtrer blir brukt for å unngå at lys av korte bølgelengder skader netthinnen. De må i midlertidig tillate den fluoriserende fargen å passere, hvis ikke ville man bare fått negative resultat. Barrierefiltrene kan være ufarget, samt forskjellige nyanser av gul, helt til mørk oransje. Fargede barrierer kan endre den endelige fargen av den fluoriserende prøven og derfor må alle filter som er brukt i et system bli dokumentert når et resultat blir rapportert (11 s. 49).

Kondensorer

De fleste systemer bruker en «mørkfeltkondensor» som ikke tillater direkte lys inn i objektivet, og i tillegg har den større sannsynlighet til å gi en bakgrunn med mørk kontrast til fluorescensen. Omtrent en tiendedel av den tilgjengelige energien som blir brukt blir begrenset av kondensorens design. Fluorescerende lysemisjon er i de fleste tilfeller veldig svake i forhold til mengde energi absorbert av fluorokromen eller fluoroforen. Effektivitetsratioen er mellom 1:1000 og 1:100 i de beste tilfeller, så systemer som reduserer den tilgjengelige energien bør tas til betraktning før det blir satt i bruk (11 s.50).

Objektiver

Valget av objektiver er også viktig. Med «Dark – ground illumination» blir valgmulighetene for objektiver større, og linsene blir mer forseggjort med høyere apertur og bedre lyssamlingsevne (11 s. 50).

3. Materialer

3.1 Prøvematerialer

3.1.1 *Lepeophtheirus salmonis*

Vi brukte lakselus som ble oppbevart i enten etanol i romtemperatur eller i saltvann i kjølerom. De som var oppbevart i etanol ble hentet fra et anlegg på Sunnmøre i juni og oktober 2014. Lusene oppbevart i saltvann ble hentet fra et anlegg i Romsdalsfjorden i mars 2015.

3.1.2 Gjellevev

Gjellevevet fra *Salmo salar* ble enten oppbevart i saltvann på kjølerom eller lagt direkte i fryseren. Saltvannsprøvene og de ferskfrosne ble hentet fra et anlegg i Romsdalsfjorden i mars 2015. Vi fikk også utdelt en prøve der det var påvist AGD (amoebic gill disease), denne ble oppbevart i fryseren på RNA later. Denne ble også hentet fra Romsdalsfjorden.

3.2 Utstyr og reagenser

- **Xylen:** brukt i framføringsprosessen og under farging. Vi brukte to forskjellige typer, den ene var rent P-xylen og den andre var en blanding av flere isomerer.
- **Etanol:** brukt i flere prosesser. Vi brukte de for å oppbevare prøvemateriale, som fikseringsmiddel, i framføringen og også i fargeprosessen.
- **Formaldehyd**: brukt som fikseringsmiddel i de fleste prøvene. Vi brukte både 37% formaldehyd fortynnet med rent destillert vann til 4% og en ferdigblandet fosfatbufret 4% formaldehyd.
- **Erytrosin B**: fra BDH Laboratory Supplies ble brukt i Hematoxylin-Erytrosin fargingen. Gir god kontrast til hematoxylinen i kjerner ved å farge proteiner rødt.
- **Harris' hematoxylin**: fra MERCK ble brukt både i HE fargingen og PAS fargingen.
- **Perjodsyre**: ble brukt under PAS fargemetoden, fortynnet til 1%.
- **Shiff's**: fra MERCK ble brukt under PAS fargemetoden.
- **Parafin**: Den vi brukte blir kalt Histowax og vi brukte den både under framføring og innstøpning av vevsbitene. Smeltepunktet på Histowax er på 54-56 °C.
- **Mikrobølgovn**: fra Kenwood (modell nummer KEN CJS25) ble brukt under PAS.

- **Proteinase K**: fra QIAGEN ble brukt i cirka halvparten av snittene under FISH fargingen.
- **Nukleinsyreprober**: fra Invitrogen som var enten spesifikk for AGD (*Neoparamoeba perurans*) eller for *Paranucleospora theridion* ble brukt til FISH farging.
- **SSC buffer**: fra AppliChem ble brukt under vasketrinnene i FISH metoden.
- **Fettstift**: fra Dako Denmark A/S ble brukt under FISH til å avgrense proben til snittet.
- **«Optical Clear Adhesive Seal Sheets»:** fra Thermo ble brukt til å forsegle FISH-preparatene for inkubering i fuktekammer.
- **Kar**: Disse inneholdt diverse reagenser som xylen, alkohol, og fargeløsninger og ble brukt i deparafinering og fargingen av vevssnittene.
- **Begerglass**: brukt til oppbevaring av forskjellige løsninger for eksempel under fiksering.
- **Målesylinder**: ble brukt til oppmåling og tillaging av løsninger.
- **Parafilm**: fra American National Can ble brukt til forseiling av flyktige løsninger som xylen.
- **Avtrekkskap**: ble brukt for å unngå å puste inn skadelige stoffer som xylen og formaldehyd.
- **Hansker**: fra VWR ble brukt til å beskytte huden fra diverse kjemikalier.
- **Kjølerom og fryser**: ble brukt til oppbevaring av reagenser og prøver.
- **Varmeskap fra Termaks og varmeplate Leica HI 1220**: ble brukt i temperaturavhengige steg.
- **Automatpipetter**: fra Eppendorf ble brukt til små volum mens engangspipetter ble brukt til tilsetting av løsninger der det ikke var nødvendig med like nøyaktige mengder.
- **Objektglass:** ble brukt til alle snitt.
- **Dekkglass:** ble brukt til å beskytte prøven etter farging.
- **Mountex (lim):** fra Histolab ble brukt til liming av dekkglass til objektglass
- **Skjærefjøl og skalpell**: ble brukt til skjæring av vevsbiter.
- **Kassetter:** ble brukt under framføringsprosessen og innstøpning av vevsbiter.
- **Metallformer:** brukt under innstøpning av vevsbiter.
- **Pinsett**: ble brukt til flytting av vevsbiter.

- **Lysmikroskop OLYMPUS BX50 og fluorescensmikroskop Leica DM2000 LED**: ble brukt til mikroskopering av de ferdige preparatene.
- **Digitale mikroskopikameraet Leica DFC450 C**: ble brukt sammen med Leica DM2000 LED for å ta bilder av preparatene.
- **Kuldeplaten Leica Histoblock**: ble brukt både under innstøpning av prøver og under snitting av vevsblokkene.
- **Mikrotomen Leica RM2235**: ble brukt til snitting av innstøpte vevsbiter.
- **Vannbad fra AXEL JOHNSON LAB SYSTEM:** ble brukt under snitting av innstøpte vevsbiter.

4. Metode

4.1 Inndeling av prøver

I dette forsøket ble prøvene delt opp i flere grupper etter hva de ble oppbevart i, og hvordan de ble fiksert. Saltvanns gjelleprøver (SG1, SG2, etc.) ble oppbevart i saltvann, og fiksert i 4% formaldehydløsning. Saltvannslus (SL1, SL2, etc.) ble oppbevart i saltvann og fiksert i 4% formaldehydløsning. Etanollusene (EL1, EL2, etc.) ble oppbevart i etanol og var dermed ferdigfiksert og klar til framføring. Alle ferskfrosne gjelleprøver (FG1, FG2, etc.) ble delt i tre og fiksert i 4% formaldehydløsning, 4% formaldehydløsning med fosfatbuffer, eller i etanol. Derfor fikk ferskfrosne gjelleprøvene i tillegg til FG navnet også etternavnene E for etanol, F for 4% formaldehydløsning, og FF for 4% formaldehydløsning med fosfatbuffer. Alle ferskfrosne gjelleprøver ble innstøpt i to til tre parafinblokker som ble nummerert 1, 2, og 3. Kassetten til ferskfrossen prøve 1 fiksert i etanol og støpt inn i blokk 2 ble dermed merket: FG1 E-2. Til slutt fikk vi en frosset gjelleprøve hvor det var påvist AGD og den kalte vi for positiv kontroll (PK) og denne ble fiksert i 4% formaldehydløsning. Navnene ble skrevet med blyant på kassettene før framføringsprosessen.

4.2 Fiksering

Til fiksering av vevsbiter brukte vi tre fikseringsmiddel; etanol, 4% formaldehyd og 4% formaldehyd i fosfatbuffer. Vevsbitene ble fiksert i de forskjellige fikseringsmidler i minimum 24 timer slik at fikseringsvæsken fikk tid til å penetrere hele vevsbiten, og dermed gi fullstendig fiksering.

4.3 Framføring

Vi tok utgangspunkt i Rapid Program til framføringsmaskinen Shandon Excelsior fra Thermo som blir brukt ved sykehuset i Ålesund (17). Vi gjorde noen forandringer så det ble mulig å utføre metoden manuelt. Vi brukte da nytt begerglass for hvert nye trinn. Den endelige framføringsmetoden ble slik:

1. 70% Etanol i 30 minutter.
2. 70% Etanol i 30 minutter.
3. 96% Etanol i 30 minutter.
4. 96% Etanol i 10 minutter.
5. Abs Etanol i 20 minutter.

6. Abs Etanol i 20 minutter.
7. Xylen i 30 minutter.
8. Xylen i 30 minutter.
9. Xylen i 30 minutter.
10. Histowax i 90 minutter ved 60 °C.

4.4 Innstøpning

Vi måtte gjøre denne prosessen manuelt siden innstøpningsmaskinen var ødelagt. For å gjøre det manuelt smeltet vi voks i varmeskap i store begerglass. Vi brukte varmeplate på 60°C for å holde voksen varm mens vi helte den i formene i tillegg til å holde begerglasset som inneholdte prøvekassettene fra framføringen varm. Vi brukte en kuldeplate under sentrering av vevsbitene, og til avkjøling av vevsblokkene. Vi brukte en pinsett for å legge prøven i metallformen, og for å sentrere den midt i blokken. For å unngå at voksen på pinsetten skulle stivne, satt vi den ned i et lite begerglass med flytende voks. Begerglasset sto på varmeplaten under hele prosessen. Vi brukte to pinsetter så den ene kunne stå i begerglasset for å smelte parafinen som stivnet mens den andre var i bruk.

4.5 Snitting

Under snitting av vevsblokkene brukte vi to mikrotomer, et vannbad, pinsetter, og objektglass. Vi snittet alle prøvene i både tre og fem mikrometer. Vannbadet som ble brukt

hadde en temperatur på rundt 45°C. Alle ferskfrosne gjelleprøver ble snittet til seks objektglass, to til FISH farging, to til PAS farging, og to til HE farging. Det ble da ett snitt for hver av fargemetodene i både 3 og 5 µm. Vi merket da glassene med prøvenavn fikserings- og fargemetode, samt tykkelse (for eksempel FG1 E-2 PAS 3µm, som betyr; ferskfrossen gjelleprøve nr. 1, fiksert i etanol, skjært fra blokk 2, farget med PAS og er 3µm tykke). Vi testet også ut forskjellen mellom å vaske objektglasset med etanol før påføring av prøve og påføring av prøve uten etanolvask.

