

Amtliche Methodensammlung

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

- 1. Charakterisierung der Infektion**
- 2. Untersuchungsmaterial**
- 3. Untersuchungsgang**

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

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Infektiöse Hämatopoetische 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 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: 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*), Äsche (*Thymallus thymallus*) und Japanische Flunder (*Paralichthys olivaceus*). Der Saibling (*Salvelinus fontinalis*) wird in der Fachliteratur als empfänglich und als Carrier für VHS beschrieben (Pilcher & Fryer, 1980; Wizigmann *et al.*, 1980; Enzmann & Konrad, 1984; Rasmussen, 1965). 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. Heringe (*Clupea pallasii*, *Clupea harengus*) spielen eine besondere Rolle bei der Übertragung von VHS aus den marinen in die Süßwassergebiete (Dixon *et al.* 1997, Dixon 1999, Bootland & Leong, 1999). Die VHS verursachte ebenfalls bei der Japanischen Flunder (*Paralichthys olivaceus*) erhebliche Verluste (Kim *et al.*, 2003). 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 gelten als IHNV-empfindlich: Keta-Lachs (*Oncorhynchus keta*), Silberlachs (*O. kisutch*), Japan-Lachs (*O. masu*), Regenbogenforelle (*O. mykiss*), Rotlachs (*O. nerka*), Biwa-Forelle (*O. rhodurus*), Königslachs (*O. tshawytscha*) und Atlantischer Lachs (*Salmo salar*). Pilcher & Fryer (1980) beschreiben die Empfänglichkeit des Saiblings (*Salvelinus fontinalis*) für IHN und seine Bedeutung als Carrier bei der Übertragung dieser Erkrankung. Erreger der IHN wurden isoliert in Nordamerika, Asien und Europa.

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

Die Erreger der IHN (IHNV) 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 Basen, welches für fünf Strukturproteine codiert. IHNV und VHSV unterscheiden sich 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 es drei VHSV Serotypen. Die Mehrzahl der VHS-Ausbrüche in der Aquakultur Europas wird durch Isolate des Serotyps 1 (F1) verursacht. Alle bisherigen IHNV-Isolate sind serologisch einheitlich, weshalb sich Unterschiede nur bedingt mit verschiedenen mAk feststellen lassen. Auf der Grundlage der Gensequenz werden die Isolate in verschiedene Genogruppen unterteilt. 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 Differenzierung der Erreger. Basierend auf den Sequenzanalysen werden Veränderungen dieser Virusisolate verfolgt. Die Analysen zur genetischen Verwandtschaft der Erreger unterstützen epidemiologische Untersuchungen zur Herkunft und Verbreitung des Erregers.

1.2 Klinische Symptomatik

Die auffälligsten klinischen bzw. pathologisch-anatomischen Symptome der IHN und VHS sind die Absonderung der Fische vom Schwarm, Dunkelfärbung der Haut, Exophthalmus sowie vielfältige hämorrhagische Diathesen. Auf Grund klinischer und pathologisch-anatomischer Symptomatik lassen sich VHS und IHN nicht sicher unterscheiden. Insbesondere nach Durchseuchung kann sowohl die IHN als auch die VHS symptomlos verlaufen, was die Erkennung und Bekämpfung der Erkrankungen erschwert (Pilcher & Fryer, 1980; Wizigmann *et al.*, 1980; Enzmann & Konrad, 1984; Rasmussen, 1965; Enzmann & Konrad, 1985). Der Erreger kann in Fischen persistieren (Genom nachweisbar) und unter bestimmten Bedingungen (z. B. niedrige Wassertemperaturen im Herbst, Stress etc.) wieder zum Krankheitsausbruch führen (Kim *et al.*, 1999).

Die Inkubationszeit nach Infektion mit dem Erreger der IHN bzw. VHS ist abhängig vom Alter der Fische, von der Wassertemperatur, der Infektionsdosis und dem Infektionsmodus (Wasser, Futter, Eier, Sperma) und der Virulenz des Erregers. In der Regel beträgt die Inkubationszeit ein bis zwei Wochen. Während die Mortalität bei der VHS insbesondere bei Setzlingen und adulten Fischen sehr hoch sein kann, sind bei der IHN vor allem Brütlinge mit einer Verlustrate von bis zu 100 % betroffen. Ältere Salmoniden erkranken selten an der IHN. Bei perakuten Todesfällen können diese Symptome fehlen. 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 klinischen Symptome werden unter natürlichen Bedingungen bei Wassertemperaturen von 8 bis 15 °C (IHN) bzw. 4 bis 14 °C (VHS) ausgebildet.

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

Das klinische Bild sowohl der VHS als auch der IHN ist definiert als eine mit Ödemen und Hämorrhagien einhergehende Erkrankung mit folgenden möglichen 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.

Bei einem VHS-Ausbruch in einer bis dahin virusfreien Population unterscheidet man gewöhnlich drei 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.



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

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

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 epizootologischer Erhebungen der Verdacht eines Ausbruchs der IHN oder VHS besteht, sind Fische an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- benannte Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), 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~~ National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Kemitorvet, building 202, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark, Tel. Phone: +45 25 52 05 80

Die Diagnostik zum Nachweis der Erregerfreiheit für die Erklärung der Seuchenfreiheit von Zonen bzw. Kompartimenten (Aquakulturbetriebe), zur Überwachung der Seuchenfreiheit bzw. zur Bestätigung oder Ausschluss eines IHN- bzw. VHS-Verdachts wird in den benannten Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt. Das Nationale Referenzlaboratorium (NRL) 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. Die Klärung fraglicher Befunde der regionalen Diagnoselaboratorien, insbesondere bei Ausbruch der IHN und/oder VHS in einem oder einer zuvor als seuchenfrei erklärten Kompartiment oder Zone, erfolgt am FLI entsprechend den gesetzlichen Vorgaben. Zur Unterstützung epidemiologischer Nachforschungen der IHN und/oder VHS können die Virusisolate zur genetischen Charakterisierung an das Referenzlabor am FLI gesendet werden. Das FLI kann repräsentative Isolate an das EU-Referenzlaboratorium übergeben, das die Diagnose der Fischseuchen auf EU-Ebene koordiniert.

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

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 derzeit gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 (FischSeuchV 2008, BGBl.I S.2315) in der derzeit gültigen Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) vom 22. Mai 2013 (BGBl. I S. 1324 (Nr. 25) in der derzeit gültigen Fassung
- Durchführungsbeschluss der Kommission 2015/1554 vom 11.09.2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden (ABl. L247 vom 23.09.2015, S.1)
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des Office International des Epizooties der (O.I.E.) in der jeweils aktuellen Ausgabe

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Probenauswahl

Grundlage für die Probenahme und Diagnosemethoden zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen ist der Durchführungsbeschluss 2015/1554/EG vom 11.09.2015 mit den Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden.

