

KOMMISSION

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 13. Juni 2003

mit Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der Infektiösen Anämie der Lachse (ISA)

(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2003) 1831)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(2003/466/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaften,

gestützt auf die Richtlinie 91/67/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 806/2003⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 15,

gestützt auf die Richtlinie 93/53/EWG des Rates vom 24. Juni 1993 zur Festlegung von Mindestmaßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung bestimmter Fischseuchen⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Entscheidung 2001/288/EG der Kommission⁽⁴⁾, insbesondere auf Artikel 5 Absatz 2 und Artikel 6,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Gemäß der Richtlinie 93/53/EWG werden Probenahmen und Laboruntersuchungen zum Nachweis von Krankheiten, die in den Listen I und II in Anhang A der Richtlinie 91/67/EWG aufgeführt sind, nach den Methoden vorgenommen, die nach Artikel 15 der Richtlinie 91/67/EWG festgelegt worden sind.
- (2) Die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der in Liste II aufgeführten Fischseuchen Virale hämorrhagische Septikämie (VHS) und Infektiöse hämatopoetische Nekrose (IHN) wurden mit der Entscheidung 2001/183/EG der Kommission⁽⁵⁾ festgelegt.
- (3) Gemäß Artikel 5 Absatz 2 und Artikel 6 der Richtlinie 93/53/EWG werden alle Zuchtbetriebe eines Wassereinzugsgebiets oder eines Küstengebiets, in dem sich ein Betrieb mit Verdacht auf Infektion mit dem Virus der Infektiösen Anämie der Lachse (ISAV) oder ein Betrieb, in dem diese Infektion festgestellt wurde, befindet, unter

amtliche Überwachung gestellt. Die Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung sollten festgelegt werden.

- (4) Zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren für den Nachweis und die Feststellung der ISA sowie zur Aufstellung der Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA wurden Sachverständige für Fischgesundheit und Laborexperthen konsultiert. Außerdem müssen die Leitlinien für die Diagnose der ISA berücksichtigt werden, die in der geltenden Ausgabe des Diagnosehandbuchs für Krankheiten von aquatischen Organismen (Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases) des Internationalen Tierseuchenamts (OIE) festgelegt sind.
- (5) Für die Umsetzung dieser neuen Vorschriften ist eine ausreichende Frist vorzusehen.
- (6) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der Infektiösen Anämie der Lachse (ISA) sowie die Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA sind im Anhang der vorliegenden Entscheidung festgelegt.

Artikel 2

Diese Entscheidung gilt ab dem 23. Oktober 2003.

⁽¹⁾ ABl. L 46 vom 19.2.1991, S. 1.

⁽²⁾ ABl. L 122 vom 16.5.2003, S. 1.

⁽³⁾ ABl. L 175 vom 19.7.1993, S. 23.

⁽⁴⁾ ABl. L 99 vom 10.4.2001, S. 11.

⁽⁵⁾ ABl. L 67 vom 9.3.2001, S. 65.

Artikel 3

Diese Entscheidung ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 13. Juni 2003

Für die Kommission
David BYRNE
Mitglied der Kommission

ANHANG

Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der Infektiösen Anämie der Lachse (ISA) und Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA

EINLEITUNG UND DEFINITIONEN

Dieser Anhang

- a) enthält Leitlinien und Mindestanforderungen für Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der ISA;
- b) umfasst die Bestimmungen und Definitionen der Richtlinie 91/67/EWG und der Richtlinie 93/53/EWG;
- c) legt Vorschriften für die ordnungsgemäße Diagnose, Bekämpfung und Überwachung der ISA bei Verdacht auf oder Feststellung einer ISA-Infektion fest;
- d) richtet sich sowohl an die für die ISA-Bekämpfung zuständigen Behörden als auch an das Laborpersonal, das die Tests auf diese Fischseuche durchführt. Schwerpunkte sind daher die Probenahmeverfahren, Grundsätze und Durchführung der Labortests, die Auswertung der Testergebnisse sowie ausführliche Beschreibungen der Laborverfahren. Die Labors können die in diesem Anhang beschriebenen Tests jedoch erforderlichenfalls abändern oder andere Tests anwenden, wenn eine gleichwertige oder höhere Empfindlichkeit und Spezifität nachgewiesen werden kann. Außerdem werden Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA festgelegt.

