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

Amtliche Methodensammlung

Ansteckende Blutarmut der Lachse
(Infectious Salmon Anemia, ISA)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infectious Salmon Anemia, ISA)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Infektiöse Anämie (Infectious Salmon Anemia, ISA) ist eine Infektionskrankheit der Atlantischen Lachse (*Salmo salar*) und wird durch ein Orthomyxovirus, dem ISA-Virus (ISAV), verursacht. In Kanada wurde ISA ursprünglich als „Hämorrhagisches Nieren Syndrom (HKS)“ beschrieben. Infizierte Lachsbestände sind in Kanada, Norwegen, den USA, den Färöer- und den Shetland-Inseln, in Schottland und in Chile sowie in Irland bei im Salzwasser lebenden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) nachgewiesen worden. 2001 wurde in Chile ein ISA-Ausbruch beim pazifischen Silberlachs (*O. kisutch*) bestätigt. Weiterhin konnte ISAV aus der Meerforelle (*Salmo trutta trutta*) und dem Atlantischen Hering (*Clupea harengus*) isoliert werden. Diese Fischarten erkranken wie die Regenbogenforelle nicht, können aber als Überträger des Virus fungieren. Nach der Aquakultur-Richtlinie 2006/88/EG (1) sind Regenbogenforelle, Atlantischer Lachs und Bachforelle empfängliche Arten. Ein natürliches Reservoir des ISAV ist bisher nicht bekannt.

Eine Ausbreitung des Virus als eine Folge von subklinischen Infektionen der „Smolt“-Lachse erfolgte nachweisbar von Farm zu Farm durch Wellboats (Schiffe zum Transport oder zur Haltung von Fischen) bzw. von Schlachthäusern oder der Fischindustrie dann, wenn Fische transportiert oder Organmaterial ISA-infizierter Tiere und unbehandeltes Abwasser direkt ins Meer eingeleitet wurden.

Zu den Umweltfaktoren, die die Infektion beeinflussen, zählen in latent infizierten Populationen verschiedene Stressfaktoren, wie z. B. Behandlungen gegen Fischläuse oder Cestoden, aber auch gegen andere Infektionskrankheiten. Diese Belastungen können zwei bis drei Wochen später zu einem ISA-Ausbruch führen.

Deutschland wurde bezüglich ISA 2009 von der EU-Kommission als seuchenfrei erklärt (Entscheidung 2009/177/EG).

Die ISA wird durch ein behülltes Virus hervorgerufen, welches morphologische, biochemische und genomische Eigenschaften der Orthomyxoviren besitzt. Die Krankheit ist aber als nicht exotische Krankheit im Anhang IV der Aquakultur-Richtlinie 2006/88/EG (1) aufgeführt. Laborarbeiten mit ISAV sollten unter L2-Bedingungen nur mit zusätzlichen Auflagen (eingeschränkter Personenverkehr, zwei Tage kein Kontakt zu Nutzfischen) gestattet werden. Für Tierversuche werden L3-Bedingungen empfohlen.
Nach derzeitiger Rechtslage sind nur noch hochpathogene HPR-Del (Deletion in der hoch-polymorphen Region des Haemagglutininesterase-Gens), jedoch nicht mehr die apathogenen undeletierten HPR-0-Stämme des ISAV von seuchenrechtlicher Relevanz.

Die Inzidenz der ISA kann erfolgreich durch die Einführung von allgemeinen Maßnahmen, wie der Reglementierung des Fischtransports, einer obligatorischen Kontrolle der Bestände und der Schlachthäuser, reduziert

werden. Gleichzeitig müssen spezifische Maßnahmen festgelegt werden, die infizierte, infektionsverdächtige und deren benachbarte Betriebe betreffen. Die Schlachthaushygiene, das Rein-Raus-Prinzip in produzierenden Farmen sowie die Desinfektion von Abwässern aus Farmen, Schlachthäusern und der fischverarbeitenden Industrie müssen ebenfalls in die Bekämpfung mit einbezogen werden.

1.2 Klinische Symptomatik

Klinisch ist die systemische und letal verlaufende Viruserkrankung durch Anämie, Ascites, geschwollene und vergrößerte Leber (sehr dunkel) und Milz, aber auch durch petechiale Blutungen im Peritoneum gekennzeichnet. Blutungen wurden ebenfalls im Auge beobachtet. Typische histopathologische Befunde sind degenerative und nekrotische Veränderungen in den Leberzellen sowie tubuläre Nekrosen und Blutungen in der Niere. Die Erkrankung tritt meist bei Fischen auf, die im Salzwasser gehalten wurden bzw. Salzwasser ausgesetzt waren. Es häufen sich aber die Berichte über das Auftreten der ISA bei im Süßwasser gehaltenen Lachsen. In der Regel verbreitet sich das Virus dort langsam und besitzt nur eine geringe Virulenz, wohingegen Ausbrüche im Salzwasser durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet sind.

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch sind alle mit Anämie und erhöhter Sterblichkeit einhergehenden Erkrankungen empfänglicher Arten in Betracht zu ziehen. Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE zu finden.

1.4 Diagnostische Indikation

In Abhängigkeit von der Art der Überwachung oder, wenn als Ergebnis der klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchung oder auf Grund epidemiologischer Erhebungen der Verdacht des Ausbruchs der ISA geäußert wird, sind Fische an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden. Ein weiterer diagnostischer Indikator kann Tierverkehr sein.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Benannte Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor für ISA,
  Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. +49 38351-7-1175
- EU Referenzlabor für Fisch- und Krebstierkrankheiten, ~~DTU National Veterinary Institute, Section for Virology, Fish Diseases Unit (EURL), Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C, Denmark, Tel. +45 25 52 05 80~~
  DTU National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Kemitorvet, building 202, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark, Phone: +45 25 52 05 80

Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infectious Salmon Anemia, ISA)

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 ISA-Verdachts wird in den benannten Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt. Deutschland gilt gemäß der Entscheidung 2009/177/EG als ISA-frei. Die Bestätigung eines Primärausbruches erfolgt am NRL für ISA (NRL-ISA) des Friedrich-Loeffler-Instituts.

1.6 Rechtsgrundlagen

ISA ist eine anzeigepflichtige Tierseuche. Die Diagnose und Bekämpfung der ISA ist in Deutschland seit dem 1. April 2016 durch den Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 näher geregelt. Dieser Durchführungsbeschluss ist für die Diagnose der ISA in der Bundesrepublik Deutschland verbindlich und dient daher der Erstellung der im Tierseuchenbekämpfungshandbuch gegebenen methodischen Hinweise. Eine Anleitung zur Diagnose der ISA findet man auch im "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE in der jeweils neuesten Fassung.

Den nachfolgenden Kapiteln liegt der Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 im Wortlaut zu Grunde, wobei gegebenenfalls Ergänzungen vorgenommen wurden.

