

Studier av parasitten *Nucleospora cyclopteri* i vev hos rognkjeks ved bruk av *in situ* hybridisering

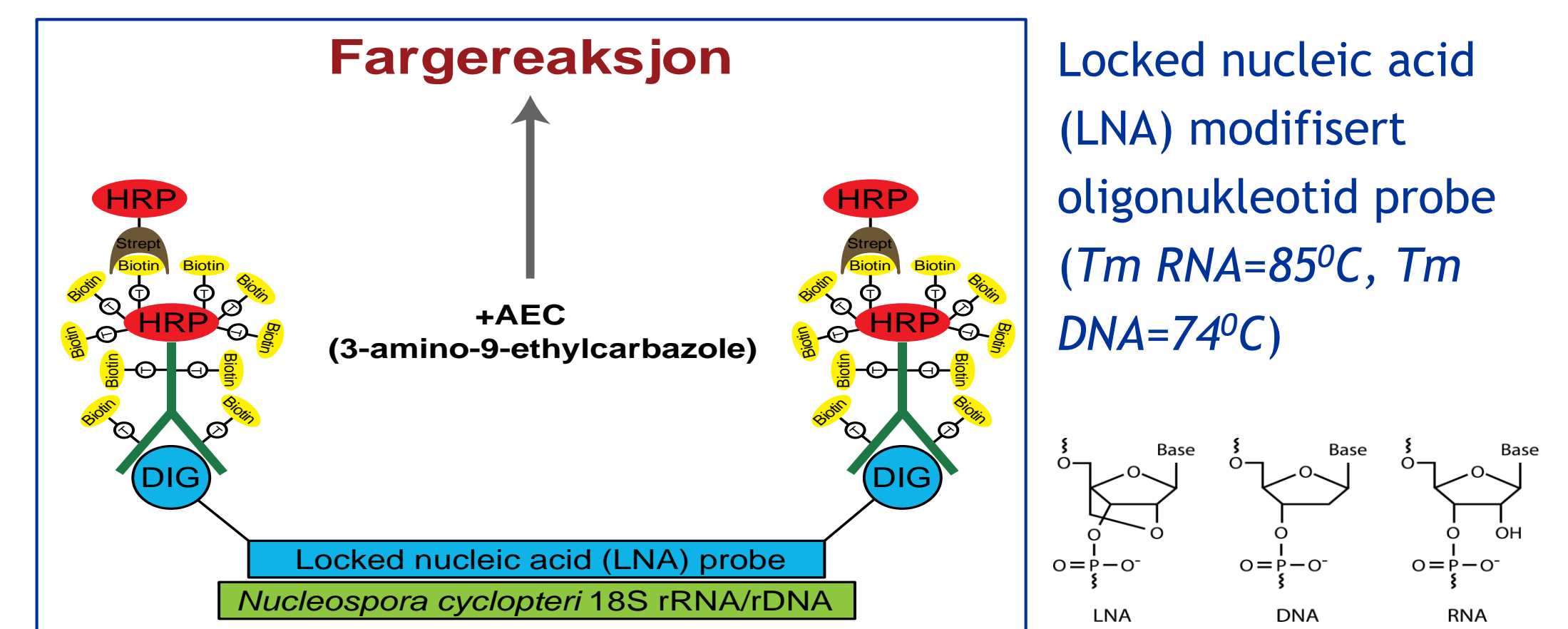
Haakon Hansen¹, Turhan Markussen², Simon Weli¹, Egil Karlsbakk^{3,4}, Randi Faller¹ og Even Thoen¹

¹Veterinærinstituttet i Oslo, ²Norges miljø- og biovitenskaplige universitet, ³Universitetet i Bergen, ⁴Havforskningsinstituttet

