

Amtliche Methode und Falldefinition

Infektion mit dem HPR- deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia Virus, ISA)

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	4
1.3 Differenzialdiagnose	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	5
1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)	5
2. Untersuchungsmaterial.....	6
2.1 Diagnosemethoden und amtliche Untersuchungen	6
2.2 Probenaufbereitung.....	9
2.3 Probenversand	10
2.4 Entnahme von zusätzlichem diagnostischen Material.....	11
3. Untersuchungsgang	12
3.1 Untersuchung von Proben mittels RT-(q)PCR und Sequenzierung	12
3.2 ISAV-Isolierung in Zellkulturen	20
3.3 Untersuchung anderer Gewebe	23
3.4 Histologie	23
3.5 Immunhistochemie (IHC)	24
3.6 Bezugsquellen für diagnostische Reagenzien und Zellkulturen	25
Literatur.....	26
Falldefinition - Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (ISA) ..	27

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia Virus, ISAV) ist eine Infektionskrankheit der Atlantischen Lachse (*Salmo salar*) und wird durch ein Orthomyxovirus, dem HPR-deletierten 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, kommen jedoch als Überträger des Virus in Frage. Im Anhang der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 sind als empfängliche Arten einer Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), der Atlantische Lachs (*Salmo salar*) und die Bachforelle (*Salmo trutta*) gelistet. Überträgerarten sind in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 nicht gelistet. Ein natürliches Reservoir des ISAV ist nicht bekannt.

Die Ausbreitung des Virus als Folge von subklinischen Infektionen der „Smolt“-Lachse von Farm zu Farm durch Wellboats (Schiffe zum Transport oder zur Haltung von Fischen), ausgehend von Schlachthäusern oder der Fischindustrie, wird begünstigt, wenn infizierte Fische transportiert bzw. Organmaterial ISA-infizierter Tiere oder unbehandeltes Abwasser direkt ins Meer eingeleitet werden.

Zu den Umweltfaktoren, die die Infektion beeinflussen, zählen in latent infizierten Populationen verschiedene Stressfaktoren, wie z. B. Behandlungen gegen Parasiten (Fischläuse, Cestoden) oder andere Infektionskrankheiten. Diese Belastungen können mit zwei- bis dreiwöchiger Verzögerung zu ISA-Ausbrüchen führen.

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

Die Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV wird durch ein behülltes Virus hervorgerufen, welches morphologische, biochemische und genomische Eigenschaften der Orthomyxoviren besitzt. Die Krankheit ist im Anhang der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 in die Kategorien C, D und E eingeordnet. Laborarbeiten mit ISAV sollten unter L2-Bedingungen nur unter zusätzlichen Auflagen (eingeschränkter Personenverkehr,

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

zwei Tage kein Kontakt zu Nutzfischen) gestattet werden. Für Tierversuche werden L3-Bedingungen empfohlen.

Nach derzeitiger Rechtslage sind nur hochpathogene HPR-Del-Stämme (Deletion in der hochpolymorphen Region des Hämagglutininesterase-Gens), jedoch nicht die apathogenen undeletierten HPR-0-Stämme des ISAV von seuchenrechtlicher Relevanz.

Die Inzidenz der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV kann erfolgreich durch die Einführung von allgemeinen Maßnahmen wie die Reglementierung des Fischtransports sowie die obligatorische Kontrolle der Bestände und Schlachthäuser reduziert werden. Gleichzeitig müssen spezifische Maßnahmen festgelegt werden, die infizierte, infektionsverdächtige und deren benachbarte Aquakulturbetriebe betreffen. Die Schlachthaushygiene, das Rein-Raus-Prinzip in produzierenden Farmen sowie die Desinfektion von Abwässern aus Farmen, Schlachthäusern und der fischverarbeitenden Industrie müssen ebenfalls mit in die Bekämpfung einbezogen werden.

1.2 Klinische Symptomatik

Klinisch ist die systemische und letal verlaufende Viruserkrankung durch Anämie, Aszites, geschwollene und vergrößerte Leber (sehr dunkel) und Milz, aber auch durch petechiale Blutungen im Peritoneum gekennzeichnet. Blutungen im Auge werden ebenfalls 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 Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV 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 Differenzialdiagnose

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

1.4 Diagnostische Indikation

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

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

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 \(EURL\) für Fisch- und Krebstierkrankheiten, DTU National Institute of Aquatic Resources \(DTU Aqua\), Kemitovet, Building 202, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark, Phone: +45 25 52 05 80](#)

Die Diagnostik der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV wird in den benannten Untersuchungseinrichtungen der Bundesländer durchgeführt. Die Bestätigung eines Primärausbruches erfolgt am NRL für ISA (NRL-ISA) des Friedrich-Loeffler-Instituts.

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

Die Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV ist eine in der Delegierten Verordnung (EU) 2018/1629 gelistete Seuche. Die Diagnosemethoden zur Tilgung der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV sowie zur Erlangung und Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“ sind in der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 Anhang VI Teil II Kapitel 2 aufgeführt.

