

Amtliche Methodensammlung

Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Infektiöse Hämatoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Infektiöse Hämatoetische Nekrose (IHN) und die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden sind in der Aquakultur die ökonomisch bedeutsamsten Rhabdovirusinfektionen. Die Erreger beider Fischseuchen verursachen in Europa große wirtschaftliche Schäden durch Verluste von bis zu 100 % sowohl in Fischzuchtanlagen als auch in freien Gewässern. Darauf basierend sind die IHN und VHS in der Gesetzgebung innerhalb der Europäischen Union (EU) als nicht exotische Seuchen aufgeführt und somit anzeigepflichtig (Anhang IV, Teil II der 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).

Die VHS hat als Infektionskrankheit vor allem Bedeutung bei Salmonidenarten. Empfänglich sind nach der Aquakultur-Richtlinie 2006/88/EG (1): Hering (*Clupea spp.*), Felchen (*Coregonus sp.*), Hecht (*Esox lucius*), Schellfisch (*Gadus aeglefinus*), Pazifischer Kabeljau (*Gadus macrocephalus*), Dorsch (*Gadus morhua*), Pazifischer Lachs (*Oncorhynchus*-Arten), Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Seequappe (*Onos mustelus*), Forelle (*Salmo trutta*), Steinbutt (*Scophthalmus maximus*), Sprotte (*Sprattus sprattus*) und Esche (*Thymallus thymallus*). Bei Wildfischen wurden natürliche Epizootien selten festgestellt. Große Bedeutung haben die für VHS empfänglichen Wildfische allerdings als Carrier und Überträger des Erregers. In den letzten Jahren wurden von zahlreichen marinen Spezies aus dem nordamerikanischen Teil des Pazifischen Ozeans, aus dem Nordatlantik und aus der Ostsee VHS-Viren isoliert. Der Hering (*Clupea pallasi*, *Clupea harengus*) spielt eine besondere Rolle bei der Übertragung von VHS aus den marinen in die Süßwassergebiete. Auch wurde VHSV schon bei der Japanischen Flunder (*Paralichthys olivaceus*) nachgewiesen. Die marinen Isolate galten bisher für Süßwasserfische als nicht oder nur schwach virulent. Mittlerweile sind über 80 verschiedene Fischarten beschrieben, die für VHS empfänglich sind. Der Erreger der VHS wurde in Asien, Amerika und Europa nachgewiesen und kommt in Deutschland endemisch vor.

IHN ist eine Infektionskrankheit der Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), verschiedener Pazifischer Lachse und des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*). Nach der EU-Richtlinie 2006/88/EG (1) gelten als IHN-empfindlich: Keta-Lachs (*Oncorhynchus keta*), Silberlachs (*O. kisutch*), Japan-Lachs (*O. masu*), Regenbogenforelle (*O. mykiss*), Rotlachs (*O. nerka*), Biwa-Forelle (*O. fhodurus*), Königslachs (*O. tshawytscha*) und Atlantischer Lachs (*Salmo salar*). Die Bachforelle (*Salmo trutta fario*) gilt als IHN-widerstandsfähig, wenngleich nicht völlig resistent. Erreger der IHN wurden isoliert in Nordamerika, Asien und Europa.

Die Erreger der IHN (IHN) und der VHS (VHSV) gehören innerhalb der Ordnung Mononegavirales zur Familie der Rhabdoviridae. Das Genom der Rhabdoviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA negativer Polarität von ca. 11.000 Base welches für fünf Strukturproteine codiert. IHN und VHSV unterscheiden sich

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

von anderen Rhabdoviren durch die Bildung des Nichtstrukturproteins NV ("non virion"). Basierend auf der Genomorganisation und der Bildung des NV-Proteins werden IHNV und VHSV taxonomisch dem Genus Novirhabdovirus zugeordnet.

Insgesamt gibt 3 VHSV Serotypen wobei die Mehrzahl der VHS-Ausbrüche in der Aquakultur Europas durch Isolate des Serotyps 1 (F1) verursacht wird. Alle bisherigen IHNV-Isolate sind serologisch einheitlich, weshalb sich Unterschiede nur bedingt mit verschiedenen mAk feststellen lassen. Auf der Grundlage der Gensequenz können die Isolate in verschiedene Genogruppen unterteilt werden. Eine sichere Differenzierung von identifizierten IHNV- bzw. VHSV-Isolaten ist mit den bislang vorhandenen mAk oft nicht möglich, daher erlaubt nur die genetische Charakterisierung eine eindeutige Identifizierung der Erreger. Basierend auf den Sequenzanalysen werden Veränderungen dieser Virusisolate verfolgt und Rückschlüsse auf die Herkunft des Erregers gezogen.