4.6 Farging

4.6.1 Deparafinering

Deparafinering ble brukt som første steg gjennom alle fargemetodene. Vi testet om det var en forskjell ved å sette objektglassene i varmeskap på 60°C i 30 minutter, i motsetning til å la objektglassene kun tørke på benk før deparafinering. Tabell 1: refererer til HE og PAS fargingen av de ferskfrosne gjelleprøvene. Alle FISH- og PK-preparatene ble satt i varmeskap i 30 minutter før xylenbadet. Alle saltvannsprøvene, EL-HE og EL-PAS ble kun tørket på benk.

Tabell 1: Tørkemetoder for ferskfrosne gjelleprøver

	Varmeskap	**På benk**
FG1	X	
FG2	X	
FG3	X	
FG4		X
FG5		X

Vi brukte denne prosedyren for deparafinering:

1. Xylen i 10 minutter.
2. Abs Etanol i 1 minutt.
3. 96% Etanol i 1 minutt.
4. 96% Etanol i 1 minutt.
5. 70% Etanol i 1 minutt.
6. 70% Etanol i 1 minutt.
7. H_2O i 1 minutt.

4.6.2 Hematoxylin – Erytrosin (HE)

1. Snitt til vann (deparafinering).
2. Harris' Hematoxylin 4 minutter.
3. Blånes i vann i 5 minutter (bad med svakt rennende vann).
4. Erytrosin 1% i 1 minutt og 30 sekunder.
5. Skylles i vann.
6. Dehydreres 1 minutt i hvert bad (70% → 70% → 96% → 96% → Abs).
7. Xylen i et minutt.
8. Legges opp (mountex og dekkglass).

(18)

4.6.2 PAS

1. Snitt til vann (deparafinering).
2. 1% perjodsyre, 7 minutter.
3. Skylles i vann.
4. Shiff's reagens 10-15 sekunder i mikrobølgeovn ved 350W. Fargeløsningen skal bli mørk rosa, men ikke koke.
5. Inkuberes på benk i 3 minutter.
6. Skylles i varmt vann i 3 minutter.
7. Hematoxylin i 4-5 minutter.
8. Blånes i varmt vann i ca. 5 minutter.
9. Dehydreres 1 minutt i hvert bad (70%→70%→96%→96%→Abs).
10. Xylen i 1 minutt.
11. Legges opp (Mountex og dekkglass).

(19)

4.6.3 FISH

1. Snitt til vann (deparafinering)
2.

- Alternativ 1: Preparatet denatureres ved 80°C i 5 minutter.
- Alternativ 2: Preparatet denatureres ved å dryppe proteinase K på snittet for så å legge på et dekkglass. Inkuber preparatet ved 56°C i 5 minutter, og skyll av dekkglasset og proteinase K ved å dyppe preparatet i 2x SSC buffer.

3. Bruk en fettstift for å merke området som skal farges.
4. Tilsett 10 µl med probe (1 mM konsentrasjon), enten spesifikk for *P. theridion* eller *N. perurans* (AGD).
5. Legg på dekkglass og forsegl med egnet teip.
6. Plasser objektglassene i fuktkammer og inkuber over natt ved 37°C.
7. Etter hybridisering fjernes dekkglass.
8. Fjern overskudd av probe ved å vaske i 2X SSC buffer – la stå i 2 minutter.
9. La objektglasset tørke. Beskytt preparatet fra lys til det skal mikroskoperes.

Siden vi hadde en stor prøvemengde for farging av FISH laget vi tre tabeller som viser inndelingen med tanke på tykkelse, denatureringsmetode og probe.

Tabell 2: Ferskfrosne gjelleprøver

Prøve	Tykkelse	Denaturering	Probe
FG1-F	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
FG2-F	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
FG3-F	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
FG4-F	3 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
FG5-F	3 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
FG1-FF	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG2-FF	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG3-FF	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG4-FF	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
FG5-FF	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
FG1-E	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG2-E	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG3-E	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
FG4-E	3 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
FG5-E	3 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*

Tabell 3: Etanolfikserte lakselus

Prøve	Tykkelse	Denaturering	Probe
EL-2	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
EL-3	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
EL-5	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
EL-6	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
EL-10	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
EL-11	3 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*
	5 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*

Tabell 4: Positive kontroller

Prøve	Tykkelse	Denaturering	Probe
PK-1	3 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
	5 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
PK-2	3 µm	56°C med proteinase	*N. perurans*
	5 µm	80°C uten proteinase	*N. perurans*
PK-3	3 µm	80°C uten proteinase	*P. theredion*
	5 µm	56°C med proteinase	*P. theredion*

4.7 Mikroskopering

Etter farging av vevssnittene analyserte vi dem i mikroskop. Vi så først på noen HE og PAS fargede preparat under lysmikroskopet OLYMPUS BX50. Fluorescens mikroskopet LEICA DM2000 LED sammen med kameraet LEICA DFC450 ble brukt til mikroskopering av FISH-preparatene og vi brukte det til å ta bilde av preparatene farget med HE og PAS. Vi sammenlignet da bildene til snittene for å kunne si noe om forskjellene i forhold til farging, tykkelse, framføring og fiksering.

5.0 Resultat

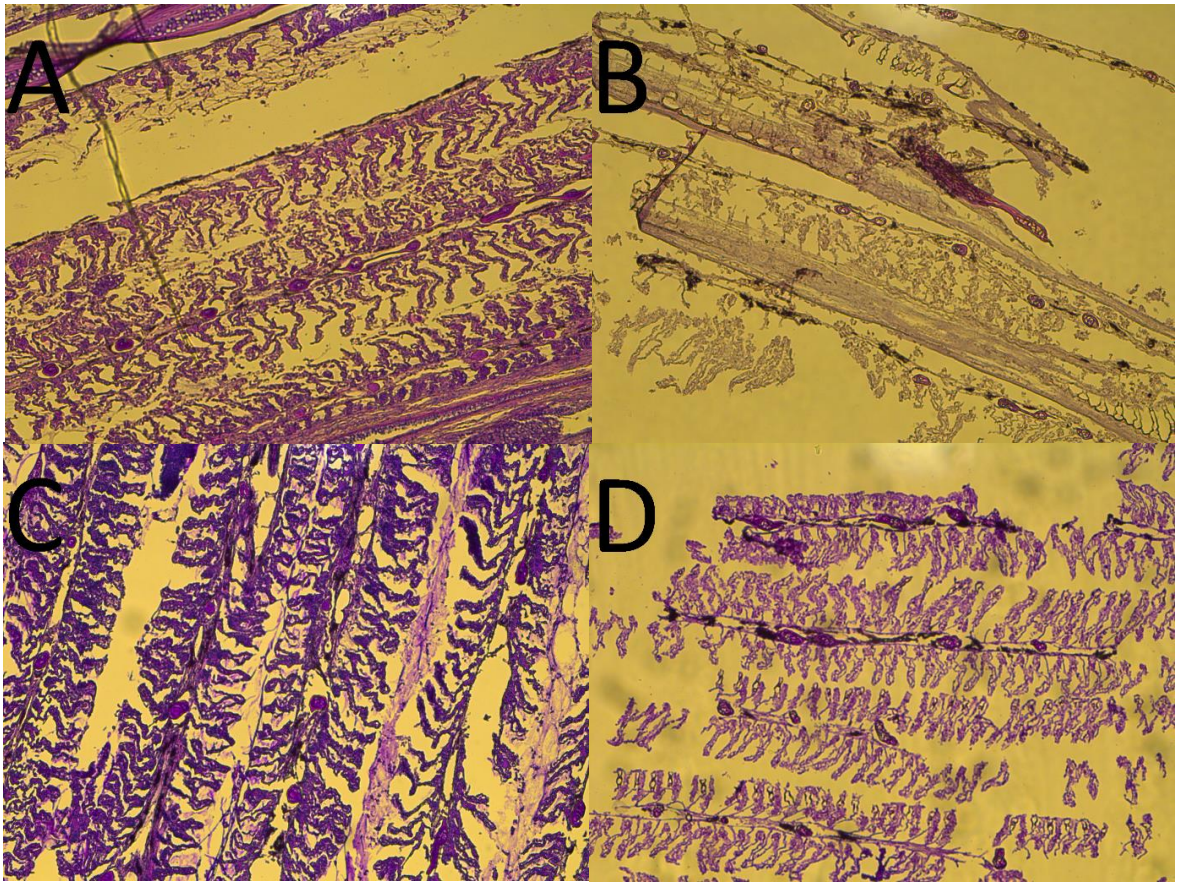
Her skal vi ved bruk av figurer sammenligne forskjellige oppbevaringsmedier, fikseringsmidler, snittykkelser, bruk av varmeskap før dehydrering, farging og tilstedeværelse av patogen.

5.1 Oppbevaringsmedium

De forskjellige oppbevaringsmediene ga ulik kvalitet, noe som kommer tydelig frem i mikroskopbildene.

5.1.1 Gjellevev

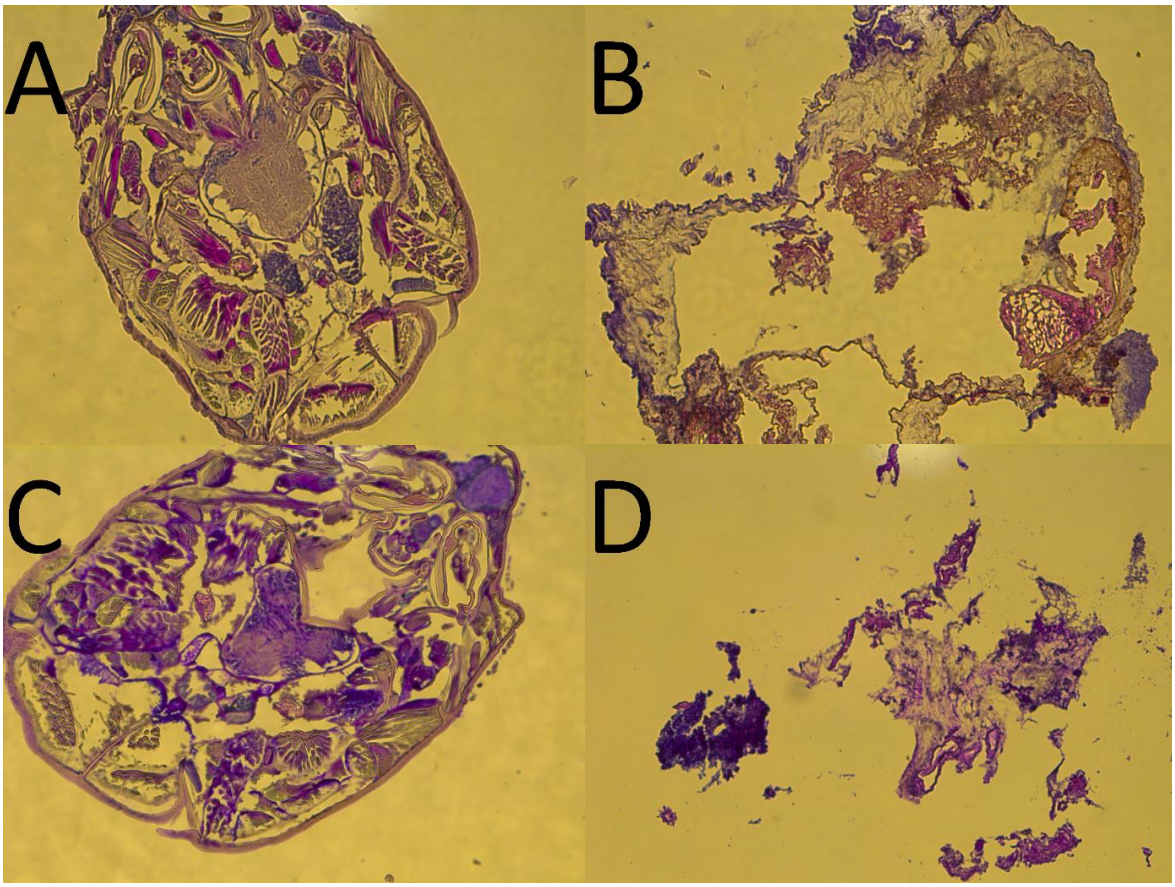
Figur 1 viser forskjeller mellom oppbevaringsmetode av gjellevev.



