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

Amtliche Methodensammlung

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Das White Spot Syndrome (WSS) oder White Spot Disease (WSD) bzw. die Weißpünktchenkrankheit ist eine virale Infektion der Dekapoden, vor allem aber der penaiden Shrimps. Die Krankheit ist hoch kontagiös, verläuft sehr oft akut und geht mit sehr hoher Mortalität einher.
Der Erreger der WSD ist ein doppelsträngiges DNA-Virus mit einer Größe von ca. 120 - 150 x 270 - 290 nm und gehört zum Genus Whispovirus innerhalb der Familie *Nimaviridae*.
WSD ist als nichtexotische Krankheit in der Richtlinie 2006/88/EG und in der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen aufgelistet und damit anzeigepflichtig.

1.2 Klinische Symptomatik

Empfänglich sind gemäß der Richtlinie 2006/88/EG alle Dekapoden (Zehnfußkrebse). Eine wirtschaftliche Bedeutung für die Aquakultur haben vor allem die zur Familie *Penaeidae* gehörenden Arten (tropische Riesengarnelen/„Shrimps“), aber auch Flusskrebsspezies.
Die Klinik der Weißpunktkrankheit ist gekennzeichnet durch:

- stark variierende Mortalität
- multifokale bis konfluierende, runde, 0,5 bis 2 mm große weiße Veränderungen („Weißpünktchen“) in der Kutikula (Kalziumeinlagerungen auf der Innenseite des Exoskeletts)
- Pigmentationsverlust (rosa – rotbraune Körperoberfläche)
- Konzentration der Tiere an der Wasseroberfläche oder den Rändern der Haltungseinheiten
- Lethargie
- Inappetenz

Die klinischen Symptome werden unter natürlichen Bedingungen durch Wassertemperaturen von unter 30 °C und Stressoren (z. B. Salinitätswechsel) begünstigt. Betroffen sind alle Entwicklungsstadien von Dekapoden.

Verlaufsformen:

- perakut: Rötungen, Tod nach 2 - 3 Tagen
- akut: multifokale bis konfluierende, runde, 0,5 bis 2 mm große weiße Veränderungen („Weißpünktchen“), Tod nach 7 - 10 Tagen
- chronisch: subklinisch, Inappetenz, Tod nach 15 - 28 Tagen

Übertragung:

- vertikal (transovariell)
- horizontal (Kannibalismus, Nahrung, Wasser)

Eine besondere Gefahr stellen „Carrier“-Tiere dar, die das Virus in sich tragen und ausscheiden, ohne jedoch selbst Symptome zu zeigen (persistierende Infektion).

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 exotischen anzeigepflichtigen Krebstiererkrankungen Taura Syndrom und Gelbkopfkrankheit (Yellow Head Disease). Ferner sind differentialdiagnostisch pH-Wert-bedingte Kalkeinlagerungen im Exoskelett zu berücksichtigen. Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE in der jeweils gültigen Fassung 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 ein amtlich festgestellter Verdacht des Ausbruchs der WSD vorliegt, sind Dekapoden an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann der Tierverkehr sein.

Ein klinischer Verdacht auf WSD besteht, wenn erhöhte Mortalitäten bzw. klinische Symptome der WSD zu beobachten sind.

Als gesichertes diagnostisches Verfahren zum Erregernachweis wird derzeit die PCR verwendet. Ein direkter Erregernachweis über die Virusisolierung in der Zellkultur ist nicht möglich. Der Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen nach HE-Färbung von histologischen Schnitten oder Quetschpräparaten dient lediglich der Verdachtserhebung. Der Nachweis von viralem Antigen durch Immunhistochemie (IHC) unter Verwendung WSDV-spezifischer Antikörper (z. B. Aquatic Diagnostics Limited - ADL), Elektronenmikroskopie (Organe, Hämolymphe) sowie In-situ-Hybridisierung (ISH) werden vom EURL nur einschränkend empfohlen.