1.2 Klinische Symptomatik

Das klinische Bild einer VHS ist definiert als eine mit Ödemen und Hämorrhagien einhergehende Erkrankung mit folgenden Symptomen:

- Lethargie (Randsteher) und sporadische Hyperaktivität,
- Dunkelfärbung (Abb. 1A),
- Exophthalmus (Abb. 1B),
- Anämie,
- Auftreiben des Leibes (durch Aszites),
- Pseudofaeces (lange weißliche, aus dem Rektum heraushängende Auswürfe),
- Hämorrhagien, vorrangig an den Flossenansätzen (Abb. 1C),
- Inappetenz.

Die klinischen Symptome werden unter natürlichen Bedingungen bei Wassertemperaturen von 4 bis 14 °C ausgebildet. Bei perakuten Todesfällen können diese Symptome fehlen. Die Inkubationszeit beträgt bei Wassertemperaturen von 8 bis 10 °C etwa 7 Tage. Sie ist abhängig vom Alter der Fische, von der Wassertemperatur, der Infektionsdosis und der Virulenz des Erregers.

Bei einem VHS-Ausbruch in einer bis dahin virusfreien Population unterscheidet man gewöhnlich 3 Phasen. An die erste, akute Phase, gekennzeichnet durch hohe Fischverluste in einer relativ kurzen Zeit, schließt sich eine zweite Phase mit chronischem Verlauf an. In der dritten, sogenannten „nervösen“ Phase zeigen die Fische zentralnervöse Störungen, die durch Drehung um die Längsachse oder plötzliche, spiralförmige Schwimmbewegungen der Fische gekennzeichnet sind.

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden



Abb. 1: An VHS erkrankte Forellen mit Dunkelfärbung der Haut (A), Exophthalmus (B) und petechialen Hämorrhagien in der Muskulatur und auf inneren Organen (C) (© FLI)

Das klinische Bild einer IHN ist charakterisiert als eine ebenfalls mit Ödemen und Hämorrhagien einhergehende Krankheit gleicher Symptomatik:

- Lethargie und sporadische Hyperaktivität,
- Dunkelverfärbung,
- Exophthalmus,
- Anämie,
- Auftreiben des Leibes (durch Aszites),
- Pseudofaeces (lange weißliche, aus dem Rektum heraushängende Auswürfe),
- Hämorrhagien, vorrangig an den Flossenansätzen
- Inappetenz.

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

Die klinischen Symptome werden bei Wassertemperaturen von 8 bis 15 °C ausgebildet. Bei perakuten Todesfällen können die Symptome fehlen. Die Inkubationszeit nach Infektion mit dem Erreger ist abhängig vom Alter der Fische, von der Wassertemperatur, der Infektionsdosis und dem Infektionsmodus (Wasser, Futter, Eier, Sperma). In der Regel beträgt sie ein bis zwei Wochen. Betroffen sind vor allem Brütlinge mit einer Verlustrate von bis zu 100 %, während die Mortalität bei einjährigen Setzlingen nur 10 % beträgt. Ältere Salmoniden erkranken selten. Das IHNV kann nur zu bestimmten Zeiten des Lebenszyklus infizierter Lachse isoliert werden, d. h., bei sterbender Brut oder sterbenden Setzlingen bzw. bei laichreifen Fischen. Die auffälligsten klinischen bzw. pathologisch-anatomischen Symptome der IHN und VHS sind die Absonderung der Fische vom Schwarm, Dunkelfärbung der Haut und Exophthalmus sowie vielfältige hämorrhagische Diathesen und katarrhalische Enteritis. Auf Grund klinischer und pathologisch-anatomischer Symptomatik lassen sich VHS und IHN nicht unterscheiden.

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch müssen die IHN und VHS von der Infektiösen Pankreasnekrose (IPN), verursacht durch Aquabirnaviren sowie von anderen septikämischen Erkrankungen z.B. bakteriellen Infektionen unterschieden werden.

1.4 Diagnostische Indikation

In Abhängigkeit von der Art der Überwachung oder, wenn als Ergebnis der klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchung oder auf Grund epizootiologischer Erhebungen der Verdacht des Ausbruchs der IHN oder VHS geäußert wird, sind Fische an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Zugelassene regionale Untersuchungsämter der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor für IHN und VHS, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. +49 38351-7-1254/-1692
- EU Referenzlabor für Fischkrankheiten, DTU National Veterinary Institute, Section for Virology, Fish Diseases Unit (EURL), Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C, Denmark, Tel. +45 25 52 05 80

