FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Taura Syndrom (TS)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Taura Syndrom (TS)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger des Taura Syndroms, das Taura Syndrome Virus (TSV), ist ein positiv-einsträngiges RNA-Virus und gehört zum Genus Aparavirus innerhalb der Familie *Dicistroviridae*. TSV ist als exotischer Tierseuchenerreger in der EU gelistet und damit anzeigepflichtig (Directive 2006/88/EC Part II Annex IV; OIE Diagnostic Manual).

1.2 Klinische Symptomatik

Das Taura Syndrom ist eine virale Infektion der Dekapoden. Die Krankheit ist hoch kontagiös, verläuft sehr oft akut und geht einher mit sehr hoher Mortalität. Als empfängliche Arten gelten laut OIE und EFSA verschiedene Spezies der Unterfamilie *Penaeidae*: u. a. Gulf white shrimp (*Penaeus setiferus*), Pacific blue shrimp (*P. stylirostris*), and Pacific white shrimp (*P. vannamei*), Yellow shrimp (*Metapenaeus brevicornis*), Jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) und Roshna prawn (*Palaemon styliferus*). Andere penaeide Spezies sind experimentell infizierbar, wobei letztere keine klinischen Symptome entwickeln. Ausgewählte Linien von *L. stylirostris* sind gegenüber TSV resistent.
Das TSV befällt vor allem juvenile Stadien zwischen 0.05 und 5 g. Bei postlarvalen, juvenilen und subadulten Entwicklungsstadien von *L. vannamei* werden Mortalitäten von 40 % bis über 90 % erreicht. Adulte Shrimps können betroffen sein, besonders, wenn sie noch nicht mit TSV in Kontakt gekommen sind. Shrimps, die eine TSV-Infektion überstanden haben, können das Virus lebenslang tragen.
Beim TS werden drei Phasen unterschieden: akute, transiente und chronische. Während der akuten Phase kommt es zur Vermehrung roter Chromatophoren, was mit einer rötlichen Verfärbung der Shrimps einhergeht. Infolgedessen weisen Schwanzfächer und Pleopoden eine deutliche Rötung ('red tail' disease) auf. Mit der Lupe lassen sich besonders an den Rändern der Uropodien und Pleopoden fokale kutikuläre Nekrosen des Epithels erkennen. Solche Shrimps weisen eine Erweichung des Außenskeletts auf. Die sich am Rande der Teiche sammelnden moribunden Shrimps werden leicht Opfer von Seevögeln. Zusammen mit Wasserinsekten, die sich von toten Shrimps ernähren, gelten diese als mechanische TSV-Vektoren.
Während der transienten Phase kommt es zur Ausprägung tendenziell typischer Krankheitssymptome: multifokale, irreguläre braunschwarze Läsionen der Kutikula als Folge einer Hämozytenakkumulation bei oftmals normalem Verhaltensmuster.
Während der darauffolgenden chronischen Phase zeigen die Shrimps keine Klinik, sind aber weniger stressresistent (z. B. bei plötzlicher Veränderung der Wassersalinität).
Die Krankheit kann horizontal (infiziertes Organmaterial, Kannibalismus, Wasser) übertragen werden. Vertikale Übertragungswege werden diskutiert. Die Inkubationszeit beträgt sieben bis zehn Tage.
Das TSV ist auf dem amerikanischen Kontinent sowie in Südostasien weit verbreitet.