Gesundheitsuntersuchungen und Probenahmen sind geregelt für:

- Zonen und Kompartimente während des zweijährigen Kontrollzeitraums (2015/1554/EG Tab. 1.A) und vierjährigen Kontrollzeitraums (2015/1554/EG Tab. 1B) vor Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf VHS und/oder IHN,
- Zonen und Kompartimente zur Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf VHS und/oder IHN (2015/1554/EG Tab. 1C) entsprechend des ermittelten Risikoniveaus.

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

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

zu lassen. Sofern eine Laboruntersuchung hierfür erforderlich ist, ist diese von einem von der zuständigen Behörde benannten Laboratorium durchzuführen.

Gesundheitsuntersuchungen und Probenahmen zwecks virologischer Untersuchung müssen ebenfalls erfolgen:

- bei Verdacht auf eine Infektion mit VHSV und/oder IHNV,
- In Betrieben mit empfänglichen Arten, die innerhalb eines Sperrgebietes liegen.

Gesundheitsuntersuchungen und ggf. Probenahmen zwecks virologischer Untersuchung müssen ferner bei Ansteckungsverdacht bzw. im Rahmen von epidemiologischen Nachforschungen erfolgen. Gesundheitsuntersuchungen und Probenahmen sind bei einer Wassertemperatur < 14 °C durchzuführen, bzw. wenn der wahrscheinlich niedrigste Jahreswert des Gewässers erreicht wird. Die Dokumentation der Wassertemperatur zum Zeitpunkt der Probenahme ist empfehlenswert. Intervalle zwischen den Untersuchungen bzw. Probenahmen müssen mindestens vier Monate betragen bzw. so lang wie möglich sein, wobei die zuvor genannten Temperaturanforderungen zu berücksichtigen sind. In Betrieben sind alle Produktionseinheiten insbesondere auch die Wasserquellen und Wasserabflussbereiche auf verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische zu überprüfen.

Für die Beprobung sind IHN und VHS empfängliche Fischarten nach folgenden Kriterien auszuwählen:

- Regenbogenforellen
- andere empfängliche Arten, mit typischen Anzeichen einer IHN oder VHS
- Sind keine Regenbogenforellen vorhanden, muss die Probe alle anderen vorhandenen empfänglichen Arten repräsentieren.
- Geschwächte, verhaltensgestörte und soeben verendete Fische (ohne Anzeichen der Zersetzung)
- Berücksichtigung aller Wasserquellen
- Proportionale Zusammensetzung der Probe aus Fischen aller Altersklassen und aller Produktionseinheiten des Betriebes.

Die Häufigkeit der Gesundheitsuntersuchungen und Probenahmen und die Zahl der zu beprobenden Fische muss den Anforderungen des § 7 Abs. 1 der Fischseuchenverordnung entsprechen. Die Durchführung erfolgt entsprechend dem Risikoniveau zur Erhaltung (Tabelle 1) des Seuchenfreiheitsstatus, dem Überwachungssystem zur Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf IHN und/oder VHS (Tabelle 2 und 3) bzw. der Kontrollen bei Verdacht oder Ausschluss auf eine dieser Erkrankungen (Tabelle 4).

Die Tabellen 2 und 3 geben einen allgemeinen Überblick zur Anzahl der Probenahmen bzw. zum Probenumfang entsprechend des zwei- oder vierjährigen Kontrollzeitraums vor Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf IHN und/oder VHS. Das zu untersuchende Probenmaterial ist abhängig

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

von der Tiergröße und den durchzuführenden Untersuchungsmethoden (Tabelle 5). Eine Probe sollte im Allgemeinen Organteile oder Ovarial- bzw. Samenflüssigkeit von maximal zehn Fischen enthalten. Im Falle von Probenahmen zum Genomnachweis der IHN und VHS bei Vorliegen einer geringen Menge an Inokulum ist Gewebematerial von maximal fünf Tieren zu poolen. Probenahmen in Betrieben einer Schutzzone (= Sperrgebiet), die nicht offiziell als VHS und/oder IHN verseucht erklärt worden sind, erfolgen gemäß Tabelle 4.

Tabelle 1: Überwachung zur Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf IHN und/oder VHS

Risikoniveau	Gesundheitsuntersuchung einschließlich Probenahme	Anzahl der Tiere
Hoch	2 x jährlich	2 x 30
Mittel	1 x jährlich	1 x 30
gering	1 x alle 2 Jahre	1 x 30

Tabelle 2: Überwachung vor Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf IHN und/oder VHS -
zweijähriger Kontrollzeitraum

Art des Betriebes	Zahl der Gesundheitsuntersuchungen pro Jahr (zwei Jahre)	Zahl der Probenahmen pro Jahr (zwei Jahre)	Zahl der Fische in der Probe ¹	
			Zahl der Brütlinge, Setzlinge, Speisefische	Zahl der Laichfische ²
a) Betriebe mit Laichfischen	2	2	50 (1. Untersuchung) 75 (2. Untersuchung)	30 (1. oder 2. Untersuchung) 0 (1. oder 2. Untersuchung)
b) Betriebe, in denen ausschließlich Laichfische gehalten werden	2	1	0	75 (1. oder 2. Untersuchung)
c) Betriebe ohne Laichfische	2	2	75 ³ (1. oder 2. Untersuchung)	0
Höchstzahl der Fische je Poolprobe: 10				
¹ Die Proben sind frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu entnehmen. ² Ovarial- und Samenflüssigkeit von Laichfischen wird zum Zeitpunkt der Reife in Verbindung mit dem „Abstreifen“ entnommen. ³ Proben müssen von einer Anzahl Fische genommen werden, die die Erkennung von IHN und/oder VHS mit einer statistischen Zuverlässigkeit von 95 % sicherstellt, wenn die Design-Prävalenz 5 % beträgt.				