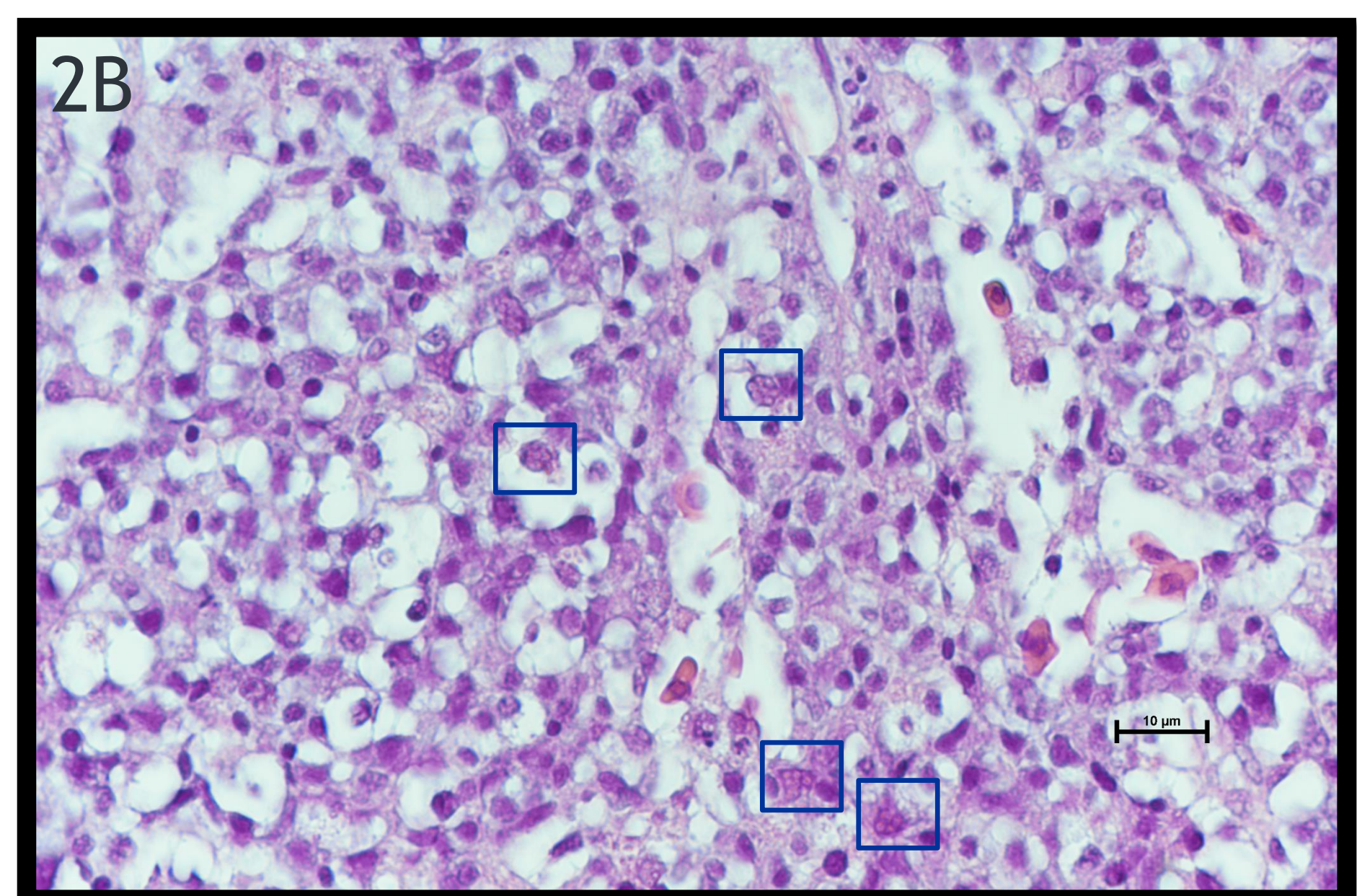
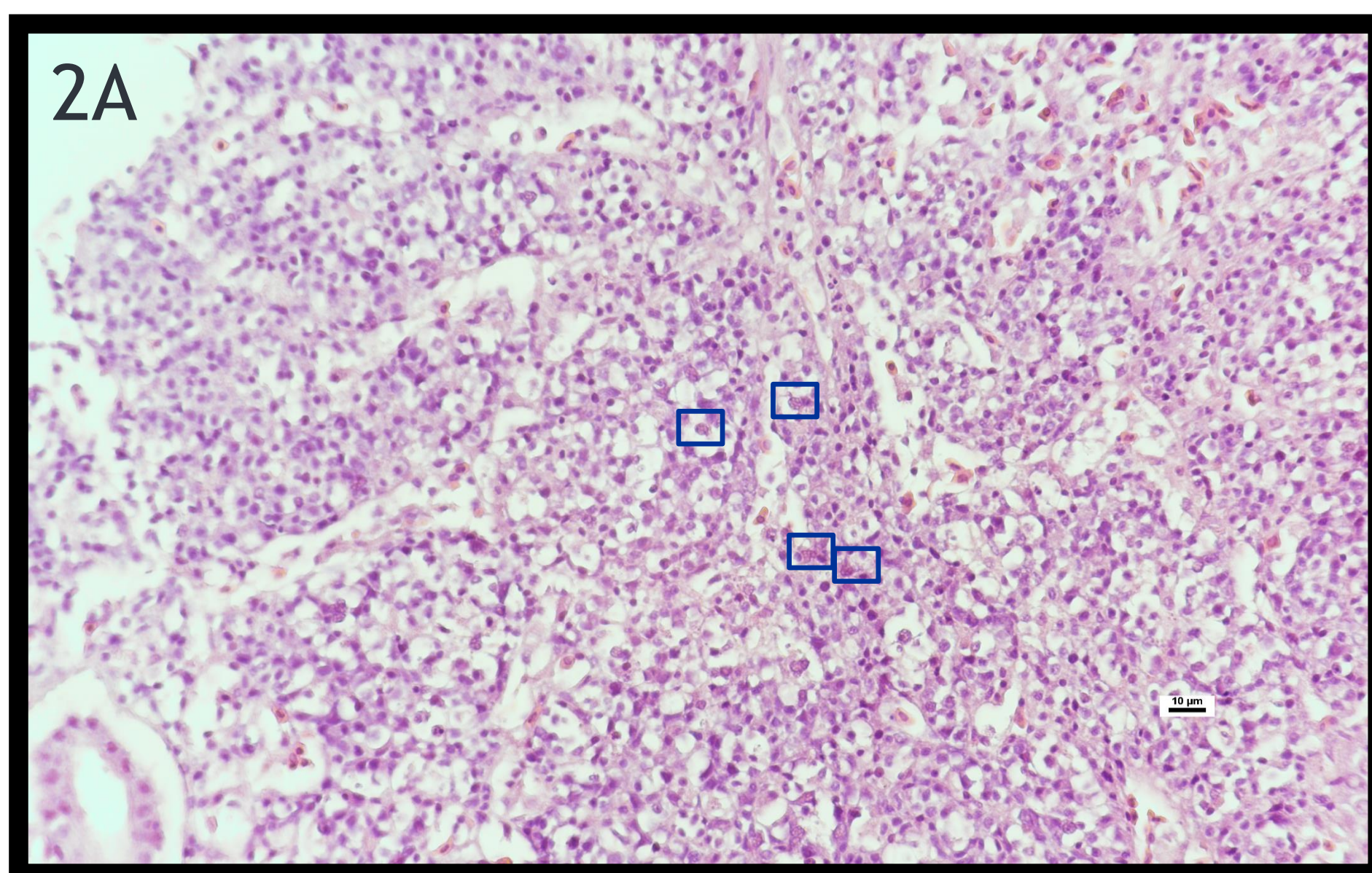
Bakgrunn. Mikrosporidien *Nucleospora cyclopteri* utvikler sporer inne i kjernene til hvite blodlegemer hos rognkjeks. Parasitten er vanlig og kan forårsake sykdom og dødelighet i oppdrett.

