

# Auswertung des nationalen Ringtests zur Diagnostik von viralen Fischseuchen-Erregern

Heike Schütze, Sven M. Bergmann und Uwe Fischer

FLI, Institut für Infektionsmedizin

Gemäß §27 des Gesetzes zur Vorbeugung und Bekämpfung von Tierseuchen führten die nationalen Referenzlabore (NRL) für gelistete Fischseuchen 2022 den jährlichen Ringversuch zur Diagnostik der viralen Erreger der als Kategorie C+D+E bzw. E gelisteten Krankheiten Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS), infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN), Infektiöse Anämie der Lachse (ISA) bzw. Koi-Herpesvirus Infektion (KHV-I) durch.

## Aufgabenstellung

Der nationale Ringtest FLI\_RT2022 umfasste insgesamt fünf Proben. Alle Proben enthielten jeweils 2 x ca. 1 ml virushaltiges bzw. nicht virushaltiges Zellkulturmaterial. Ziel des Ringvergleichs war die Diagnostik der o.g. Erreger auf Grundlage der Delegierten Verordnungen EU 2020/687 und EU2020/689 und der amtlichen Methodensammlung des FLI. Die teilnehmenden Labore wählten dabei selbst, ob der Erregernachweis mittels Zellkulturverfahren und anschließender Bestätigung durch immunhistochemische Techniken und/oder durch Genomnachweis des Erregers durchgeführt wurde.

## Teilnahme

Insgesamt nahmen 23 in Deutschland amtlich benannte Labore sowie ein Labor aus Österreich teil. Von den 24 Teilnehmenden beteiligten sich 23 Labore an der Diagnostik

der Kategorie E-Seuche KHV-I. Die Nachweisverfahren für Erreger der IHN und VHS (Kategorie C+D+E) sind in 23 Laboren etabliert. Obwohl Deutschland bislang frei von der Kategorie C-Seuche ISA ist, führten 19 Labore Nachweisverfahren zur Diagnostik des ISA-Erregers durch.

## Ergebnisse

Die Erreger wurden von allen Teilnehmenden korrekt diagnostiziert. Die Identifizierung erfolgte überwiegend mittels Genomnachweis in der quantitativen (RT-)PCR ((RT)-qPCR). Mehr als die Hälfte der Labore isolierte die Erreger IHNV/ VHSV in der Zellkultur. Zur Bestätigung des positiven Erreger- bzw. Genomnachweises nutzten einige Labore konventionelle Amplifizierungsverfahren einschließlich der Sequenzierung. Tabelle 1 gibt einen Überblick zu den angewandten Techniken.

## Erregernachweis mittels Zellkultur

IHNV und VHSV (Ampulle 5) wurden in 15 von 23 Laboren in der Zellkultur isoliert und anschließend im Immunfluoreszenztest (IFT, 12 Labore), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, vier Labore) identifiziert. Den Virusgehalt ermittelten acht Teilnehmer parallel auf verschiedenen Zelllinien. Dabei wurden die empfohlenen Zelllinien der Elritze CCLV Rie 57 (FHM) von einem Labor, CCLV Rie 173 (EPC) von acht Laboren und der Regenbogenforelle CCLV Rie 38 (RTG-2), 686 (RTG-2/f) von sieben Laboren bzw. des Sonnenbarsches CCLV Rie 290 (BF-2) oder 88 (RT/F) von drei Laboren verwendet. In Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie variieren die ermittelten Titer

Ampulle	1	2	3	4	5	
Spezies	Karpfen	Karpfen	Lachs	Lachs	Forelle	
Ampulleninhalt	KHV	negativ	negativ	ISAV-HPRdel*	IHNV	VHSV
Teilnehmer	23	23	19	19	23	23
Virusnachweis	4	-	-	7	15	15
Zellkultur	4	-	-	7	15	15
Titer	3	-	-	3	9	9
IFT	2	-	-	6	12	12
ELISA	-	-	-	-	3	3
PLA	1	-	-	1	1	1
Elektronenmikroskopie	1	-	-	5	4	4
Genomnachweis	23	-	-	17	23	23
(RT-)qPCR	22	-	-	15	20	22
(RT-)PCR	8	-	-	11	9	8
Sequenzierung	6	-	-	7	5	4