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

Tabelle 3: Überwachung vor Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf IHN und/oder VHS - vierjähriger Kontrollzeitraum

Art des Betriebes	Zahl der Gesundheitsuntersuchungen pro Jahr	Zahl der Probenahmen pro Jahr	Zahl der Fische in der Probe ¹	
			Zahl der Brütlinge, Setzlinge, Speisefische	Zahl der Laichfische ²
Erste zwei Jahre des Überwachungszeitraumes				
a) Betriebe mit Laichfischen	2	1	0 (1. Untersuchung) 30 (2. Untersuchung)	0 (1. und 2. Untersuchung)
b) Betriebe, in denen ausschließlich Laichfische gehalten werden	2	1	0	30 (1. oder 2. Untersuchung)
c) Betriebe ohne Laichfische	2	1	30 ³ (1. oder 2. Untersuchung)	0
Letzte zwei Jahre des Überwachungszeitraumes				
a) Betriebe mit Laichfischen	2	2	30 (1. Untersuchung) 0 (2. Untersuchung)	0 (1. Untersuchung) 30 (2. Untersuchung)
b) Betriebe, in denen ausschließlich Laichfische gehalten werden	2	2		30 (1. und 2. Untersuchung)
c) Betriebe ohne Laichfische	2	2	30 ³ (1. und 2. Untersuchung)	
Höchstzahl der Fische je Poolprobe: 10				
¹ Die Proben sind frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu entnehmen. ² Ovarial- und Samenflüssigkeit von Laichfischen wird zum Zeitpunkt der Reife in Verbindung mit dem „Abstreifen“ entnommen. ³ Proben müssen von einer Anzahl Fische genommen werden, die die Erkennung von IHN und/oder VHS mit einer statistischen Zuverlässigkeit von 95 % sicherstellt, wenn die Design-Prävalenz 5 % beträgt.				

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

Tabelle 4: Bestätigung oder Ausschluss der IHN oder VHS bei Verdacht

Verdacht	Keine Klinik	Klinik
Gesundheitsuntersuchung	1	1
Anzahl der Probenahmen	1	1
Anzahl der Tiere	≥ 30	10

Tabelle 5: Probenmaterial in Abhängigkeit von der Tiergröße und den Untersuchungsmethoden

Fischgröße	Material	Virologischer Nachweis, Genomnachweis ≥ 0.5 g	Genomnachweis ≤ 0.5 g ^{1,2}
Laichfische	Ovarialflüssigkeit	k. A.	k. A.
< 4 cm	Körper oberhalb der Darmöffnung	≤ 10 Tiere/ Pool	≤ 5 Tiere/ Pool
4 - 6 cm	Innereien einschl. Nieren	≤ 10 Tiere/ Pool	≤ 5 Tiere/ Pool
> 4 cm	Nieren, Milz, Herz u./o. Gehirn	≤ 10 Tiere/ Pool	≤ 5 Tiere/ Pool

k. A. - keine Angabe

¹⁾ Vorliegen einer geringen Menge an Inokulum

²⁾ Alternativ können 0,2 g des Probenmaterials in 1 ml RNA-Stabilisator bis zur weiteren Verarbeitung (Genomnachweis) gelagert werden. Dieses Material ist für virologische Untersuchungen nicht geeignet.

2.2 Gewebeprobe

Zur Entnahme des Probenmaterials müssen die zu untersuchenden Fische tierschutzgerecht betäubt und getötet werden. Unmittelbar danach hat die Tötung durch Entbluten und die Organentnahme mit sterilen Sektionsinstrumenten (Schere, Skalpell, Pinzette, Mikrolöffel) zu erfolgen. Nach einem Querschnitt vor dem After, wird die Bauchseite mit einer geraden Schnittführung bis zur Kopfunterseite geöffnet (Ventrialschnitt). 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 müssen Milz und Vorderniere (Kopfnieren) sowie entweder Herz oder Gehirn entnommen werden. Zur Detektion chronisch infizierter Fische wird die Entnahme von Gehirn empfohlen. Zur Entnahme der Vorderniere, die unter der Wirbelsäule liegt, werden Magen, Darm, Leber, viscerales Fett, Pylorusschläuche und die Schwimmblase entfernt.

Zur Gehirnentnahme wird der Schädel z. B. mit Hilfe eines Sagittalschnittes aufgespalten, um das Gehirn freizulegen.

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

Bei der Beprobung von Laichfischen können auch Ovarial- oder Samenflüssigkeit untersucht werden (EG 2015/1554, Tab.1B).

Das zu verwendende Probenmaterial ist abhängig von der Körpergröße der Tiere (Tabelle 5).

Fische von weniger als 4 cm Länge werden nach Entfernen der hinter der Darmöffnung liegenden Körperteile zerkleinert. Von Tieren einer Länge zwischen 4 und 6 cm, müssen sämtliche Innereien einschließlich der Nieren entnommen werden. Größeren Fischen sind Niere, Milz, Herz und/oder Gehirn zu entnehmen.

Die Gewebeproben oder Ovarial- bzw. Samenflüssigkeit werden in sterile Gefäße verbracht, die mindestens 4 ml Transportmedium (Zellkulturmedium 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. Das Transportmedium muss in jedem Fall die Sammelprobe vollständig bedecken. Jede Gewebeprobe sollte mindestens 0,5 g wiegen. Ausnahme bildet die Probenahme von Tieren zum Zweck des diagnostischen Genomnachweises mittels RT-qPCR. In diesem Fall können 0,2 g Probenmaterial in 1 ml RNA Stabilisierungslösung aufgenommen werden. Mit Einverständnis der Untersuchungseinrichtung kann weiteres Fischgewebe entnommen und für zusätzliche Untersuchungen bereitgestellt werden.

Abbildungen zur Probenahme sind im speziellen Teil des Tierseuchenbekämpfungshandbuches, Kapitel Fischseuchen, enthalten.

2.3 Probenversand

Proben müssen nach Voranmeldung direkt zur Untersuchungsstelle verbracht werden.

Fische können getötet, unzerteilt und gekühlt (maximal 10 °C) ohne Wasser in Saugpapier umhüllt und 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 einem Transportkarton oder in einer 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 Aquakulturbetrieb vorgenommen werden. Das Probenmaterial muss auf dem schnellsten Weg zum Untersuchungslabor verbracht werden. Die Probengefäße sollten in Isolationsbehälter (z. B. dickwandige Styroporkiste) und zur Gewährleistung einer ununterbrochenen Kühlung bis ins Labor mit ausreichend Eis oder Kühlelementen versehen werden. Ein Anfrieren ist zu

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

vermeiden. Während des Transports sollte die Temperatur im Behälter zu keiner Zeit mehr als 10 °C betragen. Bei Ankunft im zuständigen Labor muss noch Eis oder zumindest ein Kühlelement noch teilweise oder vollständig gefroren sein. Proben sind in jedem Fall telefonisch oder schriftlich (E-Mail) anzukündigen und nach Möglichkeit per Kurier an das zuständige Untersuchungslabor zu schicken.