Figur 1: A og B er farget med HE, der A er ferskfrosset og B er oppbevart i saltvann. C og D er farget med PAS, der C er ferskfrosset og D er oppbevart i saltvann.

5.1.2 Lakselus

Figur 2 viser forskjeller mellom oppbevaringsmetode av lakselus.

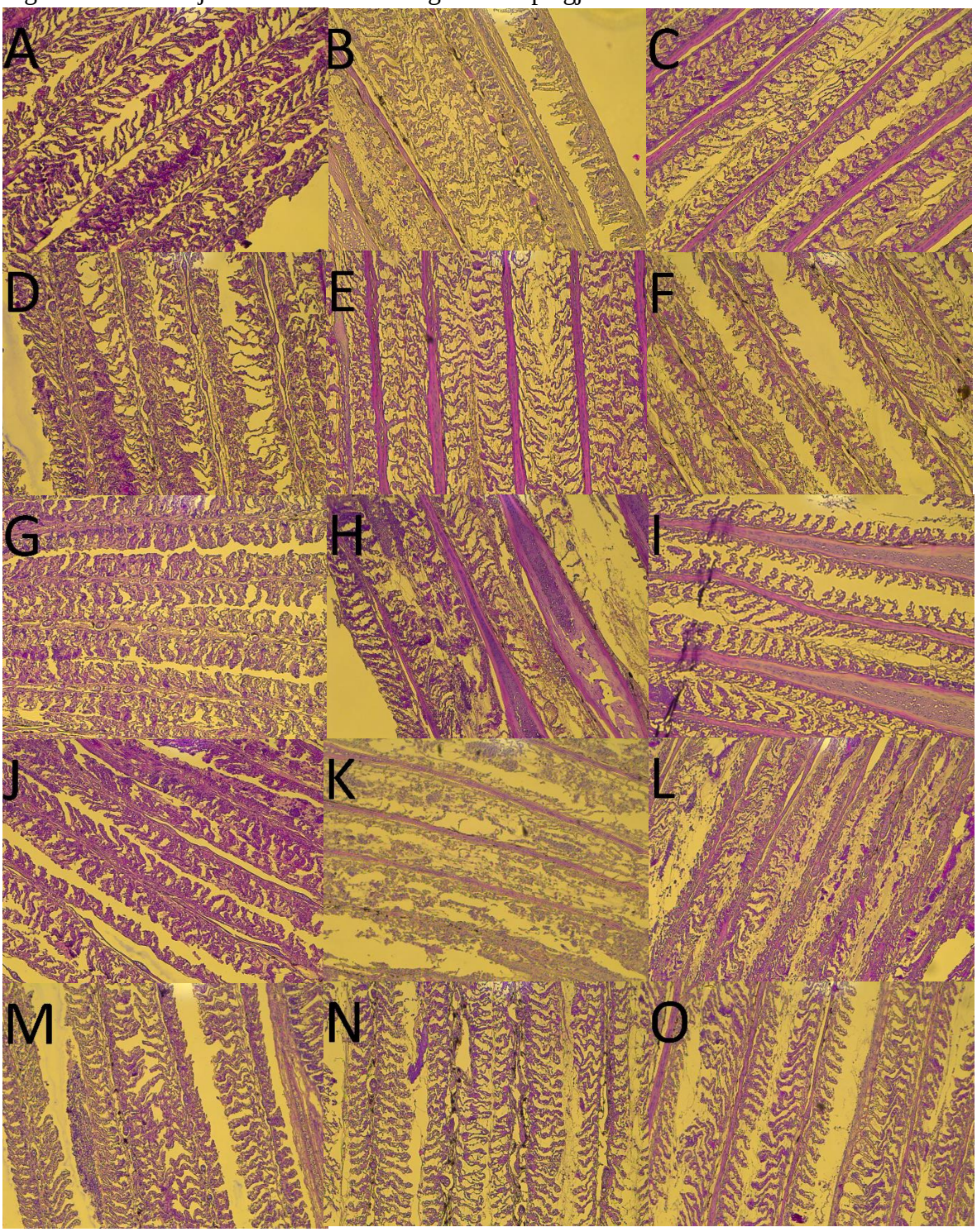


Figur 2: A og B er farget med HE, der A er oppbevart i etanol og B er oppbevart i saltvann. C og D er farget med PAS, der C er oppbevart i etanol og D er oppbevart i saltvann.

5.2 Fikseringsmiddel

Fikseringsmiddel brukt ga utslag på kvaliteten til preparatene, noe som tydelig kan sees på mikroskopbildene under.

Figur 3 viser forskjeller mellom fikseringsmiddel på gjellevev.

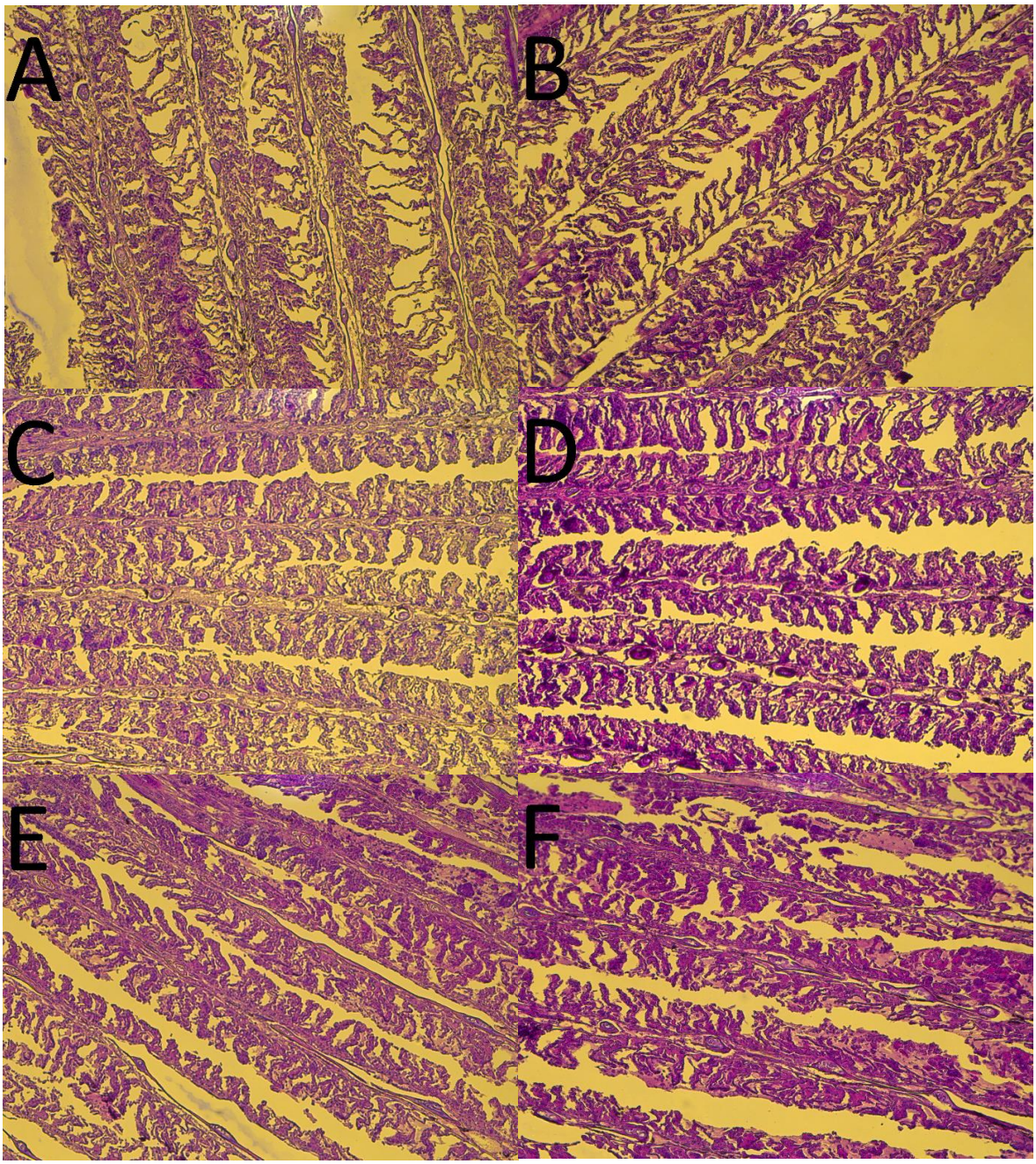


Figur 3: Sammenligner fiksering med etanol (A, D, G, J, M), med 4% formaldehydløsning (B, E, H, K, N), og med 4% formaldehydløsning i fosfatbuffer (C, F, I, L, O). Alle vevssnittene er ferskfrosne gjelleprøver farget med HE.