Die Anforderungen an die Diagnose der WSD sind im Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 aufgeführt. Weitere Hinweise, im „Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals“ der OIE in der jeweils gültigen Fassung sowie im „Diagnostic Manual“ des EURL (~~CEFAS, Weymouth, UK~~DTU Aqua, Lyngby, Dänemark) aufgelistet.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Benannte Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor für die WSD,
- Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. +49 (0) 38351-7-1175
- EU Referenzlabor für ~~Krebstiere, CEFAS,~~Fisch- und Krebstierkrankheiten, DTU National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Kemitorvet, building 202, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark, Tel. Phone: +45 25 52 05 80
- ~~Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, UK, Tel: +44 (0) 1305 206735~~

Die Diagnostik zum Nachweis der Erregerfreiheit für die Erklärung der Seuchenfreiheit von Zonen bzw. Kompartimenten (Aquakulturbetriebe), zur Überwachung der Seuchenfreiheit bzw. zur Bestätigung oder Ausschluss eines WSD-Verdachts wird in den benannten Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt. Das Nationale Referenzlaboratorium für WSD am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems koordiniert die Diagnose auf der Grundlage der EU- und nationalen Gesetzgebung. Zur Klärung fraglicher Befunde oder zur Bestätigung der Ergebnisse der regionalen Diagnoselaboratorien bei Ausbruch der WSD in einem oder einer zuvor als seuchenfrei erklärten Kompartiment oder Zone sind Proben zur Identifizierung und genetischen Charakterisierung an das Referenzlabor einzusenden. Repräsentative Proben werden an das EU-Referenzlaboratorium übergeben, das die Diagnose der Fischseuchen auf EU-Ebene koordiniert.

1.6 Rechtsgrundlagen

Die WSD ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung der WSD ist in Deutschland durch die Fischseuchenverordnung und seit dem 1. April 2016 durch den Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 der Kommission vom 11. September 2015 geregelt. Den nachfolgenden Kapiteln liegt der Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 zu Grunde, wobei gegebenenfalls Ergänzungen vorgenommen wurden.

Weitere Rechtsgrundlagen:

- Aquakultur-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
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der derzeit geltenden Fassung
- Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) in der derzeit geltenden Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) in der derzeit geltenden Fassung
- Durchführungsbeschluss der Kommission 2015/1554 vom 11. September 2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden

- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) in der jeweils aktuellen Ausgabe

2. Untersuchungsmaterial

Die Beprobung von Krebstieren für Laboruntersuchungen ist dann vorzunehmen, wenn die Wassertemperatur ihren wahrscheinlichen Jahreshöchststand erreicht. Dieses Erfordernis in Bezug auf die Wassertemperatur gilt auch für Gesundheitsuntersuchungen, sofern diese machbar und angezeigt sind.

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. Bei Vorhandensein von klinisch auffälligen oder frisch verendeten Dekapoden sind diese bevorzugt für die Beprobung heranzuziehen. Sind solche Tiere nicht verfügbar, 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. Wird für die Krebstierproduktion mehr als eine Wasserquelle verwendet, so müssen bei der Probenahme alle Wasserquellen berücksichtigt werden. Für die Probenahme in Wildpopulationen gelten gemäß dem Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 besondere Anforderungen (siehe Anhang I, Teil 6, Abschnitt I.1).

Die Anzahl der zu beprobenden Tiere richtet sich nach den Anforderungen des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554. Eine amtliche Untersuchung für die Bestätigung einer WSD-Infektion bzw. die Ausräumung eines Verdachts darauf umfasst mindestens eine Beprobung von zehn Krebstieren, wenn klinische oder postmortale Anzeichen einer WSD-Infektion beobachtet werden, oder von 150 Krebstieren, wenn keinerlei klinische oder postmortale Anzeichen beobachtet werden. Die erforderlichen Probenvolumina für Laboruntersuchungen zur Erlangung oder Erhaltung der Seuchenfreiheit sind den Tabellen 6.A und 6.B im Teil 6 des Anhangs I des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 zu entnehmen.

Je nach Verlauf der Erkrankung sind v. a. eine Rosa- oder Rotbraunfärbung durch Pigmentverlust oder weiße Punkte durch Kalzium-Einlagerung typische Symptome für WSD. Ferner kann es zu nekrotisierenden Läsionen der Extremitäten (v. a. Pleopoden) kommen. Lethargische und am Rand oder der Wasseroberfläche stehende Tiere zeigen Konditionsschwäche, die durch die Krankheit hervorgerufen werden kann.

2.1. Proben

Proben von integumentaler Epidermis, seziert oder in Laufbeinen enthalten, Schwimmbeinen, Mundwerkzeugen oder Kiemen des zu untersuchenden Tieres werden vor der Vorbereitung von Proben für die PCR in 95%igem Ethanol fixiert und können auch so transportiert werden.

