

Amtliche Methodensammlung

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN) wird durch das Virus der Epizootischen Hämatopoetischen Nekrose (EHNV) verursacht.

Bislang wurde dieser Erreger in Deutschland nicht nachgewiesen. Das EHNV wurde erstmals 1984 in Victoria (Australien) von juvenilen Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) nach akuten Verlusten isoliert (Langdon et al., 1986). Als weitere empfängliche Fischarten erwiesen sich in Aquakultur gehaltene Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit vergleichbaren pathologischen Symptomen, jedoch nicht vergleichbaren Mortalitätsraten. Experimentell lassen sich der Marquarie-Buntbarsch (*Macquaria australasica*), der Mosquitofisch (*Gambusia affinis*), der Silberbarsch (*Bidyanus bidyanus*), der Galaxias (*Galaxias olidus*), Murraydorsch (*Maccullochella peelii peelii*) und der Atlantische Lachs (*Salmo salar*) infizieren (Langdon 1989).

Das EHNV ist verwandt mit Krankheitserregern der Kröten und Frösche und wird dem Genus Ranavirus der Familie Iridoviridae zugeordnet. Infektionen mit dem nah verwandten European Sheatfish Virus (ESV, Wel-siridovirus) wurden beim Europäischen Wels (*Silurus glanis*) beschrieben. Das European Catfish Virus (ECV), welches nicht vom ESV unterschieden werden kann, infiziert den Amerikanischen Katzenwels (*Ictalurus melas*), den Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*), den Goldfisch (*Carassius auratus*) und den Kurzflossen-Aal (*Anguilla australis*). ESV und ECV führten in Deutschland bzw. Frankreich und Italien zu Verlusten in der Aquakultur. Systemische Infektionen mit nicht näher untersuchten Iridoviren wurden beim Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) beschrieben.

EHN wurde bislang nicht in Europa nachgewiesen. Seit 2006 ist EHNV als exotischer Tierseuchenerreger in der EU gelistet und damit anzeigepflichtig (Directive 2006/88/EC Part II Annex IV; OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015, Chapter 2.3.1. Epizootic haematopoietic necrosis; Diagnostic manual for EHN, CRL for Fish Diseases).

1.2 Klinische Symptomatik

Empfänglich sind Regenbogenforellen und Flussbarsche aller Altersklassen. Das klinische Bild der EHN ist unspezifisch und eher bei juvenilen Fischen stärker ausgeprägt. Bei Flussbarschen (*Perca fluviatilis*), offenbar dem Hauptwirt in Australien, äußert sich die Infektion durch plötzliche Todesfälle ohne jegliche äußere und innere Anzeichen. Symptome können Dunkelfärbung der Haut, Inappetenz, Ataxie, Lethargie, Blutungen an den Flossenrändern, Geschwürbildung, Rötung und/oder Ablösung der Haut sein. Betroffene Organe und Gewebe sind Leber, Kopfnieren, Milz und andere parenchymale Gewebe. Der Erreger wurde bislang nicht aus Ovarialgewebe oder Brut isoliert. Die Inkubationszeit ist abhängig vom Alter der Fische, von

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

der Wassertemperatur, von der Infektionsdosis und von der Virulenz des Erregers und beträgt in der Regel 3 bis 32 Tage. Bei experimentell infizierten Regenbogenforellen betrug die Inkubationszeit 3 bis 10 Tage bei 19 bis 21 °C bzw. 14 bis 32 Tage bei 8-10 °C Wassertemperatur. In Flussbarschen wurden Todesfälle nach 10 bis 11 Tagen bei 19 bis 21 °C und nach 10 bis 28 Tagen bei 12 bis 18 °C beobachtet.

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch sind alle mit erhöhter Sterblichkeit einhergehenden Erkrankungen empfänglicher Arten in Betracht zu ziehen, die eine klinische Erkrankung ausprägen können. Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind im "Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015" des OIE zu finden.

1.4 Diagnostische Indikation

In Abhängigkeit von der Art der Überwachung oder, wenn als Ergebnis der klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchung oder auf Grund epidemiologischer Erhebungen der Verdacht des Ausbruchs der EHN geäußert wird, sind Fische an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann Tierverkehr sein.