Tab. 1: Teilnahme an der Diagnostik viraler Fischseuchenerreger im Rahmen des FLI\_RT2022. Aufgeführt ist die Anzahl der Teilnehmer mit positivem Erregernachweis und den angewandten Methoden. - negativ bzw. nicht durchgeführt; \* Die Ergebnisse „ISAV“ ohne Differenzierung der HPR-Deletion bzw. „Orthomyxovirus“ wurden als positiv gewertet.

zwischen  $8,43 \times 10^4$  auf der CCLV Rie 290 (BF-2) und  $1,08 \times 10^6$  auf der CCLV Rie 173 (EPC). Laut NRL wurde der Virusgehalt für die IHN- und VHSV-Doppelinfection in Ampulle 5 unter Verwendung der Zelllinien EPC sowie BF-2 mit  $5,00 \times 10^5$  und RTG-2 mit  $3,41 \times 10^5$  ermittelt. In der Zellkultur wäre eine Differenzierung der viralen Erreger von Ampulle 5 jeweils nur nach Neutralisierung von IHN- bzw. VHSV möglich.

Insgesamt beteiligten sich 19 der 24 teilnehmenden Labore an der Diagnostik von ISAV. Der Erreger der Ampulle 4 (ISAV-HPRdel) wurde erfolgreich von sieben Laboren in der Zellkultur (CCLV Rie 926, ASK bzw. CCLV Rie 489, SHK) isoliert und mittels IFT (5 Labore), ELISA (1 Labor) oder Elektronenmikroskopie (5 Labore) bestätigt. Die übermittelten Titer korrelieren mit den Angaben des NRL (Abb. 1). Nach Infektion mit dem Inhalt der Ampulle 1 (KHV) wurde von vier Laboren in der Zellkultur ein zytopathischer Effekt (CPE) festgestellt und anschließend mittels IFT (zwei Labore) und Peroxidase-linked Immunosorbent Assay (PLA) bzw. durch elektronenmikroskopische Analyse (jeweils ein Labor) als KHV identifiziert. Die übermittelten Titer (zwei Labore) entsprechen der Titerangabe des NRL (Abb. 1).

### Genomnachweis

Von den teilnehmenden Laboren wurde vorwiegend die (RT)-qPCR zum Nachweis von KHV-, ISAV-, IHN- und VHSV-Genom eingesetzt (Tab. 1). Die übermittelten cq-Werte sind in Abbildung 2 graphisch zusammengefasst. Die Genome von IHN- und VHSV (Ampulle 5) wurden von allen Teilnehmenden korrekt nachgewiesen. Zur Anwendung kamen die RT-qPCR zum Nachweis von IHN-Genom in 20 bzw. von VHSV-Genom in 22 Laboren. Der cq-Mittelwert beträgt ca. 24 sowohl für IHN- als auch VHSV. Die maximale Differenz zum Mittelwert beträgt ~ 3 für IHN- bzw. 4,9 für VHSV. Generell

besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den ermittelten Virustitern und den cq-Werten, insbesondere auch bei den Laboren, die beide Methoden durchgeführt haben. Die RT-PCR wurde in neun Laboren zum Nachweis von IHN- bzw. in acht Laboren zur Identifizierung von VHSV eingesetzt. Methoden zum Genomnachweis des ISAV sind in 17 Laboren etabliert.