Weitere 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
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der derzeit gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung (FischSeuchV) in der derzeit gültigen Fassung
- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) 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
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der OIE in der jeweils aktuellen Ausgabe

2. Untersuchungsmaterial

Der Betreiber eines Aquakulturbetriebes hat seinen Fischbestand regelmäßig durch die zuständige Behörde und durch die „mit der Gesundheit von Wassertieren befassten qualifizierten Dienste“ (in Deutschland sind das i. d. R. die Fischgesundheitsdienste) klinisch und ggf. auch virologisch untersuchen zu lassen. Die Kontrollhäufigkeit ist abhängig von der Einordnung des Aquakulturbetriebes in die Kategorien und der damit festgelegten Art der Überwachung laut EU-Richtlinie 2006/88/EG. Sie ist im Anhang I, Teil 3 dieser Richtlinie festgelegt.

Aufgrund des Seuchenfreiheitsstatus erfolgt die Überwachung auf ISA in Deutschland jedoch passiv. Die passive Überwachung bedeutet eine verbindliche unverzügliche Meldung des Auftretens der ISA oder einer erhöhten Mortalität bzw. eines entsprechenden Verdachts. In diesem Falle müssen Gesundheitsuntersuchungen und Laboruntersuchungen eingeleitet werden.

Bei der Beprobung und Laboruntersuchung für die Durchführung von Überwachungs- oder Tilgungsprogrammen gemäß Anhang I Teil 3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 oder zur Bestätigung des Vorliegens der ISA oder zur Ausräumung eines Verdachts darauf gemäß Artikel 57 Buchstabe b der Richtlinie 2006/88/EG ebenfalls in Verbindung mit Anhang I Teil 3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 sind die unter den Nummern I.1, I.2 und I.3 ausgeführten detaillierten Methoden und Verfahren anzuwenden.

2.1 Diagnosemethoden und amtliche Untersuchungen

2.1.1 Proben

Untersucht werden müssen:

a) Histologie: Kopfniere, Leber, Herz, Pankreas, Darm, Milz und Kieme;

b) Immunhistochemie: Rumpfniere, Herz einschließlich Herzklappen und *Bulbus arteriosus*;

c) RT-qPCR-Analyse: Rumpfniere und Herz;

d) Zellkultur: Rumpfniere, Herz, Leber und Milz.

Organteile von höchstens fünf Fischen können gepoolt werden.

2.1.2. Diagnosemethoden für die Erlangung oder Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf die ISA

Die Diagnosemethode für die Erlangung oder Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf die ISA gemäß den Nummern I.2 und I.3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 ist die RT-qPCR, gefolgt von der Sequenzierung positiver Proben gemäß den in Anhang II Teil 3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554

ausgeführten detaillierten Methoden und Verfahren. Ergibt die RT-qPCR einen Positivbefund, so sind weitere Proben zu untersuchen, bevor erste Bekämpfungsmaßnahmen gemäß Artikel 28 der Richtlinie 2006/88/EG durchgeführt werden. Diese Proben sind im Einklang mit den weiter unten aufgeführten detaillierten Methoden und Verfahren wie folgt zu untersuchen:

a) Screening der Proben mittels RT-qPCR, einschließlich Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion
und

b) Untersuchung von Gewebepräparaten mittels spezifischer Antikörper gegen ISAV (IHC an fixierten Gewebeschnitten oder IFAT an Abklatschpräparaten) oder

c) Isolierung und Nachweis des ISAV in einer Zellkultur von mindestens einer Probe von einem beliebigen Fisch im Betrieb.

2.1.3 Amtliche Untersuchung und Diagnosemethoden für den Ausschluss bzw. die Bestätigung des Vorliegens der ISA

Muss ein Verdacht auf ISA gemäß Artikel 28 der Richtlinie 2006/88/EG bestätigt bzw. ausgeräumt werden, so ist folgendes Untersuchungs-, Probenahme- und Testverfahren anzuwenden:

a) amtliche Untersuchung, die mindestens eine Gesundheitsuntersuchung und eine Beprobung von zehn moribunden Fischen umfasst, wenn klinische oder postmortale Anzeichen der ISA beobachtet werden. Werden keine klinischen oder postmortalen Anzeichen der ISA festgestellt, so wird nach der Gesundheitsuntersuchung eine gezielte Beprobung von mindestens 30 moribunden Fischen oder soeben verendeten Fischen normaler Verfassung gemäß Nummer I.1 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 durchgeführt. Die Proben werden gemäß den in Buchstabe b des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 aufgeführten Diagnosemethoden untersucht;

b) ergibt die RT-qPCR einen Positivbefund für HPR-deletiertes ISAV, so sind weitere Proben zu untersuchen, bevor erste Bekämpfungsmaßnahmen gemäß Artikel 28 der Richtlinie 2006/88/EG durchgeführt werden. Ein Verdacht auf ISA-Infektion wird unter Verwendung der detaillierten Methoden und Verfahren in Anhang II Teil 3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 nach folgenden Kriterien bestätigt:

i) Nachweis des ISAV mittels RT-qPCR, einschließlich Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion, und Nachweis des ISAV in Gewebepräparaten mittels spezifischer Antikörper gegen ISAV (IHC an fixierten Gewebeschnitten oder IFAT an Abklatschpräparaten) oder

ii) Nachweis des ISAV mittels RT-qPCR, einschließlich Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletierung und Isolierung und Nachweis des ISAV in einer Zellkultur von mindestens einer Probe von einem beliebigen Fisch im Betrieb;

c) werden klinische, pathologisch-anatomische oder histopathologische Veränderungen beobachtet, die auf ISA hindeuten, so muss dieser Befund gemäß Anhang II Teil 3 des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 durch einen Virusnachweis mittels zweier Diagnosemethoden unterschiedlichen Nachweisverfahren, wie beispielsweise RT-qPCR und IHC, erhärtet werden.

Der Verdacht auf ISA kann ausgeschlossen werden, wenn Tests und Untersuchungen über einen Zeitraum von zwölf Monaten ab dem Zeitpunkt der Verdachtsmeldung keine weiteren Hinweise auf ISA ergeben.

Tabelle 3.A: Überwachungssystem für Zonen und Kompartimente während des zweijährigen Kontrollzeitraums gemäß Nummer I.2.1 vor der Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf die ISA

Jahr der Überwachung	Zahl der Gesundheitsuntersuchungen pro Jahr (zwei Jahre)	Zahl der Laboruntersuchungen pro Jahr (zwei Jahre)	Zahl der pro Jahr zu beprobenden Fische
Jahr 1	6	2(1)	2 * 75(2)
Jahr 2	6	2(1)	2 * 75(2)

(1) Die Proben müssen während zweier jährlicher Testzeiträume von jeweils einem Monat (nämlich im Frühjahr und im Herbst) entnommen, gelagert und untersucht werden oder wenn es aufgrund praktischer Überlegungen angemessen erscheint.

(2) Höchstzahl Fische pro gepoolte Probe: 5.

