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

Amtliche Methodensammlung

Yellow Head Disease (YHD)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Yellow Head Disease (YHD)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Yellow Head Disease (YHD, Gelbkopfkrankheit) ist das Yellowheadvirus (YHV; Genotyp 1, Genus Okavirus, Familie *Roniviridae*, Ordnung Nidovirales).
YHV 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

Natürliche und experimentelle Infektionen mit dem YHV (Genotyp 1, Genus Okavirus, Familie *Roniviridae*, Ordnung Nidovirales) sind für eine ganze Reihe penaeider und palemonider Schalentiere beschrieben worden, wobei die höchsten Mortalitäten (80 % - 100 %) bei *Penaeus monodon*, *P. styliferus*, *P. serrifer*, *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostrus*, *Farfantepenaues aztecus*, *Fa. Duorarum* und *Machrobrachium sintangene*, inbesondere bei juvenilen Tieren, auftreten.
Klinische Symptome, wie Konzentration der Tiere an der Oberfläche und den Rändern der Teiche, Inappetenz, Rötungen an Körper und Gliedmaßen, gelb-rosa Verfärbung der Kiemen werden ab dem postlarvalen Stadium beobachtet. Diese Symptome sind bei Erkrankungen der Schalentiere jedoch häufig anzutreffen und somit nicht pathognomonisch. Die gelbliche Verfärbung des Cephalothorax durch das darunterliegende gelbe und weiche (normalerweise braune und solidere) Hepatopankreas sind typische Krankheitssymptome, können aber nicht bei jedem Ausbruch beobachtet werden.
Die Krankheit kann horizontal (infiziertes Organmaterial, Wasser) und vertikal übertragen werden. Die Inkubationszeit beträgt sieben bis zehn Tage.
Bei chronischer bzw. nach überstandener Infektion scheint das YHV lebenslang zu persistieren. Die Prävalenz von YHV in Schalentierfarmen Asiens, Australiens und Ostafrikas beträgt 50 bis 100 %.

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 Krebstiererkrankungen Taura Syndrom und die nichtexotische Weißpünktchenkrankheit (White Spot Disease). Letztere sind in der EU, wie auch die YHD, anzeigepflichtig. 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 der

YHD geäußert wird, sind Dekapoden an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann Tierverkehr sein.
Ein Verdacht auf YHD besteht, wenn erhöhte Mortalitäten bzw. klinische Symptome der YHD 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. Der Nachweis basophiler zytoplasmatischer Einschlusskörper nach HE-Färbung von histologischen Schnitten oder Quetschpräparaten sowie Nekrosen im lymphoiden Organ, Karyorrhexis und -pyknose in Hämozyten dienen lediglich der Verdachtserhebung. Der Nachweis mittels Elektronenmikroskopie (Kieme, lymphoides Organ), Genomsequenzierung, Western Blot (Hämolymphe) und In-situ-Hybridisierung (ISH) werden vom EURL nur einschränkend empfohlen.
Vorgaben zur Diagnose der YHD sind im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals der OIE sowie im Diagnostic Manual des EURL (~~CEFAS, Weymouth, UK~~ DTU Aqua, Lyngby, Dänemark) aufgelistet.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

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

1.6 Rechtsgrundlagen

YHD ist eine exotische anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung der YHD 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 der YHD festgelegt. Diese Entscheidung ist für die Diagnose der YHD in Deutschland verbindlich und dient daher der Erstellung der im Tierseuchenbekämpfungshandbuch (TSBH) gegebenen methodischen Hinweise. Eine Anleitung zur Diagnose der YHD 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 gelbliche Verfärbung des Cephalothorax ein typisches Symptom für YHD. 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. Das YHV befällt blutbildende Organe, Hämozyten, Kiemen, die Subkutis, den Darm, die Antennendrüsen, die Gonaden sowie Nerven und Ganglien. 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 Tage bzw. bis zu vier 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 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 das lymphoide Organ, Kieme oder Hämolymphe entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Frisches Gewebe wird dabei bevorzugt. In 95 % Ethanol, in RNAlater oder bei -70 °C aufbewahrtes lymphoides Organ und Kieme sind 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. 1 h 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 YHV-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

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 FJ848675.1)

Name	Richtung	Sequenz	Position	Produktgröße
10 F	fwd	5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'	13831	
144R	rev	5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'	13965	135 bp

Kontrollen

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

Yellow Head Disease (YHD)

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 10F	10 pmol/µl		1,5 µl
Primer 144R	10 pmol/µl		1,5 µl
Enzymmix			1,0 µl
Rnasin			1,0 µl
R N A		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 (z. B. Roth, Promega) 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 100 V, 400 mA, 60 min (variabel).

Die PCR-Produkte werden unter Verwendung eines Transilluminators detektiert und beurteilt.
Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn ein 135 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.

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)

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

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