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch sind alle mit erhöhter Sterblichkeit einhergehenden Erkrankungen empfänglicher Arten in Betracht zu ziehen, die eine klinische Erkrankung ausprägen können. Dazu zählen insbesondere die exotische Krebstiererkrankung Yellowhead-Disease und die nichtexotische Weißpünktchenkrankheit (White Spot Disease). Letztere sind in der EU, wie auch das TS, anzeigepflichtig.
Mittels Histologie in der akuten Phase der Infektion diagnostizierbare körnige Zelltrümmer als Ausdruck multifokaler Nekrosen des Epithels der Kutis, der Kiemen und des Darms gelten als pathognomonisch für TS wenn gleichzeitig Nekrosen der Tubuli des lymphoiden Organs ausbleiben. Diese fehlenden Nekrosen sind ein differenzialdiagnostisches Kriterium gegenüber der Yellowhead-Disease, bei der Nekrosen des lymphoiden Organs regelmäßig auftreten.
Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der 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 des TS geäußert wird, sind Dekapoden an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann Tierverkehr sein.
Ein Verdacht auf TS besteht, wenn erhöhte Mortalitäten bzw. klinische Symptome des TS zu beobachten sind.
Als gesichertes diagnostisches Verfahren zum (indirekten) Erregernachweis wird derzeit die RT-PCR verwendet. Ein direkter Erregernachweis über die Virusisolierung in der Zellkultur ist nicht möglich. Das TSV befällt das kutikuläre Epithel (Hypodermis) des Außenskeletts, den Vorder- und Enddarm, die Kiemen, häufig auch das hämatopoetische und Bindegewebe, das lymphoide Organ sowie die Antennendrüsen. Das Hepatopankreas, der Mitteldarm und deren Caeca, glatte, Herz- und quergestreifte Muskulatur sowie neuronales Gewebe sind normalerweise TSV-negativ.
Der labordiagnostische Nachweis kann außer mit der RT-PCR mit folgenden Methoden erfolgen: Mikroskopisch fallen in der akuten Phase der Infektion multifokale Nekrosen des Epithels der Kutis, der Kiemen und des Darms mit erhöhter zytoplasmatischer Eosinophilie, Karyorrhexis und –pyknose (positive Feulgenreaktion) auf. In der transienten Phase ist ein Abklingen der Entzündungsreaktion und Akkumulation von melanisierten Hämozyten in den Nekroseherden zu beobachten, wobei TSV durch In-situ-Hybridiserung (ISH) und Immunhistochemie (ICH) unter Verwendung monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden kann. Während der chronischen Phase werden zahlreiche Lymphoidorganspheroide (LOS) als spherische Akkumulationen von Zellen des lymphoiden Organs und von Hämozyten, die positiv in der ISH und der IHC sind, beschrieben.
Der Nachweis mittels Elektronenmikroskopie, Genomsequenzierung, Western Blot, IHC und ISH werden vom EURL nur einschränkend empfohlen.

Taura Syndrom (TS)

Vorgaben zur Diagnose des TS sind im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals der OIE sowie im Diagnostic Manual des EURL for Fish and Crustacean Diseases (~~CEFAS, Weymouth, UK~~DTU, Lyngby, Dänemark) aufgelistet.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

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

1.6 Rechtsgrundlagen

TS ist eine exotische anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung des TS ist in Deutschland durch die "Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (Fischseuchenverordnung)" geregelt. Diese Verordnungen dienen der Umsetzung der Aquakultur-Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006, die zur Harmonisierung der Diagnose und Bekämpfung von Fischseuchen innerhalb der Europäischen Union erlassen wurde. In Entscheidung 2001/183/EWG der Kommission vom 22. Februar 2001 werden die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zum Nachweis des TS festgelegt. Diese Entscheidung ist für die Diagnose des TS in Deutschland verbindlich und dient daher der Erstellung der im Tierseuchenbekämpfungshandbuch gegebenen methodischen Hinweise. Eine Anleitung zur Diagnose des TS findet man auch im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE in der jeweils neuesten Fassung.

2. Untersuchungsmaterial

Probenauswahl

Bei der Begehung des Betriebes sind alle Produktionsanlagen (Teiche, Becken usw.) auf klinisch auffällige Dekapoden zu kontrollieren. Besondere Beachtung sind der Wasseroberfläche, dem Wasserabflussbereich sowie den Rändern der Haltungseinheiten zu widmen, wo sich häufig geschwächte Tiere sammeln. Sind klinisch auffällige oder frisch verendete Dekapoden vorhanden, sind diese bevorzugt für die Beprobung heranzuziehen. Sind solche Tiere nicht vorhanden, ist die Beprobung an die Gegebenheiten des Haltungsbetriebes anzupassen. Dazu sind gesund erscheinende Tiere proportional zu den jeweiligen Produktionseinheiten des Betriebes sowie zu allen Altersklassen zu beproben.

