

Amtliche Methode und Falldefinition

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

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	4
1.3 Differenzialdiagnose	5
1.4 Diagnostische Indikation	5
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	6
1.6 Rechtsgrundlagen.....	6
2. Untersuchungsmaterial	7
2.1 Probenauswahl	7
2.2 Gewebeproben	9
2.3 Probenversand	10
3. Untersuchungsgang	12
3.1 Aufbereitung der Proben	13
3.2 Virologische Untersuchung	14
3.3 Virusnachweis	16
3.4 Genomnachweis	18
Anhang	23
Literatur	28
Falldefinition - Infektiöse Hämatopoetische Nekrose der Salmoniden (IHN); Virus der IHN ..	29
Falldefinition - Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden (VHS); Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden	32

Amtliche Methode

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 sowohl in Fischzuchtanlagen als auch in freien Gewässern. 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 und codiert für fünf Strukturproteine. 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 innerhalb der Subfamilie *Gammarhabdovirinae* dem Genus Novirhabdovirus zugeordnet. Da der Wirtsbereich des IHNV vorwiegend auf Salmoniden beschränkt ist, wird dieser Erreger der Spezies Salmonid Novirhabdovirus zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurde VHSV von zahlreichen Fischarten verschiedener taxonomischer Familien isoliert und somit der Spezies Piscines Novirhabdovirus zugeordnet.

Erreger der IHN und VHS wurden mehrfach in Asien, Amerika und Europa nachgewiesen. 2016 wurde erstmals von IHN-Ausbrüchen in Kenia berichtet.

In Deutschland verursachen die IHN und VHS in Aquakulturbetrieben jährlich enorme Verluste.

Weltweit gelten IHN und VHS als anzeigepflichtige Seuchen. Entsprechend der Delegierten Verordnung (EU)2018/1882 der Kommission (2) sind die IHN und VHS als Seuchen der Kategorie C + D + E gelistet. Ebenso sind in dieser Verordnung Arten und Artengruppen benannt, die nach derzeitigem Kenntnisstand empfänglich für IHN und/oder VHS sind oder diese Erkrankungen übertragen können, sind in den Delegierten Verordnungen (EU) 2018/1882 und 2022/925 genannt (Tabellen 1 und 2 im Anhang). Da diese gelisteten Arten ein erhebliches Risiko bei der Verbreitung der Seuchen darstellen, sind geeignete Maßnahmen zur Prävention und Bekämpfung, d. h. auch im Rahmen der Diagnostik, auf diese gelisteten Arten (Empfänger und Überträger) anzuwenden.

Laborarbeiten mit IHNV und/oder VHSV sollten unter S2-Bedingungen und zusätzlichen Auflagen (eingeschränkter Personenverkehr, zwei Tage kein Kontakt zu Nutzfischen) gestattet werden. Für Tierversuche werden L2-Bedingungen empfohlen.

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

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 & 1985; Rasmussen, 1965). 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) sowie 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 perakutem Verlauf 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.

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 (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.

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



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

1.3 Differenzialdiagnose

Differenzialdiagnostisch 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 Untersuchungen oder auf Grund epizootiologischer Erhebungen der Verdacht eines Ausbruchs der IHN oder VHS besteht, sind Fische an die zuständige diagnostische Einrichtung zur virologischen Prüfung einzusenden.

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

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 Fisch- und Krebstiererkrankungen, EURL for Fish & Crustacean Diseases, National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Kemitorvet, Building 202, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark, 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 zum Ausschluss eines IHN- bzw. VHS-Verdachts wird in den benannten Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt. Die Klärung fraglicher Befunde, insbesondere im Rahmen von Untersuchungen 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 entsprechenden Virusisolate zur genetischen Charakterisierung an das NRL für IHN und VHS am FLI gesendet werden. Das FLI kann repräsentative Isolate an das EU-Referenzlaboratorium übergeben, das die Diagnose der Fischseuchen auf EU-Ebene koordiniert.

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) einschl. der Delegierten Verordnungen und Durchführungsbestimmungen in der jeweils gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung in der jeweils gültigen Fassung
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/690 vom 17. Dezember 2019 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der gelisteten Seuchen, die Überwachungsprogrammen in der Union unterliegen, des geografischen Geltungsbereichs solcher Programme und der gelisteten Seuchen, für die der Status „seuchenfrei“ von Kompartimenten festgelegt werden kann
- EU_Diagnostic methods and procedures for surveillance confirmation of IHN and VHS in der jeweils gültigen Fassung
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des Office International des Epizooties (O.I.E.) in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

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

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen
- Durchführungsverordnung (EU) 2019/1715 vom 30. September 2019 mit Vorschriften zur Funktionsweise des Informationsmanagementsystems für amtliche Kontrollen und seiner Systemkomponenten („IMSOC-Verordnung“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/691 vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für Aquakulturbetriebe und Transportunternehmer, die Wassertiere befördern
- Durchführungsverordnung (EU) 2022/925 vom 14. Juni 2022 zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 betreffend gelistete Wassertierseuchen und die Liste der Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Probenauswahl

Der Betreiber eines Aquakulturbetriebes hat seinen Fischbestand regelmäßig durch die zuständige Behörde oder durch Tierärzte und Angehörige der mit der Gesundheit von Wassertieren befassten Berufe (ehem. „Qualifizierte Dienste“) klinisch und ggf. auch virologisch untersuchen zu lassen. Die Kontrollhäufigkeit ist abhängig vom jeweiligen Risiko, das von einem Aquakulturbetrieb ausgeht (Delegierte Verordnung (EU) 2020/689, Anhang VI Teil I Kapitel 1-3).

Bei der Beprobung und Laboruntersuchung für die Durchführung von Überwachungs- oder Tilgungsprogrammen oder zur Bestätigung des Vorliegens einer IHN- bzw. VHS-Infektion oder zur Ausräumung eines Verdachts darauf sind Diagnosemethoden zu verwenden, die in der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 Anhang VI Teil II Kapitel 1 festgelegt sind. Die Testung hat in Übereinstimmung mit den von dem EURL für Fischkrankheiten genehmigten detaillierten Diagnosemethoden zu erfolgen.