Ein Verdacht auf EHN besteht, wenn in scheinbar gesunden, moribunden oder toten **Fischen** im parenchymalen Gewebe histologisch der Nachweis von fokalen, multifokalen oder lokal extensiv verflüssigter oder koagulierender Nekrose mit oder ohne intrazytoplasmatischen basophilen Einschlusskörpern erfolgte. Als diagnostische Verfahren werden derzeit die Virusisolierung in Zellkultur, immunologische Verfahren zum Antigen-Nachweis (Immunhistochemie, Immunofluoreszenz), serologische Methoden (ELISA) oder der Genomnachweis (PCR) empfohlen. Vorgaben zur Diagnose von EHNV und Ranaviren der Amphibien sind im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals des OIE sowie im Diagnostic Manual for EHN des CRL for Fish Diseases aufgelistet.

Mit Ausnahme der Grouper Iridoviren besitzen Ranaviren gruppenspezifische Antigene. Somit ist eine eindeutige Differenzierung der Ranaviren, d.h., eine Identifizierung des EHNV, ausschließlich basierend auf ihrem Antigenprofil, nicht möglich.

Verschiedene diagnostische PCR wurden zur Identifizierung von EHNV entwickelt. Diese basieren auf der Analyse von Genabschnitten, kodierend für das MCP (**major capsid protein**), die Thymidinkinase, die virale DNA-Polymerase oder das Neurofilament triplet H1-like Protein (NF-H1). Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den spezifischen genomischen Regionen der Ranaviren gering.

Das MCP Gen ist hoch konserviert und durch seine Stabilität besonders zur genetischen Differenzierung der Ranaviren geeignet (Hyatt et al., 2000). Es weist eine Länge von 1392 bp auf und kodiert für ein ca. 49 kDa Protein. Partielle und vollständige MCP Gensequenzen von Ranaviren sind bereits in der Genbank verfügbar.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Die Untersuchungen zum Nachweis des EHNV werden im Nationalen Referenzlaboratorium für EHN am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems (Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 038351 7-1175) durchgeführt. Bei Verdacht auf Vorliegen der EHN ist das NRL zu verständigen und es sind Proben, wie im Teil „Untersuchungsmaterial“ aufgeführt, zu entnehmen und einzusenden.

1.6 Rechtsgrundlagen

EHN ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung der EHN ist in Deutschland durch die "Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (Fischseuchenverordnung)" geregelt. Diese Verordnungen dienen zur Umsetzung der Aquakultur-Richtlinie 2006/88/EG, die zur Harmonisierung der Diagnose und Bekämpfung von Fischseuchen innerhalb der Europäischen Union erlassen wurde. In Entscheidung 2001/183/EWG der Kommission werden die Probennahmepläne und Diagnoseverfahren zum Nachweis der EHN festgelegt. Diese Entscheidung ist für die Diagnose der EHN in Deutschland verbindlich und dient daher der Erstellung der im TSBH gegebenen methodischen Hinweise. Eine Anleitung zur Diagnose der EHN findet man auch im **"Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals"** des OIE in der jeweils neuesten Fassung.

2. Untersuchungsmaterial

Wahl und Entnahme der Proben

Für die Untersuchung gemäß Entscheidung 2001/183/EG werden die Organe: Leber, Kopfniere, Milz, Herz und Kiemen entnommen.

Der Transport des Materials erfolgt in Biosicherheitscontainern der Klasse II.

Die Probennahme erfolgt entsprechend der Größe der Fische:

Fische >60 mm: 0.1 g Leber, Kopfniere, Milz und andere betroffene Organe

Fische 30-60 mm: alle inneren Organe

Fische <30 mm: ganze Fische ohne Kopf und Schwanz

Der Effekt von Poolproben verschiedener Fische auf die Sensitivität der diagnostischen Tests ist noch nicht evaluiert. Es wird eine Poolgröße von max. 5 bis 10 Fischen je Test empfohlen.