Für die Zwecke dieses Anhangs gelten die folgenden zusätzlichen Definitionen:

„Wassereinzugsgebiet“: das gesamte Einzugsgebiet von den Quellen der Wasserläufe bis zur Mündung oder ein Teil eines Einzugsgebiets von der Quelle eines Wasserlaufs bis zu einem natürlichen oder künstlichen Hindernis, das eine Stromabwärtswanderung der Fische verhindert;

„Küstengebiet“: ein Teil der Küste oder des Meeres oder eines Mündungsgebietes mit genauer geografischer Abgrenzung, das aus einem homogenen hydrodynamischen System oder einer Reihe solcher Systeme besteht.

Teil I enthält die allgemeinen Grundsätze und die Kriterien für die Diagnose und Feststellung der ISA sowie Kriterien für die Zonenabgrenzung und die amtliche Überwachung, die bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA durchzuführen ist.

In Teil II werden die Kontrollen und Probenahmen für den Nachweis der ISA beschrieben.

In Teil III werden die Methoden für die virologische Untersuchung festgelegt.

In Teil IV wird das Verfahren für die Untersuchung der Proben mit Hilfe von RT-PCR zum Nachweis der ISA beschrieben.

Teil V enthält das Protokoll für die Untersuchung von Abklatschpräparaten der Niere auf ISA durch IFAT.

Teil VI betrifft Methoden für die Histologie.

Akronyme und Abkürzungen sind in Teil VII erläutert.

I. Kriterien für die Diagnose der ISA, für die Zonenabgrenzung, bestimmte Bekämpfungsmaßnahmen und die amtliche Überwachung**I.1. Allgemeine Grundsätze für die Diagnose der ISA**

In Teil I.2 dieses Anhangs sind eine Reihe von Indizien aufgeführt, die einen Verdacht auf eine ISAV-Infektion begründen. Die Mitgliedstaaten tragen dafür Sorge, dass bei Verdacht auf ISAV-Infektion von Fischen in einem Zuchtbetrieb baldmöglichst und unter Anwendung der Kontrollen und klinischen Untersuchungen, der Entnahme und Auswahl von Proben sowie der Laboruntersuchungsmethoden, die in den Teilen III bis VI dieses Anhangs festgelegt sind, eine amtliche Untersuchung zur Bestätigung oder Widerlegung des Seuchenverdachts durchgeführt wird. Eine ISA-Infektion gilt als amtlich festgestellt, wenn eines der drei Arten von Kriterien gemäß Teil I.3 dieses Anhangs erfüllt ist.

I.2. Verdacht auf ISA-Infektion

I.2.1. Verdacht auf ISA-Infektion besteht, wenn eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- a) Postmortale Befunde, die auf ISA hindeuten, mit oder ohne klinische Symptome der Seuche. Die postmortalen Befunde und klinischen Symptome müssen mit denen übereinstimmen, die in der geltenden Fassung des OIE-Diagnosehandbuchs für Krankheiten von aquatischen Organismen festgelegt sind;
- b) Isolierung und Nachweis von ISAV in Zellkultur von einer einzigen Probe von einem beliebigen Fisch im Betrieb gemäß Teil III;

- c) stichhaltige Hinweise auf ISAV durch zwei unabhängige Labortests wie RT-PCR (Teil IV) und IFAT (Teil V);
- d) Einsetzen lebender Fische in einen Zuchtbetrieb, wenn Grund zu der Annahme besteht, dass zum Zeitpunkt des Einsetzens der Fische ein ISA-Befall vorlag;
- e) wenn eine Untersuchung ergibt, dass andere wichtige epidemiologische Verbindungen zu Betrieben mit ISA-Verdacht oder festgestellter ISA-Infektion bestehen.