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

Gesundheitsuntersuchungen und Probenahmen sind bei einer Wassertemperatur < 14 °C durchzuführen, bzw. wenn der wahrscheinlich niedrigste Jahreswert des Gewässers erreicht wird. In Betrieben sind alle Produktionsanlagen, wie Teiche, Tanks, Netzkäfige sowie alle Wasserquellen und Wasserabflussbereiche auf verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische zu überprüfen. Für die Probenahme sind Fische gelisteter Arten wie folgt auszuwählen:

Sind Regenbogenforellen vorhanden, so sind nur Fische dieser Art für die Beprobung zu wählen, es sei denn, es sind andere empfängliche Arten vorhanden, die typische Anzeichen von VHS oder IHN aufweisen.

Sind keine Regenbogenforellen vorhanden, so muss die Probe repräsentativ für alle vorhandenen empfänglichen Arten sein.

Auszuwählen sind geschwächte, verhaltensgestörte oder soeben verendete Fische (jedoch ohne Anzeichen der Zersetzung).

Die Probe muss sich proportional aus Fischen aller Produktionseinheiten (Teiche, Tanks, Netzkäfige) des Betriebes sowie aller Jahresklassen zusammensetzen.

Der Status „frei von IHN“ oder „frei von VHS“ für Zonen und Kompartimente mit unbekanntem Gesundheitsstatus kann gewährt werden, wenn in einem Zeitraum von zwei- oder vier Jahren (verringertes Stichprobenumfang) die Untersuchungen aller Proben mit den festgelegten Diagnosemethoden keinen Hinweis auf IHN oder VHS ergeben haben.

Nachfolgend sind die Programme zur Erlangung und Aufrechterhaltung des Status „frei von IHN“ oder „frei von VHS“ tabellarisch abgebildet.

Tabelle 3: Programm für Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimente während des zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erlangung des Status „frei von VHS“ und des Status „frei von IHN“

Betriebe	Zahl pro Jahr in jedem Betrieb		Zahl der Fische je Probe ¹	
	Gesundheitsbesuche	Probenahmen	Jungfische	Laichfische ²
mit Laichfischen	2	2	50 (1. Besuch) 75 (2. Besuch)	30 (1. oder 2. Besuch)
nur mit Laichfischen	2	1	0	75 (1. oder 2. Besuch)
ohne Laichfische	2	2	75 (1. und 2. Besuch)	0

Höchstzahl der Fische je Poolprobe: 10

¹ Im Fall von Küstenzonen oder -kompartimenten sind die Proben frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu entnehmen.

² Ovarien- und Samenflüssigkeit von Laichfischen wird zum Zeitpunkt der Reife in Verbindung mit dem „Abstreifen“ entnommen.

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

Tabelle 4: Programm für Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimente, während des vierjährigen Kontrollzeitraums vor der Erlangung des Status „frei von IHN“ und des Status „frei von VHS“

Jahre	Betriebe	Zahl pro Jahr in jedem Betrieb		Zahl der Fische je Probe ¹	
		Gesundheitsbesuche	Probenahmen	Jungfische	Laichfische ²
1 und 2	mit Laichfischen	2	1	30 (2. Besuch)	0
	nur mit Laichfischen	2	1	0	30 (1. oder 2. Besuch)
	ohne Laichfische	2	1	30 (1. oder 2. Besuch)	0
3 und 4	mit Laichfischen	2	2	30 (1. Besuch)	30 (2. Besuch)
	nur mit Laichfischen	2	2		30 (1. und 2. Besuch)
	ohne Laichfische	2	2	30 (1. und 2. Besuch)	

Höchstzahl der Fische je Poolprobe: 10

¹ Im Fall von Küstenzonen oder -kompartimenten sind die Proben frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu entnehmen.

² Ovarien- und Samenflüssigkeit von Laichfischen wird zum Zeitpunkt der Reife in Verbindung mit dem „Abstreifen“ entnommen.

Tabelle 5: Programm für Mitgliedstaaten, Zonen oder Kompartimente für die Aufrechterhaltung des Status „frei von IHN“ oder „frei von VHS“

Risikoniveau ³	Zahl der Gesundheitsbesuche pro Jahr in jedem Betrieb	Zahl der Fische je Probe ^{4, 1}
Hoch	1 x jährlich	30
Mittel	1 x alle zwei Jahre	30
gering	1 x alle drei Jahre	30

Höchstzahl der Fische je Poolprobe: 10

¹ Im Fall von Küstenzonen oder -kompartimenten sind die Proben frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu entnehmen.

² Ovarien- und Samenflüssigkeit von Laichfischen wird zum Zeitpunkt der Reife in Verbindung mit dem „Abstreifen“ entnommen.

³ Risikoniveau, das dem Betrieb von der zuständigen Behörde zugewiesen wurde, außer im Fall abhängiger Kompartimente, wo alle Betriebe als Betriebe mit hohem Risiko angesehen werden.

⁴ Bei jedem Gesundheitsbesuch ist eine Probe zu nehmen.

2.2 Gewebeproben

Proben von höchstens zehn Fischen können gepoolt werden. Zu untersuchen sind Organ- und Gewebeproben von Milz, Kopfniere und entweder Herz oder Gehirn. Im Fall von Laichfischen können auch Ovarial- oder Samenflüssigkeit untersucht werden. Bei der Beprobung von Fischbrut können ganze Fische als Probe entnommen werden.

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

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 (Kopfniere) 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, viszerales Fett, Pylorusschläuche und die Schwimmblase entfernt.

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

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 Gewebeprobe 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.

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

Die Entnahme von Gewebeprobe(n) 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 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 (per 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.

Beim Probenversand sind die gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Gefahrgut zu beachten, wie u. a. die Verpackungsvorschriften nach IATA bzw. ADR für diagnostische Proben (UN 3373) und chemische Gefahrstoffe wie z. B. Formalin (UN 2209, begrenzte Mengen beachten). Verpackung und Beschriftung des zu versendenden Materials müssen mindestens den Anforderungen der Verpackungsvorschrift P650 (Klassifizierung: UN 3373) erfüllen. Sicherer ist es, zusätzlich Biobottles nach Verpackungsvorschrift P620 zu verwenden.