Es gelten folgende Rechtsakte:

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. 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“)
- 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) 2020/687 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

- 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) 2020/690 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
- 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
- "Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases" der **OIE** WOAH in der jeweils aktuellen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

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. Sie ist im Anhang VI Kapitel 2 der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 festgelegt. Bei der Beprobung und Laboruntersuchung für die Durchführung von Überwachungs- oder Tilgungsprogrammen oder zur Bestätigung des Vorliegens der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV oder zur Ausräumung eines Verdachts darauf sind gemäß der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 für die Gewährung und Aufrechterhaltung des Status „seuchenfrei“ die im Anhang VI Teil II Kapitel 2 Abschnitt 5 festgelegten Diagnosemethoden zu verwenden. Die Testung hat in Übereinstimmung mit den vom EURL für Fisch- und Krebstierkrankheiten genehmigten detaillierten Diagnosemethoden zu erfolgen.

Aufgrund des Seuchenfreiheitsstatus erfolgt die Überwachung auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV in Deutschland passiv. Die passive Überwachung bedeutet eine verbindliche unverzügliche Anzeige des Auftretens der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV oder einer erhöhten Mortalität bzw. eines entsprechenden Verdachts. In diesem Falle müssen Gesundheits- und Laboruntersuchungen eingeleitet werden.

2.1 Diagnosemethoden und amtliche Untersuchungen

Dem Kapitel 2.1 liegt die Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 zugrunde, aus der nachfolgend in Teilen zitiert wird.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

2.1.1 Proben

Folgende Organe und Gewebematerialien sind als Proben zu nehmen und zu untersuchen:

- a) Histologie: Kopfnieren, Leber, Herz, Pankreas, Darm, Milz und Kieme;
- b) Immunhistochemie: Rumpfnieren, Herz einschließlich Herzklappen und *Bulbus arteriosus*;
- c) RT-(q)PCR-Analyse: Rumpfnieren und Herz;
- d) Zellkultur: Rumpfnieren, Herz, Leber und Milz.

Organteile von höchstens fünf Fischen können gepoolt werden.

2.1.2 Diagnosemethoden zur Anerkennung oder Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“

Die Diagnosemethodik zur Anerkennung oder Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“ entsprechend den Abschnitten 2 bis 4 ist die RT-qPCR mit nachfolgender konventioneller RT-PCR und Sequenzierung des HE-Gens aus positiven Proben in Übereinstimmung mit den detaillierten Diagnosemethoden und -verfahren, die vom EURL für Fischseuchen genehmigt sein müssen.

Ergibt die RT-qPCR einen Positivbefund, so sind weitere Proben zu untersuchen, bevor erste Bekämpfungsmaßnahmen gemäß den Artikeln 55 bis 65 der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 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 Gewebepreparaten 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 Diagnosemethoden für den Ausschluss bzw. die Bestätigung des Vorliegens der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV

Muss ein Verdacht auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV gemäß Artikel 55 der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 bestätigt oder ausgeschlossen werden, müssen folgende Anforderungen hinsichtlich Gesundheitsbesuch, Probenahme und Untersuchung erfüllt werden:

- a) in dem verdächtigen Betrieb wird mindestens ein Gesundheitsbesuch und eine Beprobung von zehn moribunden Fischen vorgenommen, wenn klinische Anzeichen für eine Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV oder entsprechende postmortale Läsionen beobachtet werden, oder von mindestens 30 Fischen, wenn keinerlei klinische oder postmortale Anzeichen beobachtet werden. Die Proben sind mit einer oder mehreren der unter 2.1.2 genannten Diagnosemethoden in Übereinstimmung mit den vom EURL für Fischseuchen genehmigten detaillierten Diagnosemethoden und -verfahren zu testen;

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

- b) ergibt die RT-qPCR einen Positivbefund für HPR-deletiertes ISAV, so sind weitere Proben zu untersuchen, bevor erste Bekämpfungsmaßnahmen gemäß Artikel 58 der Delegierten Verordnung (EU) 2020/689 durchgeführt werden. Ein Verdacht auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV wird unter Verwendung der vom EURL für Fischseuchen genehmigten detaillierten Methoden und Verfahren 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
 - ii) Nachweis des ISAV mittels RT-qPCR, einschließlich Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion und Isolierung und Identifizierung des ISAV in Zellkultur von mindestens einer Probe eines Fisches aus dem Betrieb;
- c) werden klinische, pathologisch-anatomische oder histopathologische Veränderungen beobachtet, die auf eine Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV hindeuten, so muss dieser Verdacht gemäß den vom EURL für Fischseuchen genehmigten Verfahren durch einen Nachweis des Virus mittels zweier Diagnosemethoden mit unterschiedlichen Nachweisgrundsätzen, wie beispielsweise RT-qPCR und IHC, erhärtet werden.

Der Verdacht auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV kann ausgeschlossen werden, wenn Tests und Untersuchungen über einen Zeitraum von zwölf Monaten ab dem Zeitpunkt der Verdachtsmeldung keine weiteren Hinweise auf eine Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV ergeben.

Nachfolgend sind die Programme zur Erlangung und Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“ tabellarisch dargestellt.

