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

Amtliche Methode
und Falldefinition

Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit

Infection with Yellow Head Virus (YHV)

Vollständig überarbeitete Version, Stand 21.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode **3**

1. Charakterisierung der Infektion **3**

1.1 Erreger 3

1.2 Klinische Symptomatik 3

1.3 Differenzialdiagnose 4

1.4 Diagnostische Indikation 4

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung 4

1.6 Rechtsgrundlagen 5

2. Untersuchungsmaterial **6**

2.1 Probenauswahl 7

2.2 Organentnahme 7

2.3 Transport 8

3. Untersuchungsgang **8**

3.1 RNA-Extraktion mittels Nucleo Spin RNAII Kit (Macherey&Nagel) 8

3.2 Labordiagnostischer Nachweis mittels RT-PCR 9

Literatur **13**

Falldefinition - Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit **14**

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger der Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit (früher Yellow Head Disease, YHD) ist das Yellowheadvirus (YHV; Genotyp 1, Genus Okavirus, Familie *Roniviridae*, Ordnung Nidovirales).
Die Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit ist in der Delegierten Verordnung (EU) 2018/1629 als Seuche gelistet und in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 den Kategorien A (D und E) zugeordnet.

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*, insbesondere bei juvenilen Tieren, auftreten.
Im Anhang der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 sind als empfängliche Arten aufgeführt: Gulf brown shrimp (*Penaeus aztecus*), Gulf pink shrimp (*Penaeus duorarum*), Kuruma-Garnele (*Penaeus japonicus*), Black Tiger Garnele (Penaeus monodon), Gulf white shrimp (Penaeus setiferus), Blaue Garnele (*Penaeus stylirostris*), Vannamei Garnele (*Penaeus vannamei*). Ebenfalls in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 werden als Überträgerarten aufgeführt: Schinkenmuschel (*Atrina* spp.), Wellhornschnecke (*Buccinum undatum*), Portugiesische Auster (*Crassostrea angulata*), Herzmuschel (*Cerastoderma edule*), Pazifische Auster (*Crassostrea gigas*), Amerikanische Auster (*Crassostrea virginica*), Mittelmeer-Dreiecksmuschel (*Donax trunculus*), Seeohr der Art Haliotis discus hannai (Haliotis discus hannai), Grünes Seeohr (*Haliotis tuberculata*), Gemeine Strandschnecke (*Littorina littorea*), Nördliche Venusmuschel (*Mercenaria mercenaria*), Japanische Venusmuschel (Meretrix lusoria), Sandklaffmuschel (Mya arenaria), Miesmuschel (*Mytilus edulis*), Mittelmeer-Miesmuschel (*Mytilus galloprovincialis*), Gemeiner Krake (*Octopus vulgaris*), Europäische Auster (*Ostrea edulis*), Große Pilgermuschel (*Pecten maximus*), Gegitterte Venusmuschel (*Ruditapes decussatus*), Japanische Teppichmuschel (*Ruditapes philippinarum*), Gewöhnlicher Tintenfisch (*Sepia officinalis*), Schnecken der Gattung Strombus (*Strombus spp.*), Goldene Teppichmuschel (*Venerupis aurea*), Kleine Teppichmuschel (*Venerupis pullastra*), Raue Venusmuschel (*Venus verrucosa*).
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 Differenzialdiagnose

Differenzialdiagnostisch sind alle mit erhöhter Sterblichkeit einhergehenden Erkrankungen empfänglicher Arten in Betracht zu ziehen, die eine klinische Erkrankung ausprägen können. Dazu zählen insbesondere die Krebstiererkrankungen wie Infektion mit dem Taura-Syndrom-Virus und Infektion mit dem Virus der Weißpünktchenkrankheit. Weitere differenzialdiagnostische 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 nur einschränkend empfohlen.
Vorgaben zur Diagnose der Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit sind im Diagnostic Manual des EU-Referenzlabors (EURL) für Fisch- und Krebstierkrankheiten sowie im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals der OIE aufgelistet.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Die Untersuchungen zum Nachweis des YHV werden im Nationalen Referenzlabor (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