Aufbereitung und Einsendung der Proben

Unter sterilen Kautelen entnommene Organe (Milz, Kopf- bzw. Vorderniere, Herz oder Gehirn) sind in ein steriles Kunststoffröhrchen zu füllen, das steriles Transportmedium (Zellzuchtmedium für Fischzelllinien mit 10 % Kälberserum und Antibiotika, z. B. 200 I. E. Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Kanamycin oder 50 µg Enrofloxacin pro ml) enthält.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Die Röhrchen sind in Isolationsbehälter (z. B. dickwandige Styroporkästen mit Eis oder Kühlelementen) zu packen. Es ist zu gewährleisten, dass die Proben beim Transport zum Labor bei einer Temperatur von 0 bis 5 °C gehalten werden. Ein Anfrieren ist zu vermeiden. Während des Transportes darf die Temperatur zu keiner Zeit mehr als 10 °C betragen. Bei der Ankunft sollten im Transportbehälter noch Eis oder gefrorene Kühlelemente vorhanden sein.

Fische können unzerteilt (ganz) zum Labor gesandt werden, sofern die Temperaturanforderungen während der Beförderung erfüllt sind. Ganze Fische müssen unter Umständen mit saugfähigem Papier umhüllt und auslaufsicher verpackt werden.

Verpackung und Beschriftung müssen den nationalen und internationalen Transportregeln entsprechen.

Entnahme von zusätzlichem Probenmaterial

Im Einvernehmen mit dem Diagnoselaboratorium kann weiteres Probenmaterial entnommen und für weitere Untersuchungen aufbereitet werden.

3. Untersuchungsgang

3.1 Labordiagnostischer Nachweis

Der eindeutige Nachweis von EHNV mit serologischen Methoden (Immunoperoxidase-Test, ELISA, Immunofluoreszenz-Test) ist nicht möglich, da Ranaviren gruppenspezifische Antigene besitzen.

Deshalb erfolgen der eindeutige Nachweis und die Bestätigung des Verdachtes durch:

Anzucht des Erregers in der Zellkultur nach Ausprägung eines zytopathogenen Effektes mit anschließendem Nachweis des Erregergenoms in der PCR,

Nachweis des Genoms in der PCR mit anschließendem Restriktion-Endonuklease-Verdau oder Sequenzierung und Identifizierung des PCR Produktes.

Mit der diagnostischen Untersuchung ist so schnell wie möglich zu beginnen, spätestens jedoch 48 Stunden, in Ausnahmefällen 72 Stunden nach der Entnahme, sofern das Untersuchungsmaterial durch das Transportmedium geschützt war und die Temperaturanforderungen während der Beförderung erfüllt wurden.

Dauert der Transport länger als 48 Stunden, müssen die Proben gefroren (weniger als -10 °C) transportiert werden. Dabei darf die Kühlkette bis zum Eintreffen im Labor nicht unterbrochen werden. Ist in Ausnahmefällen eine virologische Untersuchung des Probenmaterials innerhalb von 48 Stunden nach Probennahme nicht möglich (z. B.: ungünstige Witterungsverhältnisse, Feiertage etc.) so kann das Material im Transportmedium (Zellkulturmedium mit 10 % Kälberserum und Antibiotika) bei -20 °C und kälter eingefroren werden. Die virologische Untersuchung sollte dann innerhalb von 14 Tagen erfolgen.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Aufarbeitung der Organproben

Das Probenmaterial wird unabhängig voneinander aufgearbeitet. Nach jeder Probe werden Arbeitsplatz und Zubehör desinfiziert. Die Untersuchungen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das Gewebematerial wird unter Verwendung von Stomacher, Mixer, Mörser, Mikrohomogenisator o. ä. homogenisiert und in Medium suspendiert. 300 mg des homogenisierten Organmaterials werden mit 1 ml Enrofloxacin haltigem Zellkulturmedium (0.01 % Endkonzentration) gründlich mit dem Vortexer vermischt und über Nacht bei 10 °C im Intervallschüttler (Intervall von 5 min 30 sec schütteln) inkubiert. Nach Zentrifugation des Materials für 5 min bei 3.500 rpm werden Fischzellen mit dem geklärten Überstand inokuliert.

3.2 Virusanzucht in der Zellkultur

Die Virusvermehrung erfolgt auf der Zelllinie EPC CCLV Rie 173 bei 20 °C. Eine Anzucht auf BF-2 (ATCC CCL 91), FHM (ATCC CCL 42) oder CHSE-214 (ATCC CRL 1681) ist ebenfalls möglich.