Tabelle 1.A: Programm für Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimente während des zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erlangung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“

Jahr der Überwachung	Zahl der Gesundheitsbesuche pro Jahr in jedem Betrieb	Zahl der Laboruntersuchungen pro Jahr ⁽¹⁾	Zahl der Fische in der Probe
1. Jahr	6	2	75
2. Jahr	6	2	75

⁽¹⁾ Proben müssen in jedem Jahr (im Frühjahr und im Herbst) entnommen werden. Höchstzahl Fische pro gepoolte Probe: 5.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Tabelle 1.B: Programm für Mitgliedstaaten, Zonen oder Kompartimente zur Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“ ⁽¹⁾

Risikoniveau ⁽²⁾	Zahl der Gesundheitsbesuche pro Jahr	Zahl der Laboruntersuchungen pro Jahr ^{(3), (4)}	Zahl der Fische in der Probe
Hoch	2	2	30
Mittel	1	1	30
Gering	einmal alle zwei Jahre	einmal alle zwei Jahre	30

- (1) 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) Risikoniveau, das dem Betrieb von der zuständigen Behörde wie in Teil I Kapitel 2 Absatz 1 angegeben, zugewiesen wird, außer im Fall abhängiger Kompartimente, wo alle Betriebe als Betriebe mit hohem Risiko angesehen werden.
- (3) Proben müssen im Frühjahr und Herbst entnommen werden, wenn zwei Proben jährlich erforderlich sind.
- (4) Proben müssen im Frühjahr oder Herbst entnommen werden, wenn eine Probe jährlich erforderlich ist.
Höchstzahl Fische pro gepoolte Probe: 5.

2.2 Probenaufbereitung

Fischproben zum Zwecke der Laboruntersuchungen auf HPR-deletiertes ISAV sind möglichst nicht zu poolen. Für die Zwecke der Überwachung auf Infektionen mit dem HPR-deletierten ISAV dürfen jedoch Proben von bis zu fünf Fischen gepoolt werden. Von allen Fischen sind für die Analyse mittels RT-(q)PCR Organproben von Rumpfniere und Herz zu entnehmen. Mithilfe steriler Instrumente werden Teile dieser Organe in ein Röhrchen mit mindestens dem 10-fachen Volumen einer RNA-Konservierungslösung von erwiesener Wirksamkeit (z. B. RNALater) überführt. In einem Röhrchen kann Gewebematerial von bis zu fünf Fischen zusammengeführt werden, das dann eine gepoolte Probe darstellt. Das Gewicht des Gewebes in einer Probe muss ca. 0,5 g betragen. Sind die Fische zu klein, um eine Probe mit dem erforderlichen Gewicht zu generieren, so können Teile von Rumpfniere, Herz, Milz, Leber oder Pylorusblindsäcken – in dieser Reihenfolge – entnommen werden, bis ein Gesamtgewicht von ca. 0,5 g erreicht ist.

Gewebe für histologische Untersuchungen sind möglichst von frisch getöteten Fischen zu entnehmen, die auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV hindeutende klinische Symptome aufweisen. Es sind Organareale mit angrenzenden Läsionen zu beproben, wobei mithilfe eines Skalpellens Teile von Rumpfniere, Herz, Leber, Pankreas, Darm, Kiemen und Milz zu entnehmen und in 8 - 10 % (vol : vol) gepufferte Formalin-Kochsalzlösung zu überführen sind. Das Verhältnis Fixans : Gewebe muss mindestens 10 : 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 Kopf- oder Rumpfniere, Herz, Leber und Milz

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

entfernt und in sterile Röhrchen 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 sollte $1,0 \pm 0,5$ g betragen.

2.3 Probenversand

Fische können auch unzerteilt (ganz) zum Labor gesandt werden, sofern die in Absatz 3 festgelegten Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt werden können. Ganze Fische müssen mit saugfähigem Material 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 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 Proben für die RT-(q)PCR und virologische Untersuchungen 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 Fixans für histologische Untersuchungen transportiert, so ist es in auslaufsicheren Röhrchen in stoßfesten Behältern zu versenden. Das Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.

Beim Probenversand sind die gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Gefahrgut zu beachten. Siehe hierzu Verpackungsvorschriften nach IATA bzw. ADR für diagnostische Proben (UN3373) und chemische Gefahrstoffe wie z. B. Formalin (UN2209, begrenzte Mengen beachten!). Verpackung und Beschriftung des zu versendenden Materials müssen mindestens die Anforderungen der Verpackungsvorschrift P 650 (Klassifizierung: UN 3373) erfüllen. Sicherer ist es, zusätzlich Biobottles nach Verpackungsvorschrift P 620 zu verwenden.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

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 diagnostischem Material

Mit Einverständnis des diagnostischen Labors können andere Fischgewebe, als die in Nummer 2.1.1 genannten, entnommen und für Zusatzuntersuchungen aufbereitet werden.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

3. Untersuchungsgang

3.1 Untersuchung von Proben mittels RT-(q)PCR und Sequenzierung

Die Diagnosemethode der Wahl für das Screening auf ISA ist die RT-qPCR. Da nur Infektionen mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse seuchenrechtlich reglementiert werden, ist bei positivem Genomnachweis eine RT-PCR zur Sequenzierung der hochpolymorphen Region (HPR) aus dem Segment 6 des ISAV erforderlich, mit dem Ziel der differenzialdiagnostischen Unterscheidung zwischen HPR-deletiertem (HPRdel) und -nichtdeletiertem (HPR0) ISAV.