I.2.2. Der Verdacht auf ISA-Infektion gilt als widerlegt, wenn kontinuierliche Untersuchungen, die mindestens eine klinische Kontrolle im Monat über einen Zeitraum von sechs Monaten umfassen, keine weiteren signifikanten Hinweise auf ISA ergeben.

I.3. Feststellung der ISA

Eine ISA-Infektion gilt als amtlich festgestellt, wenn eines der folgenden Kriterien unter den Buchstaben a), b) oder c) erfüllt ist:

- a) Klinische Symptome und postmortale Befunde, die auf ISA hindeuten und mit denen übereinstimmen, die in der geltenden Fassung des OIE-Diagnosehandbuchs für Krankheiten von aquatischen Organismen festgelegt sind, einschließlich verendeter, geschwächter oder verhaltensgestörter Fische, Anzeichen für Anämie, sonstige postmortale Befunde und pathologische Veränderungen sowie Nachweis von ISAV durch eine oder mehrere der folgenden Methoden:
 - i) Isolierung und Nachweis von ISAV in Zellkultur von mindestens einer Probe von einem beliebigen Fisch im Betrieb gemäß Teil III;
 - ii) Nachweis von ISAV durch RT-PCR nach den in Teil IV beschriebenen Methoden;
 - iii) Nachweis von ISAV in Geweben oder Gewebepräparaten mittels spezifischer Antikörper gegen ISAV (z. B. IFAT an Abklatschpräparaten der Niere gemäß der Beschreibung in Teil V).
- b) Isolierung und Nachweis von ISAV in zwei Proben von einem oder mehreren Fischen im Betrieb bei mehreren Tests nach der in Teil III beschriebenen Methode.
- c) Isolierung und Nachweis von ISAV in mindestens einer Probe von einem beliebigen Fisch im Betrieb nach der in Teil III beschriebenen Methode mit Bestätigung von ISAV in Gewebepräparaten von einem beliebigen Fisch im Betrieb entweder durch RT-PCR (Teil IV) oder durch IFAT (Teil V).

I.4. Kriterien für die Ausweisung und die Aufhebung von Schutzzonen und Zonen mit amtlicher Überwachung bei Verdacht auf und Feststellung der ISA

I.4.1. Zur Aufstellung eines auf dem Risiko basierenden amtlichen Überwachungsprogramms weisen die Mitgliedstaaten in der Umgebung eines amtlich ISA-verdächtigen oder amtlich als ISA-infiziert bestätigten Betriebs angemessene Schutz- und Überwachungszonen aus.

I.4.2. Die auszuweisenden Zonen werden auf der Grundlage von Einzelfallanalysen der Risiken für eine weitere Verschleppung der Seuche abgegrenzt. Je nach epizootiologischer Lage wird das betreffende Wassereinzugs- oder Küstengebiet

— als Schutzzone definiert oder

— kann es in ausgedehnten Wassereinzugs- oder Küstengebieten in eine Schutzzone und eine Überwachungszone aufgeteilt werden, wenn die Prävention der Seuchenverschleppung dadurch nicht beeinträchtigt wird.

Außerdem können außerhalb des Wassereinzugsgebiets oder des Küstengebiets erforderlichenfalls zusätzliche Überwachungszonen ausgewiesen werden.