Tabelle 3.B: Überwachungssysteme für Zonen oder Kompartimente zur Erhaltung des Seuchenfreiheitsstatus in Bezug auf ISA gemäß Nummer I.3(2)

Risikoniveau	Zahl der Gesundheitsuntersuchungen pro Jahr	Zahl der Laboruntersuchungen pro Jahr	Zahl der pro Jahr zu beprobenden Fische
hoch	2	2(1)	2 * 30
mittel	1	1(1)	30
gering	einmal alle zwei Jahre	einmal alle zwei Jahre	30 alle zwei Jahre

(1) Die Proben müssen während zweier jährlicher Testzeiträume von jeweils einem Monat (nämlich im Frühjahr und im Herbst) entnommen, gelagert und untersucht werden oder wenn es aufgrund praktischer Überlegungen angemessen erscheint.

(2) Gilt nicht für Betriebe, in denen ausschließlich Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und/oder Forellen (*Salmo trutta*) aufgezogen werden und deren Wasserversorgung ausschließlich aus Süßwasserquellen stammt, in denen kein Atlantischer Lachs (*Salmo salar*) lebt.

2.2 Aufbereitung der Fischproben

Fischproben für die Zwecke der Laboruntersuchungen auf ISA sind möglichst nicht zu poolen. Für die Zwecke der Überwachung auf ISA dürfen jedoch zwei bis fünf Fische gepoolt werden. Von allen beprobten Fischen sind Proben für die Analyse mittels RT-PCR zu entnehmen. Mithilfe eines sterilen Instruments ist ein Teil der Rumpfniere zu entnehmen und in ein Microfuge-Röhrchen mit 1 ml RNA-Konservierungslösung von erwiesener Wirksamkeit (z. B. RNALater) zu überführen. In einem Röhrchen mit Transportlösung kann Gewebematerial von bis zu fünf Fischen zusammengeführt werden, das dann eine gepoolte Probe darstellt. Das Gewicht des Gewebes in einer Probe muss 0,5 g betragen. Sind die Fische zu klein, um eine Probe mit dem erforderlichen Gewicht zu entnehmen, so sind Teile von Niere, Herz, Milz, Leber oder Pylorusblindsäcken — in dieser Reihenfolge — zu entnehmen, bis ein Gesamtgewicht von 0,5 g erreicht ist.

Gewebe für histologische Untersuchungen sind möglichst von frisch getöteten Fischen zu entnehmen, die auf ISA hindeutende klinische Symptome aufweisen. Äußere oder innere Läsionen sind zu beproben, und auf jeden Fall sind den einzelnen Fischen mithilfe eines Skalpells Proben von Rumpfniere, Herz, Leber, Pankreas, Darm, Kiemen und Milz zu entnehmen und in 8 - 10 % (vol : vol) gepufferte Formalin-Kochsalzlösung zu überführen. Das Verhältnis des Fixierungsmittels zum Gewebe muss mindestens 20 : 1 betragen, damit eine ausreichende Erhaltung der Gewebe gewährleistet ist. Für die immunhistochemischen Untersuchungen sind Proben von Rumpfniere und Herz zu entnehmen.

Von allen beprobten Fischen ist Gewebematerial für virologische Untersuchungen in Zellkultur zu entnehmen. Mithilfe eines sterilen Instruments werden Teile von Leber, Kopf- oder Rumpfniere, Herz und Milz entfernt und in Kunststoffröhrchen mit 9 ml Transportmedium überführt. In einem Röhrchen mit Transportlösung kann Gewebematerial von bis zu fünf Fischen zusammengeführt werden, das dann eine gepoolte Probe darstellt. Das Gewicht des Gewebes in einer Probe muss 1,0 ± 0,5 g betragen.

2.3 Versand von Fischproben

Fische können unzerteilt (ganz) zum Labor gesandt werden, sofern die in Absatz 3 festgelegten Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt werden können. Ganze Fische müssen mit Saugpapier umhüllt und gekühlt in einem Kunststoffbeutel versandt werden.

Fische können auch lebend transportiert werden, jedoch nur unter der Aufsicht des Nationalen Referenzlabors und unter Berücksichtigung der Biosicherheit bei der Beförderung von lebenden Fischen.

Die Blutproben und Röhrchen mit Fischgewebe für die virologische Untersuchung oder für die RT-PCR-Analyse sollten in Isolationsbehälter, z. B. dickwandige Styroporkästen, gepackt werden, die genügend Eis oder Kühlelemente enthalten, um zu gewährleisten, dass die Proben beim Transport zum Labor gekühlt gehalten werden. Ein Anfrieren ist zu vermeiden.

In Ausnahmefällen können RT-PCR-Proben und Proben für die virologische Untersuchung schockgefroren und bei –20 °C oder darunter zum Labor verbracht werden.

Für die RT-PCR-Analyse von Gewebe in RNAlater muss die RNA-Extraktion je nach Lagertemperatur der Proben innerhalb folgender Zeiträume vorgenommen werden:

bei 37 °C gelagerte Proben: innerhalb eines Tages;
bei 25 °C gelagerte Proben: innerhalb einer Woche;
bei 4 °C gelagerte Proben: innerhalb eines Monats;
bei –20 °C gelagerte Proben: unbefristet.

Wird Fischgewebe in Fixierungsmittel für histologische Untersuchungen transportiert, so ist es in auslaufsicheren Röhrchen in stoßfesten Behältern zu versenden. Das Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.

Mit der virologischen Untersuchung auf Zellkultur ist baldmöglichst zu beginnen, spätestens jedoch 48 Stunden nach der Probenahme. In Ausnahmefällen kann die virologische Untersuchung innerhalb von 72 Stunden nach der Materialentnahme begonnen werden, sofern das Untersuchungsmaterial durch das Transportmedium geschützt war und die Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt wurden.

2.4 Entnahme von zusätzlichem Diagnosematerial

Mit Einverständnis des Diagnoselabors können andere Fischgewebe, als die in Nummer 2.1 genannten, entnommen und für Zusatzuntersuchungen aufbereitet werden.

3. Untersuchungsgang

Werden Laboruntersuchungen nach den in Anhang I Teil 3 Abschnitt II des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 aufgeführten Diagnosemethoden zum Zweck der Erlangung oder Erhaltung eines bestimmten Gesundheitsstatus in Bezug auf ISA gemäß Anhang I Teil 3 Abschnitt I des Durchführungsbeschlusses (EU) 2015/1554 oder zum Zweck der Bestätigung des Vorliegens von ISA oder zur Ausräumung eines Verdachts darauf gemäß Artikel 57 Buchstabe b der Richtlinie 2006/88/EG durchgeführt, so sind die im Folgenden unter den Nummern 3.1 bis 3.5 aufgeführten detaillierten Methoden und Verfahren anzuwenden.

3.1 Untersuchung von Proben mittels RT-PCR

Die Diagnosemethode der Wahl für das Screening auf ISA ist die RT-qPCR. Da die Ergebnisse der RT-qPCR in Abhängigkeit von den Bedingungen, unter denen sie durchgeführt wird, unterschiedlich ausfallen können, sind geeignete Positiv- und Negativkontrollen und Amplikons einzubeziehen.

Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infectious Salmon Anemia, ISA)

3.1.1 Gesamt-RNA-Extraktion

Alle Arbeiten mit RNA werden auf Eis und unter Verwendung von Handschuhen durchgeführt.