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

Zur Untermauerung der bei der PCR gewonnenen Daten können auch andere Methoden wie Histologie und Transmissionselektronenmikroskopie herangezogen werden.

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. Es ist sinnvoll, die Tiere nach prozessbedingter Stresseinwirkung (z. B. Abfischen, Transport) zu beproben, um die Nachweissicherheit zu erhöhen. Das Virus besiedelt vor allem Gewebe ektodermalen oder mesodermalen Ursprungs, insbesondere die Kutikula und Subkutikula.

Folgende Organe bzw. Gewebe sind zur Untersuchung auf WSDV bevorzugt einzusenden: Schwimmbeine (Pleopoden) und/oder Kiemen. Es können auch Proben von integumentaler Epidermis oder Mundwerkzeugen eingesandt werden. In der Regel stellt sich die Entnahme der Schwimmbeine aus technischer Sicht am einfachsten dar (Abbildung 1).

Abbildung 1: Entnahme von Pleopoden (Foto: Kleingeld, LAVES)

Hier reicht es, jeweils ein Beinpaar pro getötetes Tier einzusenden. Zur Vermeidung des Abbaus differentialdiagnostisch relevanter RNA des Yellowhead-Virus und Taurasyndrom-Virus sollten die für die PCR-Diagnostik einzusendenden Proben in Nukleinsäure-Stabilisierungsmedium (z. B. RNAlater) verbracht werden. Ist eine differentialdiagnostische Abklärung nicht notwendig, reicht die Fixation des Probenmaterials durch Ethanol (95 %) oder Schockfrosten bei -80 °C.

Der Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 enthält keine Angaben zur Poolgröße. Gemäß dem "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE dürfen jedoch Organteile von maximal fünf Tieren gepoolt werden.

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.

2.2 Diagnosemethoden für die Erlangung oder Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf WSD

Die Diagnosemethode für die Erlangung oder Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf WSD gemäß den in Anhang II Teil 6 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 ausgeführten detaillierten Diagnosemethoden und -verfahren ist die zweistufige PCR.

Ergibt die zweistufige PCR einen Positivbefund, so ist das Ergebnis durch die Sequenzierung des Amplikons zu bekräftigen, bevor erste Bekämpfungsmaßnahmen gemäß Artikel 28 der Richtlinie 2006/88/EG durchgeführt werden. Wo möglich, können histologische (Nekrosen, Einschlusskörper) sowie transmissionselektronenmikroskopische (Nachweis von Viruspartikeln) Untersuchungen den Befund erhärten.

2.3 Amtliche Untersuchung und Diagnosemethoden für die Bestätigung einer WSD-Infektion bzw. die Ausräumung eines Verdachts darauf

Muss gemäß Artikel 28 der Richtlinie 2006/88/EG eine WSD-Infektion ausgeschlossen bzw. ein Verdacht darauf ausgeräumt werden, so ist folgendes Untersuchungs-, Probenahme- und Testverfahren anzuwenden:

a) die amtliche Untersuchung umfasst mindestens eine Gesundheitsuntersuchung und eine Beprobung von zehn Krebstieren, wenn klinische oder postmortale Anzeichen einer WSD-Infektion beobachtet werden, oder von 150 Krebstieren, wenn keinerlei klinische oder postmortale Anzeichen beobachtet werden. Die Proben werden gemäß den unter Nummer II.2 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 aufgeführten Diagnosemethoden untersucht (zweistufige PCR);

b) Das Vorliegen von WSD gilt als bestätigt, wenn der Befund aus der zweistufigen PCR, gefolgt von einer Sequenzierung gemäß den in Anhang II Teil 6 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 aufgeführten detaillierten Diagnosemethoden und -verfahren positiv ist und die ausgewählten Wirte pathognomonische Anzeichen von WSD aufweisen.

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

Ein Verdacht auf WSD gilt als ausgeräumt, wenn diese Tests keine weiteren Nachweise für das Vorhandensein von WSD ergeben.

