

## Amtliche Methodensammlung

# Weißpüktchenkrankheit der Krebstiere

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### 1. Charakterisierung der Infektion

#### 1.1 Erreger

Das White Spot Syndrome (WSS), oder White Spot Disease (WSD) bzw. Weißpünktchenkrankheit ist eine virale Infektion der Dekapoden, vor allem aber der penaiden Shrimps. Die Krankheit ist hoch kontagiös, verläuft sehr oft akut und geht einher mit sehr hoher Mortalität.

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 nicht-exotischer Tierseuchenerreger in der EU gelistet und damit anzeigepflichtig (Directive 2006/88/EC Part II Annex IV; OIE Diagnostic Manual).

#### 1.2 Klinische Symptomatik

Wirtschaftliche Bedeutung für die Aquakultur haben vor allem die zur Familie Penaeidae gehörenden Arten. Empfänglich sind im Prinzip alle Dekapoden (Zehnfußkrebse).

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 2mm große weiße Veränderungen („Weißpünktchen“), Tod nach 7-10 Tagen

chronisch: subklinisch, Inappetenz,

Tod nach 15-28 Tagen.

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### 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). Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" 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 WSD geäußert wird, sind Dekapoden an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann Tierverkehr sein.

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

Als gesichertes diagnostisches Verfahren zum (indirekten) 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.

Vorgaben zur Diagnose der WSD sind im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals des OIE sowie im Diagnostic Manual des EURL (CEFAS, Weymouth, UK) aufgelistet.

### 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

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

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### 1.6 Rechtsgrundlagen

WSD ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung der WSD 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 Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zum Nachweis der WSD festgelegt. Diese Entscheidung ist für die Diagnose der WSD in der BRD verbindlich und dient daher der Erstellung der im TSBH gegebenen methodischen Hinweise. Eine Anleitung zur Diagnose der WSD findet man auch im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des 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, so 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 sind v. a. eine Rosa- oder Rotbraunfärbung durch Pigmentverlust oder weiße Punkte durch Calcium-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.

Der Probenumfang sollte mindestens 30 Tiere betragen, wobei Gewebeteile von bis zu fünf Tieren gepoolt werden können.

### *Routineuntersuchung:*

Bei Betrieben, die zweimal jährlich im Rahmen eines Untersuchungsprogramms zur Erlangung oder Aufrechterhaltung des EU-Status (Zulassungsuntersuchung) klinisch untersucht werden, müssen die Abstände zwischen den Untersuchungen mindestens vier Monate betragen.

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### 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 5 Tiere gepoolt werden können. 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. Die OIE empfiehlt, folgende Organe bzw. Gewebe zur Untersuchung auf WSS-V einzusenden: Schwimmbeine (Pleopoden), Kiemen, Magen, Abdominalmuskulatur oder Hämolymphe. Die epithelialen Zellen von Hepatopankreas und Darm sind endodermalen Ursprungs und eignen sich nicht als Untersuchungsmaterial. 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 PCR-Diagnostik einzusendenden Proben in Nukleinsäure-Stabilisierungsmedium (z.B. RNAlater) verbracht werden, um die für die differentialdiagnostische RT-PCR (Yellowhead Virus, Taurasyndrom Virus) notwendige RNA zu stabilisieren. Ist eine differentialdiagnostische Abklärung nicht notwendig reicht die Fixation des Probenmaterials durch Ethanol (95%).

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 24-48 h ist das Material in 70%-iges Ethanol zu überführen.

Das Medium stabilisiert RNA bei 18-25°C bis zu 7 Tage bzw. bis zu 4 Wochen bei 2-8°C. Zur Archivierung kann eine Lagerung der Proben bei -20°C oder -80°C erfolgen.

### 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 Styro-

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

porboxen 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 Probennahme zu beginnen.

### 3. Untersuchungsgang

#### 3.1 DNA-Extraktion mittels QIAamp DNA Mini-Kit Kit (QIAGEN)

Von den gelieferten Proben (ggf. Pleopoden) 10-25mg 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 inkubieren lassen bis die Probe komplett lysiert ist (1-3h).

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

Lysierte Probe kurz anzentrifugieren (4000 upm\*), 200 µl AL-Puffer zur Probe geben, 15 sec vortexen, 10 min. bei 70°C inkubieren lassen, danach gut durchmischen und wieder kurz anzentrifugieren (4000 upm).