Die virologischen Untersuchungen zum Nachweis der Erregerfreiheit für die Anerkennung seuchenfreier Gebiete bzw. Fischhaltungsbetriebe, zur Überwachung der Seuchenfreiheit bzw. zur Bestätigung von IHN- bzw. VHS-Verdachtsfällen werden in den zugelassenen, regionalen Untersuchungsämtern der Bundesländer durchgeführt. Das Nationale Referenzlaboratorium für IHN und VHS am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems koordiniert die Diagnose von Fischseuchen auf der Grundlage der EU- und nationalen Gesetzgebung. Zur Klärung fraglicher Befunde oder zur Bestätigung der Ergebnisse der regionalen Diagnoselaboratorien bei Ausbruch einer Fischseuche in einem als seuchenfrei erklärten Bestand oder

Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

Gebiet sind die Virusisolate zur Identifizierung und molekularbiologischen Charakterisierung an das Referenzlabor einzusenden. Repräsentative Isolate werden an das EU-Referenzlaboratorium übergeben, das die Diagnose der Fischseuchen auf EU-Ebene koordiniert.

1.6 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 (ABl. L 328 vom 24.11.2006, S. 14)
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (FischSeuchV 2008, BGBl. I S. 2315) zuletzt geändert durch Artikel 30 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388)
- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) vom 22. Mai 2013 (BGBl. I S. 1324 (Nr. 25))
- 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)
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des Office International des Epizooties (O.I.E.) in der jeweils aktuellen Ausgabe

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Proben-Auswahl

Die Probenahme bei Fischen zwecks virologischer Untersuchung wird in der Entscheidung 2001/183/EG zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG beschrieben. Die Untersuchungs- und Probenahme ist geregelt für:

- Gebiete und Betriebe in nicht zugelassenen Gebieten während des zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erstzulassung als VHS- und/oder IHN-frei (2001/183/EG, Tab. 1A),
- den zweijährigen Kontrollzeitraum vor der Erstzulassung als VHS und/ oder IHN-frei in Gebieten und Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten mit amtlich anerkannter Freiheit von diesen Seuchen (2001/183/EG, Tab. 1B) und
- für Gebiete und Betriebe in nicht zugelassenen Gebieten zur Aufrechterhaltung der Zulassung als VHS- und/oder IHN-frei (2001/183/EG, Tab. 1C).

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

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.

Wer eine genehmigungspflichtige Tätigkeit nach § 3 Fischseuchenverordnung ausübt, hat empfängliche Fischarten nach Maßgabe des Anhangs III Teil B der Richtlinie 2006/88/EG in geeigneter Weise untersuchen zu lassen. Sofern eine Laboruntersuchung hierfür erforderlich ist, ist diese von einem von der zuständigen Behörde benannten Laboratorium durchzuführen.

Probennahmen zwecks virologischer Untersuchung müssen ebenfalls erfolgen bei:

- Ansteckungsverdacht,
- im Rahmen epizootiologischer Nachforschungen sowie
- bei der Erlangung und Aufrechterhaltung eines EU-Status als zugelassener Betrieb oder zugelassenes Gebiet.

Bei der Begehung des Fischhaltungsbetriebes müssen alle Produktionsanlagen (Teiche, Becken, Netzgehege, usw.) auf verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische kontrolliert werden. Besondere Beachtung ist dem Wasserabflussbereich sowie den Teichrändern zu widmen, wo sich geschwächte Fische häufig aufhalten. Vorhandene geschwächte, verhaltensgestörte oder frisch verendete Fische (noch blassrote Kiemen) sind für die Beprobung auszuwählen. Sind diese nicht vorhanden, müssen die Fische so ausgewählt werden, dass sich die Probe proportional aus normal erscheinenden, gesunden Fischen aller Produktionseinheiten des Betriebes sowie aller Jahresklassen zusammensetzt.

Die Auswahl erfolgt entsprechend der klinischen Symptomatik. Dunkelverfärbung (Abb. 1A), Apathie und am Teichrand stehende Fische sind Hinweise auf Konditionsschwäche. Exophthalmus (Abb. 1B) kann auf eine Erkrankung viraler Genese hindeuten.

Im Rahmen einer Untersuchung sollten in Betrieben mit Regenbogenforellen nur Fische dieser Art für die Probennahme gewählt werden. Sind keine Regenbogenforellen vorhanden, so muss die Probe Fische aller für das VHS und/oder IHN empfänglichen Arten des Betriebes umfassen.

Wird für die Fischproduktion mehr als eine Wasserquelle verwendet, so müssen bei der Probennahme alle Wasserquellen berücksichtigt werden.

Eine Probe sollte aus maximal 10 Fischen bestehen.

Die klinische Untersuchung und die Entnahme von Gewebeproben im Rahmen von Routineuntersuchungen sind bei einer Wassertemperatur unter 14 °C durchzuführen. Die Wassertemperatur des zu beprobenden Wasserkörpers sollte dokumentiert werden.

Bei Brütlingen muss die Probe aus mindestens 20, bei Fischen über 5 cm Länge aus mindestens 10 Fischen bestehen.