I.4.3. Bei der Ausweisung der oben genannten Zonen ist in erster Linie den Faktoren Rechnung zu tragen, die sich auf die Risiken für die Ausbreitung der Seuche auf Zucht- und Wildlachs auswirken, wie beispielsweise: Zahl, Prozentsatz und Verteilung der verendeten Fische im ISAV-verdächtigen oder als ISAV-infiziert bestätigten Betrieb; Ursache der Todesfälle in dem betreffenden Betrieb; Entfernung zu benachbarten Betrieben und Besatzdichte in diesen Betrieben; Kontaktbetriebe; in diesen Betrieben gehaltene Arten; Management im betroffenen Betrieb und in den benachbarten Betrieben; die hydrodynamischen Bedingungen und andere Faktoren von epidemiologischer Bedeutung, die im Rahmen der gemäß Artikel 5 Absatz 2 und Artikel 8 der Richtlinie 93/53/EWG durchgeführten epizootiologischen Untersuchung identifiziert werden.

I.4.4. Für die Ausweisung der Schutzzonen gelten folgende Mindestkriterien:

I.4.4.1. Der Mitgliedstaat weist in der unmittelbaren Umgebung eines als ISAV-infiziert bestätigten Betriebs nach folgenden Kriterien eine „Schutzzone“ aus:

- in Küstengebieten: das Gebiet im Umkreis von mindestens einer Gezeitenzonenbreite oder von mindestens 5 km um den Betrieb mit bestätigter ISAV-Infektion oder ein entsprechendes Gebiet, das unter Berücksichtigung der betreffenden hydrodynamischen oder epidemiologischen Daten bestimmt wird; oder
- in Binnenwassergebieten: das gesamte Wassereinzugsgebiet des Betriebs mit bestätigter ISAV-Infektion; in ausgedehnten Wassereinzugsgebieten kann der Mitgliedstaat die Zone auf Teile des Einzugsgebiets begrenzen, vorausgesetzt, dass die Prävention der Seuchenverschleppung dadurch nicht beeinträchtigt wird.

I.4.4.2. Bei Verdacht auf ISA-Infektion ist nach denselben Kriterien, die für die „Schutzzone“ erläutert wurden, eine „befristete Schutzzone“ auszuweisen.

I.4.4.3. Der Mitgliedstaat weist erforderlichenfalls außerhalb der Schutzzone in Gebieten, für die eine weniger intensive Überwachung als ausreichend angesehen wird, nach folgenden Kriterien eine „Überwachungszone“ aus:

- in Küstengebieten: ein die Schutzzone umgebendes Gebiet sich überschneidender Gezeitenzonen oder ein Gebiet im Umkreis von 10 km um den Mittelpunkt der Schutzzone oder ein entsprechendes Gebiet, das unter Berücksichtigung der betreffenden hydrodynamischen oder epidemiologischen Daten bestimmt wird; oder
- in Binnenwassergebieten: erforderlichenfalls ein erweitertes Gebiet außerhalb der ausgewiesenen Schutzzone.

I.5. *Stilllegung von Zuchtbetrieben und Aufhebung der Zonen*

I.5.1. Die zuständige Behörde des Mitgliedstaats trägt dafür Sorge, dass alle Betriebe innerhalb der Schutzzone nach der Räumung für einen angemessenen Zeitraum stillgelegt und erforderlichenfalls desinfiziert werden. Betriebe mit bestätigter ISA-Infektion müssen für mindestens sechs Monate stillgelegt werden. Über die Dauer der Stilllegung anderer Betriebe in Schutzzonen entscheidet die zuständige Behörde von Fall zu Fall auf der Grundlage einer Risikobewertung. Wenn alle Betriebe in der Schutzzone von Fischen geräumt sind, muss eine synchronisierte Stilllegung von mindestens sechs Wochen erfolgen.

Außerdem kann die zuständige Behörde die Stilllegung von Betrieben in den ausgewiesenen Überwachungszone beschließen.

I.5.2. Die Schutzzone dürfen erst aufgehoben und wieder mit Fischen besetzt werden, wenn alle Betriebe in den Zonen von Fischen geräumt, erforderlichenfalls desinfiziert und gemäß Nummer I.5.1 stillgelegt worden sind. Wenn in den Schutzzone wieder Fische eingesetzt werden, sind sie gemäß Nummer I.4.4.3 in Überwachungszone umzuwandeln.