Parasittens utvikling i rognkjeks er dårlig kjent. For å studere påvirkning av forskjellige utviklingsstadier i ulike typer vev behøves fargemetoder med høy sensitivitet og spesifisitet, slik som *in situ* hybridisering (Fig. 1). Ikke alle utviklingsstadiene til mikrosporidier farges av tradisjonelle metoder, noen farger både bakterier og sopp i tillegg til mikrosporidier. En utfordring med farging av DNA/RNA i mikrosporidiesporer er at disse er svært robuste og blant annet har en vegg av kitin. Dette gjør at det kan være vanskelig nå inn i parasitten med DNA/RNA - proben.

1. *In situ* hybridiseringsmetodikk

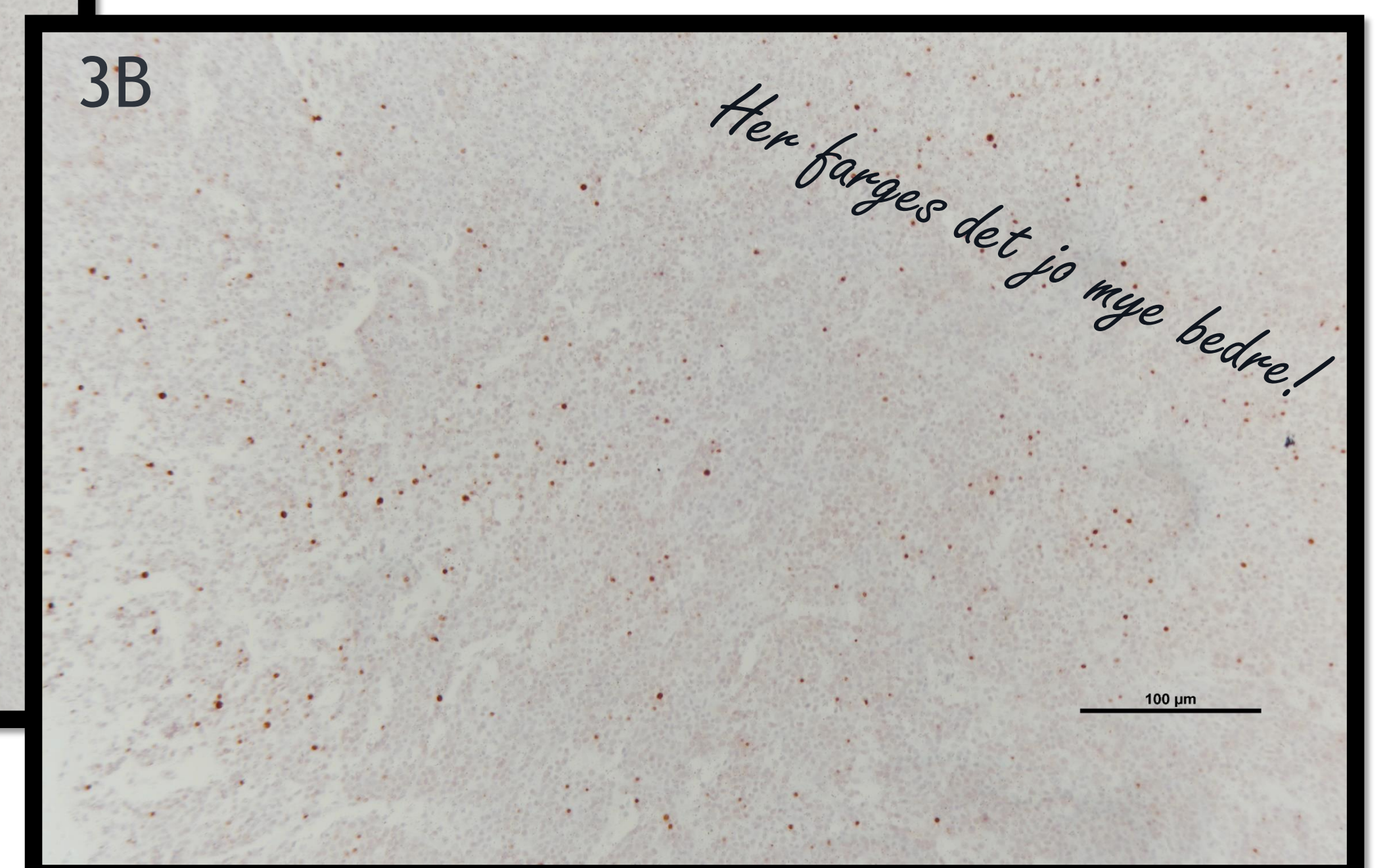


- 1) Hybridisering av digoxigenin (DIG)-merket LNA-probe til *Nucleospora cyclopteri* 18SrRNA/DNA.
 - 2) Anti-DIG horseradish peroxidase (HRP) antistoff binder DIG.
 - 3) Biotin-tyramid amplifisering (aktiveres av HRP og binder protein).
 - 4) Streptavidin-konjugert HRP binder biotin.
- HRP reagerer med substratet AEC som gir spesifikk fargereaksjon.