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

2.2 Gewebeproben

Die zu untersuchenden Fische müssen tierschutzgerecht betäubt werden. Unmittelbar nach Betäubung hat die Organentnahme zu erfolgen. Dieses geschieht mit Hilfe von sterilen Sektionsinstrumenten (Schere, Skalpell, Pinzette, Mikrolöffel). Nach einem Querschnitt vor dem After, wird die Bauchseite mit einer geraden Schnittführung bis zur Kopfunterseite geöffnet (Ventralschnitt). Zum Freilegen der Organe der Leibeshöhle wird die Körperwand mit Hilfe eines bogenförmigen Lateralschnittes vom After über die Seitenlinie bis zur Kiemenhöhle entfernt. Für die virologischen Untersuchungen sollten Herz, Milz, Vorderniere (Kopfniere) und u.U. Gehirn entnommen werden. Zur Entnahme der Vorderniere, die unter der Wirbelsäule liegt, werden Magen, Darm, Leber, viscerales Fett, Pylorusschläuche und die Schwimmblase entfernt.

Der Kiemendeckel wird entfernt (Operkularschnitt) und der Schädel wird mit Hilfe eines Sagittalschnittes aufgespalten, um das Gehirn freizulegen.

Besteht die Probe aus Fischen von weniger als 4 cm Länge, so sollten diese mit Hilfe einer sterilen Schere oder einem sterilen Skalpell nach Entfernen der hinter der Darmöffnung liegenden Körperteile zerlegt werden. Wenn die Fische zwischen 4 und 6 cm lang sind, sollten die Innereien einschließlich der Nieren entnommen werden.

Die Gewebeproben werden in sterile Gefäße verbracht, die ein Transportmedium (Nährmedium mit 10 % Kälberserum und Antibiotika) enthalten. Empfehlenswert ist ein Gemisch aus 200 IE Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Kanamycin je ml; es können aber auch andere erprobte Antibiotika verwendet werden. Untersucht werden Milz, Vorderniere sowie entweder Herz oder Gehirn.

In Betrieben mit Laichfischen muss auch Ovarliquor untersucht werden (siehe Entscheidung 2001/183/EG). Ovarliquor fällt nur beim Abstreifen von laichreifen Salmoniden (Forellenartigen) in ausreichender Menge an.

Ovarliquor oder Organteile von zehn Fischen sind als Sammelprobe in ein Gefäß mit Transportmedium zu verbringen, das mindestens 4 ml Transportmedium enthält. Das Transportmedium muss in jedem Fall die Sammelprobe vollständig bedecken. Jede Gewebeprobe sollte mindestens 0,5 g wiegen.

Abbildungen zur Probennahme sind im speziellen Teil des Tierseuchenbekämpfungshandbuchs, Kapitel Fischseuchen, enthalten.

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

2.3 Probenversand

Proben müssen nach Voranmeldung direkt zur Untersuchungsstelle verbracht werden.

Fische können getötet, **unzerteilt** und gekühlt (maximal 10 °C) ohne Wasser in einem Plastikbeutel transportiert werden.

Ferner können Fische auch **lebend** verbracht werden. Dazu werden Transportbeutel geeigneter Beschaffenheit und Größe zu einem Drittel mit sauberem Transportwasser und zu zwei Drittel mit technischem Sauerstoff befüllt. Die sicher verschlossenen Beutel werden in liegender Position in einen Transportkarton oder in eine Styroporkiste verbracht. In der warmen Jahreszeit, sollte für zusätzliche Kühlung gesorgt werden. Es ist darauf zu achten, dass das Transportwasser in ständiger Bewegung bleibt, damit das Wasser während des Transportes ausreichend Sauerstoff aufnehmen kann.

Die Entnahme von **Gewebeproben** kann im Fischhaltungsbetrieb vorgenommen werden. Das Probenmaterial muss auf dem schnellsten Weg zum Untersuchungslabor verbracht werden. Die Probengefäße sollten in Isolationsbehälter (z. B. dickwandige Styroporkästen) und zur Gewährleistung einer ununterbrochenen Kühlung bis ins Labor mit ausreichend Eis oder Kühlelementen versehen werden. Ein Anfrieren ist zu vermeiden. Während des Transports sollte die Temperatur im Behälter zu keiner Zeit mehr als 10 °C betragen. Proben sind nach Möglichkeit per Kurier an das zuständige Untersuchungslabor zu schicken. Sie sind in jedem Fall telefonisch oder schriftlich (E-Mail) anzukündigen.

Mit der virologischen Untersuchung ist baldmöglichst zu beginnen, spätestens jedoch 48 Stunden nach der Probennahme.