Die Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit ist nach Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 als Seuche den Kategorien A (D und E) zugeordnet. Die Diagnose und Bekämpfung der Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit ist in der EU im Anhang XII der Delegierten Verordnung (EU) 2020/687 geregelt. Die Auswahl der zu beprobenden Organe, die Vorbereitung, die Lagerung und die Verbringung der Proben in das NRL für YHD müssen unter Einhaltung der Empfehlungen des EURL für Fisch und Krebstierkrankheiten erfolgen. Die Proben müssen mittels der vom EURL zugelassenen Diagnosemethoden und Verfahren untersucht werden. Eine Anleitung zur Diagnose der YHD findet man auch im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE in der jeweils neuesten Fassung.
Es gelten folgende EU-Rechtsgrundlagen:

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen

2. Untersuchungsmaterial

Bei der klinischen Untersuchung und der Gewinnung von Proben für Laboruntersuchungen müssen gemäß Anhang XII der Delegierten Verordnung (EU) 2020/687 folgende Tiere der unter 1.1. gemäß Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 gelisteten Arten herangezogen werden:

i) Krebstiere, die klinische Anzeichen der Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit aufweisen;

und

ii) Krebstiere, die wahrscheinlich vor Kurzem an einer Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit (bei Verdacht und Bestätigung) verendet sind;

und

iii) Aquakulturtiere mit epidemiologischer Verbindung zu einem Verdachtsfall oder einem bestätigten Fall von Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit.

Die Mindestanzahl der zu ziehenden Proben beträgt bei Berichten über erhöhte Sterblichkeit zehn Krebstiere, bei *Post-mortem*-Befunden oder klinischen Anzeichen der Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit zehn Krebstiere und beim Verdacht auf Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit aufgrund anderer Umstände 150 Krebstiere.

Bei der Beprobung gelten folgende zusätzliche Kriterien:

i) Sind schwache oder moribunde Krebstiere gelisteter Arten in den Produktionseinheiten vorhanden, müssen diese Krebstiere zuerst ausgewählt werden. Sind keine solchen Tiere vorhanden, müssen die ausgewählten Krebstiere Tiere unterschiedlicher Jahrgänge umfassen, die proportional in der Probe vertreten sind;

ii) Wird mehr als eine Wasserquelle zur Krebstierproduktion verwendet, müssen Proben von Krebstieren gelisteter Arten aus allen Wasserquellen genommen werden, sodass alle Teile des Betriebs proportional in der Probe vertreten sind;

iii) Wenn die Entnahme von Proben aus Wildpopulationen gelisteter Arten gemäß Artikel 102 Buchstabe a der Delegierten Verordnung (EU) 2020/687 erforderlich ist, müssen die Anzahl und geografische Verteilung der Probenahmestellen so festgelegt werden, dass eine angemessene Abdeckung des Gebiets, in dem eine Infektion vermutet wird, sichergestellt ist.

Die Probenahmestellen müssen für die verschiedenen Ökosysteme repräsentativ sein, in denen die Wildpopulationen empfänglicher Arten für die Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit leben; dazu gehören Meeres-, Mündungs- und Flusssysteme sowie Seen.

2.1 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.

2.1.1 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.

2.2 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 nichtletale 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.

2.3 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. Beim Probenversand sind die gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Gefahrgut zu beachten; siehe hierzu Verpackungsvorschriften nach IATA bzw. ADR für diagnostische Proben (UN 3373) und Gefahrstoffe wie z. B. Ethanol (UN 1170; entzündbarer flüssiger Stoff, begrenzte Mengen beachten!) und chemische Gefahrstoffe wie z. B. Formalin (UN 2209, begrenzte Mengen beachten!). Verpackung und Beschriftung des zu versendenden Materials müssen mindestens den Anforderungen der Verpackungsvorschrift P650 (Klassifizierung: UN 3373) erfüllen. Sicherer ist es, zusätzlich Biobottles nach Verpackungsvorschrift P620 zu verwenden.
Mit der Laboruntersuchung ist spätestens 48 Stunden nach der Probenahme zu beginnen.