Die Gesamt-RNA ist mithilfe der Phenol-Chloroform-Methode durch RNA-Affinitäts-Säulen oder durch andere geeignete Methoden (z. B. magnetisch) entsprechend den Anweisungen des Herstellers zu extrahieren.

Die gereinigte RNA wird in destilliertem, RNAse-freiem Wasser (nämlich mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser) erneut suspendiert.

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA sind mittels Messung der optischen Dichte bei 260 nm und bei 280 nm zu überprüfen. Alternativ könnten interne Kontrollen einbezogen werden, die speziell auf das Virusgenom abzielen.

Isolierung viraler und zellulärer RNA aus Zellkulturüberstand

RNeasy Mini Kit, Qiagen

-	100 µl Zellkulturüberstand in 1,5 ml ED-Röhrchen überführen			
-	Zugabe von 500 µl RLT + ß-Mercaptoethanol (ß-ME) (1ml RLT + 10 µl ß-ME)			
		→	mit Pipette mischen	
-	Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol	→	mit Pipette mischen	
-	700 µl des Probenmaterials auf Säule	→	15’’	≥ 8.000 g
-	Säule in neues Röhrchen ohne Deckel			
-	Restliches Probenmaterial auf Säule	→	15’’	≥ 8.000 g
-	Säule in neues Röhrchen ohne Deckel			
-	700 µl RW1 auf Säule	→	15’’	≥ 8.000 g
-	Säule in neues Röhrchen ohne Deckel			
-	500 µl RPE auf Säule	→	15’’	≥ 8.000 g
-	Säule in neues Röhrchen ohne Deckel			
-	500 µl RPE auf Säule	→	2’	≥ 8.000 g
-	Säule in neues Röhrchen ohne Deckel	→	1’	≥ 8.000 g
-	Elution der RNA mit 30 – 50 µl sterilem destilliertem Wasser (SDW) →		1’	≥ 8.000 g

Isolierung viraler und zellulärer RNA aus Zellkulturüberstand

(TRIzol, Life Technologies, UK)

- Zellkulturmaterial frieren/tauen (-20 °C/Raumtemperatur)
- 1 – 5 ml zentrifugieren, 20 min 4.000 g 4 °C
- Pellet in 500 µl des geklärten Überstandes aufnehmen und gut mischen
- 1 ml TRIzol zugeben und gut mischen
- 5 min schütteln bei Raumtemperatur
- Abzentrifugieren
- Zugabe von 200 µl Chloroform
- 20 sec vortexen
- Zentrifugation 20 min 8.000 g 4 °C
- Fällung der RNA durch Zugabe des Überstands zu 0,5 ml Isopropanol
- Vorsichtig invertieren (nicht vortexen!!!)
- Zentrifugation 10 min 8.000 g 4 °C
- Überstand entfernen
- Pellet mit 75 % Ethanol (Ethanol + SDW) „waschen“
- Zentrifugation 5 min 10.000 g 4 °C
- Überstand entfernen
- Pellet trocknen
- Lösen der RNA in 50 µl SDW

Alternativ können weitere geeignete Extraktionsverfahren eingesetzt werden.

3.1.2 Nachweis von ISAV mittels RT-PCR

Für die Amplifikation des ISAV-Genoms können mehrere RT-PCR-Methoden verwendet werden. Es kann eine zweistufige RT-PCR verwendet werden, bei der die reverse Transkription (RT-Schritt) und die eigentliche PCR-Reaktion in zwei separaten Ansätzen durchgeführt werden. Bevorzugt wird die einstufige Reaktion, bei der diese beiden Schritte in einem Röhrchen durchgeführt werden, wobei die Gefahr von Kreuzkontaminationen ohne Verlust von Sensitivität weiter minimiert werden kann.

Es sind die hier beschriebenen Primer und Assays zu verwenden, nämlich das ILA1- bzw. ILA2-Primerpaar, die auf das Segment 8 abzielen und als für den Nachweis des ISAV bei Ausbrüchen und bei Trägerfischen geeignet befunden wurden. Der ILA-2-Rückwärtsprimer entspricht nicht den Isolaten aus Nordamerika; daher sollte in diesen Fällen ein alternativer Primersatz verwendet werden.

Vorwärtsprimer (ILA1): 5′-GGCTATCTACCATGAACGAATCT-3′;
Rückwärtsprimer (ILA2): 5′-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3′.

Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infectious Salmon Anemia, ISA)

Testkit: OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)

25 µl Ansatz:	14,5	µl	RNAse-freies Wasser (variabel)
	5,0	µl	5 x RT-PCR Puffer
	1,0	µl	dNTP-Mix (jeweils 10mM)
	1,0	µl	Primer forward (10 pmol/µl)
	1,0	µl	Primer reverse (10 pmol/µl)
	1,0	µl	Enzyme-Mix
	0,5	µl	RNAsin (40 U/µl; Promega)
	1,0	µl	RNA (variabel)

Zyklusbedingungen:

1 Zyklus	bei 50 °C über eine Dauer von 30 Minuten,
1 Zyklus	bei 94 °C über eine Dauer von 15 Minuten,
40 Zyklen	bei 94 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 55 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 72 °C über eine Dauer von 60 Sekunden;
1 Zyklus	bei 72 °C über eine Dauer von 5 Minuten.

Produktgröße ist 155 bp.

Die Ergebnisse der PCR können je nach den Bedingungen, unter denen diese durchgeführt wird, unterschiedlich ausfallen, insbesondere könnte in Bezug auf die Temperaturprotokolle je nach verwendetem Thermocycler eine Optimierung erforderlich sein. Außerdem können aufgrund von falschem Primer-Annealing oder einer Kontamination des Labors falsch-positive Ergebnisse auftreten. Jeder Lauf muss **Negativ- und Positivkontrollen beinhalten**. Alternativ können andere RT-PCR-Versionen mit erwiesenermaßen ähnlicher Wirksamkeit verwendet werden.

3.1.3 Nachweis von ISAV mittels RT-qPCR

Durch die Verwendung der RT-qPCR können in der Regel eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität erreicht werden. Die Methode kann schneller durchgeführt werden, da keine Gelelektrophorese erforderlich ist, und sie verringert die Gefahr der Kreuzkontamination, da es möglich ist, die Menge der genomischen viralen RNA im Probenröhrchen zu ermitteln ohne diese zu öffnen. Ein Nachteil des RT-qPCR-Assays ist, dass es oftmals nicht möglich ist, amplifizierte Produkte zu sequenzieren. Bestehen jedoch Zweifel in Bezug auf die Spezifität des amplifizierten Produkts, ist ein weiterer ISAV-spezifischer Assay durchzuführen, um das Ergebnis zu überprüfen.

Es ist der im Folgenden beschriebene Assay zu verwenden, der auf das Segment 8 des ISAV-Genoms abzielt. Dieser Assay deckt Isolate aus der Europäischen Union, der Europäischen Freihandelsassoziation und Nordamerika ab. Es ist möglichst das einstufige Verfahren anzuwenden, da der Assay in einem einzigen Röhrchen die Gefahr der Kreuzkontamination minimiert.