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.

Isolierung viraler und zellulärer RNA aus Zellkulturüberstand (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen)

1. 560 µl Puffer AVL mit Carrier-RNA (1 µg/µl) in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettieren
2. 140 µl Plasma, Serum, Urin, Zellkulturüberstand oder zellfreie Körperflüssigkeit hinzugeben, Homogenisieren durch Pulsvortexen für 15 s
3. 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. kurz anzentrifugieren, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen
5. 560 µl Ethanol (96-100%) hinzufügen und durch Pulsvortexen für 15 s homogenisieren, kurz anzentrifugieren, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen
6. 630 µl der Lösung auf QIAamp Mini-Säule auftragen (in 2 ml Sammelröhrchen) ohne Rand zu benetzen, Deckel schließen und bei 6000 x g für 1 min zentrifugieren; QIAamp Mini-Säule danach in ein sauberes 2-ml-Sammelröhrchen stellen und das Röhrchen mit dem Filtrat verwerfen; falls die Lösung die Membran nicht vollständig passiert hat, erneut mit einer höheren Geschwindigkeit zentrifugieren
7. QIAamp Mini-Säule vorsichtig öffnen und Schritt 6 wiederholen; falls Probenvolumen mehr als 140 µl beträgt, diesen Schritt wiederholen, bis gesamtes Lysat aufgebraucht ist
8. QIAamp Mini-Säule öffnen und 500 µl Puffer AW1 hinzufügen, Deckel schließen und bei 6000 x g für 1 min zentrifugieren, QIAamp Mini-Säule in 2-ml-Sammelröhrchen (mitgeliefert) platzieren und Röhrchen mit Filtrat entsorgen
9. QIAamp Mini-Säule öffnen und 500 µl Puffer AW2 hinzufügen, Deckel schließen und bei 20.000 x g für 3 min zentrifugieren, weiter direkt mit Schritt 11; **oder** um eine mögliche Kontamination mit Puffer AW2 zu eliminieren, Schritt 10 ausführen und dann weiter mit Schritt 11.
Hinweis: Restpuffer AW2 im Eluat kann im weiteren Verlauf zu Problemen führen.
10. Optional: QIAamp Mini-Säule in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen (nicht mitgeliefert) stellen, altes

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Sammelröhrchen mit Filtrat entsorgen, Zentrifugation bei Höchstdrehzahl für 1 Minute

11. QIAamp Mini-Säule in sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht mitgeliefert) stellen, altes Sammelröhrchen mit Filtrat entsorgen, QIAamp Mini Säule öffnen und 60 µl Puffer AVE (äquilibriert auf Raumtemperatur) hinzufügen, Deckel schließen und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
12. Zentrifugation bei 6000 x g für 1 Minute.

Hinweis: Die Elution mit 60 µl Buffer AVE reicht aus, um mindestens 90 % der viralen RNA zu eluieren. Eine wiederholte Elution mit 2 x 40 µl Puffer AVE kann die Ausbeute um bis zu 10 % steigern. Die Elution mit Volumina von weniger als 30 µl führt zu reduzierter Ausbeute und erhöht nicht die Endkonzentration der RNA im Eluat.

Isolierung von RNA aus Organmaterial und EDTA-Blut (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

ACHTUNG: bei Erstbenutzung des Testkits Zugabe von Ethanol (≥99,8 %, p.a.) zum RPE-Puffer

1. A) Homogenisieren von Organmaterial unter Verwendung des TissueLyser

Ansatz im RNase-freien 2,0 ml Eppendorfröhrchen:

- 600 µl RLT-Puffer
- 6 µl β-Mercaptoethanol
- 5 µl IC2-RNA (optional)
- RNase-freie nichtrostende Stahlkugel (Durchmesser 5 mm)
- Zugabe von 10 bis 30 mg Organmaterial
- gut mixen
- Homogenisieren im TissueLyser für 2 min bei 30 Hertz
- zentrifugieren 3 min, full speed
- Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen (1,5 ml) überführen, Pellet verwerfen

B) Homogenisieren von Organmaterial unter Verwendung des gentle MACS Dissociators,

- ca. 0.5-4 g Organmaterial in M-Tubes (Miltenyi Biotec) verbringen
- Zugabe von ca. 10 ml Zellkulturmedium
- Miltenyi Homogenisator, Programm RNA 1 oder RNA 2
- Überführen des Homogenates in 50 ml Röhrchen
- Auffüllen mit Zellkulturmedium (End-Volumenverhältnis von Organ: Medium = 1:10)
- 15 min bei 4 °C und ca. 3.000 x g zentrifugieren
- Überstand in neues Röhrchen dekantieren
- Zugabe von Gentamycin (1mg/ml)
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank (-5 °C)
- 15 min bei 4 °C und ca. 4.000 x g zentrifugieren