3. Untersuchungsgang

Die hier beschriebenen Methoden und Verfahren orientieren sich am OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, die auch vom EURL für Fisch- und Krebstierkrankheiten empfohlen werden. Es dürfen alternative Ansätze angewendet 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 Methoden aufweisen.
Beim Nachweis von YHV anhand von Gewebeproben sind folgende Schritte erforderlich: Homogenisierung des Gewebes, Extraktion der RNA, spezifische Amplifikation der DNA mittels RT-PCR, Visualisierung des amplifizierten Produkts auf einem Gel, Reinigung der DNA und Sequenzierung zur Bestätigung der Identität des Erregers.

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 s bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren.
Die Stahlkugel jetzt aus dem Eppendorfröhrchen entnehmen und für mindestens 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 Raumtemperatur (RT) inkubieren.
200 µl Waschpuffer RA2 auf blaue Säule geben und 30 s bei 11.000 x g (10000 upm*) zentrifugieren, anschließend Sammelröhrchen wechseln, 600 µl Waschpuffer RA3 auftragen und 30 s 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 alkoholkonserviertem 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

Polymerasekettenreaktion (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 (GenBank Acc. No. 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 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
5x RT-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 Mastermix 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

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

Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen

Durchführungsverordnung (EU) 2019/1715 der Kommission vom 30. September 2019 mit Vorschriften zur Funktionsweise des Informationsmanagementsystems für amtliche Kontrollen und seiner Systemkomponenten („IMSOC-Verordnung“)

Durchführungsverordnung (EU) 2020/690 der Kommission vom 17. Dezember 2019 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der gelisteten Seuchen, die Überwachungsprogrammen in der Union unterliegen, des geografischen Geltungsbereichs solcher Programme und der gelisteten Seuchen, für die der Status „seuchenfrei“ von Kompartimenten festgelegt werden kann

Durchführungsverordnung (EU) 2020/691 der Kommission vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für Aquakulturbetriebe und Transportunternehmer, die Wassertiere befördern

Falldefinition – Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit

Klinisches Bild

Im Anhang der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 sind als empfängliche Arten für eine Infektion mit dem Virus der Gelbkopf-Krankheit aufgeführt: Gulf brown shrimp (*Penaeus aztecus*), Gulf pink shrimp (*Penaeus duorarum*), Kuruma-Garnele (*Penaeus japonicus*), Black Tiger Garnele (Penaeus monodon), Gulf white shrimp (Penaeus setiferus), Blaue Garnele (*Penaeus stylirostris*), Vannamei Garnele (*Penaeus vannamei*). Das Virus befällt blutbildende Organe, Hämozyten, Kiemen, die Subkutis, den Darm, die Antennendrüsen, die Gonaden sowie Nerven und Ganglien. Das Virus kann lebenslang persistieren. Klinische Symptome bei Mortalitäten bis 100 % sind:

- gelbliche Verfärbung des Cephalothorax (Aufhellung des Hepatopankreas)
- Rötungen an Körper und Gliedmaßen, gelb-rosa Verfärbung der Kiemen
- Inappetenz
- Konzentration der Tiere an der Oberfläche und den Rändern der Teiche

Inkubationszeit: sieben bis zehn Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Der labordiagnostische Nachweis kann mit folgenden Methoden erfolgen:

Mikroskopische Untersuchung

- Infektion spezifisch-pathogenfreier Tiere

Erregernachweis:

- RT-PCR (lymphoides Organ, Kieme, Hämolymphe) gefolgt von Sequenzierung
- Ergänzende aber nicht spezifische Methoden:
  - Elektronenmikroskopie (Kieme, lymphoides Organ)
  - Western Blot (Hämolymphe)
  - *In-situ*-Hybridisierung

Epidemiologischer Zusammenhang

Verdächtige Fälle sollten mit der PCR überprüft werden. In freien Ländern, Zonen oder Kompartimenten sollten positive PCR-Befunde durch Sequenzierung bestätigt werden. Virusnachweis bei chronischer Infektion und geringer Erregerprävalenz ist nicht alleiniger Beleg für die Krankheitsursache.

Voraussetzung für den Verdacht

Erhöhte Mortalität und klinische Symptome

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:
Erregernachweis in ecto- oder mesodermalen Geweben durch RT-PCR und Sequenzierung

Rechtsvorschriften

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/687 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen

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