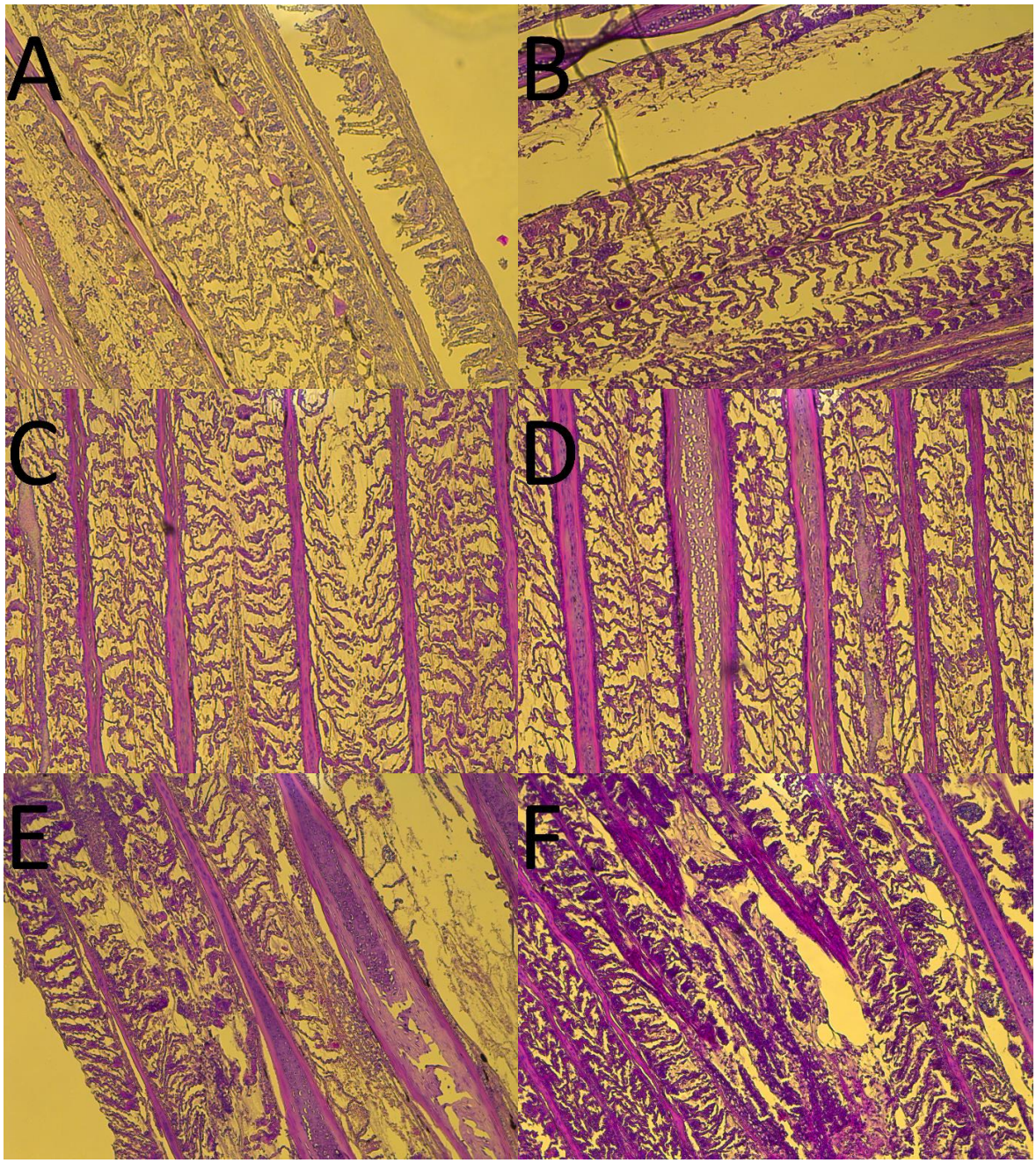
5.3 Tykkelse

Tykkelse på snittene ga utslag på kvaliteten til preparatene, noe som tydelig kan sees på mikroskopbildene under.

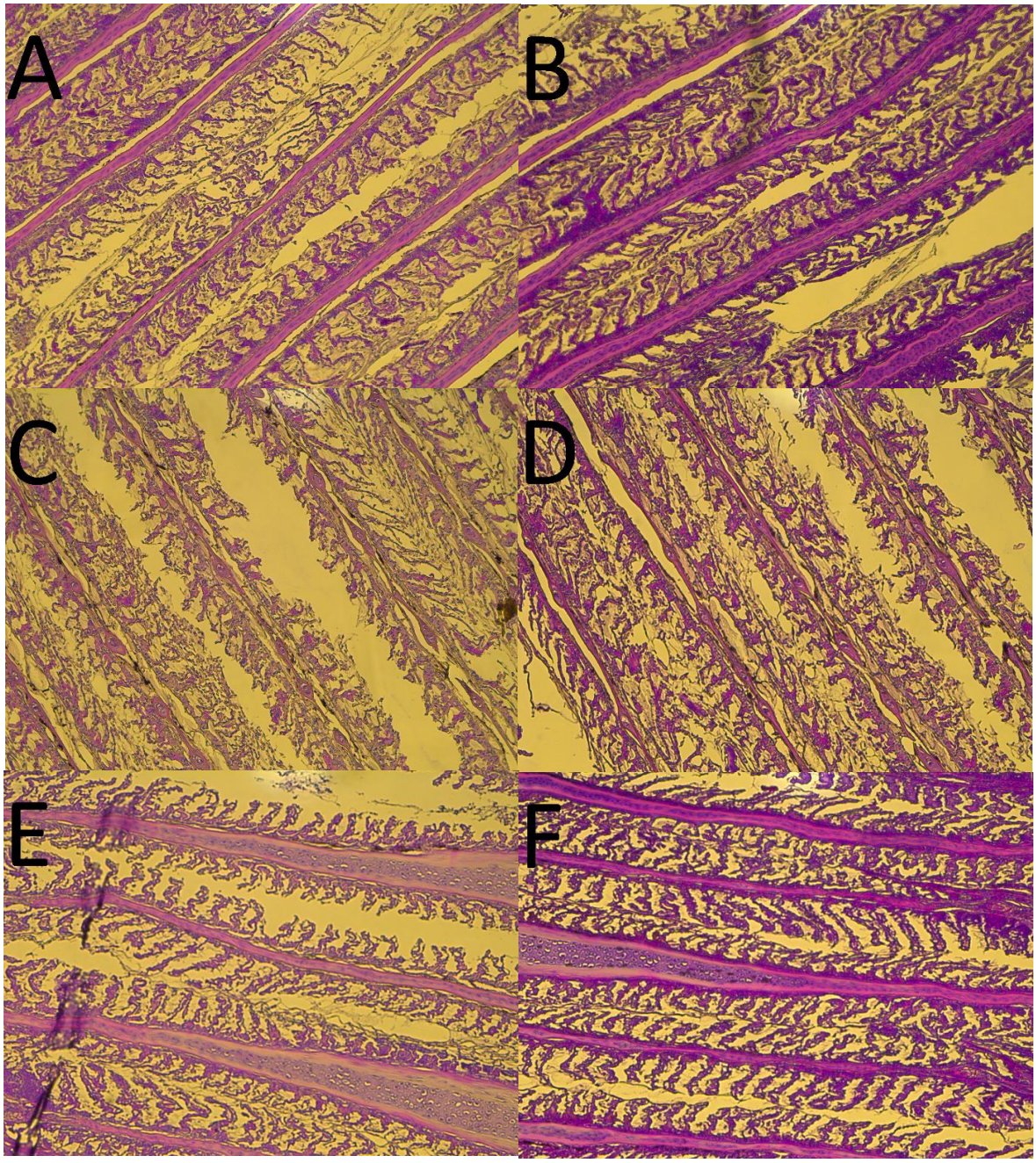
Figur 4 viser forskjeller ved snitting av gjellevev ved 3 og 5µm.



Figur 4: Sammenligner etanol-fikserte HE fargede snitt i 3µm (A, C, E) og i 5µm (B, D, F).



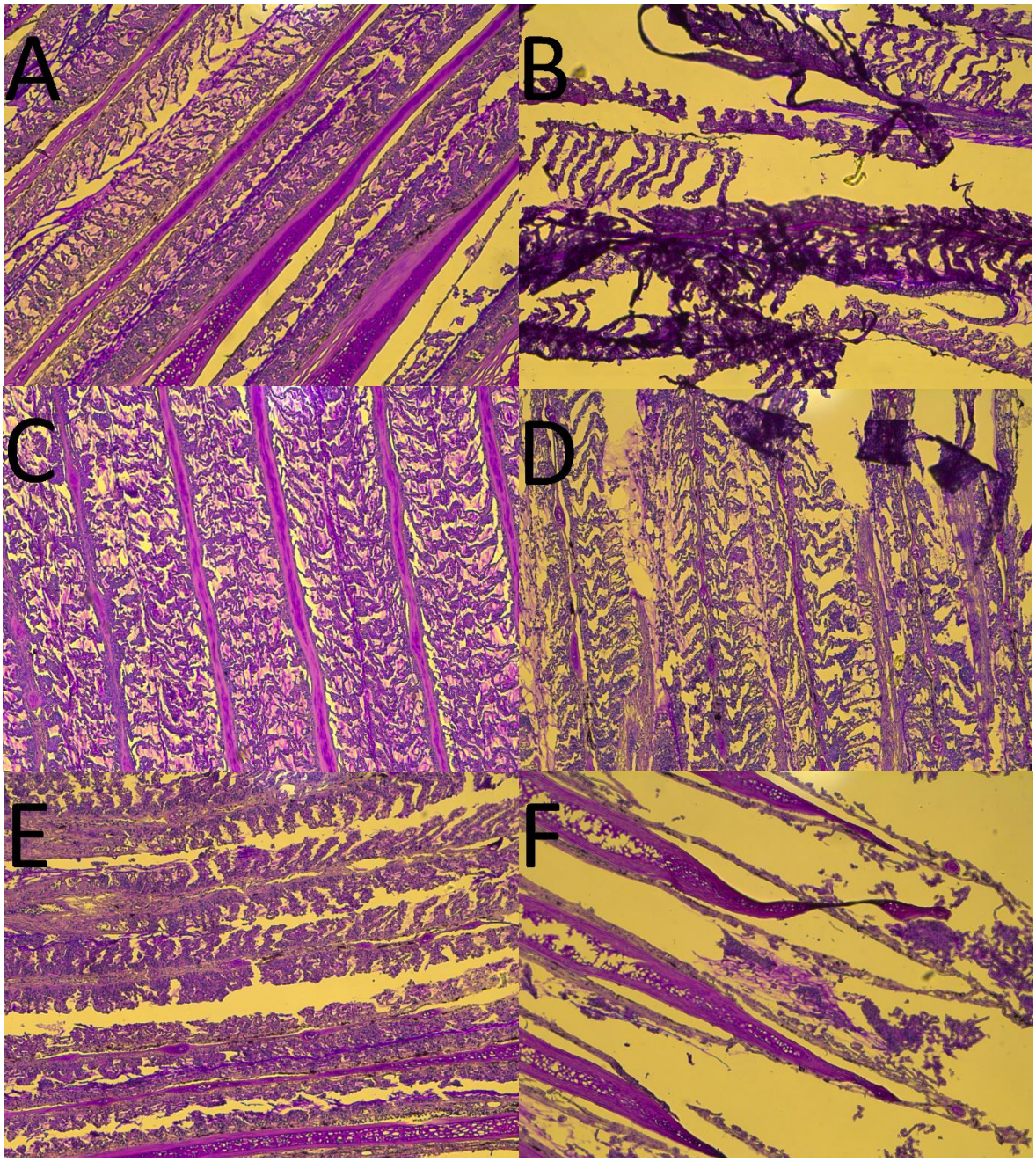
Figur 5: Sammenligner 4% formaldehyd-fikserte HE fargede snitt i 3µm (A, C, E) og i 5µm (B, D, F).



Figur 6: Sammenligner 4% formaldehyd i fosfatbuffer-fikserte HE fargede snitt i 3µm (A, C, E) og i 5µm (B, D, F).

5.4 Varmeskap før dehydrering

Bruk av varmeskap før dehydrering hadde en positiv effekt på kvaliteten til preparatet, noe som kommer frem av figur 7.