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?
- Befindet sich der Bestand in einem Kompartiment oder einer Zone mit dem anerkannten Status „frei von IHN“ und/oder „frei von VHS“?
- Untersuchungsgrund/Verdacht
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

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

Im Rahmen epidemiologischer Nachforschungen sind folgende zusätzliche Angaben hilfreich:

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

3. Untersuchungsgang

Zur Erlangung oder Aufrechterhaltung des Status „frei von IHN“ oder „frei von VHS“ müssen folgende Diagnosemethoden durchgeführt werden:

- Virusnachweis durch Virusisolierung in Zellkulturen mit anschließender Bestätigung durch den immunochemischen bzw. molekularbiologischen Virusnachweis, wie den Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), den indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFAT), den Virusneutralisationstest (VNT) oder den Genomnachweis, oder
- Genomnachweis des Erregers durch die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).

Muss der Verdacht auf IHN oder VHS bestätigt oder ausgeschlossen werden, sind folgende Anforderungen an den Gesundheitsbesuch, die Probenahme und Untersuchung zu erfüllen:

- In dem verdächtigen Betrieb muss mindestens ein Gesundheitsbesuch erfolgen. Sind klinische Anzeichen für eine Infektion mit IHN oder VHS oder entsprechende postmortale Läsionen zu beobachten, sind entsprechend zehn Fische für die Beprobung zu entnehmen. Sind keine klinischen Anzeichen oder postmortalen Läsionen sichtbar, sind mindestens 30 Fische zu beproben. Das Probenmaterial ist mit den oben beschriebenen Diagnosemethoden und -verfahren zum Virus- oder Genomnachweis zu testen.
- Das Auftreten von IHN gilt als bestätigt, wenn eine oder mehrere Diagnosemethoden positive Befunde für IHNV ergeben. Das Auftreten von VHS gilt als bestätigt, wenn eine oder mehrere Diagnosemethoden positive Befunde für VHSV ergeben.
- Der erste Fall von IHN oder VHS in zuvor nicht infizierten Zonen oder Kompartimenten muss durch den Virusnachweis, d. h. die Virusisolierung in Zellkultur mit anschließender Bestätigung durch den immunochemischen bzw. molekularbiologischen Virusnachweis oder den Genomnachweis (RT-PCR) des Erregers einschließlich der Sequenzierung des Amplifikationsprodukts bestätigt werden.
- Ein Verdacht auf VHS oder IHN gilt als ausgeschlossen, wenn Zellkultivierung oder RT-qPCR keine weiteren Nachweise für das Vorhandensein von VHSV oder IHNV ergeben.

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 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 vier 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.

Gewebeproben 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

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

Im Fall der Aufarbeitung von Gewebeproben in RNA-Stabilisierungsreagenz ist zu beachten, dass die Gewebemenge für die RNA-Extraktion nicht die vom Hersteller empfohlenen Angaben überschreitet. Bei Einsatz größerer Gewebeproben für die RNA-Extraktion sind die Extraktionsverfahren (Reagenzien und Methoden) entsprechend auszuwählen. Deshalb ist es ratsam, vor der RNA-Extraktion das gesamte Material aufzuarbeiten (entfernen des RNA-Stabilisierungsreagenz, waschen der Organe mit PBS-Puffer) und nach dem Homogenisieren der Proben entsprechend zu aliquotieren. Proben, die in RNA-Stabilisierungsreagenzien gesammelt und gelagert wurden, sind für virologische Untersuchungen (Infektion von Zellkultur) nicht geeignet. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert diese Proben mit einem entsprechenden Hinweis zu kennzeichnen.

3.2 Virologische Untersuchung

Neutralisation gegen IPNV

Um einen IPNV-bedingten zytopathischen Effekt (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 eine 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 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 CPE 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 Bio-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

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

zu puffern. Erfolgt die Zellkultivierung in offenen Systemen, ist eine Begasung mit 2,5 % CO₂ empfehlenswert.

Zum Zeitpunkt der Beimpfung sollten die Zellkulturen zwölf bis 24 Stunden alt, bzw. ca. 90 % konfluent sein. Die Empfänglichkeit (Infektionsanfälligkeit) der Zellkulturen ist alle sechs 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. des Sonnenbarschs verbracht. Dazu wird die mit Antibiotikum versetzte Organsuspension (Organ : Medium = 1 : 10) unverdünnt und 1 : 10 verdünnt auf die Zellkultur gegeben. Dadurch entsteht eine Endverdünnung des Organmaterials im Zellkulturmedium von etwa 1 : 100 und 1 : 1.000. 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 sieben bis maximal zehn 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 sieben bis maximal zehn Tage bebrütet.

Tritt innerhalb der ersten drei Tage nach Erstinfektion ein toxischer CPE auf, so muss in dieser Phase eine Subkultivierung erfolgen. Nach Inkubation dieser Passage für sieben Tage ist eine weitere Subkultivierung (= 3. Passage) für sieben Tage bei geeigneter Temperatur (15 °C) durchzuführen.

Entwickelt sich ein toxischer CPE erst nach drei 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 sieben 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

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

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.

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 (NRL) für Fischkrankheiten weiterzuleiten. Die zum Virusnachweis verwendeten Diagnostika müssen bezüglich Qualität, Titer und Spezifität vom Nationalen Referenzlaboratorium zugelassen sein (siehe <https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-fuer-veterinaermedizinische-infektionsdiagnostika/>).

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 : 100 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 angegeben),
- Zellkulturmedium (Positivkontrolle).

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

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

Alternativ können auch andere erprobte Neutralisationstestverfahren angewandt werden.

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

Indirekter Immunfluoreszenz-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-empfindliche 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 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 ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur. Fixierte Zellen werden anschließend mit PBS gespült und mit einer IHNV- 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 inkl. Propidiumjodid zur Kernfärbung (Fa. Roth) eingebettet werden. Die Analyse und Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 2).