Im Anschreiben zum Probenversand sollten folgende Angaben enthalten sein:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Fax-Nummer sowie E-Mail Adresse)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

Im Rahmen epidemiologischer Nachforschungen sind folgende zusätzliche Angaben hilfreich:

- Wie groß ist der Bestand? Tierarten?
- Art des Bestandes (Kategorie, Betriebsart)
- Bestehen Kontakte zu IHN und/ oder VHS infizierten Beständen?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

3. Untersuchungsgang

3.1 Aufbereitung der Proben für die virologische Untersuchung

Unter sterilen Kautelen entnommene Organe (Milz, Kopf- bzw. Vorderniere, Herz oder Gehirn) und/oder Ovarialflüssigkeit sind in ein steriles Kunststoffröhrchen zu füllen, das steriles Zellzuchtmedium für Fischzelllinien mit 10 % fötalem Kälberserum sowie Antibiotika, z. B. 200 I.E. Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Kanamycin oder 50 µg Enrofloxacin pro ml (=Transportmedium) enthält. Ovarialflüssigkeit oder Organteile von maximal 10 Fischen können als Sammelprobe mit einem Gesamtgewicht von mindestens 0,5 g je 10 ml Kunststoffröhrchen gefüllt werden. Das Volumen des Transportmediums ist abhängig von der Masse der Organprobe. Das Verhältnis Organ: Medium sollte 1:10 betragen.

Organteile von bis zu 10 Fischen können als Poolprobe in einem Plastikgefäß gesammelt und für die Untersuchungen verwendet werden. Das Gesamtgewicht der Poolprobe sollte etwa 1.0 +/- 0.5 g pro Gefäß nicht überschreiten. Nach dem Homogenisieren mittels Stomacher, Mixer, Mörser, Mikrohomogenisatorstempel wird der Organbrei im Volumenverhältnis von 1:10 in dem ursprünglichen Transportmedium suspendiert. Kleine Fische (weniger als 6 cm) werden nach Entfernung des hinter der Darmöffnung liegenden Körperteiles in toto homogenisiert. Alternativ kann die Gewebeprobe mit dem Tissue Lyser (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers homogenisiert werden. Anschließend wird das Homogenat für 15 min bei 2.000-4.000 x g und einer Temperatur von 5-12 °C zentrifugiert. Wurde die Probe nicht in einem antibiotikahaltigem Medium versandt, ist der Überstand für 4 Stunden bei 15 °C oder über Nacht bei 4-8 °C antibiotisch (z. B. 1 mg/ml Gentamycin) zu behandeln.

Nach Sterilfiltration des Überstandes (0.8-0.45 µm) werden Fischzellen mit dem geklärten Überstand inokuliert.

Erfolgt die virologische Untersuchung ausnahmsweise nicht sofort oder sind Wiederholungsuntersuchungen notwendig, kann die Probe bei -80 °C gelagert werden. Die Untersuchung ist jedoch innerhalb von 14 Tagen vorzunehmen.

Um einen IPNV-bedingten CPE auszuschließen, kann der Überstand vor der Zellkultur-Beimpfung mit IPNV-Antiseren (Titer im 50 %-Plaquetest mindestens 1:2.000 gegen die einheimischen IPNV-Serotypen) gemischt und für mindestens 1 Stunde bei 15 °C oder für höchstens 18 Stunden bei 4 °C inkubiert werden.

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

3.2 Virologische Untersuchung

Zur diagnostischen Bestätigung einer IHN bzw. VHS Infektion ist nach der gültigen Rechtslage (RL2006/88/EG, RL 2001/183/EG) der Virusnachweis zu erbringen. Folgende Verfahren sind anzuwenden:

- a) Virusisolierung mit anschließendem serologischen Virusnachweis,
- b) Virusisolierung mit gleichzeitigem serologischen Virusnachweis
- c) Andere Diagnoseverfahren IFAT, ELISA

Zur Diagnose eines ersten IHN bzw. VHS Ausbruchs in Betrieben zugelassener Gebiete sind Ergebnisse der Verfahren c) durch a) oder b) zu bestätigen.

Zellkulturen und Nährmedien

Das Untersuchungsmaterial wird auf das Vorhandensein viraler Erreger in zwei unterschiedlichen Zelllinien überprüft. Der Virusnachweis muss auf Zellen der Elritze **und** Regenbogenforelle bzw. Sonnenbarsch erfolgen. Empfohlen werden die Zellen CCLV Rie 57 (FHM) und CCLV Rie 173 (EPC) der Elritze, die Zellen CCLV Rie 38, 686 (RTG-2, RTG-2/f) und CCLV Rie 88 (RT/F) der Regenbogenforelle bzw. die Zellen CCLV Rie 290 (BF-2) des Sonnenbarsch. Die Anzucht der Zellen erfolgt in geeigneten Zellkulturmedien z. B. Eagles Minimum Essential Medium unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und geeigneter Temperatur zwischen 20 und 27 °C. Informationen zur Anzucht der Zellen sind in den Datenblättern der Zellbank des FLI aufgeführt.