Tabelle 6.A: Überwachungssystem für Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimente während des zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf WSD gemäß Nummer I.2.1 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554

	Zahl der klinischen Untersuchungen pro Jahr	Zahl der Laboruntersuchungen pro Jahr	Zahl der Krebstiere in der Probe
Betriebe/Probenahmestellen	1	1	150

Tabelle 6.B: Überwachungssystem für Mitgliedstaaten, Zonen oder Kompartimente zur Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf WSD gemäß Nummer I.3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554

Risikoniveau	Zahl der Gesundheitsuntersuchungen	Zahl der Laboruntersuchungen	Zahl der Krebstiere in der Probe
hoch	einmal jährlich	eine alle zwei Jahre	150
mittel	eine alle zwei Jahre	eine alle zwei Jahre	150
gering	eine alle zwei Jahre	eine alle vier Jahre	150

3. Untersuchungsgang

3.1 DNA-Extraktion

Im folgenden Kapitel wird die Extraktion mittels QIAamp DNA Mini-Kit (QIAGEN) beschrieben. Es können auch andere erprobte Extraktionsverfahren verwendet werden.

Von den gelieferten Proben (ggf. Pleopoden) 10 - 25 mg in einem 2 ml Eppendorfröhrchen abwiegen.

Zum Lysieren eine Stahlkugel in das Eppendorfröhrchen geben und mit 80 µl PBS auffüllen, die Proben in den TissueLyser II geben und tarieren, bei 30 Hz für 2 min schütteln lassen und nach dem Homogenisieren 100 µl ATL-Puffer hinzugeben.

Der Probe 20 µl Proteinase K zusetzen, auf Thermoblock geben und bei 56 °C unter Schütteln (300 upm) inkubieren lassen, bis die Probe komplett lysiert ist (1 - 3 h).

Nach dem Lyseschritt die Proben entnehmen und Schüttler auf 70 °C einstellen. Die Stahlkugel jetzt aus dem Eppendorfröhrchen entnehmen und für min. 1 h in 2 % Grotanatlösung desinfizieren.

Lysierte Probe kurz anzentrifugieren, 200 µl AL-Puffer zur Probe geben, 15 sec vortexen, 10 min bei 70 °C inkubieren lassen, danach gut durchmischen und wieder kurz anzentrifugieren.

Zur Probe 200 µl Ethanol (mind. 96 %) pipettieren, wieder 15 sec vortexen und kurz anzentrifugieren. Sammelröhrchen (2 ml) und Säule vorbereiten, Probe auf die Säule geben und 1 min bei ca. 6.000 g zentrifugieren.

Sammelröhrchen verwerfen und Säule auf ein neues Sammelröchen setzen, 500 µl AW 1-Puffer auf Säule pipettieren und 1 min bei 6.000 g zentrifugieren. Sammelröhrchen wechseln, 500 µl AW 2-Puffer auf die Säule geben und 3 min bei ca. 20.000 g zentrifugieren.

Säule auf ein neues Eppendorfröhrchen (1,5 ml) geben, 200 µl AE-Puffer oder DEPC-Wasser auf die Säule geben, 1 min bei RT inkubieren lassen und anschließend 1 min bei ca. 6.000 g zentrifugieren.

Durchfluss nicht verwerfen und die gleichen 200 µl noch einmal auf die Säule geben und 1 min bei ca. 6.000 g zentrifugieren.

DNA-Messung erfolgt mittels Nanodrop 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 DNA zu prüfen.

3.2 Labordiagnostischer Nachweis mittels PCR und Sequenzierung

Die hier beschriebenen Methoden und Verfahren orientieren sich (mit Anpassungen) an dem nach ISO-17025 akkreditierten Test, den das Referenzlaboratorium der Europäischen Union für Krebstierkrankheiten anwendet. Es dürfen alternative Ansätze angewandt werden, bei denen gleichwertige Bedingungen oder Kits zum Einsatz kommen, die von unterschiedlichen Herstellern produziert werden, aber eine gleichwertige Empfindlichkeit und Spezifität wie die in diesem Teil beschriebenen aufweisen. In allen Fällen ist das PCR-Produkt zu sequenzieren, um zu bestätigen, dass es sich tatsächlich um das Weißpünktchensyndromvirus (WSSV) handelt.

Beim Nachweis von WSSV anhand von Gewebeproben sind folgende Schritte erforderlich: Homogenisierung des Gewebes, Extraktion der DNA, spezifische Amplifikation der WSSV-DNA mittels PCR, Visualisierung des amplifizierten Produkts auf einem Gel, Reinigung der DNA und Sequenzierung zur Bestätigung der Identität des Erregers.