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

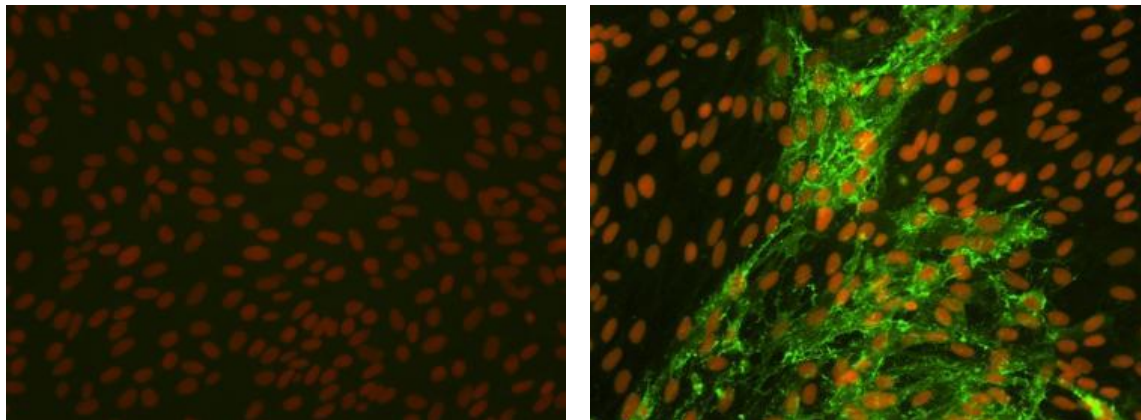


Abb. 2: Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von VHSV in CCLV Rie 38 RTG-2-Zellen (1 dpi, 1.AK: mAk VHS BioX 1 : 20, FITC Alexa Fluor 488 anti Maus IgG Invitrogen 1 : 600) Kernfärbung mit Propidiumiodid)

Enzymimmuntest (ELISA)

IHNV- und VHSV-Antigene können im ELISA mit dem in Deutschland zugelassenen Bio-X VHSV-IHN 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 differenzialdiagnostischen 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

Die RNA wird mit der Phenol-Chloroform-Methode oder mit RNA-Affinitätsspinsäulen gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Folgende kommerziell erhältliche RNA-Extraktionskits haben sich bislang bewährt: QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen), RNeasy 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

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

3.1 Aufarbeitung der Proben/Gewebeproben in RNA-Stabilisierungsreagenz). Die RNA-Extraktion erfolgt aus 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.

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. Deshalb ist es ratsam, vor der RNA-Extraktion das gesamte Material aufzuarbeiten (entfernen des RNA-Stabilisierungsreagenzes, waschen der Organe mit PBS-Puffer) und nach dem Homogenisieren der Proben entsprechend zu aliquotieren. Die RNA-Extraktion kann dann von der vom Hersteller empfohlenen Menge aus einem Aliquot erfolgen. Nachfolgend sind einige Protokolle für die manuelle RNA-Extraktion aus Organhomogenat oder Zellekulturüberstand im Detail aufgeführt.

▪ RNA Isolierung unter Verwendung des QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen)

- 70 µl geklärter Organhomogenat-Überstand bzw. 100 µl Zellkulturüberstand auf insgesamt 140 µl mit PBS auffüllen
- 140 µl des mit PBS verdünnten Probenmaterials zu 560 µl AVL Puffer geben, Röhrchen gut verschließen, alles gut durchmischen (15 sec pulse vortex) und 10 min bei Raumtemperatur (15 - 25 °C) inkubieren.
- zum Entfernen von Probenmaterial im Deckel alles kurz bei ca. 6.000 x g zentrifugieren
- Zugabe von 560 µl Ethanol (96 - 100 %), Röhrchen gut verschließen, alles gut durchmischen (15 sec pulse vortex) und kurz bei ca. 6.000 x g zentrifugieren
- Auftragen von 630 µl der Probe auf die Säule (in 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel), Säule gut verschließen
- Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g
- Restliches Probenmaterial auf Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel) geben
- Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g
- Auftragen von 500 µl AW1-Puffer auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel), Säule gut verschließen
- Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g
- Auftragen von 500 µl AW2-Puffer auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel), Säule gut verschließen
- Zentrifugation für 3 min bei 20.000 x g
- Säule in neues 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel überführen
- Zentrifugation für 1 min bei 20.000 x g
- Zugabe von 60 µl AVE-Puffer auf die Säule (in RNase-freiem 1,5 ml-Röhrchen mit Deckel), Säule gut verschließen
- Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
- Elution der RNA von der Säule durch Zentrifugation für 1 min bei 6.000 x g
- Lagerung der RNA bei -20 °C bis -80 °C

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

▪ RNA-Isolierung unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen)

- 70 µl geklärter Organhomogenat-Überstand bzw. 100 µl Zellkulturüberstand in 1,5 ml-Röhrchen überführen
- Zugabe von 530 µl RLT + β ME (1 ml RLT + 10 µl β ME) zu 70 µl Organhomogenat bzw.
- Zugabe von 500 µl RLT + β ME (1 ml RLT + 10 µl β ME) zu 100 µl Zellkulturüberstand
- mit Pipette gut mischen
- Homogenisieren des Ansatzes mit 21 x g Kanüle mind. 5X
- Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol und mit Pipette mischen
- 700 µl des Probenmaterials auf die Säule (in 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel)
- Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 x g
- Restliches Probenmaterial auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel)
- Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 x g
- ca. 700 µl RW1 auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel)
- Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 x g
- 500 µl RPE auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel)
- Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 x g
- 500 µl RPE auf die Säule (in neuem 2 ml-Sammelröhrchen ohne Deckel)
- Zentrifugation für 2 min bei 8.000 x g
- Säule in neues 2 ml-Sammelröhrchen (ohne Deckel)
- Zentrifugation für 1 min bei 8.000 x g
- Zugabe von 60 µl H₂O auf die Säule (in RNase-freiem 1,5 ml-Röhrchen mit Deckel), Säule gut verschließen
- Elution der RNA von der Säule durch Zentrifugation für 1 min bei ca. 8.000 x g
- Lagerung der RNA bei -20 °C bis -80 °C

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.

Im Handbuch zur Diagnostik von IHNV und VHSV des EURL (Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of IHN and VHS) werden die RT-qPCR nach Jonstrup *et al.*, 2013 für den Genomnachweis von VHSV empfohlen. Für den Nachweis des Genoms von IHN-Erregern aller Genogruppen empfiehlt das EURL Da die RT-qPCR zum Nachweis von IHNV-Genom nach Cuenca *et al.*, 2020 und von europäischen IHNV die Methode nach Hoferer *et al.*, 2019 mit verändertem Thermoprofil. Bis zu einer abschließenden Validierung der RT-qPCR nach Hoferer *et al.* 2019 mit IHN-Erregern nicht-europäischer Genogruppen durch das EURL sind im Rahmen der Diagnostik beide Methoden parallel durchzuführen. nicht alle in Deutschland identifizierten IHN-Erreger eindeutig detektiert, empfiehlt das FLI die RT-qPCR nach Hoferer *et al.*, 2019. nach Cuenca *et al.*, 2020 für den Genomnachweis von IHNV sowie nach Jonstrup *et al.*, 2013 für den Genomnachweis von VHSV empfohlen. Ebenfalls zulässig sind andere Nachweisverfahren

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

gleicher Sensitivität und Spezifität. Neben der höheren Spezifität hinsichtlich der Nachweisbarkeit von IHN-Erregern aus Deutschland bietet diese Methode nach Hoferer *et al.* 2019 auch einen optimierten Ablauf auf Grund eines einheitlichen Thermoprofils der RT-qPCR zum Nachweis von IHNV-, VHSV- und IPNV-Genom einschließlich einer internen Kontrolle. Deshalb wird zunächst die RT-qPCR nach Hoferer *et al.*, 2019 für den Genomnachweis von IHNV und VHSV einschließlich der internen Kontrolle aufgeführt und abschließend durch die vom EURL empfohlenen Methoden ergänzt.