Vorwärtsprimer (ISAV for):	5′- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3′;
Rückwärtsprimer (ISAV rev):	5′- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3′;
Sonde (ISAV Probe):	5′- FAM - CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ -3′.
Produkt:	104 bp (nach Snow *et al.*, 2006)

Als interne Kontrolle wird die Amplifizierung des Lachs-Elongationsfaktors 1alpha (ELF) empfohlen.

Vorwärtsprimer (salmoELF-f):	5‘- GCTGTGCGTGACATGAGG -3‘
Rückwärtsprimer (salmoELF-r):	5‘- ACTTTGTGACCTTGCCGC -3‘
Sonde (salmoELFprobe):	5‘- HEX – CTGTCGGTGTCATCATCAAGGCTGTTG - BHQ1 -3‘
Produkt:	88 bp (nach Ingerslev *et al.*, 2009)

Jeder Lauf muss mindestens eine Negativ- und eine Positivkontrolle beinhalten.

Testkit: QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)

25 µl Ansatz:	5,25	µl	RNAse-freies Wasser (variabel)
	12,5	µl	2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix
	2,5	µl	Primer fwd (5 µM)
	2,5	µl	Primer rev (5 µM)
	1,0	µl	Sonde ISA 8 Probe MGB (2,5µM)
	0,25	µl	QuantiTect RT Mix
	1,0	µl	RNA

Alternativer Testkit:

One step RT-PCR Reagents (Ambion-Applied Biosystems)

25 µl Ansatz:	4,0	µl	RNase freies Wasser
	12,5	µl	2 x Reaktionsmix
	1,0	µl	Reverse Transkriptase
	1,0	µl	Primer 1 (10 µM)
	1,0	µl	Primer 2 (10 µM)
	0,5	µl	Taqman Probe
	5,0	µl	RNA Template

Zyklusbedingungen:

1 Zyklus	bei 50 °C über eine Dauer von 30 Minuten,
1 Zyklus	bei 95 °C über eine Dauer von 15 Minuten,
40 Zyklen	bei 94 °C über eine Dauer von 15 Sekunden,
	bei 60 °C über eine Dauer von 60 Sekunden;

Erforderlichenfalls sind Anpassungen vorzunehmen. Alternativ können andere RT-PCR oder RT-qPCR-Versionen mit erwiesenermaßen ähnlicher Wirksamkeit verwendet werden.

3.1.4 Sequenzierung amplifizierter PCR-Produkte

Vorwärtsprimer (ILAs6-3F):	5′-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3′;
Rückwärtsprimer (ILAs6-2R):	5′-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3′.
Produkt:	146 bp

Jeder Lauf muss Negativkontrollen und Positivkontrollen beinhalten.

OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) – Ansatz

Reagenzien		Volumen
Rnase/Dnase fr. Wasser		14,5 µl
5xRT-Puffer		5 µl
dNTP		1 µl
Primer fwd	10 pmol/µl	1 µl
Primer rev	10 pmol/µl	1 µl
Enzymmix		1 µl
Rnasin		0,5 µl
Mastermix		24 µl
RNA		1 µl
Gesamt		25 µl

Zyklusbedingungen (einstufige RT-PCR):

1 Zyklus	bei 50 °C über eine Dauer von 30 Minuten,
1 Zyklus	bei 94 °C über eine Dauer von 15 Minuten,
40 Zyklen	bei 94 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 55 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 72 °C über eine Dauer von 60 Sekunden,
1 Zyklus	bei 72 °C über eine Dauer von 5 Minuten;

Erforderlichenfalls sind Anpassungen vorzunehmen. Alternativ können andere RT-PCR oder RT-qPCR-Versionen mit erwiesenermaßen ähnlicher Wirksamkeit verwendet werden.

Alternativ kann z. B. folgende Methode zur HPR-Sequenzierung in Segment 6 verwendet werden:

Vorwärtsprimer:	5′-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3′;
Rückwärtsprimer:	5′-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3′;
Produktgröße:	304 bp, wenn HPR0.

OneStep RT-PCR Kit (Quiagen) – Ansatz

Reagenzien		Volumen
Rnase/Dnase fr. Wasser		14,5 µl
5xRT-Puffer		5 µl
dNTP		1 µl
Primer fwd	10 pmol/µl	1 µl
Primer rev	10 pmol/µl	1 µl
Enzymmix		1 µl
Rnasin		0,5 µl
Mastermix		24 µl
RNA		1 µl
Gesamt		25 µl

Zyklusbedingungen (einstufige RT-PCR):

1 Zyklus	bei 50 °C über eine Dauer von 30 Minuten,
1 Zyklus	bei 95 °C über eine Dauer von 15 Minuten,
40 Zyklen	bei 94 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 60 °C über eine Dauer von 30 Sekunden,
	bei 72 °C über eine Dauer von 45 Sekunden,
1 Zyklus	bei 72 °C über eine Dauer von 10 Minuten;

Es können auch andere RT-PCR-Assays verwendet werden, die eine ähnliche Sensitivität und ähnliche Spezifitäten wie die hier beschriebenen Assays aufweisen.

Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die amplifizierten RT-PCR-Produkte entsprechender Größe aus den Gelen ausgeschnitten und mittels PCR-Fragment-Affinitäts-Spinsäulen entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Mit der so aufgereinigten DNA werden zwei separate PCR-Ansätze, jeweils unter Verwendung des Vorwärtsprimers und des Reversprimers aus der vorausgegangenen PCR gefahren, wobei in die hierbei amplifizierten DNA-Fragmente fluorochromierte Nukleotide eingebaut werden, die für die anschließende Detektion im Sequenzierautomaten benötigt werden. Die im Sequenzierlabor ermittelten Sequenzen sind mit der Suchfunktion BLAST zu analysieren und die Sequenzen mit anderen bekannten Sequenzen in der Nukleotid-Datenbank des US National Centre for Biotechnical Information (NCBI) oder anderen Datenbanken zu vergleichen.

Mittels Sequenzvergleich wird einerseits ermittelt, ob es sich um ein Virusisolat mit Deletion in der hochpolymorphen Region des Segmentes 6 (HPRdel) handelt oder ob die PCR Produkte die Maximallänge von 146

bzw. 304 Basenpaaren (HPR0) aufweisen. Ausschließlich Nachweise von HPRdel-Isolaten ziehen seuchenrechtliche Konsequenzen nach sich. Andererseits lassen sich durch Sequenzvergleiche mit den bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen phylogenetische Beziehungen zu bereits bekannten Isolaten ermitteln.

3.2 ISAV-Isolierung in Zellkulturen

3.2.1 Vorbereitung der Proben

Das Gewebe kann bei –80 °C aufbewahrt werden, darf jedoch vor der Untersuchung nur einmal eingefroren und aufgetaut werden. Untersuchungen für Überwachungs- und Bekämpfungszwecke sind so schnell wie möglich durchzuführen.