Mit der virologischen Untersuchung ist baldmöglichst zu beginnen, spätestens jedoch 48 Stunden nach der Probenahme. Ist eine Aufarbeitung und Untersuchung des Probenmaterials in dieser Zeit aus technischen Gründen nicht möglich, so ist ein einmaliges Einfrieren der Organproben in Transportmedium bei mindestens -20 °C möglich. Die virologische Untersuchung hat in diesem Ausnahmefall innerhalb von 14 Tagen zu erfolgen. Vor der Untersuchung darf das Probenmaterial nur einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Gründe und Daten dieser Ausnahmesituation sind zu dokumentieren.

Im Anschreiben zum Probenversand sollten folgende Angaben enthalten sein:

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

Im Rahmen epidemiologischer Nachforschungen sind folgende zusätzliche Angaben hilfreich:

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

3. Untersuchungsgang

Zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer IHN- bzw. VHS-Infektion sind der Virusnachweis und/oder der quantitative Genomnachweis erforderlich.

Der Virusnachweis umfasst die Virusisolierung in Zellkultur mit anschließenden immunochemischen oder molekularbiologischen Nachweisverfahren, wie den Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), den

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

(in)direkten Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFAT), den Virusneutralisationstest (VNT) oder die quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR).

Der quantitative Genomnachweis erfolgt mittels RT-qPCR.

Das Auftreten von IHN bzw. VHS gilt als bestätigt, wenn der Virusnachweis und/oder der quantitative Genomnachweis positiv ist.

Ein Verdacht auf IHN und/oder VHS gilt als ausgeräumt, wenn der Virusnachweis und/oder der quantitative Genomnachweis (RT-qPCR) keine Hinweise auf das Vorhandensein des IHN- und/oder VHS-Erregers **bzw. dessen Genom** geben.

Laut Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 sind auch andere Diagnosetechniken, wie der IFAT an Gefrierschnitten oder immunochemische Analysen von Formalin-fixiertem Material möglich. Die Ergebnisse dieser Schnelltechniken müssen innerhalb von 48 Stunden nach Probenahme durch eine virologische Untersuchung ergänzt werden, wenn ein Negativbefund oder ein Positivbefund im Falle eines Erstausbruchs für IHN und/oder VHS vorliegt.

Ein Erstnachweis der IHN und/oder VHS in zuvor für seuchenfrei erklärten Mitgliedsstaaten, Zonen oder Kompartimenten („Primärausbruch“) muss durch den Virusnachweis (Virusisolierung in Zellkultur) oder den quantitativen Genomnachweis (RT-qPCR) bestätigt werden (Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 und Richtlinie 2006/88EG).

Bei einem Erstausbruch der IHN und/oder VHS empfiehlt das FLI zur Absicherung des Befundes die Bestätigung durch eine weitere Methode. D.h. die Ergebnisse der RT-qPCR können im zugelassenen Diagnostiklaboratorium zusätzlich abgesichert werden durch z. B.:

- die Erregeranzucht in der Zellkultur mit anschließenden immunochemischen oder molekularen Verfahren oder
- den qualitativen Genomnachweis (RT-PCR) mit anschließender Sequenzierung des Amplifikates oder
- ein anderes Verfahren zum quantitativen Genomnachweis (anderer Genombereich).

3.1 Aufbereitung der Proben

Gewebeproben in Transportmedium

Das Fischgewebe wird mit einem Stomacher, Mixer oder unter Verwendung von sterilem Sand mit Mörser und Pistill homogenisiert. Alternativ kann die Gewebeprobe mit dem TissueLyser (Qiagen) oder anderen Geräten nach Vorschrift des Herstellers homogenisiert werden. Das Homogenat wird anschließend im ursprünglichen Transportmedium (Zellkulturmedium mit 10 % Kälberserum und Antibiotika) suspendiert und auf ein Volumenverhältnis zwischen Gewebematerial und Transportmedium von 1 : 10 eingestellt. Nach

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

Zentrifugation des Homogenates für 15 Minuten zwischen 2.000 - 4.000 x g bei 2 - 5 °C wird der geklärte Überstand für die weiteren Untersuchungen verwendet. Erfolgte der Probenversand nicht im Transportmedium, so ist eine antibiotische Behandlung des geklärten Organhomogenates für 4 Stunden bei 15 °C oder über Nacht bei 4 - 8 °C erforderlich. Empfehlenswert ist der Zusatz von 200 I.E. Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Kanamycin oder 50 µg Enrofloxacin oder 1 mg Gentamycin je ml geklärtem Homogenat. Optional kann eine Sterilfiltration (0,8 - 0,45 µm) des Überstandes vor der virologischen Untersuchung (Inokulation von Zellkulturen) durchgeführt werden. Mit der virologischen Untersuchung ist innerhalb von 48 Stunden nach Probenahme zu beginnen. In Ausnahmefällen kann mit der virologischen Untersuchung innerhalb von 72 Stunden nach der Materialentnahme begonnen werden, sofern das Untersuchungsmaterial durch das Transportmedium geschützt war und die Temperaturanforderungen während des Transportes erfüllt wurden. Ist dies aus praktischen und technischen Gründen in dieser Zeit nicht möglich, so kann der geklärte Überstand bei -80 °C eingefroren und innerhalb der nächsten 14 Tage virologisch untersucht werden. Da nur ein einmaliges Einfrieren und anschließendes Auftauen des geklärten Organhomogenates zulässig ist, ist ein Aliquotieren des Materials vor der Lagerung bei -80 °C ratsam. Somit ist für mögliche Wiederholungsuntersuchungen die gleiche Qualität des Untersuchungsmaterials gewährleistet.

Gewebeprobe in RNA Stabilisierungsreagenz

Fischgewebe, das direkt in RNA-Stabilisierungsreagenz gesammelt wurde, muss entsprechend seiner Lagertemperatur innerhalb bestimmter Zeiträume für den IHNV und/oder VHSV Genomnachweis aufgearbeitet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Aufarbeitung von Fischgewebe in RNA-Stabilisierungsreagenz

Lagertemperatur	Aufarbeitung innerhalb von:
37 °C	24 Stunden
25 °C	1 Woche
4 °C	1 Monat
-20 °C	unbegrenzt

Im Fall der Aufarbeitung von Gewebeprobe in RNA Stabilisierungsreagenz ist zu beachten, dass die Gewebemenge für die RNA-Extraktion nicht die vom Hersteller empfohlenen Angaben überschreitet. Bei Einsatz größerer Gewebeprobe für die RNA-Extraktion sind die Extraktionsverfahren (Reagenzien und Methoden) entsprechend auszuwählen. Proben, die in RNA-Stabilisierungsreagenzien gesammelt und gelagert wurden, sind für virologische Untersuchungen (Infektion von Zellkultur) nicht geeignet.