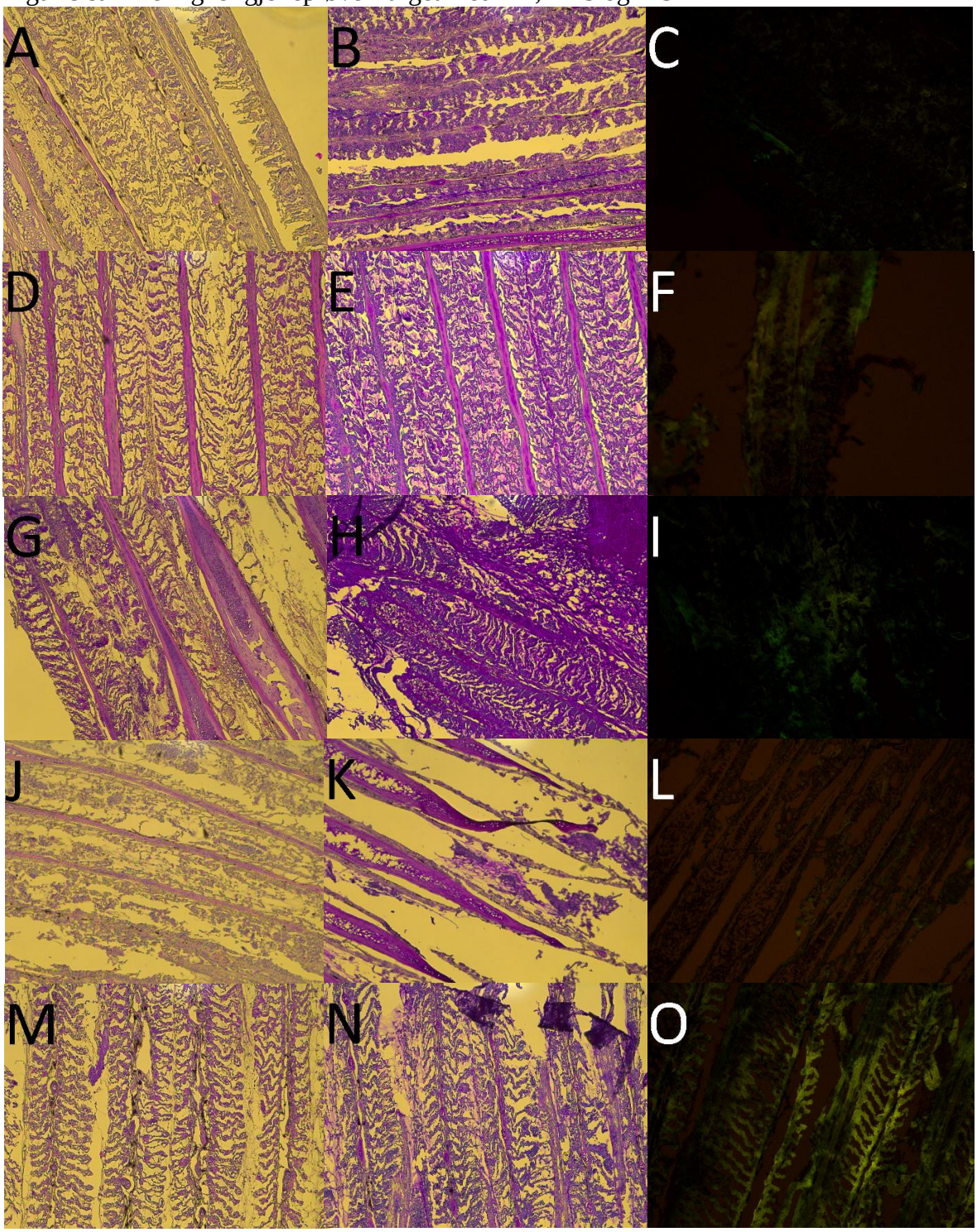
Figur 7: Sammenligning av ferskfrosne gjelleprøver farget med PAS i forhold til bruk av varmeskap før dehydrering. A, C og E i varmeskap. B, D og F uten varmeskap.

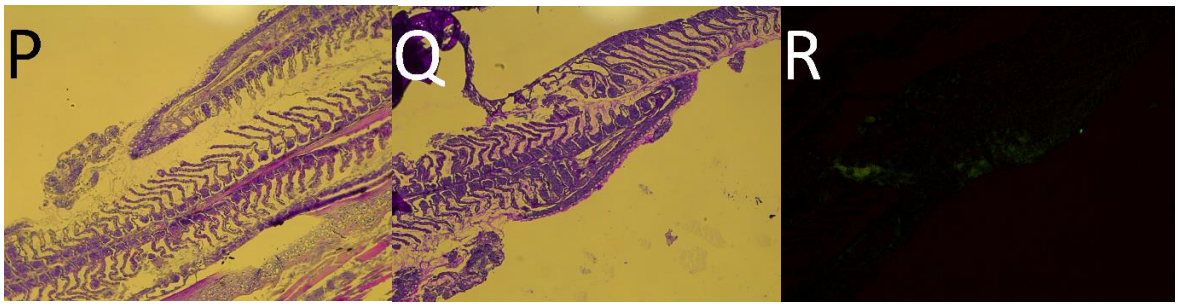
5.5 Farging

Figurene under sammenligner de forskjellige fargemetoder av lakselus og gjellevev

5.5.1 HE, PAS, og FISH fargede gjelleprøver

Figur 8 sammenligner gjelleprøver farget med HE, PAS og FISH

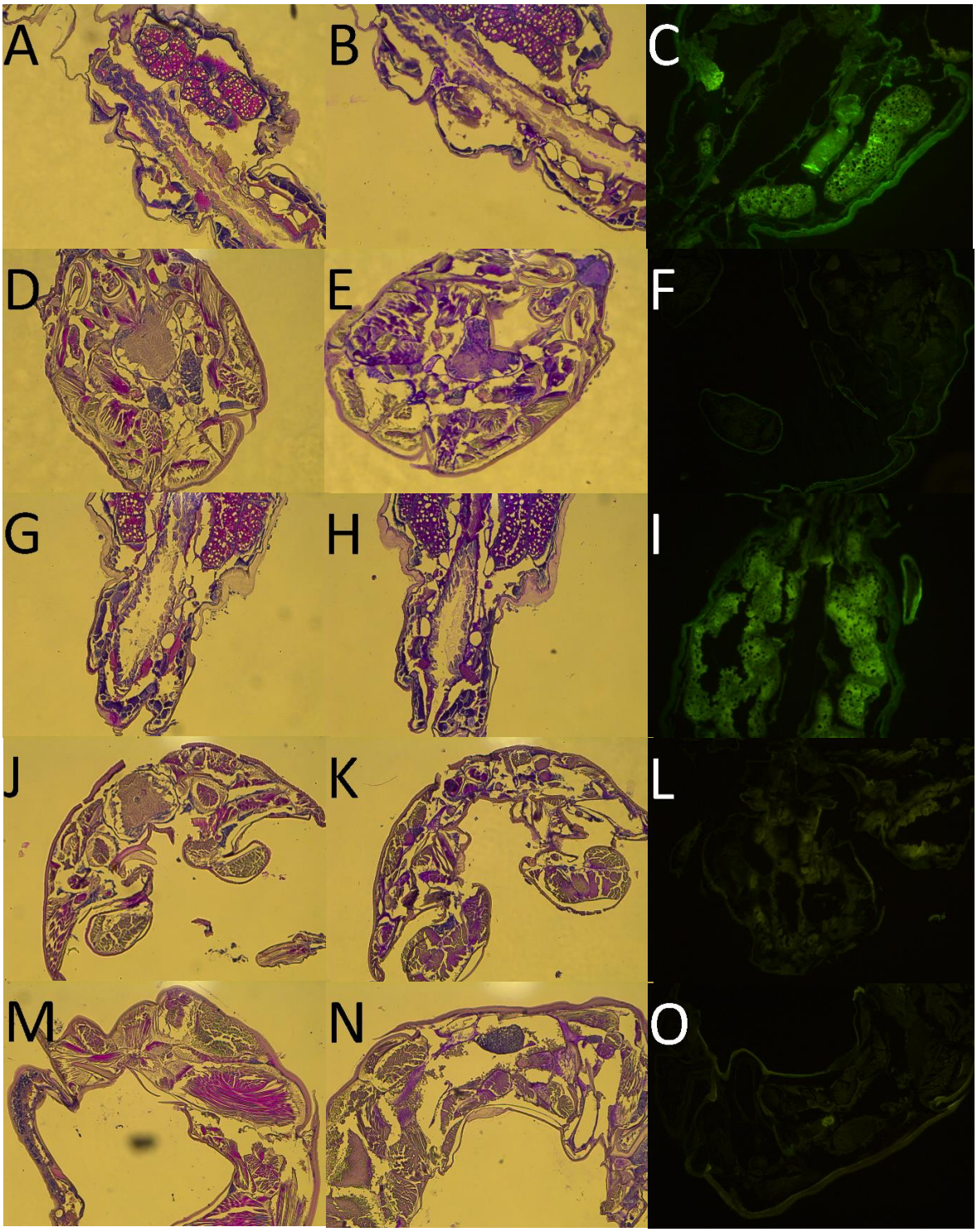




Figur 8: Sammenligner gjellevev farget med HE (A, D, G, J, M, P), PAS (B, E, H, K, N, Q), og FISH (C, F, I, L, O, R). Alle prøvene ble fikser i en 4% formaldehydløsning og er 3µm tykke.

5.5.2 HE, PAS, og FISH fargede lakselus

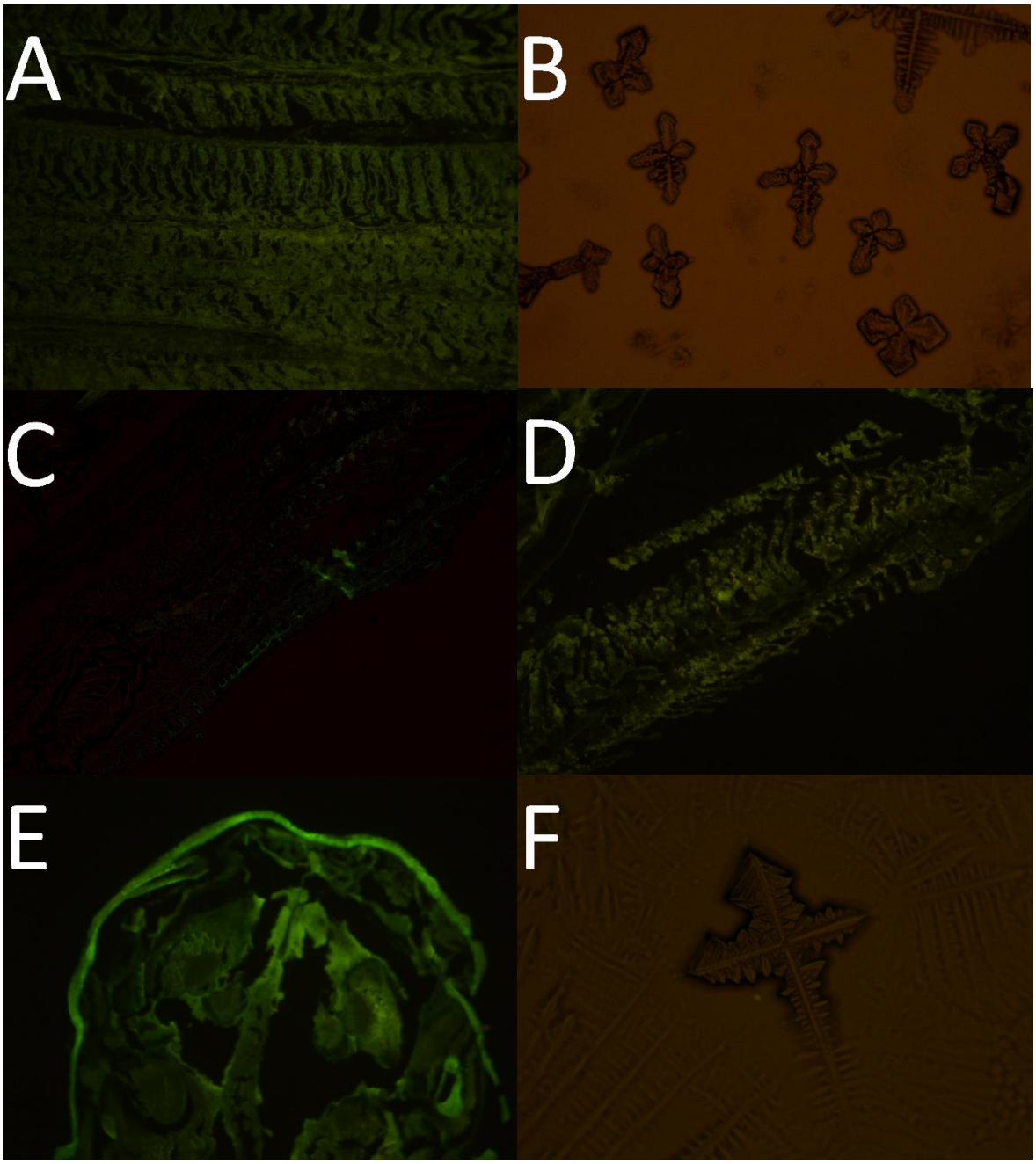
Figur 9 sammenligner lakselus farget med HE, PAS og FISH.