I.5.3. Befristete Schutzzone dürfen erst aufgehoben werden, wenn der Verdacht auf ISA-Infektion gemäß Nummer I.2.2 widerlegt ist. Bei Bestätigung des ISA-Verdachts gemäß Teil I.3 ist die befristete Schutzzone als Schutzzone auszuweisen.

I.5.4. Überwachungszone dürfen frühestens zwei Jahre nach der Aufhebung der Schutzzone aufgehoben werden.

I.6. *Amtliche Überwachung bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA*

I.6.1. Mit Bezug auf Artikel 5 Absatz 2 und Artikel 6 der Richtlinie 93/53/EWG und zur Ermittlung der Verteilung und Entwicklung der Seuche bei Verdacht auf oder Feststellung der ISA in einem Betrieb muss von der zuständigen Behörde oder von qualifizierten Fischgesundheitsdiensten in Konsultation mit oder unter Aufsicht der zuständigen Behörde in allen Betrieben innerhalb der ausgewiesenen Zonen ein auf dem Risiko basierendes amtliches Überwachungsprogramm durchgeführt werden.

I.6.2. Für die Durchführung eines solchen amtlichen Überwachungsprogramms muss die zuständige Behörde, erforderlichenfalls durch eine Vor-Ort-Kontrolle, alle Betriebe in den ausgewiesenen Zonen identifizieren, eine amtliche Bestandsaufnahme der Arten und Kategorien von Fischen vornehmen sowie die Zahl der in diesen Betrieben gehaltenen Fische und der verendeten Fische erfassen.

- I.6.3. Nach der ersten amtlichen Bestandsaufnahme melden die in den befristeten Schutzzonen gelegenen Betriebe, in denen Atlantischer Lachs (*Salmo salar*) oder andere im OIE-Gesundheitskodex für aquatische Organismen (Aquatic Animal Health Code), jüngste Ausgabe, als ISA-empfindlich oder potenzielle ISA-Träger genannte Arten gehalten werden, die Zahl der verendeten Fische alle 14 Tage an die zuständige Behörde. Eine erhöhte Sterblichkeit ist nach Tagen und Käfigen aufgeschlüsselt zu melden. Die zuständige Behörde untersucht jeden signifikanten Anstieg der Sterblichkeit in einem Betrieb.

Wird ein Seuchenverdacht bestätigt, so haben alle Betriebe in der ausgewiesenen Schutzzone der zuständigen Behörde wöchentlich die Zahl der verendeten Fische nach Käfigen und Tagen aufgeschlüsselt zu melden.

Die Betriebe in den Überwachungszonen melden die Zahl der verendeten Fische alle 14 Tage an die zuständige Behörde.

Außerdem werden in den ausgewiesenen Zonen während des gesamten Jahres mit der in Tabelle 1 aufgeführten Frequenz Kontrollen durchgeführt. Können diese Kontrollen während eines Teils des Jahres witterungsbedingt nicht durchgeführt werden, so können die Mitgliedstaaten im Krisenplan andere Kontrollfrequenzen festlegen.

Tabelle 1

Amtliches Überwachungsprogramm

Lage des Betriebs	Mindestzahl der Kontrollen/Jahr	Mindestzahl der Kontrollen/Jahr nach Aufhebung der Schutzzone
Schutzzone	12	
Überwachungszone	6	6
Befristete Schutzzone	6	

Das Überwachungsprogramm wird durchgeführt, bis die Ausweisung der Schutzzonen aufgehoben ist.

- I.6.4. Die Kontrollen sowie Auswahl, Entnahme, Aufbereitung und Versand der Proben erfolgen gemäß den Teilen II.1 bis II.4. Die Proben werden gemäß den Teilen III bis VI untersucht.