Vom Organmaterial wird je Probe oder Pool eine 1:10 und 1:100 Verdünnung unter Verwendung von Zellkulturmedium angelegt. Jede Zellkultur wird mit 100 µl der entsprechend verdünnten Probe pro ml Kulturmedium inokuliert. Dies entspricht einer Endverdünnung von 1:100 bzw. 1:1000. Ein separater Adsorptionsschritt ist nicht erforderlich.

Jede Verdünnung wird auf mindestens zwei Zelllinien in einem 24-well Kulturgefäß oder größer inokuliert. Alternativ können zwei bis drei Zellkulturen direkt mit 10 µl des homogenisierten Probenmaterials je ml Zellkulturmedium inokuliert werden.

Die Virusvermehrung erfolgt bei 20 °C für 7 bis 10 Tage.

Die inokulierte Zellkultur wird regelmäßig (mind. 3x wöchentlich) auf die Ausbildung eines CPE kontrolliert.

Nach Ausbildung eines CPE erfolgt der Nachweis des Erregergenoms in der PCR.

Bei Ausbleiben eines CPE nach Primärinkubation von 7 bis 10 Tagen, erfolgt die Subkultivierung auf frischen Zellkulturen. Homologe Zellkulturen werden mit unverdünntem bzw. 1:10 verdünntem Material der ersten Passage inokuliert. Empfohlen werden Zellkulturgefäße von mind. 24-Well-Format.

Wird nach mindestens zwei Zellkulturpassagen mit jeweils 7 bis 10 Tagen Inkubation bei 20 °C kein CPE beobachtet, ist die Probe als negativ zu deklarieren.

3.3 Virus-Genomnachweis

Aus der virushaltigen Suspension (Zellkulturüberstand bzw. geklärter Organüberstand) wird die DNA bevorzugt unter Verwendung des QIAamp DNA Kit (Qiagen) bzw. einer vergleichbaren standardisierten Methode nach Vorschrift des Herstellers isoliert (Protokoll: siehe Isolierung viraler DNA).

Virales Genom wird in der PCR nach Amplifizierung von MCP-Genabschnitten (hochkonservierter Bereich der Iridoviren) nachgewiesen. Dazu wird die DNA mit EHNV MCP-Gen spezifischen Primern, dem PCR Reaktionspuffer einschließlich dNTP's und Magnesiumchlorid sowie der thermostabilen DNA Polymerase versetzt. Bevorzugt werden folgende kommerziell erhältlichen Kits: HotStar Taq Master Mix Kit, HotStar HiFidelity PCR Kit, Taq PCR Kit von Qiagen. Die Amplifizierung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Zur Amplifizierung werden die spezifischen Primer ~~Rana MCP for und Rana MCP rev~~MCP-2 (M153/M154) empfohlen. Das resultierende Produkt weist eine Länge von 516/25 bp auf.

Das reguläre PCR Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt und 4035 Zyklen. Je nach Hersteller ist u.U. ein initialer Inkubationsschritt für 15 min bei 95 °C erforderlich. Die Annealingtemperatur ist von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer abhängig ($T_m = 4 (G \text{ bzw. } C + 2 (A \text{ bzw. } T))$). Die Elongationszeit ist an die Länge des zu erwartenden Produktes angepasst (~~30 sec < 1 kb bzw. 3 min > 1 kb~~1 kb/min) (Protokoll: siehe Polymerase-Ketten-Reaktion).

Zur Identifizierung von EHNV und Differenzierung dieses Erregers von anderen Ranaviren z. B. FV3, ESV, ECV wird das Amplifikat der ~~Rana MCP PCR (= 516 bp)~~ MCP-2-PCR mit der Restriktionsendonuklease ~~SalI~~Acc I verdaut. Ein EHNV spezifisches ~~Rana MCP~~MCP-2-PCR Produkt wird nach ~~SalI~~Acc I-Verdau in Fragmente von 365/238 bp und 151/387 bp Größe gespalten. Das Ergebnis unterscheidet sich eindeutig vom entsprechenden Restriktionsmuster für ECV, ESV und FV3.