Figur 9: Sammenligner vev av lakselus farget med HE (A, D, G, J, M), PAS (B, E, H, K, N,), og FISH (C, F, I, L, O). Alle prøvene ble fiksert i etanol.

5.5.3 FISH farging, med og uten proteinase

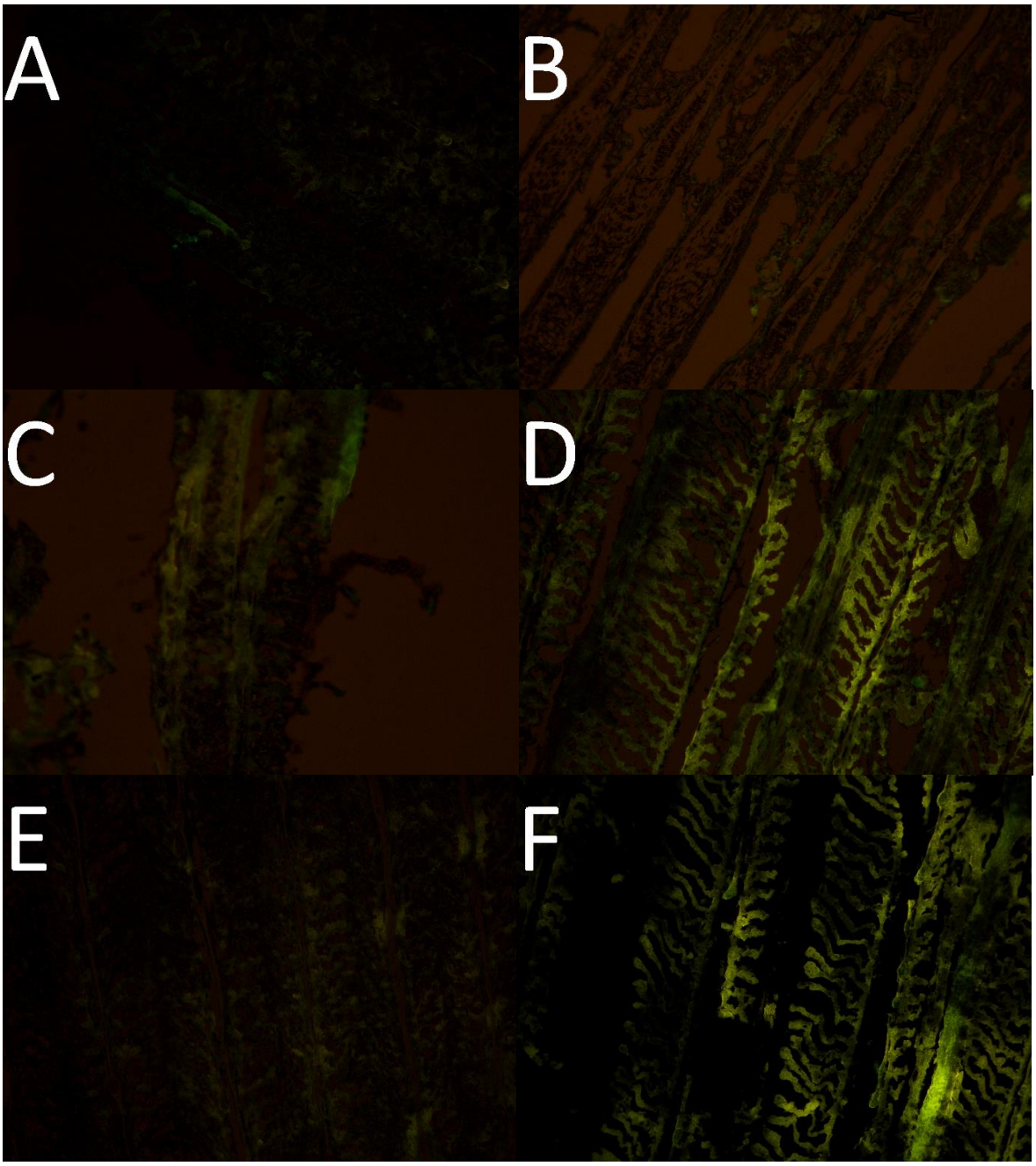
Figur 10 sammenligner denaturering med og uten proteinase.

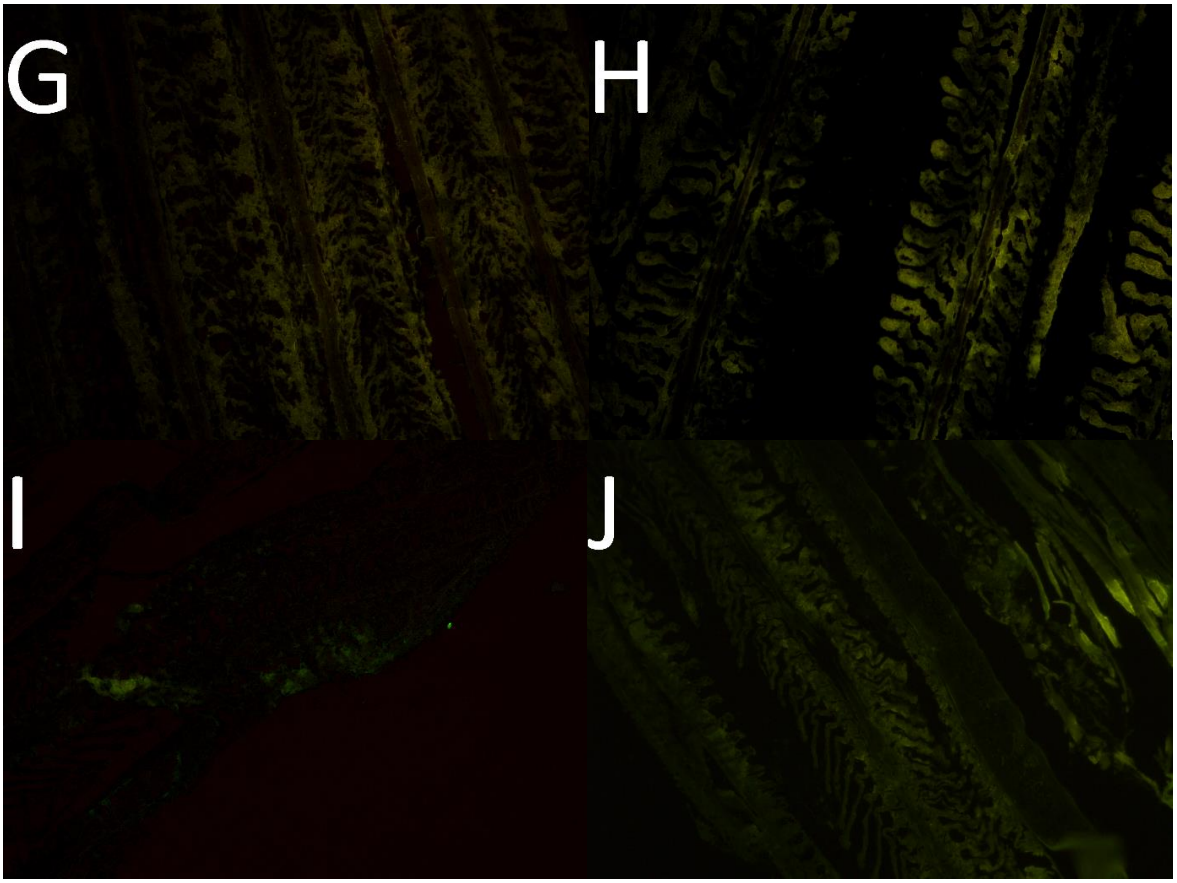


Figur 10: Sammenligner bruk av proteinase K, med kun bruk av varmeplate under FISH farging. A, C og E er uten proteinase K, mens B, D og F er med proteinase K. A og B er ferskfrosset gjellevev, C og D er positiv kontroll, og E og F er lakselus.

5.5.4 FISH probe

Figur 11 sammenligner FISH-probene for AGD og *P. theridion.*



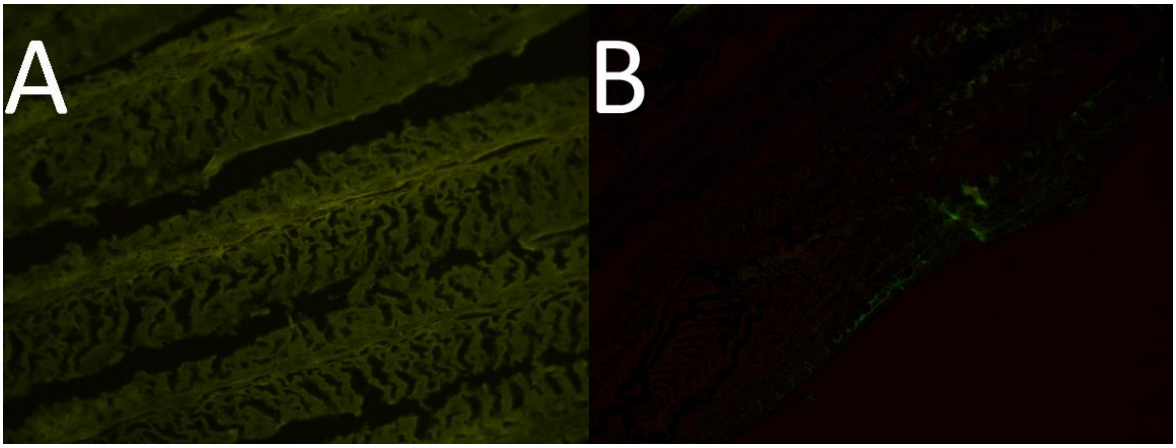


Figur 11: Sammenligner fluorescensbildet med bruk av *N. perurans* proben (A, C, E, G, I) og *P. theridion* (B, D, F, H, J).