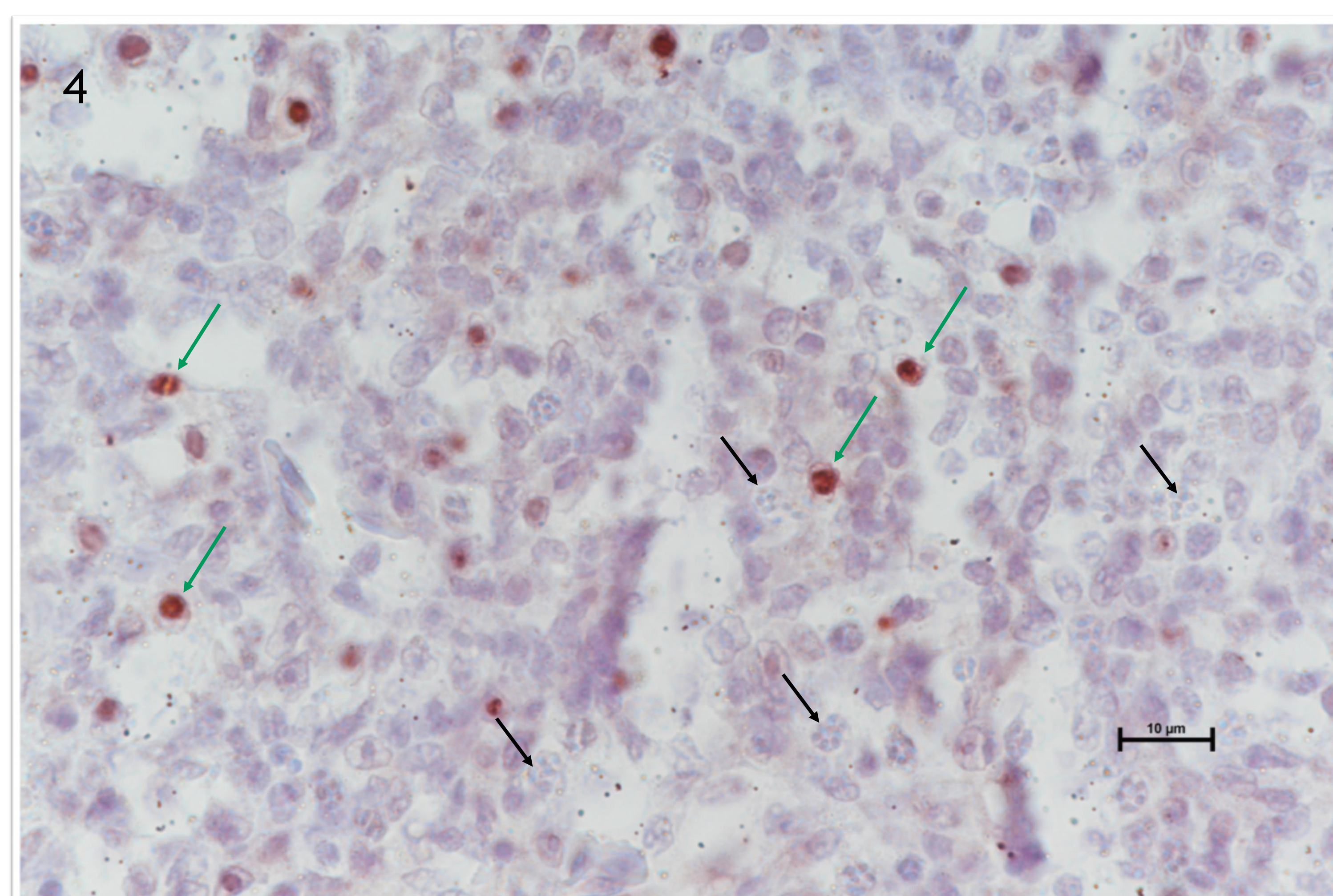


2. Standard histologisk analyse, hematoxylin og eosin (HE) - farging av nyrevev. Mikrosporidier er svært små parasitter og vanskelige å oppdage ved rutineundersøkelser av f.eks. HE-farget vev under 40X (Fig. 2A). Selv ved 100X forstørrelse (Fig. 2B) kan de være vanskelig å oppdage og slike undersøkelser er tidkrevende.

Finansiert av FHF, prosjektnummer 901320



3. *In situ* hybridisering - optimalisering og resultat. For å lette inntrenging av proben og dens kontakt med parasitt DNA/RNA ble det gjort proteinase K - behandling med forskjellig varighet. Et større antall parasitter ble farget ved lengre behandling. Figur 3 viser behandling i henholdsvis 30 minutter (3A) og 60 minutter (3B).



4. Videre arbeid. Metoden ser ut til å farge tidlige stadier av *Nucleospora cyclopteri* spesifikt (grønne piler i figur 4), men tilsynelatende er det vanskelig å få farget sporer (sorte piler i figur 4). Det gjenstår å finne ut av om dette kan forbedres med en videre optimalisering av protokollen og/eller om det er noen utviklingsstadier som farges lettere enn andre.