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

- Überstand mittels 0.8 µm/ 0.45µm Filter steril filtrieren (wenn möglich zusätzlich mit 0.2 µm)
- Probe aliquotieren (z.B.: 2 x 5 ml, 3 x 1.5 ml, ~ 70 µl f. RNA-Isolierung, ~ 300 µl f. DNA Isolierung)
- Geklärtes Homogenat unmittelbar für diagnostische Untersuchungen (z.B.: Zellkultur, RNA-Isolierung aus 70 bis 200µl des Homogenates) verwenden oder bei -80°C lagern
- Ansatz mit 100 µl Homogenat:
 - 100 µl Organhomogenat
 - 500 µl RLT-Puffer
 - 5 µl β-Mercaptoethanol
 - 5 µl IC2-RNA (optional)
 - mit Pipette gut mischen, bei Bedarf mit Kanüle homogenisieren

C) EDTA-Blut

Ansatz im RNase-freien 2,0 ml Eppendorfröhrchen:

- 600 µl RLT-Puffer
 - 6 µl β-Mercaptoethanol
 - 5 µl IC2-RNA (optional)
 - Zugabe von 100 µl EDTA-Blut
1. Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol
 - mit Pipette mischen oder mixen
 - kurz anzentrifugieren
 2. Überführen von 650 µl Lysat auf die Säule
 - 15 sec bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugieren
 - Durchfluss verwerfen
 - Wiederholung mit dem restlichen Lysat
 - Durchfluss verwerfen
 - Säule in neues Auffanggefäß überführen
 3. 700 µl RW 1 Puffer auf die Säule geben
 - 15 sec bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugieren
 - Durchfluss verwerfen
 - Säule in neues Auffanggefäß überführen
 4. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben
 - 15 sec bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugieren

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

- Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues Auffanggefäß überführen

- 5. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben
 - 2 min bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugieren
 - Durchfluss verwerfen
 - Optional: Säule in ein neues Auffanggefäß überführen
 - 1 min bei voller Leistung zentrifugieren
 - Durchfluss verwerfen
 - Säule in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführen

- 6. Elution der RNA: 30-60 µl RNase freies Wasser ins Zentrum der Säule tropfen
 - 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
 - 1 min bei $8000 \times g$ zentrifugieren
 - Säule verwerfen

Isolierung viraler und zellulärer RNA aus Organmaterial und Zellkulturüberstand

TRIZOL, Life Technologies, UK

1. Organe

- 50-100 mg Organ + 1 ml Trizol-Reagenz + sterile nichtrostende Stahlkugel + 5 µl IC2 (optional)
- Homogenisierung mit dem TissueLyser bei 30 Hertz, 2 min
- Zentrifugation bei $20.000 \times g$, 3 min, bei Raumtemperatur, weiter mit Überstand

Zellkultur und andere Flüssigkeiten

- 250 µl Flüssigkeit (z.B. Zellkultur nach Gefrier-/Tauschritt) + 750 µl Trizol LS Reagenz + 5 µl interne Kontrolle (z.B. IC2 optional) - vortexen

Weiter:

2. Inkubation 5 min bei Raumtemperatur
3. Kurz anzentrifugieren
4. Zugabe von 200 µl Chloroform, 15 sec vortexen
5. Inkubation 5 min bei Raumtemperatur
6. Zentrifugation $12.000 \times g$, 15 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$
7. Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen überführen
8. Zugabe des Überstandes zu 500 µl (bei Organen 250 µl) Isopropanol, vorsichtig invertieren

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

(Fällung der RNA)

9. Inkubation 10 min bei Raumtemperatur
10. Zentrifugation 12.000 x g, 10 min, 4 °C
11. Überstand verwerfen
12. Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol waschen
13. Zentrifugation 7.500 x g, 10 min, 4 °C
14. Überstand verwerfen, Eppendorfröhrchen gut abtropfen lassen
15. Trocknen des Pellets im Eppendorfröhrchen, 5 min bei Raumtemperatur
16. Elution des Pellets in 50 µl in destilliertem, RNase-freiem (0,1 % Diethylpyrocarbonat behandeltem) Wasser

Alternativ können weitere geeignete Extraktionsverfahren eingesetzt werden.

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.

Virale RNA ist bis zu einem Jahr stabil, wenn sie bei -30 bis -15 °C gelagert wird, entsprechend länger bei -90 bis -65 °C.

3.1.2 Nachweis von ISAV mittels RT-qPCR

Durch die Verwendung der RT-qPCR können in der Regel eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität zum Nachweis von ISAV-Genom erreicht werden. Die Methode kann schneller als die konventionelle RT-PCR durchgeführt werden, da keine Gelelektrophorese erforderlich ist. Bei der RT-qPCR wird die Gefahr der Kreuzkontamination reduziert, da es möglich ist, die Menge der viralen RNA im Probenröhrchen zu ermitteln ohne dieses zu öffnen. Ein Nachteil des RT-qPCR-Assays ist, dass es oftmals nicht möglich ist, amplifizierte Produkte zu sequenzieren.

Die RT-qPCR kann jedoch nur zum Vorscreening genutzt werden, da sie nicht die Unterscheidung zwischen HPRdel- und HPR0-ISAV erlaubt. Hierfür ist die weiter unten beschriebene konventionelle RT-PCR mit anschließender Sequenzierung zu verwenden.

