

Amtliche Methodensammlung

Infektion mit *Microcytos mackini*

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Infektion mit *Microcytos mackini*

1. Charakterisierung der Infestation

1.1 Erreger

Microcytos mackini ist ein einzelliger Parasit (1-2 µm) von unklarer taxonomischer Zuordnung. Neue phylogenetische Untersuchungen zeigen jedoch, dass der Parasit nicht, wie vorher angenommen, in die *Haplosporidien* einzuordnen ist. Die durch die Infektion mit dem Parasiten ausgelöste Erkrankung wird als "Denman Island Disease" bezeichnet. *M. mackini* kann in vielen Geweben der Austern der Familie *Ostrea* nachgewiesen werden (Abbildung 1).

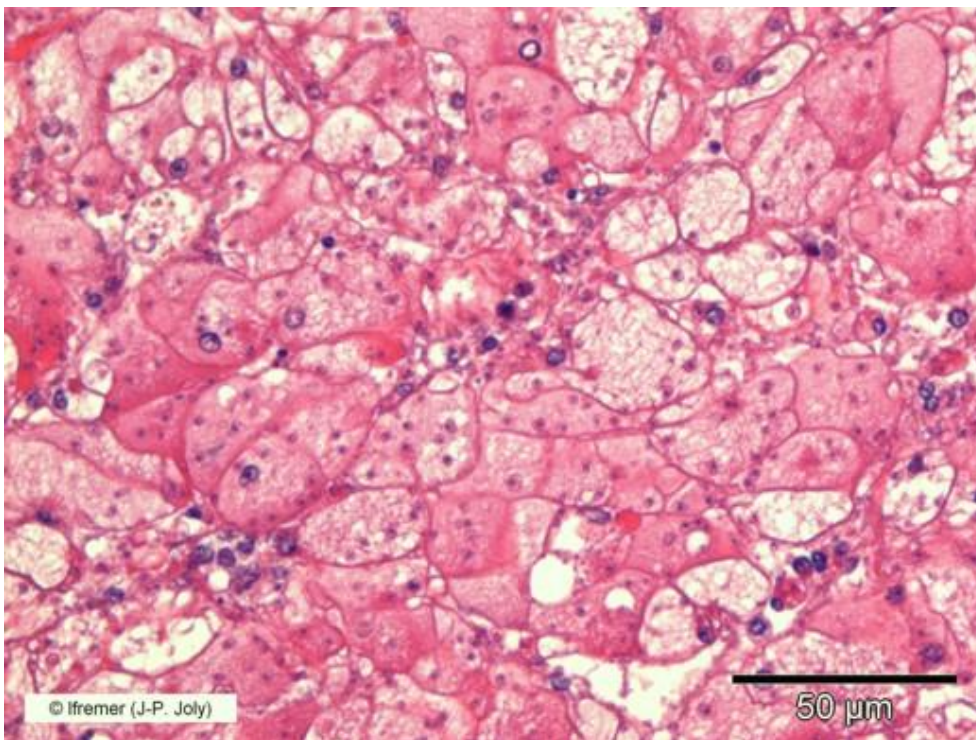


Abb. 1: Massive Infestation mit *M. mackini* im Gewebe einer Pazifischen Auster (HE)
(Bild EU-Referenzlabor Muschelkrankheiten, J-P Loly)

1.2 Klinische Symptomatik

Für die Infestation mit dem Parasiten *M. mackini* wird kein differenziertes klinisches Bild beschrieben. Es können jedoch gelblich-grüne Pusteln in allen sichtbaren Geweben sowie in der Schale der Austern auftreten. Ein Zeichen für die Infektion mit dem protozoären Parasiten ist die stark erhöhte Mortalität in der betroffenen Muschel-Population. Zeichen können offene Schalen bzw. Abfallen vom Hafthintergrund (Felsen, Stricke, Holzpfähle) sein. Befallen werden die Austernarten *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Ostrea edulis* und *O. conchaphila*. Histologisch kann der Parasit in allen Geweben beobachtet werden (Abbildung 1). Die Infektion wurde bisher ausschließlich im nordamerikanischen Raum beschrieben.