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

3.2 Virologische Untersuchung

Neutralisation gegen IPNV

Um einen IPNV-bedingten CPE auszuschließen, ist der Überstand vor der Zellkultur-Beimpfung zu gleichen Teilen mit einem entsprechend verdünnten Mix von IPNV-Antiseren gegen die einheimischen IPNV-Serotypen für mindestens 1 Stunde bei 15 °C oder maximal 18 Stunden bei 4 °C zu inkubieren. Der Titer des IPNV Antiserum-Gemisches muss im 50 %-Plaquetest mindestens 1 : 2.000 betragen.

Die Behandlung aller Inokula mit IPNV-Antiserum (in einigen Teilen Europas sind 50 % der Fischproben mit dem IPN-Virus kontaminiert) dient der Vorbeugung gegen einen IPNV-induzierten zytopathischen Effekt (CPE) bei beimpften Zellkulturen. Eine solche Behandlung kann vorgenommen werden, um die Dauer der virologischen Untersuchungen und die Zahl der Fälle zu reduzieren, bei denen ein zytopathischer Effekt als Indiz für IHN und oder VHSV gewertet werden müsste. Stammen die Proben aus Produktionseinheiten, die als IPN-frei gelten, so kann auf die Behandlung der Inokula mit IPNV-Antiserum verzichtet werden.

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) der Regenbogenforelle bzw. die Zellen CCLV Rie 290 (BF-2), CCLV Rie 88 (RT/F) vom Sonnenbarsch. Die Anzucht der Zellen erfolgt in geeigneten Zellkulturmedien, z. B. Eagles Minimum Essential Medium (Eagle's MEM) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und geeigneter Temperatur zwischen 20 °C und 27 °C. Informationen zur Anzucht der Zellen sind in den Datenblättern der **ZellbankBio-Bank** 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. Erfolgt die Zellkultivierung in offenen Systemen, ist eine Begasung mit 2,5 % CO₂ empfehlenswert.

Zum Zeitpunkt der Beimpfung sollten die Zellkulturen 4 bis 48 Stunden alt, bzw. ca. 90 % konfluent sein. Die Empfänglichkeit (Infektionsanfälligkeit) der Zellkulturen ist alle 6 Monate durch Titration mit VHS- und IHN-Referenzviren (Lagerung bei -80 °C) zu überprüfen.

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

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

(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. Das Verhältnis von Inokulum zu Zellkulturmedium muss etwa 1 : 10 betragen. Für jede Verdünnungsstufe und Zelllinie ist eine Zellkulturfläche von mindestens 2 cm² (entspricht einer Mulde einer 24-Well-Zellkulturplatte) zu verwenden. Entsprechende Positivkontrollen (IHNV und/oder VHSV Referenzmaterial) sowie Negativkontrollen sind bei jeder Untersuchung mitzuführen. Die Inkubation der infizierten Zellkulturen einschließlich der Kontrollen erfolgt bei 15 °C. Die Infektion von Zellen in offenen Zellkultursystemen erfolgt zusätzlich unter 2,5 % CO₂ Begasung. Täglich erfolgt die lichtmikroskopische Beobachtung der infizierten Zellen im Vergleich zu den nichtinfizierten und mit Referenzvirus infizierten Zellkontrollen 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- (ELISA, IFAT, VNT) und/oder Genomnachweis (RT-PCR und/oder RT-qPCR) zu bestätigen.

Tritt nach 7- bis 10-tägiger Erstbebrütung kein CPE auf, so erfolgt eine Passage auf frischen Zellkulturen mit einer Fläche von mindestens 2 cm² (24 well). 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. Die Passagen werden erneut bei 15 °C für 7 bis maximal 10 Tage bebrütet. Tritt innerhalb der ersten 3 Tage nach Erstinfektion ein toxischer CPE auf, so muss in dieser Phase eine Subkultivierung erfolgen. Nach Inkubation dieser Passage für 7 Tage ist eine weitere Subkultivierung (= 3. Passage) für 7 Tage bei geeigneter Temperatur (15 °C) durchzuführen.

Entwickelt sich ein toxischer CPE erst nach 3 Tagen, so sind die infizierten Zellen nur ein weiteres Mal zu passagieren und so lange zu bebrüten, bis eine Gesamtzeit von 14 Tagen ab der Erstinokulation erreicht wird. In den letzten 7 Tagen des Bebrütens sollte keine Toxizität mehr auftreten.

Ist die Probe trotz Antibiotikabehandlung mit Bakterien kontaminiert, so ist der Überstand vor der Subkultivierung 15 bis 30 Minuten zwischen 2.000 und 4.000 x g bei 2 - 5 °C zu zentrifugieren und/oder durch eine 0,45 µm Membran zu filtrieren. Zusätzlich gilt für die Subkultivierung das zuvor beschriebene Verfahren unter Zusatz von Antibiotika.

Tritt nach zwei bzw. drei Passagen bei einer Gesamtinkubationszeit von 14 Tagen kein CPE auf, so ist der Test als negativ zu bewerten.

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

3.3 Virusnachweis

Virusnachweisverfahren

Bei offenkundigem Auftreten eines CPE erfolgt die Virusidentifizierung mit mindestens einem der folgenden Verfahren: Virusneutralisationstest, Immunfluoreszenztest, Enzymimmuntest, RT-(q)PCR.

Haben diese Tests nach einer Woche keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, ist das Isolat an das nationale Referenzlaboratorium für Fischkrankheiten weiterzuleiten. Die zum Virusnachweis verwendeten Diagnostika müssen bezüglich Qualität, Titer und Spezifität vom nationalen Referenzlaboratorium (NRL) zugelassen sein (siehe <https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-des-fli/>).

Virusneutralisation (VNT)

Zur Beseitigung von Zellresten wird das virushaltige Zellkulturmaterial für 5 Minuten 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 im Zellkulturmedium verdünnt. Aliquote Mengen von mindestens zwei Verdünnungen werden jeweils mit gleichen Teilen der folgenden Reagenzien versetzt und für 60 Minuten bei 15 °C bebrütet:

- Serum mit gruppenspezifischen VHSV-Antikörpern, 1 : 50 verdünnt,
- Serum mit gruppenspezifischen IHNV-Antikörpern, 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 (Positivkontrolle).