Die im Folgenden beschriebene RT-qPCR zielt auf das Segment 8 des ISAV-Genoms ab. Dieser Test deckt Isolate aus der Europäischen Union, der Europäischen Freihandelsassoziation und Nordamerika ab. Es ist möglichst das einstufige Verfahren anzuwenden, da sich durch die separate Transkription der RNA in cDNA die Gefahr einer Kreuzkontamination erhöht.

Vorwärtsprimer (ISAV for): 5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3';

Rückwärtsprimer (ISAV rev): 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3';

Sonde (ISAV Probe): 5'- FAM - CATCGTCGCTGCAGTTC - MGBNFQ -3'.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Produkt: 104 bp (nach Snow *et al.*, 2006)

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

Vorwärtsprimer (salmoELF-f): 5'- GCTGTGCGTGACATGAGG -3'

Rückwärtsprimer (salmoELF-r): 5'- ACTTTGTGACCTTGCCGC -3'

Sonde (salmoELFprobe): 5'- HEX - CTGTCGGTGTCATCAAGGCTGTTG - BHQ1 -3'

Produkt: 88 bp (nach Ingerslev *et al.*, 2009)

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

Testkit: QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)

25 µl Ansatz:	2,75 µl	RNase-freies Wasser (variabel)
	12,5 µl	2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix
	1,5 µl	Primer fwd (5 µM)
	1,5 µl	Primer rev (5 µM)
	1,5 µl	Sonde ISA 8 Probe MGB (2,5 µM) (Endkonzentration 0,2µM)
	0,25 µl	QuantiTect RT Mix
	1,0 µl	RNA (variabel)

Alternativer Testkit:

OneStep 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	45 °C	10 min,
1 Zyklus	95 °C	10 min,
40 Zyklen	95 °C	15 sec
	60 °C	20 sec

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

3.1.3 RT-PCR und Sequenzierung

RT-PCR

Folgende PCR-Tests können zur Amplifikation von PCR-Produkten für die nachfolgende Sequenzierung der HPR in Segment 6 verwendet werden:

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

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, <304 bp wenn HPRdel (empfohlen von der **OIE-WOAH**)

oder

Vorwärtsprimer: 5'-TTG-ACC-AGA-CMA-GCT-TAG-GTA-ACA-3';
Rückwärtsprimer: 5'-GCA-ATC-CCA-AAA-CCT-GCT-ACA-CC-3';
Produktgröße: 229 bp, wenn HPR0, <229 bp wenn HPRdel (empfohlen vom EURL)

OneStep RT-PCR Kit (Quiagen) - Ansatz

Reagenzien		Volumen
Rnase/Dnase freies 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	50 °C	30 min
1 Zyklus	95 °C	15 min
40 Zyklen	94 °C	30 sec
	60 °C	30 sec
	72 °C	45 sec
1 Zyklus	72 °C	10 min

Es können auch andere RT-PCR-Assays verwendet werden, die eine erwiesenermaßen gleiche oder höhere Sensitivität und Spezifität 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 extrahiert. 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.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Ansatz der Sequenzierreaktion (10 µl Ansatz)

- Wasser 5 µl (variabel)
- Big Dye Ready reaction mix (Enzym) 0,5 µl wenn PCR Produkt <500bp bzw. 1µl wenn PCR Produkt >500bp
- 5 x sequencing buffer 2,5 µl
- Primer fwd oder rev (1,6 pmol/ µl) 1 µl
- PCR-Produkt (DNA-Template, ca.130ng/1kb) 1 µl (max. 6µl)
- (siehe LA DNA-Gel-Extraktion)

Cycler-Reaktionsbedingungen

1. 1 min 96° C
2. 10 sec 96° C
3. 5 sec 50° C (beachte: Annealingtemperatur ist abhängig vom verwendeten Primer)
4. 4 min 60° C - gehe zu 2 25 Zyklen
5. hold 8° C

Reinigung der zu sequenzierenden PCR-Produkte

A) *Ethanol-Fällung*

- Sequenzieransatz (4° C) kurz anzentrifugieren
 - 10 µl PCR Produkt aus der Sequenzier-PCR
 - 2,5 µl 125 mM EDTA
 - 30µl 100% Ethanol
1. alles mehrfach mit Pipette mischen, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß geben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
 2. 15 min zentrifugieren, max. Geschwindigkeit (20.000 x g), 4° C (längeres Zentrifugieren möglich)
 3. sofort etwa 40µl Überstand mit Pipette entfernen und werfen
 4. 60 µl 70% Ethanol dazugeben, kein Mischen erforderlich
 5. 10 min zentrifugieren, 4° C, max. Geschwindigkeit (20.000 x g)
 6. sofort etwa 70 µl Überstand abnehmen und werfen
 7. Eppendorfröhrchen mit geöffnetem Deckel für 10 min bei 60° C in den Thermoblock stellen (mit Alufolie abdecken)
 8. wenn Inhalt des Eppendorfröhrchens getrocknet ist, 20 µl Formamid dazugeben (nicht schütteln) und für 5 min auf Eis stellen

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

B) Nucleo SEQ Columns (Macherey&Nagel)

Die Aufreinigung des Sequenzieransatzes erfolgt nach Vorschrift des Herstellers.