- RT-qPCR zum Genomnachweis von IHNV und VHSV einschließlich der internen Kontrolle (Hoferer *et al.*, 2019, Empfehlung des FLI)

Die Reaktion erfolgt in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 5 µl RNA und entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die spezifischen Parameter, wie Primer und Sonden einschließlich der Konzentration sowie die Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

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

Die am FLI ermittelte analytische Sensitivität dieser RT-qPCR von 2 - 7 und 13 TCID₅₀/ml IHNV bzw. VHSV (Hoferer *et al.*, 2019) sollte zur Bewertung der Ergebnisse/Befunde zuvor unter den jeweiligen Laborbedingungen überprüft bzw. verglichen werden.

Tabelle 7: RT-qPCR zum Nachweis von IHNV- und VHSV-Genom (Hoferer *et al.*, 2019, Empfehlung des FLI)

Virus	Primer	Sequenz 5' → 3'	Endkonzentration	Reaktionsbedingungen	Referenz (Quelle)
IHNV	forward	AGA GCC AAG GCA CTG TGC G	900 nM	50 °C 30 min 95 °C 15 min 40 x: 94 °C 10 sec 58 °C 30 sec 72 °C 20 sec	Hoferer <i>et al.</i> 2019
	reverse	TTC TTT GCG GCT TGG TTG A	900 nM		
	Sonde	FAM-AGC GGG ACA GGR ATG ACA ATG GTG-BHQ1	200 nM		
VHSV	forward	AAA CTC GCA GGA TGT GTG CGT CC	900 nM		
	reverse	TCT GCG ATC TCA GTC AGG ATG AA	900 nM		
	Sonde	FAM-TAG AGG GCC TTG GTG ATC TTC TG-BHQ1	250 nM		
β-Actin	forward	CCA CCG GTA TCG TCA TGG A	100 nM		Hoferer <i>et al.</i> 2017, 2019
	reverse	CGT AGC CCT CGT AGA TGG GTA CT	100 nM		
	Sonde	HEX-TCC GGT GAC GG TGT GAC CCA CA-BHQ1	60 nM		

- RT-qPCR zum Genomnachweis von IHNV und VHSV

Das EU-RL für Fischkrankheiten empfiehlt die nachfolgend aufgeführten Methoden zum quantitativen Genomnachweis (RT-qPCR) von IHNV- und VHSV-Genom.

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

Tabelle 8: RT-qPCR zum Nachweis von IHNV- und VHSV-Genom (Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of IHN and VHS, EURL für Fischkrankheiten)

Virus	Primer	Sequenz 5' → 3'	Endkonzentration	Reaktionsbedingungen	Referenz
IHNV	forward	AGA GCC AAG GCA CTG TGC G	900 nM	50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 50 x: 95 °C 15 sec, 60 °C 1 min	Cuenca et al., 2020
	reverse	TTC TTT GCG GCT TGG TTG A	900 nM		
	Sonde	6FAM-TGA GAC TGA GCG GGA CA-NFQ/MGB	200 nM		
IHNV	forward	AGA GCC AAG GCA CTG TGC G	900 nM	50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 50 x: 95 °C 15 sec, 60 °C 1 min	EURL 2021
	reverse	TTC TTT GCG GCT TGG TTG A	900 nM		
	Sonde	FAM-AGC GGG ACA GGR ATG ACA ATG GTG-BHQ1	200 nM		
VHSV	forward	AAA CTC GCA GGA TGT GTG CGT CC	900 nM	50 °C 30 min 95 °C 15 min 40 x: 94 °C 15 sec 60 °C 40 sec 72 °C 20 sec	Jonstrup et al., 2013
	reverse	TCT GCG ATC TCA GTC AGG ATG AA	900 nM		
	Sonde	6FAM-TAG AGG GCC TTG GTG ATC TTC TG-BHQ1	250 nM		

Qualitativer Genomnachweis (RT-PCR)

Unter Verwendung virusspezifischer 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 9 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 9: RT-PCR zum Nachweis von IHNV- und VHSV-Genom (Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of IHN and VHS, EURL für Fischkrankheiten)

Virus	Primer	Sequenz 5' → 3'	Reaktionsbedingungen	Produkt	Referenz (Quelle)
IHNV	forward	AGA GAT CCC TAC ACC AGA GAC	50 °C 30 min 95 °C 2 min 40 x: 95 °C 30 sec 50 °C 30 sec 72 °C 1 min 72 °C 7 min	693 bp	Emmenegger et al. 2000
	reverse	GGT GGT GTT GTT TCC GTG CAA			
VHSV	forward	GGG ACA GGA ATG ACC ATG AT	50 °C 30 min 95 °C 15 min 35 x: 94 °C 30 sec 55 °C 30 sec 68 °C 1 min 68 °C 7 min	320 bp	Kim et al. 2018
	reverse	TCT GTC ACC TTG ATC CCC TCC AG			

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

Die Bewertung der RT-PCR erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktion in einem 1,5 % Agarose-Gel mit Ethidiumbromid oder einem anderen zur Detektion der DNA geeigneten Farbstoff. 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 grundsätzlich zu sequenzieren.