Auswahl entsprechend der klinischen Symptomatik

Je nach Verlauf der Erkrankung ist v. a. die rötliche Verfärbung des Exoskeletts ein typisches Symptom für TS. Lethargische und am Rand oder der Wasseroberfläche stehende Tiere zeigen Konditionsschwäche, die durch die Krankheit hervorgerufen werden kann.
Der Probenumfang sollte mindestens 30 Tiere betragen, wobei Gewebeteile von bis zu fünf Tieren gepoolt werden können.

Organentnahme

Die zu untersuchenden Dekapoden müssen tierschutzgerecht betäubt werden. Unmittelbar nach der Betäubung hat die Tötung und Organentnahme zu erfolgen. Die Organentnahme geschieht mit Hilfe von sterilen Sektionsinstrumenten (Schere, Skalpell, Pinzette).
In erkrankten Beständen müssen die Proben von klinisch kranken Tieren aller Altersgruppen entnommen werden, wobei jeweils bis zu fünf Tiere gepoolt werden können. Es ist sinnvoll, die Tiere nach prozessbedingter Stresseinwirkung (z. B. Abfischen, Transport) zu beproben, um die Nachweissicherheit zu erhöhen. TSV befällt das kutikuläre Epithel (Hypodermis) des Außenskeletts, den Vorder- und Enddarm, die Kiemen, häufig auch das hämatopoetische und Bindegewebe, das lymphoide Organ sowie die Antennendrüsen. Das Hepatopankreas, der Mitteldarm und deren Caeca, glatte, Herz- und quergestreifte Muskulatur sowie neuronales Gewebe sind normalerweise TSV-negativ. Für die nicht-letale Beprobung hochwertiger Dekapoden zwecks PCR können Kleinstmengen an Kiemenmaterial, Hämolymphe oder Schwimmbeinen eingesandt werden. Bei fachgerecht getöteten Dekapoden stellt sich die Entnahme der Schwimmbeine aus technischer Sicht am einfachsten dar. Hier reicht es, jeweils ein Beinpaar pro getötetes Tier einzusenden. Zur Vermeidung von Autolyse sollten die für die RT-PCR-Diagnostik einzusendenden Proben in Nukleinsäure-Stabilisierungsmedium (z. B. RNAlater) verbracht werden.
Aus Aufzuchttanks mit etwa 100.000 postlarvalen Stadien (PL) oder mehr, werden ca. 1.000 PLs von fünf verschiedenen Stellen beprobt. Die Proben werden in einem Becken gepoolt und vermischt. Dann werden aus der Mitte des Beckens lebende PLs entnommen. Die Anzahl der PLs sollte einer Menge von 10 - 20 µg entsprechen, die nachfolgend mittels Nucleo Spin RNAII Kit (Macherey&Nagel) zu RNA aufgearbeitet werden.
Für die Histologie können ganze Organe und kleinere Krebstiere (größere auch mittels Injektion) durch Einlegen in eine 10-fache Menge Fixans aufbereitet werden. Dazu wird Davidson's Fixans (für marine Spezies) oder neutral gepuffertes 4%iges Formalin (für Süßwasserspezies) verwendet. Nach 24 bis 48 Stunden ist das Material in 70%iges Ethanol zu überführen.

Das Medium stabilisiert RNA bei 18 – 25 °C bis zu sieben Tagen bzw. bis zu vier Wochen bei 2 – 8 °C. Zur Archivierung kann eine Lagerung der Proben bei –20 °C oder –80 °C erfolgen.

Taura Syndrom (TS)

Transport

Zur Untersuchung können ganze Tiere oder bereits entnommene Probenmaterialien eingesendet werden. Die Entnahme von Gewebeproben kann im Tierbestand erfolgen. Das Probenmaterial muss, unter Einhaltung der Kühlkette (maximal 10 °C), auf dem schnellsten Weg zum Untersuchungslabor verbracht werden. Die Probengefäße sind in Isolationsbehältern (z. B. dickwandige Styroporkästen) mit ausreichend Eis oder Kühlelementen zu transportieren, wobei ein Anfrieren der Proben zu vermeiden ist.
Werden ganze Tiere eingesandt, können diese entweder getötet, unzerteilt und gekühlt (maximal 10 °C) ohne Wasser in einem Plastikbeutel transportiert oder auch lebend verbracht werden. Dies kann in Styroporboxen oder Kartons geschehen, die innen mit Kunststofffolie beschichtet sein sollten, um die Tiere feucht zu halten.
Mit der Laboruntersuchung ist spätestens 48 Stunden nach der Probenahme zu beginnen.