Zum Nachweis viraler DNA aus Gewebeproben von Krebstieren (vorzugsweise Pleopoden) wird zunächst eine erste PCR durchgeführt, an die sich bei negativem Ergebnis eine nested PCR anschließt. Bei letzterer wird

als Template das Produkt aus der ersten PCR verwendet sowie Primer, die innerhalb der Primer der ersten PCR liegen.

Die Sensitivität beider PCR-Schritte beträgt ca. 20 Kopien eines Plasmid-templates.

3.2.1 Geräte und Reagenzien

Chemikalien

- Agarose (z. B. von Invitrogen)
- Ethidiumbromid (oder alternativer Fluoreszenzfarbstoff)
- 1x TBE (wahlweise auch 1x TAE-Puffer)
- Reinstwasser
- 1 kb Marker (z. B. von Promega)
- Blue/Orange 6x Loading Dye (z. B. von Promega)
- Desinfektionsmittel
- Mittel zur Dekontamination

Gebrauchsgegenstände

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

Geräte

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

PCR Kit

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

Primer

Primer für erste PCR (gene bank AF332093.2)

Name	Richtung	Sequenz	Produktgröße	Position
WSSV 146 F1	fwd	5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3'	1447 bp	224261
WSSV 146 R1	rev	5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3'		225707

Primer für nested PCR (gene bank AF332093.2)

Name	Richtung	Sequenz	Produktgröße	Position
WSSV 146 F2	fwd	5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3'	941 bp	224513
WSSV 146 R2	rev	5'-TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T-3'		225453

DNA

Die DNA-Aufbereitung erfolgt unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits.

Kontrollen

positive Kontroll-DNA, isoliert von erkrankten Krebstieren aus dem ~~CRL Weymouth~~EURL Lyngby;
negative Kontroll-DNA, isoliert von SPF-Krebstieren
No-Template-Kontrolle (Wasser)

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

Erste PCR

Erste 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	146 F1		1,5 µl
Primer rev	10 pmol/µl	146 R1		1,5 µl
Enzymmix				1,0 µl
Rnasin				1,0 µl
D N A			variabel, z. B.	1,0 µl
Endvolumen				25,0 µl

Die eingesetzte DNA Menge ist variabel, wobei das Endvolumen von 25 µl mit der variablen Wassermenge erreicht wird.

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

Die Reagenzien werden entsprechend der Zahl der Ansätze gekühlt als Master-Mix angesetzt und aliquotiert. Die DNA-Templates werden anschließend separat zu der aliquotierten Mastermixmenge zugegeben. Das Mitführen einer positiven und negativen Kontrolle ist erforderlich.

Erste PCR - Cyclerbedingungen

Deckelheizung 105 °C Vorlauf ein

1.	95 °C	15 min		
2.	94 °C	1 min		
3.	55 °C	1 min		
4.	72 °C	2 min	Schritt 2 bis 4	40 Zyklen
5.	72 °C	5 min		
6.	4 °C	variabel		

Zweite PCR = nested PCR

Nested 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	146 F2		1,5 µl
Primer rev	10 pmol/µl	146 R2		1,5 µl
Enzymmix				1,0 µl
Rnasin				1,0 µl
PCR Produkt aus 1. PCR			variabel, z. B.	1,0 µl
Endvolumen				25,0 µl

Für die nested PCR wird z. B. 1 µl des PCR-Produkts aus der 1. PCR eingesetzt, wobei die eingesetzte Menge variabel ist, so dass das Endvolumen von 25 µl ebenfalls wieder durch die variable Wassermenge erreicht wird.

Nested PCR - Cyclerbedingungen

Deckelheizung 105 °C Vorlauf ein

1.	95 °C	15 min		
2.	94 °C	1 min		
3.	55 °C	1 min		
4.	72 °C	2 min	Schritt 2 bis 4	40 Zyklen
5.	72 °C	5 min		
6.	4 °C	variabel		

Auswertung

Zur Beurteilung der Ergebnisse wird ein 1%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 Probenpuffer werden mit 10 µl PCR-Produkt gemischt.

Davon werden 10 µl in die entsprechenden Geltaschen pipettiert.
Als Marker wird ein 1 kb Marker, z. B. der Firma Promega, mitgeführt.
Die Elektrophorese läuft bei 100 V, 400 mA, 60 min (variabel).