Virus	SalI
EHNV	365/ 151
ESV	516
ECV	516
FV 3	516
SERV	332/ 184

(Protokoll: siehe Restriktionsendonuklease Test)

Wird kein Restriktionsendonuklease Verdau durchgeführt, sollte das PCR Produkt direkt sequenziert und mit publizierten Daten verglichen werden.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Protokoll: Isolierung viraler DNA

Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberstand mit QIAamp DNA Kit (Qiagen)

Je nach Ausprägung des CPE werden 30 µl bis 300 µl Zellkulturüberstand unter sterilen Bedingungen in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 2.500 U/min zentrifugiert.

20 µl bis max. 200 µl des geklärten Überstandes werden für die DNA Isolierung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit PBS auf insgesamt 200 µl aufgefüllt.

Es erfolgt die Zugabe von 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU/ml, Qiagen) und von 4 µl RNase A (100 mg/ml, Qiagen). Nach gründlicher Durchmischung mit anschließender Inkubation von 1 Minute folgt die Zugabe von 200 µl Puffer AL.

Zur Homogenisierung und vollständigen Lyse wird die Suspension 15 sec im Intervall mit dem Vortexer gemischt und anschließend für 10 min bei 56 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 230-200 µl 96-98 % Ethanol wird der Reaktionsansatz mit dem Vortexer gemischt, auf die Säule (QIAamp Spin Column) verbracht und für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert.

Wichtig ist, dass nach jedem folgendem Zentrifugationsschritt der Säulendurchfluss verworfen und die Säule in ein sauberes DNase freies Reaktionsgefäß verbracht wird.

Die auf der Säule gebundene DNA wird mit 500 µl Puffer AW1 versetzt und 1 min bei 8.000 rpm und mit 500 µl Puffer AW2 für 3 min bei 14.000 rpm gewaschen.

Auf der Säule verbliebene Flüssigkeitsreste werden durch einen Zentrifugationsschritt von 1 min bei 14.000 rpm entfernt.

Die Elution der DNA erfolgt mit 60 µl Puffer AE nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm.

Die Lagerung der DNA ist bei -20 °C möglich.

Isolierung viraler DNA aus Organmaterial (Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit, Tissue Protokoll)

Zur Gewinnung viraler DNA aus Organen (Herz, Kopfnieren, Leber, Milz, Kiemen) werden diese mittels steriler chirurgischer Instrumente entnommen und mit Hilfe steriler Scheren fein zerkleinert. Entsprechend den Herstellerangaben werden 25 mg des homogenisierten Materials unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) weiterverarbeitet. Zur Vermeidung im Gefäßdeckel verbliebener Tropfen ist vor jedem erneuten Öffnen des Gefäßes ein kurzer Zentrifugationsschritt einzuhalten, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren. Die Extraktion der viralen DNA erfolgt nach dem DNA Mini Kit Tissue Protokoll (Qiagen).

Zunächst erfolgt die Zugabe von 180 µl Puffer ATL sowie 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU/ml, Qiagen). Zur gründlichen Durchmischung wird die Suspension mit Hilfe des Vortexers 15 s gemischt. Es folgt eine Inkubationsphase bei 56 °C bis zur vollständigen Lyse des Organmaterials. Die Lyse wird durch regelmäßiges Vortexen der Suspension unterstützt. Enthaltene RNA wird durch Zugabe von 4 µl RNase A (100 mg/ml, Qiagen) mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min minimiert.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL wird die Suspension erneut mit Hilfe des Vortexers gründlich durchmischt und anschließend bei 70 °C für 10 min inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 99,8 % Ethanol wird die DNA präzipitiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wird der Reaktionsansatz auf die Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Durch Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min wird die präzipitierte DNA auf der Säule adsorbiert. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 wird die DNA durch Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min gewaschen. Es folgt ein zweiter Waschschrift durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 und anschließender Zentrifugation bei 14.000 UpM für 3 min. Zur Entfernung enthaltener Alkoholreste wird ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM für 1 min durchgeführt. Durch Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE, Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min und Zentrifugation der Probe bei 8000 UpM für 1 min wird die DNA von der Säule eluiert. Die DNA wird bei -20 °C gelagert.