3. Untersuchungsgang

3.1 RNA-Extraktion mittels Nucleo Spin RNAII Kit (Macherey&Nagel)

Von juvenilen oder adulten Shrimps werden kutikuläres Epithel des Außenskeletts (z. B. Pleopoden), Vorder- und Enddarm bzw. Kiemen entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Frisches Gewebe wird dabei bevorzugt. In 95 % Ethanol, in RNAlater oder bei -70 °C aufbewahrtes Gewebe ist ebenfalls für die Gesamt-RNA Extraktion geeignet.
10 - 20 mg Gewebe oder 50 µl Hämolymphe in ein 2 ml Eppendorfröhrchen geben.
Zum Lysieren eine Stahlkugel in das Röhrchen verbringen und mit 350 µl RA1 Puffer + 3,5 µl ß-Mercaptoethanol auffüllen, die Proben in den TissueLyser II geben und tarieren, bei 30 Hz für 2 min schütteln lassen.
Das Lysat aus dem TissueLyser II wird auf eine violette Säule mit Sammelröhrchen gegeben, dieses wird 1 min bei 10.000 x g (9400 upm*) zentrifugiert.
Die violette Säule verwerfen, gesamtes Filtrat mit 350 µl 70 % Ethanol (mit DEPC angesetzt) mischen, auf blaue Säule mit Sammelröhrchen geben und 30 sec bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren.
Die Stahlkugel jetzt aus dem Eppendorfröhrchen entnehmen und für min. 1h in 2 % Grotanatlösung desinfizieren.
Filtrat verwerfen und neues Sammelröhrchen verwenden, dann 350 µl MDB auf blaue Säule geben und 1 min bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren, Filtrat verwerfen und neues Sammelröhrchen verwenden.
Je Probe 10 µl rDNase mit 90 µl rDNase-Reaktionspuffer mischen, davon 95 µl auf blaue Säule geben und 15 min bei RT inkubieren.
200 µl Waschpuffer RA2 auf blaue Säule geben und 30 sec, bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren, anschließend Sammelröhrchen wechseln, 600 µl Waschpuffer RA3 auftragen und 30 sec bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren.
Danach Sammelröhrchen wechseln und ein zweites Mal mit 250 µl Waschpuffer RA3 waschen (2 min, 11.000 x g (10000 upm*).

Blaue Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen geben und 40 µl RNase-freies Wasser (im Kit beinhaltet) auftragen. Dann 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren (10000 upm*).
Den Durchfluss nochmals auf die blaue Säule geben (neues Eppendorfröhrchen unter die Säule stellen) und 1 min bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren. Blaue Säule verwerfen.
RNA-Messung erfolgt mittels Nanodrop (Einweisung erforderlich) oder alternativ wird eine 1/200 Verdünnung (z. B. 2,5 µl RNA in 500 µl DEPC-Wasser) angesetzt, um bei 260 nm und 280 nm (UV-Spektrophotometer) die Menge und Qualität der RNA zu prüfen. Gelöste RNA bei -70 °C lagern, falls nicht sofort damit weitergearbeitet wird.
Die RNA-Ausbeute ist vom Organ und dem Frischegrad der Proben sowie von der Qualität des Konservierungsmittels und der Dauer der Aufbewahrung abhängig. Die RNA-Ausbeute variiert normalerweise bei frischem Gewebe zwischen 0,2 und 2,0 µg/µl und bei Alkohol-konserviertem Gewebe zwischen 0,1 - 1 µg/µl.
* Die Umdrehungszahlen beziehen sich auf handelsübliche Eppendorfrotoren.

3.2 Labordiagnostischer Nachweis mittels RT-PCR

Das Prinzip der RT-PCR besteht in einem zweistufigen Test, bei dem zunächst die aus Organmaterial isolierte virale RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben wird, worauf sich die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) anschließt. Beide Reaktionen werden in einem Ansatz (one tube) durchgeführt. Der Nachweis der mittels TSV-spezifischer Primer amplifizierten DNA erfolgt durch Gelelektrophorese.