Zur Probe 200 µl Ethanol(100%) pipettieren, wieder 15 sec. vortexen und kurz anzentrifugieren.

Sammelröhrchen (2ml) und Säule vorbereiten, Probe auf die Säule geben und 1 min. bei 11.000 upm zentrifugieren.

Sammelröhrchen verwerfen und Säule auf ein neues Sammelröchen setzen, 500 µl AW I-Puffer auf Säule pipettieren und 1min bei 11.000 upm zentrifugieren. Sammelröhrchen wechseln, 500 µl AW II-Puffer auf die Säule geben und 3 min bei 14.000 upm zentrifugieren.

Säule auf ein neues Eppendorfröhrchen (1,5ml) geben, 200 µl AE-Puffer oder DEPC-Wasser auf die Säule geben, 1 min. bei RT Inkubieren lassen und anschließend 1 min bei 8.000 upm zentrifugieren.

Durchfluss nicht verwerfen und die gleichen 200 µl noch einmal auf die Säule geben und 1 min bei 8.000 upm zentrifugieren.

DNA-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.

\* Die Umdrehungszahlen beziehen sich auf handelsübliche Eppendorfrötoren.

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### 3.2 Labordiagnostischer Nachweis mittels PCR

Virale DNA aus Gewebeproben von Krebstieren (vorzugsweise Pleopoden) wird mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Hierfür 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.

#### Geräte und Reagenzien

##### Chemikalien

- Agarose (z.B. von Invitrogen)
- Ethidiumbromid
- 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

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### RT-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

Siehe Arbeitsanweisung DNA Aufbereitung unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits.

### Kontrollen

positive Kontroll-DNA, isoliert von erkrankten Krebstieren aus dem CRL Weymouth;

negative Kontroll-DNA, isoliert von SPF-Krebstieren

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

### Erste PCR

*Erste PCR - Ansatz*

Rnase/Dnase freies Wasser		variabel, z.B.	7,0 µl
5xRT-Puffer			5,0 µl
dNTP			1,0 µl
Primer fwd	15 pmol/µl	146 F1	2,5 µl
Primer rev	15 pmol/µl	146 R1	2,5 µl
Enzymmix			1,0 µl
Rnasin			1,0 µl
D N A		variabel, z.B.	5,0 µl 1:5 verdünnt
Endvolumen			25,0 µl



## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

Die eingesetzte DNA 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 DNA-Templates werden anschließend separat zu der aliquotierten Mastermixmenge zugegeben. Das Mitführen einer positiven und negativen Kontrolle ist erforderlich.

### Erste PCR - Cyclerebedingungen

Deckelheizung 105 °C Vorlauf ein

1.	95 °C	15 min	
2.	94 °C	4 min	
3.	55 °C	1 min	
4.	72 °C	2 min	
5.	94 °C	1 min	
6.	55 °C	1 min	
7.	72 °C	2 min	Schritt 5 bis 7 40 Zyklen
8.	72 °C	5 min	
9.	4 °C	variabel	

### Zweite PCR = Nested PCR

#### Nested PCR - Ansatz

Rnase/Dnase freies Wasser		variabel, z.B.	11,0 µl
5xRT-Puffer			5,0 µl
dNTP			1,0 µl
Primer fwd	15 pmol/µl	146 F2	2,5 µl
Primer rev	15 pmol/µl	146 R2	2,5 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.

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### *Nested PCR - Cyclerbedingungen*

Deckelheizung 105 °C Vorlauf ein

1.	95 °C	15 min	
2.	94 °C	4 min	
3.	55 °C	1 min	
4.	72 °C	2 min	
5.	94 °C	1 min	
6.	55 °C	1 min	
7.	72 °C	2 min	Schritt 5 bis 7 40 Zyklen
8.	72 °C	5 min	
9.	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 1kb Marker, z.B. der Firma Promega, mitgeführt.

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 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.

### **Lagerung**

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

## Weißpünktchenkrankheit der Krebstiere (White Spot Disease, WSD)

### Literatur

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

EURL: <http://www.crustaceancrl.eu/sops/2013.pdf>

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

Registry of Aquatic Pathology (RAP), Cefas Weymouth Laboratory. [www.aquaticpathology.co.uk/](http://www.aquaticpathology.co.uk/)

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 in der jeweils gültigen Fassung  
Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315)

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, [www.fli.bund.de](http://www.fli.bund.de)