Isolierung viraler DNA aus Organüberstand (Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit)

Zur Extraktion viraler DNA aus Organüberstand werden zunächst die entsprechenden Organe (Herz, Kopfnieren, Leber, Milz, Kiemen) steril entnommen und mittels steriler Scheren fein zerkleinert. 300 mg des homogenisierten Organmaterials werden in 1 ml Zellkulturmedium (ZB23ZB5) mit einem effektiven Enrofloxacingehalt von 0.01 % aufgenommen und mittels Vortexer gründlich durchmischt und anschließend über Nacht bei 10 °C im Intervallschüttler mit 30-sekündigem Schütteln im Intervall von fünf Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe bei 3500 UpM für 5 min werden 200 µl des Überstandes für die DNA Extraktion entnommen.

Es wird empfohlen, die Extraktion mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchzuführen.

Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU/ml, Qiagen) und 4 µl RNase A (100 mg/ml, Qiagen) erfolgt eine gründliche Durchmischung mittels Vortexer und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min. Zur Homogenisierung und vollständigen Lyse wird die Suspension nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL für 15 s mit Hilfe des Vortexers gemischt und anschließend für 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 230 µl 99,896-98 % Ethanol wird die DNA präzipitiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wird die gesamte Probe auf die Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Nach Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min wird der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Tube überführt. Die auf der Säule adsorbierte DNA wird mit 500 µl Puffer AW1 bei 8000 UpM für 1 min und mit 500 µl Puffer AW2 bei 14.000 UpM für 3 min gewaschen. Zur Entfernung von Alkoholrückständen der Waschpuffer wird ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM für 1 min durchgeführt. Durch die Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE und einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur und einen letzten Zentrifugationsschritt bei 8000 UpM für 1 min wird die DNA von der Säule eluiert. Die DNA wird bei -20 °C gelagert.

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Protokoll: Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgt unter Verwendung des HotStarTaq Master Mix Kits (Qiagen) oder eine vergleichbaren standardisierten Methode nach Vorschrift des Herstellers. Folgende kommerziell erhältlichen Kits sind ebenfalls geeignet: HotStar HiFidelity PCR Kit, Taq PCR Kit von Qiagen. Das verwendete Protokoll wurde gemäß den Angaben des HotStarTaq PCR Handbuchs etabliert.

In einem 25 µl Ansatz werden 12,5 µl HotStarTaq Master Mix, 9,5-10,5 µl steriles Wasser und jeweils 0,5 µl der spezifischen Primer (10 pmol/µl), sowie 21 µl der entsprechenden DNA gemischt.

Genfragmente mit einer Größe von weniger als 1000 bp (625 bp) werden nach einem initiativen Aktivierungsschritt bei 95 °C für 15 min in 40-35 Zyklen (Denaturierung bei 93-94 °C für 1 min 30 sec, Annealing bei 55-60 °C für 2 min 30 sec und Extension bei 72 °C für 0,5-1 min) amplifiziert.

Für Genfragmente mit einer Größe von mehr als 1000 bp wird die Extension bei 72 °C auf 3 minentsprechend verlängert.

Empfohlen werden die Primer ~~Rana MCP for und Rana MCP rev~~ EHN MCP-2 M153/M154. Das amplifizierte Produkt hat eine Größe von 516-625 bp.

Positiv- und Negativkontrollen sind in allen Schritten mitzuführen.

Empfohlen werden als Positivkontrolle EHNV und als Negativkontrolle ESV bzw. ECV und eine DNA-negative Probe.

PCR: HotStar Taq Master Mix Kit (Qiagen)

25 µl Ansatz:

- X µl Wasser
- 12.5 µl HotStar Taq Master Mix
- 0.5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 0.5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- Y µl DNA (i.d.R. 21 µl; <1 µg Gesamt-DNA)

PCR: HotStar HiFidelity PCR Kit (Qiagen)

25 µl Ansatz:

- X µl Wasser
- 5.0 µl 5 x HotStar HiFidelity PCR Puffer
- 0.5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 0.5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 1.0 µl HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2.5 units/µl)
- Y µl DNA (i.d.R. 2 µl; <1 µg Gesamt-DNA)

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

PCR: Taq PCR Kit (Qiagen)

50 µl Ansatz:

- X µl Wasser
- 5.0 µl 10 x PCR Puffer
- 2.0 µl dNTP mix (each 10mM)
- 1.0 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 1.0 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
- 0.5 µl Taq DNA Polymerase (5 units/µl)
- Y µl DNA (i.d.R. 2 µl; <1 µg Gesamt-DNA)