1.3 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, NRL für Muschelkrankheiten,
Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-1150 (1103)

1.4 Rechtsgrundlagen

- 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. L 328 S. 14)
- Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315)

2. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung werden die Schalen der Austern geöffnet und nach Durchtrennung des Schließmuskels die gesamte Auster entfernt. Für alle mikroskopischen Methoden wird eine Vergrößerung von 100x empfohlen (Ölimmersion).

3. Untersuchungsgang

3.1 Histologie

Für die Histologie wird die Auster so geschnitten, dass möglichst alle Organe im Schnitt enthalten sind (Kieme, Mantel, Verdauungsdrüsen, Herz, Niere). Die Schnitte werden für mindestens 24 in Davidson's Solution fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Vom Block werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt (Abbildung 1).

3.2 Abklatschpräparate

Für die Darstellung im Abklatschpräparat können alle Organe der Auster, vorzugsweise aber Mantel- und Kiementeile, mindestens 10x auf einen Objektträger getupft (Abklatsch). Nach der Trocknung wird das Präparat mit HE (Abbildung 2) bzw. mit Haemacolor® (Abbildung 2) angefärbt und mikroskopisch beurteilt.

Infektion mit *Microcytos mackini*

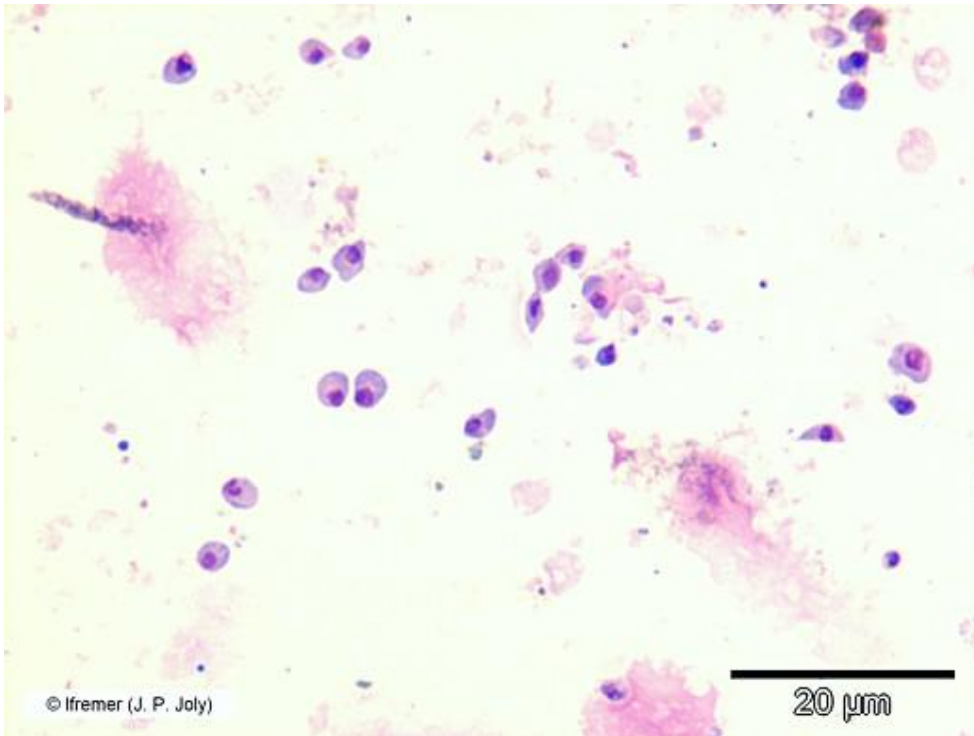


Abb. 2: Abklatsch-Präparat vom Mantel einer Pazifischen Auster mit freien Parasiten (Hemacolor® -Färbung) (Bild EU-Referenzlabor Muschelkrankheiten, J-P Joly)

3.3 PCR

Zum Nachweis des *M. mackini* sind einige parasiten-spezifische PCRs publiziert. Die PCR ist gegen die Histologie und die Abklatsch-Methode validiert worden. Sie ist bis zu 15x sensitiver als die benannten Methoden [1]. Detaillierte Information zu den Methoden werden vom EU-Referenzlabor in La Tremblade (Frankreich) bereitgestellt.