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 Neutralisationstestverfahren angewandt werden.

VHSV- und/oder IHNV-Isolate, die nicht im Neutralisationstest reagieren, müssen durch andere Methoden (IFAT, ELISA, RT-(q)PCR) nachgewiesen werden.

Indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest (IFAT)

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

IHNV und VHSV empfängliche Zellen werden in 24-well-Platten ausgesät und bei geeigneter Temperatur kultiviert. Zellen mit einer Konfluenz von 60 - 90 % (ca. 8 - 24 Stunden nach Aussaat) werden mit dem

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

virushaltigen Zellkulturüberstand in doppelten Ansätzen in mindestens zwei verschiedenen Verdünnungen (1 : 10 und 1 : 1.000) beimpft und bei 15 °C für 24 Stunden inkubiert.

Anschließend wird das Zellkulturmedium von den nichtinfizierten und infizierten Zellen entfernt. Mediumhaltige Reste werden durch vorsichtiges Waschen der Zellen mit PBS entfernt.

Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 80%igem Aceton für 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur oder einem Aceton/Methanolgemisch (1 : 1) bei -20 °C für 20 Minuten. Alternativ ist auch eine Fixierung mit 96 % Ethanol für 5 Minuten bei 2 - 10 °C möglich. Fixierte Zellen werden anschließend mit PBS gespült und mit einer IHN- bzw. VHSV-spezifischen Antikörperlösung (nach Vorgaben des Herstellers in PBS verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nachweis von IHNV bzw. VHSV sind amtlich zugelassene monoklonale Antikörper zu verwenden. Zugelassene Diagnostika mit den jeweils gültigen Chargen, inkl. der Laufzeit, sind auf der Internetseite des FLI unter Service/Zulassungsstelle aufgeführt.

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

Die Bindung der virusspezifischen Antikörper wird durch Adsorption eines FITC markierten speziesspezifischen Antikörpers nachgewiesen. Dazu wird FITC markiertes Anti-Maus-IgG nach Vorgaben des Herstellers in PBS verdünnt. Die Zellen werden mit dieser zweiten Antikörperlösung benetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden anschließend dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und abschließend 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).

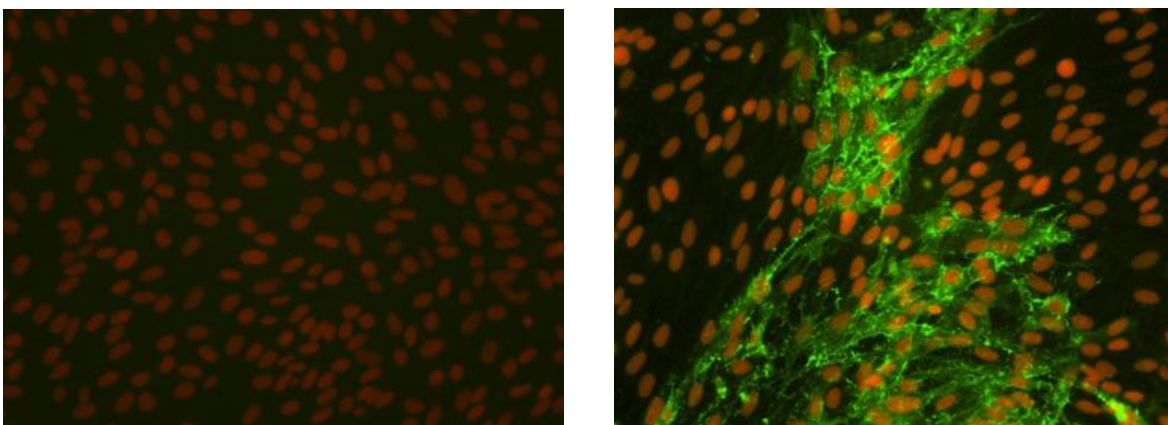


Abb. 2: Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von VHSV in CCLV Rie 38 RTG-2-Zellen (1 dpi, 1.AK: mAk VHS BioX 1:20, FITC Alexa Fluor 488 anti Maus IgG Invitrogen 1 : 600) Kernfärbung mit Propidiumjodid)

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

Enzymimmuntest (ELISA)

IHNV und VHSV Antigene können im ELISA mit dem in Deutschland zugelassenen Bio-X VHSV-IHNV ELISA Kit (BIO K 264, FLI-B 648) nachgewiesen werden. Dieses *In-vitro*-Diagnostikum ist sehr spezifisch aber nicht sehr sensitiv. Voraussetzung für den Einsatz ist eine hohe Viruskonzentration im Zellkulturmaterial. Die Durchführung, Validierung und Interpretation der Ergebnisse des Testes erfolgen entsprechend den Herstellerangaben. 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.

In Deutschland zugelassene *In-vitro*-Diagnostika (entsprechend gültiger Charge)

- mAK VHS Fa. BioX BIO 282 (IP5B11) FLI-B 646
- mAK IHN Fa. BioX BIO 285 (136/3) FLI-B 647
- Multiscreen AgELISA VHSV-IHNV / Sandwich, Biwell (BIO K 264, FLI-B 648)

3.4 Genomnachweis

RNA Extraktion

Für die RNA-Extraktion wird das RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen) empfohlen. Folgende kommerziell erhältliche RNA-Extraktionskits haben sich bislang bewährt: RNeasy Mini Kit (Qiagen), QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen), QIAamp Cadore Pathogen Mini Kit (Qiagen), High Pure viral Kit (Roche). Andere Extraktionsverfahren (z. B.: NucleoSpin 96 Virus Kit (Machery-Nagel), MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen)) sind ebenfalls zulässig, solange diese eine hochwertige RNA Qualität gewährleisten und die RNA für die nachfolgenden Protokolle zum Genomnachweis geeignet ist. Als Ausgangsmaterial dient das geklärte Organhomogenat (siehe 3.1 Aufbereitung der Proben/Gewebeproben in Transportmedium), Zellkulturüberstand (siehe 3.2 Virologische Untersuchung/Anzucht des Erregers in Zellkultur) oder Gewebeproben in RNA-Stabilisierungsreagenz (siehe 3.1 Aufarbeitung der Proben/Gewebeproben in RNA-Stabilisierungsreagenz). Die RNA-Extraktion erfolgt aus 100 oder 70 µl geklärtem Organhomogenat bzw. 100 µl Zellkulturüberstand unter Verwendung eines geeigneten RNA-Extraktionskits entsprechend den Angaben des Herstellers. Abschließend wird die RNA mit 60 µl RNase freiem Wasser eluiert. Andere RNA-Extraktionskits und Verfahren (manuell oder automatisiert) sind ebenfalls zulässig, solange eine hochwertige Qualität der isolierten RNA gewährleistet ist. Nachfolgend ist die RNA-Extraktion aus Zellsuspension mit dem RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen) beschrieben. Maximal 200 Ausgangsmaterial (Zellsuspension und Zellkulturüberstand) werden mit 500 µl RLT-Puffer und 5 µl 2-Mercaptoethanol gemischt. Nach Zugabe von 700 µl 70%igem Alkohol und vorsichtigem Mischen erfolgt die Bindung der RNA an eine Silika-Säule. Dazu werden 700 µl des Ansatzes auf die Säule appliziert und für eine Minute bei ca. 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird mit dem restlichen Probenansatz beladen und erneut für eine Minute bei ca. 8.000 x g zentrifugiert. Nach drei Waschstritten (1 x 500 µl RW1 15 sec ca. 8.000 x g, 1 x 500 µl RPE 15 sec ca. 8.000