Jede Probe (Gewebepool in Transportlösung) wird mit einem Homogenisator vollständig homogenisiert und 15 Minuten bei 2 000 bis 4 000 × g und 0 - 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein 0,45-µm-Filter filtriert und mit dem gleichen Volumen eines angemessen verdünnten Pools von Antiseren gegen die einheimischen IPNV-Serotypen inkubiert. Bei einem 50%igen Plaquetest muss der Antiserumtiter mindestens 1 : 2.000 betragen. Die Mischung wird eine Stunde bei 15 °C inkubiert. Dies ist das Inokulum. 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 ISAV 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.

3.2.2 Beimpfen von Zellkulturen

Zur ISAV-Isolierung sind in erster Linie Nierenzellen vom Atlantischen Lachs (Atlantic Salmon Kidney, ASK, Passage 65 oder niedriger) zu verwenden. Es können auch andere Zelllinien von erwiesener Wirksamkeit und Empfindlichkeit für die Isolierung von ISAV verwendet werden, wobei Stammvariabilität und die Fähigkeit verschiedener Stämme, sich in unterschiedlichen Zelllinien zu vermehren, zu berücksichtigen sind. ASK-Zellen eignen sich offenbar für die Isolierung und das Wachstum bislang bekannter Virusisolate, sofern eine niedrige Passagenzahl verwendet wird. Bei ASK-Zellen kann ein deutlicherer zytopathischer Effekt (CPE) auftreten als bei anderen empfänglichen Zelllinien wie SHK-1 (Salmon Head Kidney-1).

ASK-Zellen werden in L-15-Medium mit 10 % Rinderfötenserum, 2 % (vol : vol) 200 mM L-Glutamin und ggf. 0,08 % (vol : vol) 50 mM 2-Mercaptoethanol in Multiwellplatten kultiviert. Die antiserumbehandelte Organsuspension ist so auf junge, aktiv wachsende Zellkulturen zu impfen, dass sich eine Endverdünnung des Gewebematerials im Kulturmedium von 1 : 1.000 ergibt. Für jede Organsuspension werden 40 µl Inokulum

in ein Well mit entsprechenden Volumina von Kulturmedium gegeben. Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, sind für Proben von unterschiedlichen Betrieben getrennte 12er- oder 24er- Mikrotiterplatten zu verwenden.
Eine Platte, die als negative Kontrolle dienen soll, wird nicht beimpft. Eine getrennte Platte wird wie nachstehend beschrieben als positive Kontrolle mit einem Referenzisolat von ISAV beimpft. 100 µl einer Stammzubereitung von ISAV (Mindesttiter 10^7 Gewebekultur-Infektionsdosis 50 ($TCID_{50}$ ml^{-1}) werden in das erste Well geimpft und vermischt. Ein Volumen dieses Materials wird vom ersten in das zweite Well überführt, sodass eine 1 : 10-Verdünnung entsteht, und vermischt. Dies wird über die gesamte Platte wiederholt, so dass sich sechs 10-fache Verdünnungen ergeben. Stamm-ISAV kann bei –80 °C mindestens zwei Jahre gelagert werden, muss aber nach dem Auftauen innerhalb von drei Tagen verwendet werden. Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Kreuzkontamination der Testplatten durch positives Kontrollmaterial kommt. Diesem Risiko ist vorzubeugen, indem positive Kontrollen getrennt von den Testplatten bearbeitet werden. Statt der Einbeziehung einer Positivkontrolle bei jeder Beimpfung kann auch alle sechs Monate ein Test auf Sensitivität von Nierenzellen von Atlantischem Lachs gegenüber ISAV-Isolaten durchgeführt werden.

Die Proben werden bis zu 15 Tage bei 15 ± 2 °C inkubiert. Die Zellkulturen werden zweimal (5 - 7 Tage und 12 - 14 Tage nach dem Beimpfen) unter dem Mikroskop auf das Auftreten eines CPE überprüft. Sollte ein Pool CPE aufweisen, so ist sofort ein Virusnachweisverfahren gemäß Nummer 3.2.4 einzuleiten. Wird bis Tag 14 kein CPE festgestellt, so ist ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT), ein Hämadsorptionstest oder eine RT-PCR durchzuführen.

3.2.3 Subkultivierung

Subkulturen sind zwischen Tag 13 und Tag 15 anzulegen. Der Kulturüberstand wird in geeigneter Verdünnung (1/10) in die Wells überführt, die frische aktiv wachsende Zellen in Multiwellplatten enthalten, und bis zu 18 Tage bei 14 ± 2 °C inkubiert. Die Zellkulturen werden zweimal (5 - 7 Tage und 14 - 18 Tage nach dem Beimpfen) mikroskopisch auf das Auftreten eines CPE überprüft. Sollte ein Pool CPE aufweisen, so ist sofort ein Virusnachweisverfahren gemäß Nummer 3.2.4 einzuleiten. Wird bis Tag 14 - 18 kein CPE festgestellt, so ist ein Hämadsorptionstest oder eine RT-PCR durchzuführen.

Kommt es innerhalb der ersten sieben Tage der Inkubation zu Zytotoxizität, so ist in dieser Phase eine Subkultur anzulegen; die Zellen müssen 14 - 18 Tage inkubiert werden, und es ist eine weitere Subkultur anzulegen, die nochmals 14 - 18 Tage zu inkubieren ist. Tritt die Zytotoxizität nach sieben Tagen auf, so ist eine Subkultur anzulegen, und die Zellen sind so zu inkubieren, dass eine Gesamtinkubationszeit von 28 - 36 Tagen ab der Erstbeimpfung erzielt wird.

Kommt es in der Primärkultur zu bakterieller Kontamination, so ist der Test unter Verwendung des bei –80 °C gelagerten Gewebehomogenats neu anzusetzen. Vor der Beimpfung ist das Gewebehomogenat 15 - 30 Minuten bei 4 000 × g und 0 - 6 °C zu zentrifugieren und der Überstand durch ein 0,22-µm-Filter zu

filtrieren. Kommt es in der Phase der Subkultur zu bakterieller Kontamination, so ist der Überstand durch ein 0,22-µm-Filter zu filtrieren, auf frische Zellen zu impfen und weitere 14 - 18 Tage zu inkubieren.

3.2.4 Virusnachweistests

Wird in einer beliebigen Phase ein CPE beobachtet oder ergibt der Hämadsorptionstest einen Positivbefund, so ist ein Virusnachweisverfahren vorzunehmen. Die Methoden der Wahl für den ISAV-Nachweis sind RT-PCR gemäß Nummer 3.1. und Immunfluoreszenz (IF) gemäß Nummer 3.2.6. Wird vermutet, dass andere Viren vorhanden sind, so sind zusätzliche Virusnachweistests durchzuführen. Haben diese Tests innerhalb einer Woche keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, so ist der Überstand zum sofortigen Nachweis weiterzuleiten an das nationale Referenzlabor für Fischkrankheiten gemäß Anhang VI der Richtlinie 2006/88/EG.

3.2.5 Hämadsorption

Da die Replikation von ISAV in Zellkulturen nicht immer zu einem CPE führt, ist jedes Well einem RT-PCR-Test oder einem Hämadsorptionstest gemäß diesem Absatz oder dem IF-Test gemäß Nummer 3.2.6 zu unterziehen.