15 Labore führten die RT-qPCR durch. Die übermittelten cq-Werte variieren zwischen 19,9 und 30,6. Bezogen auf den errechneten Mittelwert von 23,6 sind die Unterschiede der ermittelten cq-Werte zum Teil erheblich. Die meisten Labore ermittelten jedoch für das ISAV-Genom einen cq-Wert von 21-24, was einer maximalen Abweichung des Virusgehaltes um den Faktor 8 entspricht. Die Identifizierung des ISAV-Genoms mittels RT-PCR erfolgte in elf Laboren. Sieben teilnehmende Labore identifizierten nach Sequenzierung des entsprechenden RT-PCR-Produktes den Erreger der gelisteten Erkrankung ISA, ISAV-HPRdel. An der Identifizierung des Erregers der KHV-I beteiligten sich alle 23 Labore mit Erfolg. Das entsprechende Genom wurde in 22 Laboren in der qPCR und in acht Laboren in der PCR korrekt nachgewiesen. Der KHV-Genomnachweis wurde von sechs Laboren durch Sequenzierung des PCR Produktes bestätigt. Die übermittelten cq-Werte unterscheiden sich untereinander maximal um etwa 5,8. Bezogen auf den Mittelwert von 21,27 beträgt die Differenz zum Minimalwert 2,62 und zum Maximalwert 3,15. Dies entspricht in etwa einer Abweichung des Virusgehaltes (TCID<sub>50</sub>) um den Faktor 10.

### Fazit

Die Ergebnisse des diesjährigen Ringtests bestätigen somit erneut die hohe Fachkompetenz der benannten Labore.

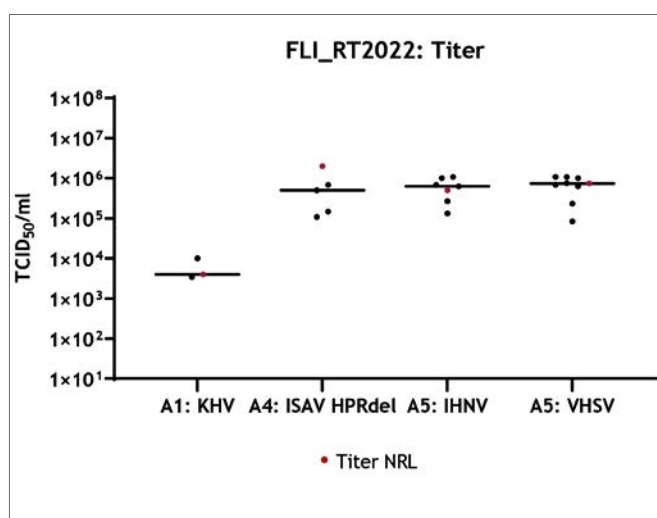


Abb. 1: Bestimmung des Virusgehaltes (Titer) der Ringtestproben. Jeder Punkt entspricht dem jeweils höchsten Titer, der von den teilnehmenden Laboren auf den entsprechend empfänglichen Zellen bestimmt wurde. Rot gekennzeichnet sind die ermittelten Werte des zuständigen NRL.

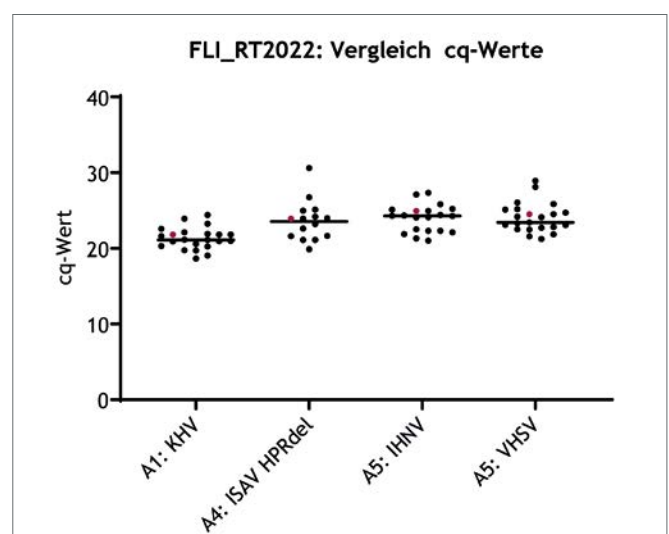


Abb. 2: Bestimmung der Erreger-Genomlast (cq-Wert) der Ringtestproben. Jeder Punkt entspricht dem übermitteltem cq-Wert je Labor. Rot gekennzeichnet sind die ermittelten Werte des zuständigen NRL.