Amplifizierung:		95 °C	15 min
1. Initiation			
2. Denaturierung		93 °C	1 min
3. Annealing		55 °C	2 min
4. Extension		72 °C	30 sec (< 1 kb)/ 3 min (> 1 kb)
5. Wiederholung	2. 4.		40x
6. Ende	Hold		20 °C

PCR	PCR Primer	PCR Produkt (bp)
RANA MCP	Rana MCP for + rev	516
MCP	MCP 1 + MCP 6R	1.392
MCP 1	MCP 1 + MCP 2R	543
MCP 2	MCP 3 + MCP 4R	530
MCP 3	MCP 5 + MCP 6R	585

Rana MCP for	5' CCA GTC CAC ATG GTC AAC CC 3'
Rana MCP rev	5' GAT AAT GTT GTG GTT GAT GGC C 3'
MCP 1	5' CAG CGT GTA TCT TAT AAT AAA AAG AAA TG 3'
MCP 2R	5' GGC TCC GTC CTG GCC TGT G 3'
MCP 3	5' GAG GCC AAG CGC ACA GGC TAC 3'
MCP 4R	5' TTG GAG CCG ACG GAA GGG TG 3'
MCP 5	5' CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT 3'
MCP 6R	5' AAA GAC CCG TTT TGC AGC AAA C 3'

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Primer	Sequenz	Referenz
EHN MCP-2 M153	5'-ATGACCGTCGCCCTCATCAC-3'	MCP-2-PCR von OIE empfohlen
EHN MCP-2 M154	5'-CCATCGAGCCGTTTCATGATG-3'	
EURL EHN f	5'-CGCAGTCAAGGCCTTGATGT-3'	EUR und OIE empfohlen
EURL EHN r	5'-AAAGACCCGTTTTGCAGCAAA-3'	
EHN MCP-1 M151	5'-AACCCGGCTTTCGGGCAGCA-3'	MCP-1-PCR OIE empfohlen
EHN MCP-1 M152	5'-CGGGGCGGGGTTGATGAGAT-3'	
EHNV fwd	5'-CCAGTCCACATGGTCAACCC-3'	RANA-MCP-PCR (H. Schütze)
EHNV rev	5'-GATAATGTTGTGGTTGATGGCC-3'	
Interne Kontrolle		
Ald ML 122 f	5'-TGTGCCAGTATAAGAAGGATGG-3'	Lessa et al. 1993 Stacey et al. 1997

Primer	Reaktionsbedingungen	PCR Produkt
EHN MCP-2 M153 EHN MCP-2 M154	1. 95 °C 15 min 2. 94 °C 30 sec 3. 60 °C 30 sec 4. 72 °C 1 min zu Schritt 2 35 Zyklen 5. 72 °C 10 min 6. 8 °C HOLD	525 bp
EURL EHN f EURL EHN r	1. 95 °C 15 min 2. 95 °C 1 min 3. 55 °C 1 min 4. 72 °C 1 min zu Schritt 2 35 Zyklen 5. 72 °C 15 min 8 °C HOLD	580 bp
EHN MCP-1 M151 EHN MCP-1 M152	1. 95 °C 15 min 2. 94 °C 30 sec 3. 60 °C 30 sec 4. 72 °C 1 min zu Schritt 2 35 Zyklen 5. 72 °C 5 min 8 °C HOLD	321 bp
EHNV fwd EHNV rev	1. 95 °C 15 min 2. 94 °C 1 min 3. 58 °C 1 min 4. 72 °C 45 sec zu Schritt 2 40 Zyklen 5. 72 °C 10 min 8 °C HOLD	516 bp
Ald ML 122 f Ald ML 123 r	1. 95 °C 15 min 2. 94 °C 1 min 3. 57 °C 1 min 4. 72 °C 1 min 30 sec zu Schritt 2 40 Zyklen 5. 72 °C 10 min 6. 8 °C HOLD	ca. 740 bp für Elritze

Epizootische Hämato-poetische Nekrose (EHN)

Präferenziell wird die MCP-2-PCR verwendet, wonach das Produkt restriktions-enzymatisch gespalten werden muss, um zwischen EHNV und anderen Iridoviren zu unterscheiden (siehe Anlage DNA Spaltung)