Anhang

Tabelle 1: Arten/Artengruppen, die ein Risiko bei der Verbreitung der IHN darstellen
Gelistete Arten laut Delegierter Verordnung (EU) 2018/1882 und 2022/925 der Kommission

Empfängliche Arten	Überträgerarten
Hecht (<i>Esox lucius</i>)	Sibirischer Stör (<i>Acipenser baerii</i>)
Cutthroat-Forelle (<i>Oncorhynchus clarkii</i>)	Russischer Stör (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)
Keta-Lachs (<i>Oncorhynchus keta</i>)	Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)
Silberlachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Sternhausen (<i>Acipenser stellatus</i>)
Japan-Lachs (<i>Oncorhynchus masou</i>)	Europäischer Stör (<i>Acipenser sturio</i>)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Schwarzer Zwergwels (<i>Ameiurus melas</i>)
Rotlachs (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	Marmorkarpfen (<i>Aristichthys nobilis</i>)
Biwa-Forelle (<i>Oncorhynchus rhodurus</i>)	Edelkrebs (<i>Astacus astacus</i>)
Königslachs (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>)
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)	Europäische Karausche (<i>Carassius carassius</i>)
Seesaibling (<i>Salvelinus alpinus</i>)	Afrikanischer Raubwels (<i>Clarias gariepinus</i>)
Amerikanischer Seesaibling (<i>Salvelinus namaycush</i>)	Karpfen und Japanischer Farbkarpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)
Marmorierte Forelle (<i>Salmo marmoratus</i>)	Dorsch (<i>Gadus morhua</i>)
Forelle (<i>Salmo trutta</i>)	Heilbutt (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)
Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)
Japanischer Seesaibling (<i>Salvelinus leucomaenis</i>)	Europäischer Hausen (<i>Huso huso</i>)
	Getüpfelter Gabelwels (<i>Ictalurus punctatus</i>)
	Katzenwelse (<i>Ictalurus spp.</i>)
	Karpfenfische der Gattung <i>Leuciscus</i> (<i>Leuciscus spp.</i>)
	Schellfisch (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)
	Flunder (<i>Platichthys flesus</i>)
	Signalkrebs (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)
	Roter Amerikanischer Sumpfkrebs (<i>Procambarus clarkii</i>)
	Pangasius (<i>Pangasius pangasius</i>)
	Rotaugen (<i>Rutilus rutilus</i>)
	Zander (<i>Sander lucioperca</i>)
	Rothasel (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)
	Wels (<i>Silurus glanis</i>)
	Schleie (<i>Tinca tinca</i>)

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

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

Tabelle 2: Arten/Artengruppen, die ein Risiko bei der Verbreitung der VHS darstellen
Gelistede Arten laut Delegierter Verordnung (EU) 2018/1882 und 2022/925 der Kommission

Empfängliche Arten	Überträgerarten
Donauhering (<i>Alosa immaculata</i>)	Sibirischer Stör (<i>Acipenser baerii</i>)
Katzenwels (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	Russischer Stör (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)
Steinbarsch (<i>Ambloplites rupestris</i>)	Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>)
Pazifischer Sandaal (<i>Ammodytes hexapterus</i>)	Sternhausen (<i>Acipenser stellatus</i>)
Süßwassertrommler (<i>Apodnotus grunniens</i>)	Europäischer Stör (<i>Acipenser sturio</i>)
Hering (<i>Clupea harengus</i>)	Schwarzer Zergwels (<i>Ameiurus melas</i>)
Pazifischer Hering (<i>Clupea pallasii pallasii</i>)	Adlerfisch (<i>Argyrosomus regius</i>)
Amerikanische Kleine Maräne (<i>Coregonus artedii</i>)	Marmorkarpfen (<i>Aristichthys nobilis</i>)
Heringsmaräne (<i>Coregonus clupeaformis</i>)	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>)
Lavaret (<i>Coregonus lavaretus</i>)	Europäische Karausche (<i>Carassius carassius</i>)
Klippenbarsch (<i>Ctenolabrus rupestris</i>)	Afrikanischer Raubwelsch (<i>Clarias gariepinus</i>)
Seehase (<i>Cyclopterus lumpus</i>)	Karpfen und Japanischer Farbkarpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)
Brandungsbarsch (<i>Cymatogaster aggregata</i>)	Zahnbrasse (<i>Dentex dentex</i>)
Amerikanischer Mägenschaten (<i>Dorosoma cepedianum</i>)	Europäischer Wolfsbarsch (<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Zebraärbling (<i>Danio rerio</i>)	Spitzbrasse (<i>Diplodus puntazzo</i>)
Europäische Sardelle (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	Geißbrasse (<i>Diplodus sargus</i>)
Hecht (<i>Esox lucius</i>)	Zweibindenbrasse (<i>Diplodus vulgaris</i>)
Muskellunge (<i>Esox masquinongy</i>)	Weißer Zackenbarsch (<i>Epinephelus aeneus</i>)
Zebra-Killifisch (<i>Fundulus heteroclitus</i>)	Brauner Zackenbarsch (<i>Epinephelus marginatus</i>)
Pazifischer Kabeljau (<i>Gadus macrocephalus</i>)	Europäischer Hausen (<i>Huso huso</i>)
Dorsch (<i>Gadus morhua</i>)	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)
Dreibärtelige Seequappe (<i>Gaidropsarus vulgaris</i>)	Getüpfelter Gabelwels (<i>Ictalurus punctatus</i>)
Dreistachlige Stichling (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	Katzenwelse (<i>Ictalurus spp.</i>)
Gefleckter Lippfisch (<i>Labrus bergylta</i>)	Karpfenfische der Gattung <i>Leuciscus</i> (<i>Leuciscus spp.</i>)
Kuckuckslippfisch (<i>Labrus mixtus</i>)	Streifenbarsch (<i>Morone chrysops x, Morone saxatilis</i>)
Flussneunauge (<i>Lampetra fluviatilis</i>)	Großkopfmeeräsche (<i>Mugil cephalus</i>)
Gemeiner Sonnenbarsch (<i>Lepomis gibbosus</i>)	Tilapia spp. (<i>Oreochromis</i>)
Blauer Sonnenbarsch (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Nordische Meerbrasse (<i>Pagellus bogaraveo</i>)
Kliesche (<i>Limanda limanda</i>)	Rotbrasse (<i>Pagellus erythrinus</i>)
Wittling (<i>Merlangius merlangus</i>)	Japanische Goldbrasse (<i>Pagrus major</i>)
Schwarzbarsch (<i>Micropterus dolomieu</i>)	Gemeine Meerbrasse (<i>Pagrus pagrus</i>)
Forellenbarsch (<i>Micropterus salmoides</i>)	Pangasius (<i>Pangasius pangasius</i>)
Blauer Wittling (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Rotauge (<i>Rutilus rutilus</i>)
Amerikanischer Streifenbarsch (<i>Morone americana</i>)	Seesaibling (<i>Salvelinus alpinus</i>)
Weißbarsch (<i>Morone chrysops</i>)	Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)
Felsenbarsch (<i>Morone saxatilis</i>)	Zander (<i>Sander lucioperca</i>)