Aus jedem Well, auch denen mit den positiven und negativen Kontrollen, wird Zellkulturmedium entnommen, das in etikettierte sterile Röhrchen überführt wird. Jedem Well werden 500 µl einer 0,2 % (vol : vol) Suspension gewaschener Erythrozyten vom Kaninchen oder Pferd oder einer 0,05 % (vol : vol) Suspension gewaschener Erythrozyten von der Regenbogenforelle oder vom Atlantischen Lachs hinzugefügt, und es wird 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Erythrozyten werden entnommen, und jedes Well wird zweimal mit L-15-Medium gewaschen. Die einzelnen Wells werden unter dem Mikroskop untersucht.

An der Oberfläche von Nierenzellen von Atlantischem Lachs anhaftende Cluster von Erythrozyten sind ein Indiz für eine Infektion mit einem Orthomyxovirus. Bei einem positiven Hämadsorptionstest ist sofort ein Virusnachweistest gemäß Nummer 3.2.4 vorzunehmen.

3.2.6 Immunfluoreszenz (IF)

ASK-Zellen (Passage 65 oder niedriger) müssen in L-15-Medium mit 10 % Rinderfötenserum, 2 % (vol : vol) 200 mM L-Glutamin und ggf. 0,08 % (vol : vol) 50 mM 2-Mercaptoethanol in Multiwellplatten kultiviert und verwendet werden, wenn mehr als 50 % Konfluenz erreicht ist. Andere Zelllinien oder Medien mit erwiesener Wirksamkeit können ebenfalls verwendet werden. Je 225 µl des mutmaßlich virusinfizierten Kulturüberstands sind in zwei Wells zu überführen und zu mischen; 225 µl sind in zwei weitere Wells zu überführen (1 : 5-Verdünnung). Zwei zusätzliche Wells bleiben als Kontrollen unbeimpft. Proben von jedem Fischbetrieb werden auf getrennten Platten untersucht, ebenso die Viruskontrolle. Für die Viruskontrolle wird ein Referenzisolat von ISAV verwendet. Die Platten werden bei 14 ± 2 °C inkubiert und bis zu sieben Tage mikroskopisch untersucht. Wenn ein früher CPE beobachtet wird oder wenn innerhalb von sieben Tagen kein CPE

beobachtet wird, ist der nächste Schritt die Fixierung. Zunächst werden die Wells mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder Zellkulturmedium gewaschen, unter Ventilatorenstrom bei Raumtemperatur getrocknet und die Platten bei -20 °C vorgekühlt. Bei den nachfolgenden Schritten ist in der Kälte und zügig zu arbeiten, da die Platten ansonsten blind werden. Die Platten werden durch 10-minütige Inkubation bei -20 °C mit einem vorgekühltem (-20 °C) Gemisch aus Aceton und Ethanol (1 : 1) fixiert. Die Platten werden nach Absaugen des Fixans sofort luftgetrocknet und entweder unmittelbar angefärbt, vor dem Anfärben höchstens 24 Stunden bei 0 - 6 °C gelagert oder für eine spätere Bearbeitung eingefroren.

Die Replikatwells werden mit der in PBS verdünnten Mischung aus den monoklonalen Antikörpern (MAK) gegen ISAV 3H6F8, 1OC9F5 oder mit anderen MAK, deren Wirksamkeit und Spezifität nachgewiesen wurde, angefärbt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die MAK sind abzusaugen und die Platten dreimal mit PBS zu waschen. Jedem Well wird in PBS verdünntes Anti-Maus-IgG-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Konjugat zugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungen verschiedener Chargen von MAK und FITC-Konjugat sind in jedem Labor zu optimieren. Die Antikörper sind abzusaugen, die Platten dreimal mit PBS zu waschen und mit einem Fluoreszenzerhaltungspuffer (gegebenenfalls unter Zugabe von Kontrastfarbstoff Propidiumjodid) zu überschichten.

Die Wells sind unverzüglich mithilfe eines für Fluoreszenzmikroskopie eingerichteten Inversmikroskops mit einem geeigneten Filter für FITC-Anregung zu untersuchen. Ein Test gilt als positiv, wenn grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Ein Test ist nur dann gültig, wenn die positiven Kontrollen einen Positivbefund und die negativen Kontrollen einen Negativbefund ergeben.

3.3 Untersuchung anderer Gewebe

Die Technik gemäß Nummer 3.2.6 kann auf Abklatschpräparate von Fischgeweben wie Niere, Leber, Milz und Herz angewandt werden, vorausgesetzt, dass eine angemessene Zahl Endothelzellen, Leukozyten oder Lymphozyten auf den Objektträger aufgebracht werden kann. Das Anfärbeverfahren ist für jedes Gewebe gleich, doch bei einigen Geweben kann es ratsam sein, auf die Propidiumjodid-Färbung zu verzichten und sich bei der Identifizierung der Zelltypen in den Abklatschpräparaten stattdessen auf die Phasenkontrastbeleuchtung zu stützen.

3.4 Histologie

Die in Paraffin eingebetteten Organe werden in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Histologische Veränderungen bei klinisch erkranktem Atlantischen Lachs sind variabel, können jedoch Folgendes umfassen:

a) zahlreiche Erythrozyten im zentralen venösen Sinus und in den Lamellenkapillaren der Kiemen, wo sich auch Erythrozytenthromben bilden können;
b) multifokale bis konfluente Petechien und/oder Hepatozytennekrose in einiger Entfernung der größeren Lebergefäße; multifokale Erythrozyten-Akkumulation in erweiterten hepatischen Sinusoiden;
c) Erythrozyten-Akkumulation in Blutgefäßen der intestinalen *Lamina propria* und möglicherweise Blutungen in die *Lamina propria*;
d) durch Erythrozyten-Akkumulation aufgeblähtes Milzstroma;
e) leichte multifokale bis starke intestinale Blutungen mit Tubulopathie in den Blutungsbereichen und Erythrozyten-Akkumulation in den Nierenglomeruli;
f) Erythrophagozytose in der Milz und sekundäre Blutungen in Leber und Niere.

3.5 Immunhistochemie (IHC)

Polyklonale Antikörper gegen das ISAV-Nukleoprotein werden auf Paraffinschnitten von Formalin-fixiertem Gewebe verwendet. Die zu untersuchenden Organe sind die Rumpfniere und das Herz (Übergangsbereich einschließlich der drei Kammern und Klappen). Fälle, in denen aufgrund pathologischer Anzeichen ein Verdacht besteht, sind mit einem positiven IHC-Ergebnis zu bestätigen. Die histologischen Schnitte sind nach den Standardmethoden anzufertigen.