Die Medien sind bei Zellvermehrung in geschlossenen Flaschen mit Bikarbonat oder bei Anzucht in offenen Systemen (z. B. Zellzuchtplatten) mit Tris-HCl (23 mM) und Natriumbikarbonat auf einen pH Wert von 7,6 zu puffern.

Zum Zeitpunkt der Beimpfung sollten die Zellkulturen 8 bis 24 Stunden alt, d.h., ca. 90 % konfluent sein. Die Empfänglichkeit (Infektionsanfälligkeit) der Zellkulturen ist alle 6 Monate durch Titration mit VHS- und IHN-Referenzvirusproben (Lagerung bei -80 °C) zu überprüfen (siehe RL 2001/183/EG, Teil IV).

Anzucht des Erregers in der Zellkultur

Das Untersuchungsmaterial wird auf mindestens zwei der oben beschriebenen Fischzellen der Elritze **und** Regenbogenforelle bzw. Sonnenbarsch verbracht. Dazu wird die mit Antibiotikum versetzte Organsuspension (Organ : Medium = 1:10) unverdünnt und 1:10 verdünnt auf die Zellkultur gegeben. Dadurch entsteht eine Endverdünnung des Organmaterials im Zellkulturmedium von etwa 1:100 und 1:1.000. Ein Verhältnis von Inokulum zu Zellkulturmedium von 1:10 ist empfehlenswert. Für jede Verdünnungsstufe und Zelllinie ist eine Zellkulturfläche von mindestens 2 cm² (entspricht einer Mulde einer 24-Well-Zellkulturplatte) zu verwenden. Die Inkubation der infizierten Zellkulturen erfolgt unter CO₂ Begasung bei geeigneter Temperatur (15 °C). Täglich erfolgt die lichtmikroskopische Beobachtung der infizierten Zellen im Vergleich zur nichtinfizierten und mit Referenzvirus infizierten Zellkontrolle auf das Auftreten eines CPE. Die beimpften Zellkulturen sind für 7 bis maximal 10 Tage zu bebrüten. Bei offenkundigem CPE ist der Virusnachweis durch einen Antigen- und/ oder Genomnachweis zu bestätigen.

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

Tritt bei der Stammkultur ein toxischer CPE innerhalb der ersten 3 Tage des Bebrütens auf, so ist die Kultur in diesem Stadium zu passagieren. Nach Inkubation dieser Passage für 7 Tage muss eine weitere Subkultivierung (= 3. Passage) für 7 Tage bei geeigneter Temperatur erfolgen. Entwickelt sich ein toxischer CPE erst nach 3 Tagen, so sollte die Stammkultur nur einmal passagiert werden und so lange bebrütet werden, so dass eine Gesamtzeit von 14 Tagen ab der Erstinokulation erreicht wird. In den letzten 7 Tagen des Bebrütens sollte keine Toxizität mehr auftreten.

Tritt nach 7- bis 10-tägiger Erstbebrütung kein CPE auf, so erfolgt eine Passage auf frische Zellkulturen mit einer Fläche von mindestens 2 cm² (24 well). Die Zellen werden durch einen Gefrier-Tau-Prozess zerstört. Aliquote Volumina von sämtlichen Kulturen (Flaschen oder Mulden) jeder Zelllinie werden zu einer Sammelprobe vereint. Die Sammelproben werden wie zuvor beschrieben in einer Endverdünnung von 1:100 und 1:1.000 zur Infektion homologer Zellkulturen eingesetzt. Ein Verhältnis von Inokulum zu Zellkulturmedium von 1:10 ist empfehlenswert. Vor der Passage können die Sammelproben mit IPNV-Antiserum inkubiert werden. Die Passagen werden erneut bei 15 °C für 7 bis maximal 10 Tage bebrütet.

3.3 Virusnachweis

Virusnachweisverfahren

Bei offenkundigem Auftreten eines CPE erfolgt die Virusidentifizierung mit mindestens einem der folgenden Verfahren: Virusneutralisationstest, Immunfluoreszenztest, Enzymimmuntest.

Haben diese Tests nach einer Woche keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, ist das Isolat an das nationale Referenzlaboratorium für Fischkrankheiten einzusenden. Die zum Virusnachweis verwendeten Diagnostika müssen bezüglich Qualität, Titer und Spezifität vom nationalen Referenzlaboratorium (NRL) zugelassen sein (siehe www.fli.bund.de/ zentraler Service/Zulassungsstelle).