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

Rotbarbe (<i>Mullus barbatus</i>)	Rothasel (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)
Schwarzmund-Grundel (<i>Neogobius melanostomus</i>)	Roter Umberfisch (<i>Sciaenops ocellatus</i>)
Smaragdglanz (<i>Notropis atherinoides</i>)	Wels (<i>Silurus glanis</i>)
Spottail Shiner (<i>Notropis hudsonius</i>)	Senegal-Seezunge (<i>Solea senegalensis</i>)
Silberlachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Seezunge (<i>Solea solea</i>)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Goldbrasse (<i>Sparus aurata</i>)
Oncorhynchus mykiss X Oncorhynchus kisutch Hybriden	Thunfische (<i>Thunnus spp.</i>)
Königslachs (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Großer Thunfisch (<i>Thunnus thynnus</i>)
Japanische Flunder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Schleie (<i>Tinca tinca</i>)
Amerikanischer Flussbarsch (<i>Perca flavescens</i>)	Schattenfisch (<i>Umbrina cirrosa</i>)
Stumpfnasen-Zwergdöbel/ Elritze (<i>Pimephales notatus</i>)	Europäischer Hecht (<i>Esox lucius</i>)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	
Flunder (<i>Platichthys flesus</i>)	
Scholle (<i>Pleuronectes platessa</i>)	
Sandgrundel (<i>Pomatoschistus minutus</i>)	
Schwarzfleck-Sonnenbarsch (<i>Pomoxis nigromaculatus</i>)	
Nagelrochen (<i>Raja clavate</i>)	
Marmorierte Forelle (<i>Salmo marmoratus</i>)	
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)	
Forelle (<i>Salmo trutta</i>)	
Amerikanischer Seesaibling (<i>Salvelinus namaycush</i>)	
Glasaugenbarsch (<i>Sander vitreus</i>)	
Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	
Pazifische Sardine (<i>Sardinops sagax</i>)	
Japanische Makrele (<i>Scomber japonicus</i>)	
Steinbutt (<i>Scophthalmus maximus</i>)	
Senegal-Seezunge (<i>Solea senegalensis</i>)	
Sprotte (<i>Sprattus sprattus</i>)	
Goldmaid (<i>Symphodus melops</i>)	
Eulachon (<i>Thaleichthys pacificus</i>)	
Mittelmeer-Bastardmakrele (<i>Trachurus mediterraneus</i>)	
Stintdorsch (<i>Trisopterus esmarkii</i>)	
Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)	
Himmelsgucker (<i>Uranoscopus scaber</i>)	
Hering (<i>Clupea spp.</i>)	
Felchen (<i>Coregonus spp.</i>)	
Schellfisch (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	
Pazifischer Lachs (<i>Oncorhynchus spp.</i>)	
Seequappe (<i>Onos mustelus</i>)	
Lippfische (<i>Labridae spp.</i>)	
Seehasen (<i>Cyclopteridae spp.</i>)	

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

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 Immunfluoreszenz-Antikörpertest
IHN(V)	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (Virus)
IPN(V)	Infektiöse Pankreasnekrose (Virus)
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
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, Bio-Bank (Virussammlung und Zellkultursammlung des FLI; zellbank@fli.de):

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

FLI, Insel Riems, Zulassungsstelle für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostika

(<https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-fuer-veterinaermedizinische-infektionsdiagnostika/>):

Liste der zugelassenen Mittel

Liste der freigegebenen Chargen

Monoklonale Antikörper Anti-VHSV

Monoklonale Antikörper Anti-IHNV

IHNV-VHSV-Antigen-ELISA

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

Literatur

- Cuenca A, Vendramin N & Olesen NJ, 2020. Analytical validation of one-step-real-time RT-PCR for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Bull Eur Ass Fish Path*, 40(6),259-272.
- 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.
- EURL, 2021. Updated laboratory diagnostic procedures for detecting IHNV RNA—Clarifications and recommendations (Letter to NRLs 16.06.2021). <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals/ihn>
- Hoferer M, Braun A, Skrypski J, Bock S, Thalheim S & Sting R, 2017. One-step cross-genogroup multiplex RT-qPCR with an internal control system for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Virol Methods* 247 (2017) 68-76.
- 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 HJ, Cuenca A, Olesen NJ, 2018. Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture*, 492, 170-183. <http://www.journals.elsevier.com/aquaculture/> doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.03.047
- 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.
- Rasmussen CJ, 1965. A biological study of the Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 126, 427.
- 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.

Falldefinition - Infektiöse Hämatopoetische Nekrose der Salmoniden (IHN); Virus der IHN

Klinisches Bild

Die IHN ist eine mit Ödemen und Hämorrhagien einhergehende Krankheit. Entsprechend der Delegierten Verordnung (EU) 2018/1882 der Kommission (2) ist die IHN als Seuche der Kategorie C + D + E gelistet. Der Wirtsbereich des IHNV ist vorwiegend auf Salmoniden beschränkt. Arten und Artengruppen, die nach derzeitigem Kenntnisstand empfänglich für IHN sind oder diese Erkrankung übertragen können, sind in den Delegierten Verordnungen (EU) 2018/1882 und 2022/925 der Kommission genannt. Das klinische Bild ist geprägt durch folgende Kriterien:

Mortalität: 10 bis 80 %; Lethargie (Randsteher) und sporadische Hyperaktivität; Dunkelverfärbung; Exophthalmus; Anämie; Pseudofaeces (lange weißliche, aus dem Rektum heraushängende Auswürfe); Hämorrhagien; Inappetenz.

Die klinischen Symptome werden unter natürlichen Bedingungen bei Wassertemperaturen bis 14 °C ausgebildet. Bei perakutem Verlauf können diese Symptome fehlen.