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

x g, 1 x 500 µl RPE 2 min ca. 8.000 x g) erfolgt die Elution der RNA mit 60 µl RNase freiem Wasser durch Zentrifugation bei ca. 8.000 x g für 1 Minute.

Bei der Extraktion von RNA aus Gewebeproben in RNA-Stabilisierungsreagenz mit kommerziellen RNA-Isolierungs-Kits ist zu beachten, dass die vom Hersteller empfohlene Probenmenge (z.B. RNeasy (Protect) Mini Kit, Fa. Qiagen: maximal 30 mg) nicht überschritten wird. Die Aufarbeitung der Proben erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.

Entsprechend dem Durchführungsbeschluss 2015/1554/EG sind für den Genomnachweis von IHNV und VHSV folgende Methoden zugelassen:

- Quantitativer Genomnachweis (RT-qPCR)
 - Zwei-Schritt-RT-qPCR IHNV nach Purcell *et al.* 2013
 - Ein-Schritt-RT-qPCR VHSV nach Jonstrup *et al.* 2013
 - andere RT-qPCR gleicher Sensitivität und Spezifität
 -
- Qualitativer Genomnachweis (RT-PCR)
 - Ein-Schritt-RT-PCR IHNV nach Emmenegger *et al.* 2000
 - Ein-Schritt-RT-PCR VHSV nach Snow *et al.* 2004
 - andere RT-PCR gleicher Sensitivität und Spezifität

Quantitativer Genomnachweis (RT-qPCR)

Für den quantitativen Genomnachweis wird während der Amplifizierung eines distinkten Bereiches des N-Gens von IHNV bzw. VHSV in der RT-PCR gleichzeitig die gebildete DNA durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Negativ- und Positivkontrollen sind in jedem Fall mitzuführen.

Entsprechend dem Im Durchführungsbeschluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG werden für IHNV eine Zwei-Schritt-RT-qPCR und für VHSV eine Ein-Schritt-RT-qPCR empfohlen. Die entsprechenden Primer und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Andere RT-qPCRen mit erwiesenermaßen ähnlicher Wirksamkeit können ebenfalls zum quantitativen Genomnachweis von IHNV und VHSV verwendet werden.

Tabelle 7: RT-qPCR für IHNV und VHSV (Durchführungsbeschluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG)

Virus	Primer	Sequenz 5' → 3'	Reaktionsbedingungen	Referenz (Quelle)
IHNV	forward	AGAGCCAAGGCACTGTGCG	2-step RT-qPCR • 1 x RT • 1 x qPCR: 1. 50 °C 2 min 2. 95 °C 10 min 3. 95 °C 15 sec 4. 60 °C 1 min 5. Zu Schritt 3. Rep 39	Durchführungsbeschluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG; (Purcell <i>et al.</i> 2013)
	reverse	TTCTTTGCGGCTTGTTGA		
	Sonde	6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB		

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

VHSV	forward	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC	<i>1-step RT-qPCR</i> 1. 50 °C 30 min 2. 95 °C 15 min 3. 94 °C 15 sec 4. 60 °C 40 sec 5. 72 °C 20 sec Zu Schritt 3. Rep 39	Durchführungsbe- schluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG; (Jonstrup <i>et al.</i> 2013)
	reverse	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA		
	Sonde	6FAM-TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG-BHQ1		

Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die RT-qPCR zum Nachweis von IHNV-Genom nach Purcell *et al.* 2013 zum einen ein erhöhtes Kontaminationsrisiko aufweist und zum anderen nicht alle in Deutschland identifizierten IHN-Erreger eindeutig detektiert. Das FLI empfiehlt daher zum Nachweis von IHNV- und VHSV-Genom die RT-qPCR nach Hoferer *et al.* 2019 (Tabelle 8). Die Vorteile dieser Nachweisverfahren sind:

- a) reduziertes Kontaminationsrisiko auf Grund einer Ein-Schritt RT-qPCR zum Nachweis von IHNV-Genom,
- b) Nachweis aller derzeit bekannten IHNV-Erreger auf Grund der modifizierten Sonde,
- c) optimierter diagnostischer Ablauf auf Grund eines einheitlichen Thermoprofils der RT-qPCRen zum Nachweis von IHNV-, VHSV- und IPNV-Genom.

Folgende kommerziell verfügbaren RT-qPCR Kits haben sich bislang bewährt: AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) und SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific).

Tabelle 8: RT-qPCR für IHNV und VHSV (Empfehlung des FLI)

Virus	Primer	Sequenz 5' → 3'	Reaktionsbedingungen	Referenz (Quelle)
IHNV	forward	AGAGCCAAGGCACTGTGCG	<i>1-step RT-qPCR</i> 1. 50 °C 30 min (RT) 2. 95 °C 15 min 3. 94 °C 10 sec 4. 58 °C 30 sec 5. 72 °C 20 sec 6. zu Schritt 3. Rep 39	Hoferer <i>et al.</i> 2019
	reverse	TTCTTTGCGGCTTGTTGA		
	Sonde	FAM-AGCGGGACAGGRATGACAATGGTG-BHQ1		
VHSV	forward	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC		
	reverse	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA		
	Sonde	FAM-TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG-BHQ1		

Die ermittelte analytische Sensitivität dieser RT-qPCRen von 2 - 7 und 13 TCID₅₀/ml IHNV bzw. VHSV (Hoferer *et al.*) sollte zur Bewertung der Ergebnisse/Befunde zuvor unter den jeweiligen Laborbedingungen überprüft bzw. verglichen werden.