(1) Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die Gewebe sind gemäß den Standardprotokollen für mindestens einen Tag in 10%igem neutral phosphatgepufferten Formalin zu fixieren, in einer aufsteigenden Ethanolreihe zu entwässern, mit Xylol zu klären und in Paraffin einzubetten. Ca. 5 µm dicke Schnitte (bei IHC auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern) sind für 20 Minuten bei 56 - 58 °C (maximal 60 °C) zu erwärmen, in Xylol zu entwachsen, mit einer absteigenden Ethanolreihe zu rehydrieren und für die Zwecke der Pathomorphologie mit Hämatoxylin und Eosin und für die Zwecke der IHC gemäß Nummer 2 einzufärben.

(2) Färbeverfahren für IHC

Die Inkubation findet, soweit in diesem Beschluss nicht anders verfügt, immer bei Raumtemperatur und auf Wippmischern statt.

a) Die Antigendemaskierung erfolgt durch Kochen der Schnitte für 2 × 6 Minuten in 0,1 M Citratpufferlösung (pH-Wert 6,0) gefolgt von 20-minütiger Blockierung mit 5 % fettarmer Trockenmilch und 2 % Ziegenserum in 50 mM TBS (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH-Wert 7,6);
b) die Schnitte werden dann über Nacht mit in TBS mit 1 % fettarmer Trockenmilch verdünntem Primärantikörper (monospezifischer Kaninchen-Antikörper gegen ISAV-Nukleoprotein) inkubiert und anschließend dreimal in TBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen;
c) für den Nachweis gebundener Antikörper sind die Schnitte mit Alkaline-Phosphatase-konjugiertem Kaninchen-IgG-Antikörper für 60 Minuten zu inkubieren. Nach einer letzten Waschung sind Echtrot (1 mg ml– 1) und Naphtol-AS-MX Phosphat (0,2 mg ml– 1) mit 1 mM Levamisol 0,1 M TBS

(pH-Wert 8,2) hinzuzufügen; danach 20 Minuten entwickeln lassen. Die Schnitte werden dann in Leitungswasser gewaschen; danach erfolgt eine Gegenfärbung mit Harris-Hämatoxylin und die Schnitte werden mit einem wässrigen Medium eingedeckt. ISAV-positive und ISAV-negative Gewebeschnitte sind als Kontrollen in jeden Aufbau einzuschließen.

(3) Interpretation des Ergebnisses der IHC - Die Interpretation des Ergebnisses des IHC-Tests erfolgt gemäß den Buchstaben a und b:

a) Kontrollschnitte gelten als positiv, wenn beobachtet wird, dass die Endothelzellen in Blutgefäßen des Endokards in den Kontrollschnitten eine deutlich sichtbare rote Färbung von Zytoplasma und Nukleus aufweisen. Ein Testprobenschnitt gilt nur dann als positiv, wenn eine solche deutliche, intranukleäre Rotfärbung der Endothelzellen vorliegt.

b) Kontrollschnitte gelten als negativ, wenn sie keine signifikanten Farbreaktionen aufweisen.

Da die intranukleäre Lokalisation charakteristisch für das Orthomyxovirus-Nukleoprotein während der Phase der Virusreplikation, eine gleichzeitige zytoplasmatische Färbung jedoch oft dominant ist, gelten zytoplasmatische oder andere Färbungsmuster ohne intranukleäre Lokalisation als unspezifisch oder nicht schlüssig.

Die stärksten positiven Färbungsreaktionen werden normalerweise in den Endothelzellen von Herz und Niere erreicht. Bei sehr umfangreichen hämorrhagischen Läsionen können die Endothel-Färbungsreaktionen geringfügig oder nicht vorhanden sein, möglicherweise aufgrund der Lyse der Endothel-Zellen.

3.6 Bezugsquellen für diagnostische Reagenzien und Zellkulturen

Kommerziell erhältliche Diagnostika:
Bio-X Diagnostics, Belgien:
Bio-X Anti-ISAV Monoklonaler Antikörper (BIO 337);
(Es sind nur die in Deutschland zur Diagnose der ISA zugelassene Chargen zu verwenden!)
mAk 18B11-M (~~Dr. Daubner/Dr. Reiche~~ Bio-Bank, FLI)

Referenzviren, im Handel nicht erhältliche Diagnostika und Zelllinien:
Friedrich-Loeffler-Institut,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10
D-17493 Greifswald – Insel Riems

Ansteckende Blutarmut der Lachse (Infectious Salmon Anemia, ISA)

Zentralabteilung ~~Zellbank~~ Bio-Bank:
Zelllinie SHK-1 (salmon head kidney); Katalog-Nr.: CCLV RIE 489,
Zelllinie ASK (Atlantic salmon kidney), Katalog-Nr.: CCLV RIE 926,

Institut für Infektionsmedizin, NRL für ISA
ISAV-Referenzstamm Glesvaer 2/90, Norway
Anti-ISAV mAk 18B11, ~~M. Dauber~~ Bio-Bank (Insel Riems)
Anti-ISAV mAk 3H6F8, K. Falk (Oslo)

Referenzen

Christiansen DH, Østergaard PS, Snow M, Dale OB, Falk K, 2011: A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV-HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.) in the Faroe Islands. J Gen. Virol. 92 (Pt 4): 909-18

Devold M, Krossoy B, Aspehaug V and Nylund A, 2000: Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout Salmo trutta after experimental infection. Dis Aquat Org 40, 9-18

DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS (EU) 2015/1554 DER KOMMISSION vom 11. September 2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden (ABl. L 247 vom 23.09.2015, S. 1)

Entscheidung der Kommission vom 31. Oktober 2008 zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates in Bezug auf Überwachungs- und Tilgungsprogramme sowie auf den Seuchenfreiheitsstatus von Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimenten (ABl. L 063 vom 07.03.2009, S. 15)

EURL for Fish Diseases: Diagnostic manual (http://www.eurl-fish.eu/Diagnostic_Manuals)

Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 (FischSeuchV) in der derzeit geltenden Fassung

Ingerslev H-C Rønneseth A, Pettersen EF und Wergeland HI (2009): Differential Expression of Immune Genes in Atlantic Salmon (Salmo salar L.) Challenged Intraperitoneally or by Cohabitation with IPNV. Scandinavian Journal of Immunology 69, 90–98

Mjaaland S, Rimstad E, Falk K, Dannevig BH, 1997: Genomic characterisation of the virus causing infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomxyo-like virus in a teleost. J Virol 71: 7681–7686

Mjaaland S, Hungnes O, Teig A, Dannevig BH, Thorud K & Rimstad E, 2002: Polymorphism in the Infectious Salmon Anemia Virus Hemagglutinin Gene: Importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. Virology 20; 304 (2): 379-391

OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals : Chapter 2.3.5. Infection with Infectious Salmon Anaemia Virus (in der jeweils aktualisierten Fassung) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.05_ISA.pdf

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)

Snow M, McKay P, McBeath AJ, Black J, Doig, F, Kerr R, Cunningham CO, Nylund A and Devold M, 2006: Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (Salmo salar). Dev Biol (Basel). 126: 133-45

Snow M, McKay P, Matejusova I, 2009: Development of a widely applicable positive control strategy to support detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) using Taqman real-time PCR. J Fish Dis 32 (2): 151-6

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 19. Juli 2011 (BGBl. I S. 1404) in der derzeit geltenden Fassung

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