3.4 Bestätigungsuntersuchung

Die histologischen Befunde und PCR-Ergebnisse können mit einer in-situ Hybridisierung ISH (Abbildung 3) bzw. mit einer Fluoreszenz ISH (FISH) bestätigt werden. Detaillierte Informationen zu den Methoden werden vom EU-Referenzlabor in La Tremblade (Frankreich) bereitgestellt. Die Methode ist auch geeignet, um frühe Stadien der Infestation zu erkennen.

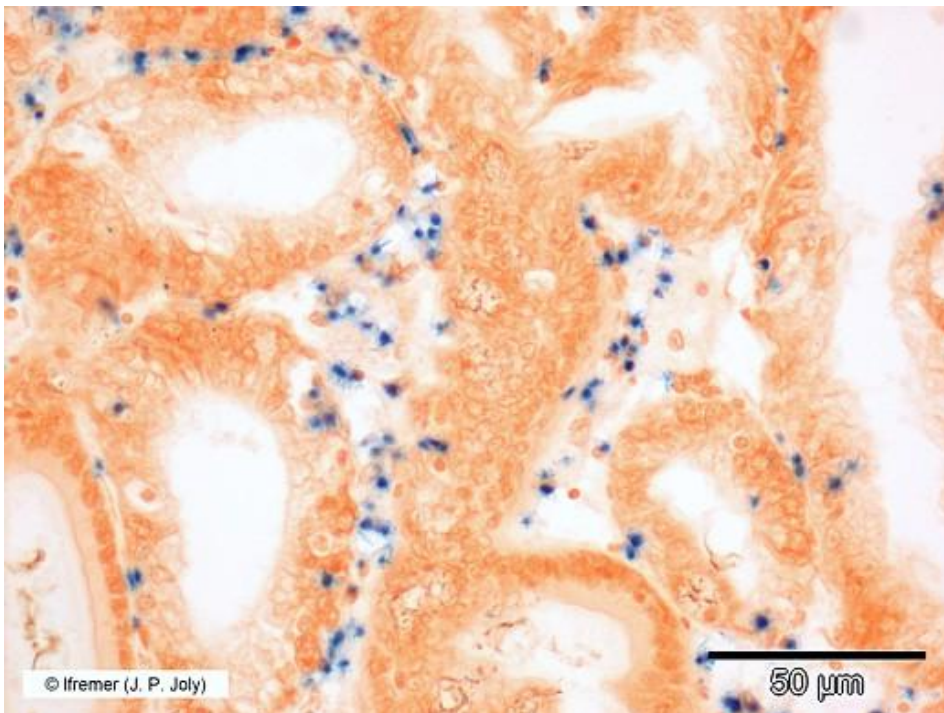


Abb. 3: ISH mit einer DIG-markierten Sonde im Bindegewebe einer Pazifischen Auster mit *M. mackini* blaue Zellen *M. mackini*, gelbe Zellen nicht infiziertes Bindegewebe um die Verdauungsdrüsen nach Bismarck Brown-Gegenfärbung (Bild EU-Referenzlabor Muschelkrankheiten)

Literatur

- Carnegie, R.B., et al., *Molecular detection of the oyster parasite *Microcytos mackini*, and a preliminary phylogenetic analysis* (vol 54, pg 219, 2003). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003. 56(1): p. 93-93.