Geräte und Reagenzien

Chemikalien

- Agarose (z. B. von Invitrogen)
- Ethidiumbromid
- 1x TBE (wahlweise auch 1x TAE-Puffer)
- Reinstwasser
- 100 bp Marker (z. B. von Roth)
- 1x Probenpuffer (z. B. Roth)
- Desinfektionsmittel
- Mittel zur Dekontamination

Taura Syndrom (TS)

Gebrauchsgegenstände

- Einkanalpipetten
- Handschuhe
- Reaktionsgefäße
- Stative
- Eis oder Kühlbehälter
- Messzylinder, Erlenmeyerkolben o. ä.

Geräte

- UV Workstation
- Thermocycler
- Kühlschrank/Gefrierschrank
- Gelelektrophoresekammer
- Stromversorgungsgerät
- Mikrowelle
- Waage

RT-PCR Kit: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit Cat.No. 210212

Primer (gene bank AF277675.1)

Name	Richtung	Sequenz	Produktgröße	Position
9992 F	fwd	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	231 bp	6910
9195 R	rev	5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'		7140

Kontrollen

positive Kontroll-RNA, isoliert von erkrankten Krebstieren aus dem EURL ~~Weymouth, UK~~ Lyngby, Dänemark; negative Kontroll-RNA, isoliert von SPF-Krebstieren

Durchführung der RT-PCR unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kits (QIAGEN)

RT-PCR Ansatz

Rnase/Dnase freies Wasser			variabel, z. B.	13,0 µl
5xRT-Puffer				5,0 µl
dNTP				1,0 µl
Primer fwd	10 pmol/µl	9992 F		1,5 µl
Primer rev	10 pmol/µl	9195 R		1,5 µl
Enzymmix				1,0 µl
Rnasin				1,0 µl
RNA			variabel, z. B.	1,0 µl
Endvolumen				25,0 µl

Die eingesetzte RNA-Menge ist variabel, wobei das Endvolumen von 25 µl mit der variablen Wassermenge erreicht wird.
Die Reagenzien werden entsprechend der Zahl der Ansätze gekühlt als Master-Mix angesetzt und aliquotiert.
Die RNA templates werden anschließend separat zu der aliquotierten Mastermixmenge zugegeben.
Das Mitführen einer positiven und negativen Kontrolle ist erforderlich.

Cyclerbedingungen

Deckelheizung 105 °C Vorlauf ein

1.	50 °C	30 min		
2.	95 °C	15 min		
3.	94 °C	30 sec		
4.	58 °C	30 sec		
5.	72 °C	30 sec	Schritt 3 bis 5	40 Zyklen
6.	72 °C	10 min		
7.	4 ° C	variabel		

Auswertung
Zur Beurteilung der Ergebnisse wird ein 2%iges Agarosegel mit 1x TBE- oder TAE-Puffer hergestellt. Bei der Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,01 % werden Handschuhe getragen.
2 µl 1x Probenpuffer (Roth) werden mit 10 µl PCR-Produkt gemischt.

Davon werden 10 µl in die entsprechenden Geltaschen pipettiert.
Als Marker wird ein 100 bp Marker, z. B. der Firma Roth, mitgeführt, von dem 5 µl aufgetragen werden.
Die Elektrophorese läuft bei 100V, 400mA, 60 min.

Die PCR-Produkte werden unter Verwendung eines Transilluminators detektiert und beurteilt.
Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn ein 231 bp langes Fragment amplifiziert wurde und die positive Kontrolle ein entsprechendes Ergebnis aufweist. In der negativen Kontrolle darf kein Produkt amplifiziert worden sein.

Lagerung
Die Lagerung der Chemikalien und Reagenzien erfolgt nach Angaben der Hersteller.

Taura Syndrom (TS)

Literatur

Entscheidung der Kommission 2001/183/EG vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne 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~~ in der jeweils akuellen Fassung

Registry of Aquatic Pathology (RAP), Cefas Weymouth Laboratory. https://www.cefas.co.uk/cefas-data-hub/registry-of-aquatic-pathology/

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)

OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals in der jeweils gültigen Fassung

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.de