Es wird empfohlen, nicht mehr als 1-2 µL Big Dye® Ready Reaktionsmischung in einer 20 µL Sequenzierungsreaktion zu verwenden um eine Überlastung der Säule zu vermeiden.

1. Zentrifugation der NucleoSEQ®-Säule für 30 s bei 750 x g
2. 600 µL dest. Wasser zugeben und vortexen, Entfernung von Luftblasen durch Vortexen oder Antippen der Säule. Inkubation für mindestens 30 min oder über bei Raumtemperatur oder 4 °C. Hydratisierte Säulen können bei 4 °C maximal 14 Tage gelagert werden. Resuspendierung der abgesetzten Gelmatrix durch mehrmaliges Umdrehen oder Vortexen der Säule. Luftblasen sollten jetzt nicht sichtbar sein. Entfernung der unteren Verschlusskappe und Verbringen der Säule in ein Sammelröhrchen (mit dem Kit geliefert).
3. Zentrifugation für 2 min bei 750 x g, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Verwerfen des Sammelröhrchens, Verbringung der Säule in ein neues Sammelröhrchen (z. B. Mikrozentrifugenröhrchen, nicht im Kit enthalten).
4. Deckel der Säule öffnen, vorsichtiges, mittiges und tropfenweises Überschichten des Gels. Das Probenvolumen sollte 20 µL nicht überschreiten.
5. Probe durch Zentrifugation der Säule für 4-6 min bei 750 x g eluieren, Verwerfen der Säule.
6. Trocknen der Probe oder direkte Verwendung.

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 304 bzw. 229 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

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

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 (TCID₅₀ ml⁻¹) werden in das erste Well geimpft und vermischt. Ein Volumen dieses Materials wird vom ersten in das zweite Well überführt und vermischt, sodass eine 1 : 10-Verdünnung entsteht. 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.

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

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

14 kein CPE festgestellt, so ist ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT) oder eine RT-(q)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 eine RT-(q)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 $4\,000 \times g$ 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 einen 0,22-µm-Filter zu filtrieren, auf frische Zellen zu impfen und weitere 14 - 18 Tage zu inkubieren.

Wird in einer beliebigen Phase ein CPE beobachtet, so ist ein Virusnachweisverfahren anzuwenden. Die Methoden der Wahl für den ISAV-Nachweis sind RT-(q)PCR gemäß Nummer 3.1. und Immunfluoreszenz (IF) gemäß Nummer 3.2.4. Wird vermutet, dass andere Viren vorhanden sind, so sind zusätzliche Virusnachweistests durchzuführen. Haben diese Tests keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, so ist der Überstand zum Nachweis an das Nationale Referenzlabor für ISA weiterzuleiten.

3.2.4 Immunfluoreszenz (IF)

ASK-Zellen (Passage 65 oder niedriger) 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 und weiterbearbeitet, wenn mehr als 50 % Konfluenz erreicht ist. Andere geeignete Zelllinien oder Medien können ebenfalls verwendet werden. Je 225 µl des mutmaßlich virusinfizierten Kulturüberstands sind in zwei Wells zu überführen und zu mischen. Je 225 µl eines 1 : 5 verdünnten Kulturüberstandes sind in zwei weitere Wells zu überführen. Zwei zusätzliche Wells bleiben als Kontrollen unbeimpft. Proben von verschiedenen Aquakulturbetrieben 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

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

kein CPE beobachtet wird, ist der nächste Schritt die Fixierung. Zunächst werden die Wells mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder Zellkulturmedium gewaschen, unter Ventilatorstrom 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 während der Fixierung ansonsten ihre Transparenz verlieren. 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, 10C9F5 oder mit anderen mAk, deren Wirksamkeit und Spezifität nachgewiesen wurde, angefärbt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die mAk-Lösung ist abzusaugen und die Platten sind dreimal mit PBS zu waschen. Jedem Well wird in PBS verdünntes Anti-Maus-IgG-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Konjugat zugegeben, wonach sich eine Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur anschließt. 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, z.B. Propidiumjodid) zu überschichten.

Die Wells sind unverzüglich mithilfe eines für Fluoreszenzmikroskopie eingerichteten Inversmikroskops mit einem geeigneten Filtersystem 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 3.2.4 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:

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

- 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 geweitetes Milzparenchym;
- e) leichte renale multifokale bis starke 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 Veränderungen ein Verdacht auf Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse besteht, sind mit einem positiven IHC-Ergebnis zu erhärten. 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 phosphatgepuffertem Formalin zu fixieren, in einer aufsteigenden Ethanolreihe zu entwässern, mit Xylol zu klären und in Paraffin einzubetten. Die ca. 5 µm dicken Schnitte sind auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufzuziehen und für 20 Minuten bei 56 - 58 °C (maximal 60 °C) zu erwärmen, in Xylol zu entwachsen, mit einer absteigenden Ethanolreihe zu rehydrieren und für Untersuchungen zur Pathomorphologie mit Hämatoxylin/Eosin und für die IHC gemäß Nummer 2 einzufärben.