5.6 Tilstedeværelse av patogen

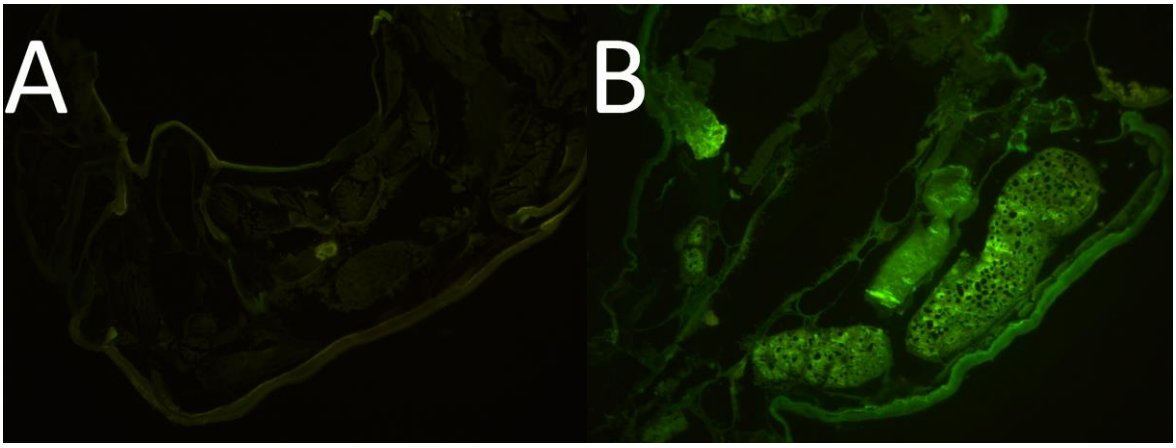
Sammenligner negative og positive prøver ved FISH-farging

5.6.1 AGD i gjellevev



Figur 12: Forskjellen mellom en negativ (A) og en positiv (B) gjelleprøve farget med AGD-proben ved FISH farging.

5.6.2 *P. theridion* i lakselus



Figur 13: Forskjellen mellom en negativ (A) og en positiv (B) lakselus farget med *P. theririon*-proben ved FISH farging.

Vi påviste AGD i den positive kontrollen men ikke i de ferskfrosne gjelleprøvene. Vi fikk heller ikke påvist *P. theridion* i de ferskfrosne gjelleprøvene. Vi påviste derimot *P. theridion* i noen etanolfikserte lakselus.

6.0 Diskusjon

Målet med oppgaven var å utvikle en patologisk undersøkelsesmetode for påvisning av AGD (*Neoparamoeba perurans*) i gjellevev hentet fra atlantisk laks og *Paranucleospora theridion* i både gjellevev og lakselus. Vi så på alle trinnene helt fra oppbevaring av prøvemateriale til farging og mikroskopering. Videre i denne diskusjonen skal vi ta for oss de forskjellige utfordringene som oppsto gjennom prosjektet, og eventuelle løsninger.

6.1 Oppbevaringsmedium

I løpet av dette prosjektet fikk vi prøvemateriale ved forskjellige tider, og oppbevart på forskjellige måter. De første prøvene vi tok i bruk var lakselus og gjelleprøver oppbevart i saltvann, ved 4°C i et kjølerom. Til å begynne med så det ut som det kunne være en tilfredsstillende metode. Problemet med å oppbevare prøvemateriale i saltvann er at det ikke stopper råtningsprosessen. Dette ser man tydelig i figur 5.1.1. og 5.1.2, der morfologien er endret betraktelig i vevet som var oppbevart i saltvann. Grunnet dette kan vi ikke regne saltvann som et egnet oppbevaringsmedium over tid.

I tillegg til å få lakselus oppbevart i saltvann, fikk vi også lakselus oppbevart i etanol ved romtemperatur. Vevets morfologi ble her bevart i mye større grad, noe som kan sees i figur 5.1.2. Siden etanol i tillegg til å være et oppbevaringsmedium også er et fikseringsmiddel, kunne disse prøvene settes direkte inn i framføringsprosessen, noe som kan spare tid ved et laboratorium.

Den tredje oppbevaringsmetoden vi testet var ferskfrosne gjelleprøver. Disse var helt klart de beste gjelleprøvene med tanke på bevaring av vevets morfologi. Forskjellen ved bevaring av vevets morfologi mellom ferskfrosne og saltvann-oppbevarte gjelleprøver kan tydelig sees ved figur 5.1.1. Vi kan derimot ikke sammenligne ferskfrysing av prøver med oppbevaring i etanol siden vi ikke hadde noen ferskfrosne lakselus eller etanoloppbevarte gjelleprøver. Vi kunne lagt noen av de ferskfrosne gjelleprøvene i etanol, men for at vi skulle kunne sett om dette var en egnet metode måtte prøven ha fått stå i en lengre periode, noe som vi ikke hadde tid til i dette prosjektet.

Vi fikk ikke testet formaldehyd som oppbevaringsmedium, men antar at det kan brukes til lakselus og gjellevev siden det er standard i mange sykehus. Formaldehyd bevarer vevets

struktur på best måte, sett bort i fra fryste prøver. Siden både etanol og formalin også er fikseringsvæsker gjør det at framføringsprosessen kan starte framføringsprosessen noe tidligere, noe som igjen vil føre til at svaret kan sendes ut på et tidligere tidspunkt. Når det gjelder formaldehyd er et av problemene at det er svært giftig. Dette betyr at stedene hvor prøvene skal hentes må ha tilstrekkelig utstyr for å kunne pakke materialet. Det inkluderer avtrekksskap (eller annen godkjent ventilasjon til slike kjemikalier), hansker og annet egnet verneutstyr. Etanol kan derfor være en god erstatter. Her trengs det mindre verneutstyr, og det er ikke like farlig om man blir eksponert til det.

6.2 Fikseringsløsning

Vi prøvde ut tre forskjellige fikseringsmidler; 96% etanol, 4% formaldehydløsning og fosfatbufret 4% formaldehydløsning. Bilder av preparat fiksert med diskuterte fikseringsløsninger ses i figur 5.2.

Etanol ble brukt til alle de vellykkede lakselusprøvene, siden disse allerede var oppbevart, og dermed allerede fiksert i etanol. Det ble også brukt til et utvalg av de ferskfrosne gjelleprøvene. Sammenlignet med de andre fikseringsmidlene var det både fordeler og ulemper med bruk av etanolfiksering. De etanolfikserte gjelleprøvene var fastere etter fiksering, noe som gjorde dem lettere å skjære opp og fordele i kassetter. De var også lettere å snitte i mikrotom, særlig ved 3µm. Vi følte at de etanolfikserte snittene satt bedre fast på objektglasset under farging. Dette merket vi særlig under PAS-farging, der de fleste vellykkede eksemplarene var etanolfiksert. Den eneste ulempen vi la merke til, var at morfologien virket noe oppsvulmet.

Prøver fiksert med 4% formaldehyd eller fosfatbufret 4% formaldehyd oppførte seg likt under hele prosessen, fra fiksering til og med farging. Resultatet sett i mikroskopet var også tilsynelatende likt. Vi hadde egentlig tenkt å kun bruke den ferdig fortynnede løsningen med fosfatbufret 4% formaldehyd, men vi la merke til at den hadde gått ut på dato i år 2000. Grunnet dette bestemte vi oss for også å fortynne vår egen 4% formaldehydløsning fra en 37% løsning som bare nylig var utgått på dato. Vi fortynnet denne med destillert vann. Formaldehydfiksering hadde også sine ulemper og fordeler. En ulempe er at stoffer er giftig og kreftfremkallende, dette gjør at man må ta forhåndsregler, som å bruke egnet verneutstyr som hansker og øyevern, samt at man må jobbe i et godkjent avtrekksskap. En fordel vi merket under mikroskoperingen er at

formaldehydfikserte preparat ga en litt bedre detalj i de mindre vevsbestanddelene enn de etanolfikserte.

6.3 Framføringsmetode

På grunn av mengden prøvemateriale vi hadde brukte vi en manuell framføringsmetode. Vi snakket med sykehuset og fikk sendt prosedyren for maskinell metode. For at det skulle være mulig å bli ferdig på en dag, tok vi bakgrunn i det raske programmet for maskinen og gjorde noen få justeringer. Å gjøre det manuelt har noen ulemper. Det er en veldig tidkrevende prosess og øker eksponeringen man har for farlige stoffer som xylen. Ved manuell metode må man også være til stede, i motsetning til en framføringsmaskin der framføringen kan gjøres over natten. Vi hadde heller ingen mulighet til å gjøre dette i et vakuum, noe som blir gjort i den maskinelle metoden. Hvor mye dette påvirker resultatet er vanskelig å si, siden vi ikke hadde noen måte å sammenligne dette på.

Siden parafinvoksen som brukes i siste trinn av framføringen måtte smeltes manuelt i varmeskap måtte vi passe på å ha denne i varmeskap i god tid. Dette fordi den ikke kan smeltes raskt ved å øke temperaturen. Voksen har ingen kokepunkt, men et punkt der den tar fyr. Vi brukte derfor et varmeskap på 60°C, mens parafinen hadde et smeltepunkt 56-58°C. Ser man bort fra tidsaspektet var det ingen problemer med framføringen.

6.4 Innstøpning og snitting

Det var planlagt at innstøpningen skulle gjøres i voksdispenseren Histotap Plus, men siden den ikke fungerte ble vi nødt til å gjennomføre innstøpningen manuelt. Det oppsto flere utfordringer gjennom innstøpningene. En av utfordringene var at selv om vi hadde voksen på varmeplate, stivnet den langs kantene og på parafinens overflate. Dette gjorde det vanskelig å tømme voksen i metallformene, og etter hvert også å hente ut kassettene fra parafinimpregneringen. Vi løste dette ved å støpe inn etappevis, der vi måtte sette voksen tilbake i varmeskap, vente til voksen smeltet, for så å fortsette med innstøpningen. De forskjellige vevsbitene varierte dermed i impregneringstid. Dette skal ikke påvirke resultatet så lenge vevsbitene har stått lenge nok til at parafinen får trekke gjennom.

Vi snittet prøvene både i 5 og 3µm for å se om det var noen forskjell i morfologien. Selv om det var lettere å snitte prøvene i 5µm ser man på figur 5.3.1, 5.3.2 og 5.3.3 at fargen blir betydelig sterkere ved 5 enn ved 3µm. Dette kan gjøre det vanskeligere å se de

forskjellige nyansene i vevet. Et annet problem vi erfarte med 5µm var at det ble vanskeligere å få fokus i hele synsfeltet. Grunnen til det er muligens at 5µm er så tykt at det kan ligge mer enn et cellelag. Før snitting passet vi på å la vevsblokkene kjøle seg ned på kuldeplaten. Dette gjør voksen stivere og dermed lettere å håndtere. Vi snittet alltid 3 før 5µm siden det er mer utfordrende og blokken da er på sitt kaldeste. Dersom vi fikk problemer med å snitte en bestemt blokk, satt vi prøven tilbake på kjøling, og prøvde heller å snitte blokk nummer to av samme prøve. Vi merket under farging at noen av prøvene ikke satt godt nok fast i objektglasset. Vi fikk da et råd fra veilederen om å vaske objektglassene med 96% etanol før påføring av prøve. Dette så ut til å ha en positiv effekt.