Virusneutralisation (VNT)

Zur Beseitigung von Zellresten wird das virushaltige Zellkulturmaterial für 5 min bei 2.000 bis 4.000 x g zentrifugiert oder filtriert (0,45 µm). Anschließend wird die zellfreie Virussuspension 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt. Aliquote Mengen der Verdünnungen werden jeweils mit folgenden Reagenzien versetzt und für 60 Minuten bei 15 °C bebrütet:

- gruppenspezifische VHSV-Antikörper, 1:50 verdünnt,
- gruppenspezifische IHNV-Antikörper, 1:50 verdünnt,
- Mix spezifischer Antiseren gegen einheimische IPNV-Serotypen (Referenzstämme Sp, Ab, VR299), 1:50 verdünnt (oder wie vom Hersteller oder vom Referenzlabor angegeben),
- Zellkulturmedium.

Von jedem Virus-Serum-Gemisch werden 50 µl in mindestens 2 Kavitäten einer 24-Well-Zellkulturplatte (oder im Verhältnis von 1:10 in andere Zellkulturgefäße) verimpft und bei 15 °C bebrütet.

Alternativ können auch andere erprobte Neutralisationsteste angewandt werden.

Infektiöse Hämotopoietische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

Indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest (IFAT)

Virale Antigene werden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nicht-infizierte und mit Referenzvirus infizierte Fischzellen dienen als Kontrolle für den Antigen-Nachweis. Um Artefakte zu vermeiden, ist ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden.

Das Zellkulturmedium wird von den nichtinfizierten und infizierten Zellen entfernt. Medium haltige Reste werden durch vorsichtiges Waschen der Zellen mit PBS entfernt.

Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 80%igem Aceton für 10-20 min bei Raumtemperatur oder einem Aceton/Methanolgemisch (1:1) bei -20 °C für 20 min. Alternativ ist auch eine Fixierung mit 96 % Ethanol für 5 min bei 2-10 °C möglich.

Fixierte Zellen werden anschließend mit Puffer (PBS) gespült und mit einer IHNV bzw. VHSV spezifischen Antikörperlösung (nach Vorgaben des Herstellers in PBS verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nichtgebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 min von den Zellen entfernt.

Die Bindung der Virus spezifischen Antikörper wird durch Adsorption eines FITC markierten Spezies-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. FITC markiertes Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein (1. AK vom Kaninchen) oder FITC markiertes Anti-Maus-IgG (1.AK von der Maus) wird nach Vorgaben des Herstellers in PBS verdünnt. Die Zellen werden mit dieser 2. Antikörperlösung benetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden anschließend dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und mit A. dest. gespült. Das Material kann optional mit Fluoreszenz-Erhaltungspuffer incl. Propidiumjodid zur Kernfärbung (Fa. Roth) eingebettet werden. Die Analyse und Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 2).

Der Antigen-Nachweis ist auch im direkten Immunofluoreszenztest möglich. Dazu werden nach der Fixierung und Waschung der Zellen (wie oben beschreiben) FITC- markierte virusspezifische Antikörper zur Detektion verwendet.

Empfohlene Antikörper:

mAK VHS Fa. BioX BIO 282 (IP5B11) FLI-B 646 Charge aVHS14C04 gültig bis 31.03.16

mAK IHN Fa. BioX BIO 285 (136/3) FLI-B 647 Charge aIHN14C04 gültig bis 31.03.16

Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

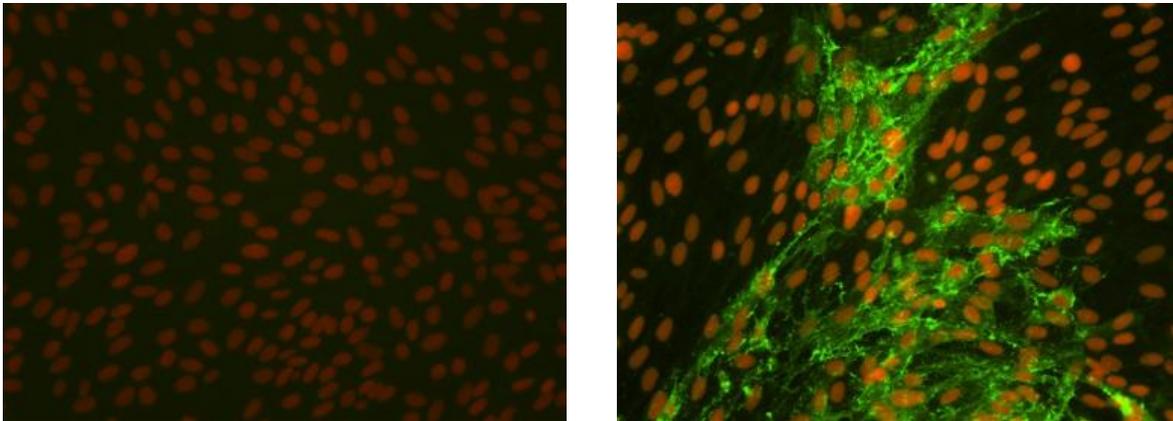


Abb. 2: Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von VHSV in CCLV Rie 38 RTG-2-Zellen (1 dpi, 1.AK: mAk VHS BioX 1:20, FITC Alexa Fluor 488 anti Maus IgG Invitrogen 1:600) Kernfärbung mit Propidiumiodid) (© FLI)