(2) Färbeverfahren für IHC

Die Inkubation findet wahlweise 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 mit verdünntem Primärantikörper (monospezifischer Kaninchen-Antikörper gegen ISAV-Nukleoprotein in TBS unter Zusatz von 1 % fettarmer Trockenmilch) überschichtet, über Nacht inkubiert und anschließend dreimal in TBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen;
- c) für den Nachweis gebundener Primärantikörper sind die Schnitte mit Alkaline-Phosphatase-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper für 60 Minuten zu inkubieren. Nach einer letzten Wäsche sind Ectrot (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 und für 20 Minuten entwickeln zu lassen. Die Schnitte

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

werden dann in Leitungswasser gewaschen, wonach eine Gegenfärbung mit Harris-Hämatoxylin und das Eindecken der Schnitte mit einem wässrigen Medium erfolgt. ISAV-positive und ISAV-negative Gewebeschnitte sind als Kontrollen mitzuführen.

(3) Interpretation des Ergebnisses der IHC

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt gemäß den Buchstaben a und b:

- a) Schnitte gelten als positiv, wenn die Endothelzellen in den Blutgefäßen des Endokards eine deutlich sichtbare rote Färbung von Zytoplasma und Nukleus aufweisen.
- b) Schnitte 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.

Die stärksten positiven Färbungsreaktionen sind in den Endothelzellen von Herz und Niere zu erwarten. Bei sehr umfangreichen hämorrhagischen Läsionen können die Endothel-Färbungsreaktionen schwach oder nicht vorhanden sein, möglicherweise aufgrund der Lyse von Endothelzellen.

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 Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV zugelassene Chargen zu verwenden!)

mAk 18B11-M (Bio-Bank, FLI)

Referenzviren, im Handel nicht erhältliche Diagnostika und Zelllinien:

Friedrich-Loeffler-Institut,

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10

D-17493 Greifswald - Insel Riems

Zentralabteilung 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, Bio-Bank (Insel Riems)

Anti-ISAV mAk 3H6F8, K. Falk (Oslo)

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Literatur

- 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
- Empfehlungen des Friedrich-Loeffler-Instituts über Mittel und Verfahren für die Durchführung einer tierseuchenrechtlich vorgeschriebenen Desinfektion, <https://desinfektions-rl.fli.de/de/home>
- EURL for Fish and Crustacean Diseases: Diagnostic manual (<https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals>)
- 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 orthomyxo-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
- Aquatic Manual der WOAAH in der jeweils aktuellen Fassung
- 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

Falldefinition - Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (ISA)

Klinisches Bild

ISA ist definiert als eine mit Anämie einhergehende Krankheit für die nach Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Atlantische Lachse (*Salmo salar*), sowie Forellen und Meerforellen (*Salmo trutta*) empfänglich sind. Aal (*Anguilla anguilla*) und Hering (*Clupea harengus*) können laut Literatur das Virus vermehren und als Überträger (Carrier) fungieren.

Die Klinik besteht in abnormalem Verhalten, andauernder Mortalität, Anämie (blasse Kiemen, helle Organe), aufgetriebenem Leib (Aszites), vergrößerter Leber und Milz sowie Petechien im viszeralen Fett.

Die Inkubationszeit beträgt in Abhängigkeit von Alter, Wassertemperatur, Infektionsdosis und Erregervirulenz 5 - 15 Tage.

Labordiagnostischer Nachweis

Nur hochpathogenes HPR-Del- (Deletion in der hochpolymorphen Region des HE-Gens), jedoch nicht apathogenes, undeletiertes HPR0-ISAV wird seuchenrechtlich reglementiert.

Diagnosemethoden zur Anerkennung oder Aufrechterhaltung des Status „frei von einer Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV“:

- Screening der Proben mittels RT-qPCR mit nachfolgender konventioneller RT-PCR und Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion und Nachweis des ISAV-Antigens in Gewebepreparaten mittels spezifischer Antikörper gegen ISAV oder
- Isolierung in Zellkultur und anschließender genomischer Nachweis des HPR-deletierten ISAV

Epidemiologischer Zusammenhang

Lebendfischbewegungen; Kontakte zu anderen Aquakulturbetrieben (über z. B. Personen, Geräte, Wasser); Aussetzen infizierter Fische in Gewässer

Voraussetzung für den Verdacht

Wenn das Ergebnis der klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchungen oder der epidemiologischen Erhebungen den Ausbruch der Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV befürchten lässt.

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Ausschluss oder Bestätigung eines Verdachts auf Infektion mit dem HPR-deletierten ISAV:

- Nachweis des ISAV-Genoms mittels RT-qPCR mit nachfolgender Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion und
Nachweis von ISAV-Antigen in Gewebepreparaten mittels spezifischer Antikörper gegen ISAV
oder
- Nachweis von ISAV-Genom mittels RT-qPCR mit nachfolgender Sequenzierung des HE-Gens zum Nachweis der HPR-Deletion und
Isolation und Identifizierung des ISAV in Zellkultur von mindestens einer Probe eines Fisches aus dem Betrieb

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. 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“)
- 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) 2020/687 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen
- 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) 2020/690 vom 17. Dezember 2019 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der gelisteten

Infektion mit dem HPR-deletierten Virus der Ansteckenden Blutarmut der Lachse (Infection with HPR-deleted Infectious Salmon Anaemia virus, ISA)

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

- 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
- ~~Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases der OIE in der jeweils aktuellen Fassung~~