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

Qualitativer Genomnachweis (RT-PCR)

Unter Verwendung Virus-spezifischer Primer erfolgt der qualitative Genomnachweis von IHNV bzw. VHSV durch Amplifizierung eines distinkten Bereiches des IHNV-G-Gens bzw. des VHSV-N-Gens nach reverser Transkription (RT) der viralen RNA über die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Zur Vermeidung zusätzlicher Kontaminationen wird eine Ein-Schritt-RT-PCR empfohlen. Das OneStep RT-PCR Kit (Fa. Qiagen) wird bevorzugt eingesetzt. Entsprechende Positiv- und Negativkontrollen sind mitzuführen. Die Durchführung erfolgt in einem 25 µl-Gesamtansatz entsprechend den Herstellerangaben. Die spezifischen Primer und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 89 zusammengefasst. Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration des RNA-Template mindestens 1 µg und maximal 2 µg beträgt. Bei der RNA-Isolierung direkt aus Organmaterial empfiehlt sich unter Umständen eine Verdünnungsreihe der RNA vor der Amplifizierung.

Tabelle 89: RT-PCR für IHNV und VHSV

Virus	Primer	Sequenz 5'→ 3'	Reaktionsbedingungen	Produkt	Referenz (Quelle)
IHNV	forward	AGAGATCCCTACACCAGAGAC	1. 50 °C 30 min 2. 95 °C 2 min 3. 95 °C 30 sec 4. 50 °C 30 sec 5. 72 °C 1 min 6. Zu Schritt 3. Rep 34 7. 72 °C 7 min HOLD 20 °C	693 bp	Durchführungsbeschluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG; (Emmenegger <i>et al.</i> 2000)
	reverse	GGTGGTGTTGTTTCCGTGCAA			
VHSV	forward	ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAG CG	1. 50 °C 30 min 2. 95 °C 15 min 3. 94 °C 30 sec 4. 55 °C 30 sec 5. 68 °C 1 min 6. Zu Schritt 3. Rep 34 7. 68 °C 7 min HOLD 20 °C	505 bp	Durchführungsbeschluss 2015/1554 der RL 2006/88/EG; (Snow <i>et al.</i> 2004)
	reverse	GCGGTGAAGTGCTGCAGTCCCC			

Die Bewertung der RT-PCR erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktion in einem 1,5 % Agarose-Gel mit Ethidiumbromid. Die Größe des PCR-Produktes beträgt 693 bp für IHNV bzw. 505 bp für VHSV. Der Genomnachweis von VHSV unter Verwendung von BF-2-Zellkulturmaterial führt u. U. zu falsch-positiven Ergebnissen. Deshalb sind in diesem Fall die entsprechenden Produkte zu sequenzieren.

Infektiöse Hämatopoietische 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
min	Minuten
OPD	Ortho-Phenyldiamin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RTG-2	Rainbow trout gonad-2 (Zelllinie der Regenbogenforelle, CCLV Rie 38 oder 686)
sec	Sekunden
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

Zugelassene in vitro Diagnostika:

Monoklonale Antikörper Anti-VHSV

Monoklonale Antikörper Anti-IHNV

IHNV-VHSV-Antigen-ELISA

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

Literatur

- Bootland LM & Leong JC. 1999. Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Fish Diseases and Disorders, Vol.3 (ed. by P.T.K.Woo & D.W. Bruno), pp.57-121. CAB International, New York, NY
- Dixon PF, 1999. VHSV came from the marine environment: Clues from the literature, or just red herrings? Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 19: 60 - 65
- Dixon PF, Feist S, Kehoe E, Parry L, Stone, DM & Way, K, 1997. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. Dis. Aquat. Org. 30: 81 - 89
- Enzmann P-J & Konrad M, 1984. Die virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle (VHS) und ihre Bekämpfung in epidemiologischer Sicht. Tierärztl. Umschau 39, 11, 886 - 892
- Enzmann P-J & Konrad M, 1985. Inapparent infections of brown trout with VHS-virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5(4), 81 - 83
- Emmenegger EJ, Meyers TR, Burton TO & Kurath G, 2000. Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. Dis. Aquat. Org. 40, 163 - 176
- Garver KA, Hawley LM, McClure CA, Schroeder T, Aldous S, Doig F, Snow M, Edes S, Baynes C & Richard J, 2011. Development and validation of reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. Dis. Aquat. Org. 95, 97 - 112
- Hoferer M, Akimkin V, Skrypski J, Schütze H & Sting R, 2019. Improvement of a diagnostic procedure in surveillance of the listed fish diseases IHN and VHS. J Fish Dis. 42, 559 - 572.
- Jonstrup SP, Kahns S, Skall HF, Boutrup TS & Olesen NJ, 2013. Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral hemorrhagic septicemia virus. J Fish Dis. 36, 9 - 23
- Kim CH, Dummer DM, Chiou PP & Leong J-AC, 1999. Truncated particles produced in fish surviving infectious hematopoietic necrosis virus infection: Mediators of persistence? J Virol 73, 843 - 849
- Kim S-M, Lee JI, Huong M-J, Park H-S & Park S-I, 2003. Genetic relationship of the VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J Fish Pathol 16, 1 - 12
- LaPatra SE & Fryer JL, 1990. Susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) to infectious hematopoietic necrosis virus. Bull. Eur. Fish Pathol. 10, 125 - 127
- Pilcher KS & Fryer JL, 1980. The viral diseases of fish: A review through 1978. Part 1: Diseases of proven viral etiology. CRC Critical Reviews in Microbiology, 6,2, 287 - 363

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

Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwi RP & Winton JR, 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 447 - 462

Purcell MK, Thompson RL, Garver KA, Hawley LM, Batts WN, Sprague L, Sampson C & Winton JR, 2013. Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.* 106, 103 - 115

Rasmussen CJ, 1965. A biological study of the Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 126, 427

Saksida SM, 2006. Infectious haematopietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia. *Dis Aquat Org* 72, 213 - 223

Snow M, Bain N, Black J, Taupin V, Cunningham CO, King JA, Skall HF & Raynard RS, 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.* 61, 11 - 21

Wizigmann G, Baath C & Hoffmann R, 1980. Isolierung des Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) aus Regenbogenforellen-, Hecht- und Äschenbrut. *Zbl. Vet. Med. B*, 27, 79 - 81

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

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