Enzymimmuntest (ELISA)

Zur Durchführung des ELISA zum Nachweis von IHNV und VHSV werden die Testkits BIO K264-Duo (VHSV, IHNV) bzw. BIO K 272 (VHSV) der Fa. BioX empfohlen. Derzeit ist der ELISA Kit BIO K264-Duo (VHSV, IHNV) in Deutschland zugelassen. Dieses Diagnostikum ist sehr spezifisch aber nicht sehr sensitiv. Voraussetzung für den Einsatz ist eine hohe Viruskonzentration im Zellkulturmaterial. Für den ELISA Kit BIO K 272 (VHSV) zum Nachweis von VHSV wird derzeit ein Zulassungsverfahren in Deutschland angestrebt.

Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung anderer fischpathogener Viren werden die Testkits BIO K 282 (IPNV ELISA Test Kit) und BIO K 275 (SVCV ELISA Test Kit) empfohlen. Die Durchführung, Validierung und Interpretation der Ergebnisse des Testes erfolgen entsprechend der beiliegenden Gebrauchsanweisung. Der ELISA ist entsprechend den Protokollen des EU RL für Fischerkrankungen (www.eurl-fish.eu) bzw. des OIE durchzuführen.

Andere diagnostische Verfahren

Entsprechend der derzeit gültigen Rechtslage ist der Virusnachweis als diagnostische Bestätigung eines VHS-Verdachttes vorgeschrieben. Obwohl die Verfahren zum Genomnachweis sehr sensitiv und effizient sind, sind sie in der gültigen Rechtsprechung noch nicht anerkannt. Dies birgt die Gefahr einer Verbreitung der anzeigepflichtigen Erkrankung. Der Erreger kann in Fischen persistieren (Genom nachweisbar) und bei geeigneten Bedingungen (z. B. niedrige Wassertemperaturen im Herbst) wieder zum Krankheitsausbruch führen (Kim et al., 1999).

Aus diesem Grund wird von der EU im Entwurf zur Gesetzesänderung der Richtlinie 2006/88/EC der Genomnachweis ebenfalls als diagnostische Bestätigung gefordert.

Nach Ratifizierung der geänderten Richtlinie werden die Methoden entsprechend in der Methodensammlung aufgeführt.

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

Anhang

Abkürzungen

BF-2	Bluegill fry-2 (Zelllinie vom Sonnenbarsch, CCLV Rie 88 oder 290)
CPE	zytopathischer Effekt
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (Zelllinie der Elritze, CCLV Rie 173)
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay
FHM	Fathead minnow (Zelllinie der Elritze, CCLV Rie 57)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IFAT	indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest
IHN(V)	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (Virus)
IPN(V)	Infektiöse Pankreasnekrose (Virus)
MEM	Minimal Essential Medium
OPD	Ortho-Phenyldiamin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RTG-2	Rainbow trout gonad-2 (Zelllinie der Regenbogenforelle, CCLV Rie 38 oder 686)
VHS(V)	Virale Hämorrhagische Septikämie (Virus)
VNT	Virusneutralisationstest

Bezugsquellen für diagnostische Reagenzien und Zellkulturen

FLI, Insel Riems, Institut für Infektionsmedizin - Nationales Referenzlaboratorium für IHN und VHS:

- VHS-Referenzvirus
- IHN-Referenzvirus
- IPN-Referenzviren (Serotypen Ab, Sp, VR299)

FLI, Insel Riems, Zentralabteilung - Zellbank:

- Zelllinie FHM, Katalog-Nr. CCLV Rie 57
- Zelllinien RTG-2, Katalog-Nr. CCLV Rie 38, CCLV Rie 686
- Zelllinien BF-2, Katalog-Nr. CCLV Rie 88, CCLV Rie 290
- Zelllinie EPC, Katalog-Nr. CCLV Rie 173

Kommerziell erhältliche Diagnostika:

- Monoklonale Antikörper Anti-VHSV
- Monoklonale Antikörper Anti-IHNV
- Monoklonale Antikörper Anti-IPNV
- Monoklonale Antikörper Anti-VHSV FITC-konjugiert
- Monoklonale Antikörper Anti-IHNV FITC-konjugiert

Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) und Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) der Salmoniden

- Monoklonale Antikörper Anti-IPNV FITC-konjugiert
- VHSV-Antigen-ELISA
- IHNV-Antigen-ELISA
- IHNV-VHSV-Antigen-ELISA

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.bund.de