6.5 Deparafinering og farging

I dette forsøket farget vi lakselus og gjellevev med tre forskjellige fargemetoder, HE, PAS og FISH. Sammenligning av disse fargemetodene sees ved figur 5.5.1 og 5.5.2. Som første steg i alle tre fargemetodene ble det gjort deparafinering. Vi testet også ut om 30 minutter i varmeskap før deparafineringen hadde en effekt på hvor godt snittet satt på objektglasset. Forskjellen så vi best ved PAS fargingen, og grunnen til dette kan være at snittet her blir utsatt for sterkere kjemikalier som perjodsyre, og i tillegg varmebehandling i mikrobølgeovn. Dette ser man godt på figur 5.4.

6.5.1 HE

HE fargingen gikk forholdsvis problemfritt og HE preparatene ble for det meste vellykket. De fungerte derfor utmerket til å sammenligne andre faktorer som tykkelse på snitt og fikseringsløsning. Mens hematoxylin kan kjøpes ferdigblandet som ved Harris' Hematoxylin, må erytrosin blandes ut med destillert vann til den får en konsentrasjon på 1%.

6.5.2 PAS

I motsetning til HE var PAS fargingen mer utfordrende. Den største utfordringen med PAS var at mange av snittene løsnet fra objektglasset slik at det enten ble folder i vevet eller at vi i verste fall mistet hele snittet. Selv om vasking av objektglass med etanol før påføring av prøve, og varmeskap i 30 minutter før deparafinering hjalp, var det under hele forsøket PAS fargingen som var den vanskeligste å få til. Mikrobølgeovnen vi brukte hadde ikke den wattinnstillingen vi skulle bruke ifølge prosedyren, så vi måtte bruke en lavere wattstyrke (270W istedenfor 350W). Dette gjorde at vi måtte ha prøven lengre i

mikrobølgeovnen for å få det ønskede fargeomslaget. Tidene varierte også, noe som gjorde det ekstra vanskelig å standardisere dette steget. I et tilfelle kokte Shiff's reagenset over, noe som førte til sterk overfarging.

6.5.3 FISH

FISH var den mest tidskrevende og kompliserte av de tre fargemetodene. Det er også den viktigste når det gjelder påvisning av *Neoparamoeba perurans* og *Paranucleospora theridion.* FISH fargingen tar to dager å gjennomføre, den første dagen gjøres snittene klare ved denaturering av vevsproteiner og tilsetning av probe, for så å inkuberes i fuktekammer til de skal mikroskoperes dagen etter. Fluorescensproben er lysømfintlig og snittene bør dermed holdes i mørke så lenge som mulig til mikroskoperingen skjer.

Vi fikk utslag på flere prøver for AGD proben i gjellevev, og for *P. theridion* proben i lakselus. Vi fikk derimot ingen tydelige positive utslag ved bruk av *P. theridion* proben på gjellevev. Dette kan sees ved figur 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3, og 5.5.4. Til denaturering av vevsproteinene ble det enten brukt proteinase K i 56°C eller kun varmeplate ved 80°C. Hensikten til proteinase K er å gjøre genmateriale lettere tilgjengelig for kontakt med proben. Vi synest derimot at proteinasen ødela vevet i for stor grad da bare noen få snitt behandlet med proteinase ga tilfredsstillende resultat som vist på figur 5.5.3. Mens man ved HE og PAS ser på strukturen til vevet, er det ved FISH ikke like viktig. Her ser man mer på tilstedeværelsen av nukleinsyresekvensen som tilsvarer den tilsatte proben.

6.6 Mikroskopering

Under mikroskopering brukte vi et fluorescensmikroskop. Mikroskoperingen gikk for det meste problemfritt, men under mikroskoperingen av FISH-fargede preparat hadde vi en så stor mengde at vi måtte ta det over flere ganger. Ifølge prosedyren vi brukte sto det at etter inkubasjon i fuktekammer, skulle prøven vaskes med SSC buffer og tørke på benk. Vi prøvde likevel å mikroskopere direkte etter vasking, og synes ikke det var noen betydelig forskjell. Vi synes heller at den positive kontrollen var tydeligere når vi mikroskoperte rett etter vasking.

7. Konklusjon

Etter at vi nå har prøvd å finne en korrekt patologisk metode for påvisning av *P. theridion og* AGD ved å utføre mange små variasjoner utover hele prosessen, har vi kommet frem til at noen metoder fungerer bedre enn andre. Det er derimot vanskelig å komme fram til den beste prosedyren. Det er mange forskjellige muligheter når man ser på alt fra oppbevaring, fiksering, snitting og farging. Hvilken måte man bør gjøre det på kommer helt an på ressursene man har disponibelt og hva man er ute etter.

Med tanke på oppbevaringsmetode har vi kommet fram til tre muligheter. Oppbevaring i formaldehyd, i etanol eller å fryse prøven i fersk tilstand. Den optimale metoden er å fryse prøven i fersk tilstand. Dette oppbevarer vevet best og gir også mulighet til å kjøre tester som for eksempel PCR. Oppbevaring i etanol er også en mulighet. Vi fikk selv ikke testet formaldehyd som oppbevaringsmedium, men vi tar det med siden det er formaldehyd som blir brukt som oppbevaringsmedium ved patologiavdelingen hos sykehuset i Ålesund. Når det gjelder fikseringsløsning brukte vi tre forskjellige; Etanol 96% og 4% formaldehyd enten med eller uten fosfatbuffer. Vi vil anbefale å bruke formaldehyd som fikseringsløsning, men dersom en har lite prøvemateriale kan det være tryggere å bruke etanol.

Selv om vi kom fram til en vellykket manuell framføringsmetode, anbefaler vi bruk av framføringsmaskin fordi dette vil spare både tid og bemanningsbehov. Det samme gjelder for innstøpningen, vi anbefaler bruk av en innstøpningsmaskin med varmeplate, kuldeplate, og voksdispenser. Manuell innstøpning er også mulig, men er vanskeligere og mer tidkrevende å utføre. Ved snitting anbefaler vi 3µm tykke snitt siden de gir et klarere bilde under mikroskopet. Vi anbefaler også etanolvask av objektglass selv om pakken sier de er klar til bruk.

Før deparafinering opplevde vi bedre feste til objektglass ved bruk av varmeskap. Når det gjelder farging var HE best når det gjaldt strukturen av vevet, men det kan hende PAS kan være mer nyttig ved diagnostisering som for eksempel påvisning av sopp. Når det gjelder FISH opplevde vi bedre resultat ved å bruke varme til å denaturere proteinene. Vi opplevde også bedre resultat ved FISH når vi mikroskoperte rett etter vasking av probe.

Til slutt vil vi konkludere med at vi har funnet en tilfredsstillende patologisk metode for påvisning av AGD og *P. theridion* i lakselus og gjellevev fra atlantisk laks. Videre arbeid kan være å lokalisere de patogene organismene med hensyn til hvor på lakselusen de sitter.

Referanser

1. Haraldstad T. Scale- and growth analysis of Atlantic salmon (salmo salar) caught with a bag net near the River Mandalselva, on the Skagerrak coast [masteroppgave]. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet; 2011. 59 s.
2. Havforskningsinstituttet [Internett]. 2014 [hentet 2015-03-19]. Tilgjengelig fra: http://www.imr.no/temasider/parasitter/lus/lakselus/nb-no
3. Olsen, T. Lakselusa – en spesialisert fiskeeter [Internett]. Norges forskningsråd; 2008 [hentet 2015-03-19]. Tilgjengelig fra: http://forskning.no/fisk-fiskehelse-fiskesykdommer-oppdrett/2008/07/lakselusa-en-spesialisert-fiskeeter
4. Forskning.no [internett]. Norge: Nofima; 2013 [hentet 2015 – 03 – 25]. Tilgjengelig fra: http://forskning.no/fisk-fiskehelse-oppdrett/2013/08/vil-avle-fram-laks-som-ikke-frister-lus
5. Bustos PA, Yound ND, Rozas MA, Bohle HM, Ildefonso RS, Morrison RN, Nowak BF. Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (Salmo salar) farmed in Chile. Aquaculture [elektronisk artikkel]. 2011 [hentet 2015-05-28];Vol.310(3):s. 281-288. Tilgjengelig fra: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848610007489)
6. Pennacchi Y, Leef MJ, Crosbie PBB, Nowak BF, Bridle AR. Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, Salmo salarL. Fish and Shellfish Immunology [Elektronisk artikkel]. 2014 [hentet 2015-03-19];36(2):563-570. Tilgjengelig fra: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464813008838
7. Villavedra M, To J, Lemke S, Birch D, Crosbie P, Adams M, Broady K, Nowak B, Raison RL, Wallach M. Characterisation of an immunodominant, high molecular weight glycoprotein on the surface of infectious Neoparamoeba spp.,causative agent of amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon. Fish and Shellfish Immunology [elektronisk artikkel].2010 [hentet 2015-03-18];Vol.29(6):pp.946-955. Tilgjengelig fra: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464810002536
8. Powell MD. Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: considerations of water chemistry and fish welfare [Internett]. Oslo: Norwegian Institute for water Research; 2014 [hentet 2014-03-19]. Tilgjengelig fra:

http://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/195619/6632-2014_200dpi.pdf?sequence=3

9. Crosbie PBB, Bridle AR, Cadoret K, Nowak BF. In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in atlantic salmon and fulfils Koch's postulates. International Journal for Parasitology [elektronisk artikkel]. 2012 [hentet 2015-03-18];42(5):s. 511-515. Tilgjengelig fra: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751912000823
10. Lodden A. The occurence, pathology and morphological development of Paranucleospora theridion in salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) [masteroppgave]. Bergen: Universitetet i Bergen Institutt for biologi; 2012; 94 s. ill.
11. Bancroft JD, Gamble M, red. Theory and Practice of Histological Techniques. London: Churchill Livingstone; 2008. 725 s.
12. Blekastad V, Bøgwald J, Gebhardt O, Grønneberg T, Krane J, Ledaal T, Mortensen TJ, Ottestad NT, Rogstad A, Skåre JU, Solberg Y, Syversen T. Kartotek for kjemiske stoffer utarbeidet for bruk i laboratorier: Stoff nr.1-209. Trondheim: Aktietrykkeriet i Trondhjem; 1984. 408 s.
13. Bancroft JD, Gamble M, red. Theory and Practice of Histological Techniques. London: Churchill Livingstone; 2002. 796 s.
14. Madigan MT, Martinko JM, red. Biology of Microorganisms. New Jersey: Pearson Prentice Hall; 2006. 992 s.
15. Chen AYY. Chen A. Fluorescence in situ hybridization. The Journal of investigative dermatology [elektronisk artikkel]. 2013 Mai [hentet 2015-03-27]; 133(5): pp.e8. Tilgjengelig fra: http://search.proquest.com/docview/1328373565?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo
16. Lyon H. Theory and Strategy in Histochemistry. Tyskland: Springer-Verlag; 1991. 591 s.
17. Berntsen LM, Bjørge TH. Framføringsmaskin Shandon Excelcior – bruk og vedlikehold. 2015 Mar;versjon1.9:4 s.
18. Guttormsen H. HES fargemetode med Leica ST5020 Multistainer. 2015 Jan;versjon 2.2:3 s.
19. Guttormsen H. PAS. 2013 Nov;versjon1.4:2 s.