II. Kontrollen und Probenahme

II.1. Kontrolle, Auswahl und Entnahme von Proben in einem Betrieb mit Verdacht auf ISA-Infektion

- II.1.1. Bei den regelmäßigen Kontrollen im Rahmen des amtlichen Überwachungsprogramms gemäß Teil I.6 und in ISA-verdächtigen Betrieben werden alle Zuchtanlagen (Käfige, Becken oder Teiche) auf verendete, geschwächte und verhaltensgestörte Fische untersucht. Kürzlich verendete (nicht verwesene), geschwächte und verhaltensgestörte Fische werden soweit möglich auf klinische Symptome oder postmortale ISA-Befunde gemäß der Beschreibung in der geltenden Fassung des OIE-Diagnosehandbuchs für Krankheiten von aquatischen Organismen untersucht.
- II.1.2. Wenn klinische Symptome festgestellt werden, die auf ISA hindeuten, oder wenn ein Inspektor oder Tierarzt aus einem anderen Grund eine Infektion vermutet, sind mindestens zehn Fische zu beproben. Die Probe muss soweit möglich kürzlich verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische umfassen. Gibt es nicht genügend klinisch erkrankte Fische, so ist die Zahl der Fische in der Probe durch gesunde Fische zu ergänzen, die aus den Käfigen, Becken und oder Teichen ausgewählt werden, die die höchste Zahl an verendeten Fischen oder an Fischen mit klinischen Krankheitssymptomen aufweisen.
- II.1.3. Werden kürzlich verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische vorgefunden, bei denen die klinischen Symptome und postmortalen Befunde aber nicht auf ISA hindeuten, so ist die Probenahme nicht obligatorisch, wenngleich nach Ermessen des Inspektors oder Tierarztes derartige Proben zur Durchführung einer Differentialdiagnose entnommen werden können.

II.1.4. Wenn Verdacht auf ISA-Infektion bei Wildlachs besteht, tragen die Mitgliedstaaten dafür Sorge, dass entsprechende Proben genommen und nach geeigneten klinischen und Labormethoden gemäß den Teilen II und III bis VI untersucht werden, um den ISA-Verdacht zu bestätigen oder zu widerlegen und um beurteilen zu können, ob das Auftreten der Seuche eine ernste Gefahr für Zuchtlachs darstellt.

II.2. *Aufbereitung der Fischproben*

II.2.1. Die Proben für histologische Untersuchungen sind ausschließlich von frisch getöteten Fischen zu entnehmen, die auf ISA hindeutende klinische Symptome oder postmortale Befunde aufweisen. Äußere oder innere Läsionen sind zu beproben, und auf jeden Fall sind den einzelnen Fischen mit Hilfe eines Skalpell's Proben von Leber, Rumpfnieren, Herz und Milz zu entnehmen und in 8-10 % (vol/vol) gepufferte Formalin-Kochsalzlösung zu überführen. Das Verhältnis des Fixierungsmittels zum Gewebe muss mindestens 20:1 betragen, damit eine ausreichende Erhaltung der Gewebe gewährleistet ist.

II.2.2. Von allen beprobten Fischen ist Gewebematerial für virologische Untersuchungen zu entnehmen. Zur Bestätigung der Tests sind Doppelproben zu nehmen. Mit Hilfe eines sterilen Instruments werden Teile von Leber, Kopfnieren, Herz und Milz entfernt und in Kunststoffröhrchen mit 9 ml Transportlösung, d.h. Zellkulturmedium mit Antibiotika, überführt. Geeignet ist eine Kombination von $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Fungizon, 200 IU ml^{-1} Polymixin B und $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, aber auch andere Kombinationen mit erwiesener Wirksamkeit können verwendet werden. In einem Röhrchen mit Transportlösung kann Gewebematerial von bis zu fünf Fischen zusammengeführt werden, das dann eine gepoolte Probe darstellt. Das Gewicht des Gewebes in einer Probe muss $1,0 \pm 0,5 \text{ g}$ betragen.