Die PCR Produkte werden unter Verwendung eines Transilluminators detektiert und beurteilt.
Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn in der ersten PCR ein 1447 bp langes Fragment bzw. in der nested PCR ein 941 bp großes Fragment amplifiziert wurde und die positive Kontrolle ein jeweils entsprechendes Ergebnis aufweist. In der negativen Kontrolle darf kein Produkt amplifiziert worden sein.

3.2.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur Vorbereitung der Sequenzier-PCR muss das PCR-Produkt aus der diagnostischen PCR aufgereinigt werden. Dabei werden Verunreinigungen, insbesondere Enzyme, freie Nukleotide, Salze sowie Gelbestandteile entfernt, die bei der nachfolgenden Sequenzier-PCR stören könnten.

Die Extraktion der DNA kann beispielsweise mittels NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) unter Verwendung des Originalprotokolls in der jeweils aktuellen Version erfolgen.

Die aufgereinigte DNA kann nachfolgend in der Sequenzier-PCR verwendet werden.

Ansatz der Sequenzierreaktion (10 µl Ansatz)

Wasser	5 µl (variabel)
Big Dye Ready reaction mix (Enzym)	0,5 µl (PCR Produkt<500 bp) bzw.1 µl (PCR Produkt>500 bp)
5 x sequencing buffer	2,5 µl
Primer fwd oder rev (1,6 pmol/ µl)	1 µl
Template-DNA (ca.130ng/ 1kb)	1 µL (max. 6µl)

Primer

WSSV 146F2 / 146R2 Annealing-Temperatur 60 °C

Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (WSD)

Cycler-Reaktionsbedingungen

1.	1	min	96 °C		
2.	10	sec	96 °C		
3.	5	sec	50 °C		
4.	4	min	60 °C	gehe zu 2	25 Zyklen
	Hold		ca. 8 °C		

Reinigung der zu sequenzierenden PCR-Produkte

Ethanol-Fällung

PCR-Produkt aus Sequenzierreaktion in gekühlter Zentrifuge kurz anzentrifugieren

10 µl	PCR Produkt aus der Sequenzier-PCR
2,5 µl	125 mM EDTA
30 µl	mind. 96%iges Ethanol

- alles mehrfach mit Pipette mischen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 15 min zentrifugieren, maximale Geschwindigkeit (ca. 20.000 g), ca. 4 °C (längeres Zentrifugieren möglich)
- sofort etwa 40 µl Überstand mit Pipette entfernen und verwerfen
- 60 µl 70%iges Ethanol dazugeben, kein Mischen erforderlich
- 10 min zentrifugieren, ca. 4 °C, max. Geschwindigkeit (ca. 20.000 g)
- sofort etwa 70 µl Überstand abnehmen und verwerfen
- Deckel des Eppendorfröhrchens öffnen, für 10 min bei 60 °C in den Thermoblock stellen (mit Alufolie abdecken)
- wenn Inhalt des Eppendorfröhrchens getrocknet ist, 20 µl Formamid dazugeben (nicht schütteln) und für 5 min auf Eis stellen

Alternativ zur Ethanolfällung kann das Kit von Macherey&Nagel „Nucleo SEQ Columns“ nach Vorschrift des Herstellers verwendet werden. Nach Elution werden 10 µl des Durchflusses mit 10 µl Formamid gemischt. Aufgereinigte Sequenzieransätze werden dem Sequenzierlabor übergeben. Die aus dem Sequenzierlabor erhaltenen Sequenzen werden mit den in Datenbanken (z. B. NCBI) vorhandenen Sequenzen verglichen (z. B. unter Verwendung des Programmes Geneious der Firma Biomatters Ltd.).

Referenzen

Bower, S.M., McGladdery, S.E. & Price, I.M. (1994) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases 4(1): 1-199

DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS (EU) 2015/1554 DER KOMMISSION vom 11. September 2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden (ABl. L 247 vom 23.9.2015, S. 1)

~~EURL: www.crustaceancrl.eu/sops/2013.pdf~~

Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315) in der derzeit geltenden Fassung

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

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

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. L 328 vom 24.11.2006, S. 14)

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 19. Juli 2011 (BGBl. I S. 2481) in der derzeit geltenden Fassung

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