Alternativ können folgende Primer verwendet werden:

PCR (Dr. Schütze)	PCR-Primer	PCR-Produkt (bp)
MCP-S	MCP 1 + MCP 6R	1.392
MCP 1	MCP 1 + MCP 2R	543
MCP 2	MCP 3 + MCP 4R	530
MCP 3	MCP 5 + MCP 6R	585

Primer	Sequenz
MCP 1	5' CAG CGT GTA TCT TAT AAT AAA AAG AAA TG 3'
MCP 2R	5' GGC TCC GTC CTG GCC TGT G 3'
MCP 3	5' GAG GCC AAG CGC ACA GGC TAC 3'
MCP 4R	5' TTG GAG CCG ACG GAA GGG TG 3'
MCP 5	5' CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT 3'
MCP 6R	5' AAA GAC CCG TTT TGC AGC AAA C 3'

Protokoll: Restriktionsendonuklease Test

In einem Gesamtansatz von 10 µl werden 2 µl der isolierten Gesamt-DNA unter Verwendung eines geeigneten Spaltpuffers mit 1 bis 2 Einheiten der Restriktionsendonuklease **Sal-I-Acc I (New England Biolabs)** bei 37 °C für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl DNA Gel Ladepuffer (50 % Glycerin, 1mM EDTA pH 8.0 bzw. **Blue/Orange Loading dye Promega**) werden die Spaltprodukte elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

10 µl-Ansatz:	6,8	µl	H ₂ O (variabel)
	2	µl	DNA (hier Rana MCP-2-PCR Produkt)
	1	µl	10x Spaltpuffer (Cut Smart buffer, New England Biolabs)
	0,2	µl	Enzym Acc I (New England Biolabs, 2 Units)

- vorsichtig mischen, kurz anzentrifugieren
- Inkubation 1-2 h entsprechend des Reaktionsoptimums des Enzyms
 - siehe Herstellerangaben
 - i.d.R. bei 37 °C
- abzentrifugieren
- Zugabe von 2 µl DNA Gel Ladepuffer (50 % Glycerin, 1mM EDTA pH 8.0 bzw. **Blue/Orange Loading dye Promega**)
- elektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte im 2,5 % Agarose Gel
- Mitführen eines 100 bp Markers (Promega)

Epizootische Hämatopoetische Nekrose (EHN)

Protokoll: Agarosegel Elektrophorese

In Abhängigkeit der Größe der DNA Fragmente erfolgt die Auftrennung in 1-1.5-2,5 % Agarosegelen in Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer bzw. TBE-Puffer.

Tabelle: Spaltanalyse der MCP-2-PCR (laut OIE-Vorgaben)

Virus	Acc I
EHNV	238 / 387
BIV, ESV, ECV, WV	625
FV3, GV	164 / 461

Alternativ

Tabelle: Spaltanalyse der RANA MCP-PCR

Virus	BamHI	PstI	AfIII	Sall
EHNV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	365/ 151
BIV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
ESV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
ECV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
PPIV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
FV3	358/ 158	341/ 175	516	516
REV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
RTRV	330/ 186	516	516	516
SERV	358/ 158	341/ 175	516	332/ 184
DFV	516	516	398/ 118	516
GV6	516	516	398/ 118	516
LMBV	516	516	398/ 118	516

Fragmentlänge	Agarosekonzentration	Bromphenolblau	Xylencyanol
1-30 kb	0.5 %	1000 bp	10 kb
0.8-12 kb	0.7 %	700 bp	6 kb
0.5-7 kb	1.0 %	300 bp	3 kb
0.4-6 kb	1.2 %	200 bp	1.5 kb
0.2-3 kb	1.5 %	120 bp	1 kb
0.1-2 kb	2.0 %	< 100 bp	0.8 kb

Literatur

Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probennahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG. (ABl. EU Nr. L 56 S. 65)

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2013

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015 (insbesondere Empfehlung der MCP-2-PCR)

Ohlemeyer et al.: Dis Aquat Org 2011, 96, 195-207

Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten (ABl. EU Nr. L328 S. 14)

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der jeweils gültigen Fassung

Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (FischSeuchV) in der jeweils gültigen Fassung

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.bund.de