Inkubationszeit: fünf bis 15 Tage (abhängig vom Alter der Fische, von der Wassertemperatur, von der Infektionsdosis und von der Virulenz des Erregers)

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

- Virusnachweis (Virusanzucht und -identifizierung mittels Neutralisation, Immunfluoreszenz, ELISA oder RT-PCR)
- Genomnachweis (RT-qPCR)

Der Erstnachweis der Erkrankung in zuvor nicht infizierten Zonen oder Kompartimenten muss durch die Virusisolierung in Zellkultur mit anschließender Bestätigung durch den immunochemischen bzw. molekularbiologischen Virusnachweis oder den Genomnachweis (RT-PCR) des Erregers einschließlich der Sequenzierung des Amplifikationsprodukts bestätigt werden.

Zusatzinformation

Das Auftreten von IHN gilt als bestätigt, wenn der Virusnachweis und/oder der quantitative Genomnachweis (RT-qPCR) positiv ist.

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

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

Epidemiologischer Zusammenhang

- Lebendfischbewegungen
- Kontakte (Personen, Geräte, Wasser) zu anderen Betrieben
- Aussetzen infizierter Fische in Gewässer

Voraussetzung für den Verdacht

Wenn bei Fischen das Ergebnis der

- klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchung
- klinischen und epidemiologischen Untersuchung
- pathologisch-anatomischen und epidemiologischen Untersuchung

den Ausbruch der IHN befürchten lässt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

- Virusanzucht und -identifizierung mittels Neutralisation, Immunfluoreszenz, ELISA oder RT-PCR oder
- Genomnachweis (RT-qPCR)

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) einschl. der Delegierten Verordnungen und Durchführungsbestimmungen in der jeweils gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 in der jeweils gültigen Fassung
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/690 vom 17. Dezember 2019 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der gelisteten Seuchen, die Überwachungsprogrammen in der Union unterliegen, des geografischen Geltungsbereichs solcher Programme und der gelisteten Seuchen, für die der Status „seuchenfrei“ von Kompartimenten festgelegt werden kann
- EU_Diagnostic methods and procedures for surveillance confirmation of IHN and VHS in der jeweils gültigen Fassung
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des Office International des Epizooties (O.I.E.) in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

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

- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen
- Durchführungsverordnung (EU) 2019/1715 vom 30. September 2019 mit Vorschriften zur Funktionsweise des Informationsmanagementsystems für amtliche Kontrollen und seiner Systemkomponenten („IMSOC-Verordnung“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/691 vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für Aquakulturbetriebe und Transportunternehmer, die Wassertiere befördern
- Durchführungsverordnung (EU) 2022/925 vom 14. Juni 2022 zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 betreffend gelistete Wassertierseuchen und die Liste der Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

Falldefinition - Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden (VHS); Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden

Klinisches Bild

Die VHS ist eine mit Ödemen und Hämorrhagien einhergehende Krankheit. Entsprechend der Delegierten Verordnung (EU) 2018/1882 der Kommission (2) ist die VHS als Seuche der Kategorie C + D + E gelistet. Der Wirtsbereich des VHSV ist nicht nur auf Salmoniden beschränkt. Arten und Artengruppen, die nach derzeitigem Kenntnisstand empfänglich für VHS sind oder diese Erkrankung übertragen können, sind in den Delegierten Verordnungen (EU) 2018/1882 und 2022/925 der Kommission genannt.

Das klinische Bild ist geprägt durch folgende Kriterien:

Mortalität: 10 % bis 80 %; Lethargie (Randsteher) und sporadische Hyperaktivität; Dunkelverfärbung; Exophthalmus; Anämie; Pseudofaeces (lange weißliche, aus dem Rektum heraushängende Auswürfe); Hämorrhagien; Inappetenz.

Die klinischen Symptome werden unter natürlichen Bedingungen bei Wassertemperaturen bis 14 °C ausgebildet. Bei perakutem Verlauf können diese Symptome fehlen.

Inkubationszeit: fünf bis 15 Tage (abhängig vom Alter der Fische, von der Wassertemperatur, von der Infektionsdosis und von der Virulenz des Erregers)

Labordiagnostischer Nachweis

Positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden:

- Virusnachweis (Virusanzucht und -identifizierung mittels Neutralisation, Immunfluoreszenz, ELISA oder RT-PCR)
- Genomnachweis (RT-qPCR)

Der Erstnachweis der Erkrankung in zuvor nicht infizierten Zonen oder Kompartimenten muss durch die Virusisolierung in Zellkultur mit anschließender Bestätigung durch den immunochemischen bzw. molekularbiologischen Virusnachweis oder den Genomnachweis (RT-PCR) des Erregers einschließlich der Sequenzierung des Amplifikationsprodukts bestätigt werden.

Zusatzinformation

Das Auftreten von VHS gilt als bestätigt, wenn der Virusnachweis und/oder der quantitative Genomnachweis (RT-qPCR) positiv ist.

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

Epidemiologischer Zusammenhang

- Lebendfischbewegungen
- Kontakte (Personen, Geräte, Wasser) zu anderen Betrieben
- Aussetzen infizierter Fische in Gewässer

Voraussetzung für den Verdacht

Wenn das Ergebnis der

- klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchung
- klinischen und epidemiologischen Untersuchung
- pathologisch-anatomischen und epidemiologischen Untersuchung

den Ausbruch der VHS befürchten lässt.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

- Virusanzucht und -identifizierung mittels Neutralisation, Immunfluoreszenz, ELISA oder RT-PCR oder
- Genomnachweis (RT-qPCR)

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) einschl. der Delegierten Verordnungen und Durchführungsbestimmungen in der jeweils gültigen Fassung
- Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 in der jeweils gültigen Fassung
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/690 vom 17. Dezember 2019 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der gelisteten Seuchen, die Überwachungsprogrammen in der Union unterliegen, des geografischen Geltungsbereichs solcher Programme und der gelisteten Seuchen, für die der Status „seuchenfrei“ von Kompartimenten festgelegt werden kann
- EU_Diagnostic methods and procedures for surveillance confirmation of IHN and VHS in der jeweils gültigen Fassung
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" des Office International des Epizooties (O.I.E.) in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)

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

- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen
- Durchführungsverordnung (EU) 2019/1715 vom 30. September 2019 mit Vorschriften zur Funktionsweise des Informationsmanagementsystems für amtliche Kontrollen und seiner Systemkomponenten („IMSOC-Verordnung“)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/691 vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für Aquakulturbetriebe und Transportunternehmer, die Wassertiere befördern
- Durchführungsverordnung (EU) 2022/925 vom 14. Juni 2022 zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 betreffend gelistete Wassertierseuchen und die Liste der Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

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