II.2.3. Abklatschpräparate der Niere für die IFAT-Untersuchung sind ausschließlich von frisch getöteten Fischen, d. h. innerhalb von 2 Stunden nach dem Tod, anzufertigen. Mit Hilfe von sterilen Instrumenten wird dem Fisch ein Teil der Rumpfnieren entnommen. Das Gewebe wird auf Saugpapier abgetupft, um überschüssiges Blut zu entfernen, und dann wiederholt gegen einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger gedrückt. Damit eine einzige kontinuierliche Schicht von Zellen entsteht, müssen die einzelnen Abklatschpräparate aneinander angrenzen, dürfen aber nicht überlappen. Blut und Gewebeflüssigkeit sind keine geeigneten Materialien für diesen Test. Es ist zu vermeiden, dass die Nierenprobe auf dem Saugpapier „abtropft“, da dies zu Blutgerinnung und zur Ablagerung großer Mengen Serumprotein auf dem Objektträger führen kann. Die Abklatschpräparate werden luftgetrocknet und dann kühl und trocken aufbewahrt, wenn sie nicht sofort fixiert werden sollen. Die Fixierung der Abklatschpräparate muss innerhalb von 72 Stunden nach der Probenahme erfolgen. Alternativ können die Abklatschpräparate nach dem Lufttrocknen unfixiert eingefroren und bis zu einem Monat bei -20°C gelagert werden.

II.2.4. Fische, die Symptome für Anämie aufweisen, können zur Blutabnahme betäubt werden; die Blutproben werden heparinisiert und umgehend einer hämatologischen Untersuchung, z. B. Messung des Hämatokrit, unterzogen.

II.2.5. Von allen beprobten Fischen ist Gewebematerial für die RT-PCR-Analyse zu entnehmen. Mit Hilfe eines sterilen Instruments ist ein Teil der Kopf- oder Rumpfnieren zu entnehmen und in ein Microfuge-Röhrchen mit 1 ml RNA-Konservierungslösung von erwiesener Wirksamkeit zu überführen. In einem Röhrchen mit Konservierungslösung kann Gewebematerial von bis zu fünf Fischen zusammengeführt werden, das dann eine gepoolte Probe darstellt. Das Gewicht des Gewebes in einer Probe muss etwa $0,5 \text{ g}$ betragen. Sind die Fische zu klein, um eine Probe mit dem erforderlichen Gewicht zu entnehmen, so sind Teile von Niere, Herz, Milz, Leber oder Pylorusblindsäcken — in dieser Reihenfolge — zu entnehmen, bis $0,5 \text{ g}$ erreicht sind.

II.3. *Versand von Fischproben*

II.3.1. Die Blutproben und Röhrchen mit Fischgewebe für die virologische Untersuchung oder für die RT-PCR-Analyse sollten in Isolationsbehälter (z. B. dickwandige Styroporkästen) gepackt werden, die genügend Eis oder Kühlelemente enthalten, um zu gewährleisten, dass die Proben beim Transport zum Labor gekühlt gehalten werden. Ein Anfrieren ist zu vermeiden, und bei der Ankunft muss im Transportbehälter noch Eis vorhanden oder muss mindestens ein Kühlelement noch teilweise oder vollständig gefroren sein. In Ausnahmefällen können RT-PCR-Proben und Proben für die virologische Untersuchung schockgefroren und bei -20°C oder darunter zum Labor verbracht werden.

II.3.2. Die Objektträger für die IFT-Untersuchung sind in Objektträgerhaltern mit ausreichend Trocknungsmitteln zu versenden, damit die Abklatschpräparate wie beschrieben trocken und kühl gehalten werden.

II.3.3. Wird Fischgewebe in Fixierungsmitteln für histologische Untersuchungen transportiert, so ist es in auslaufsicheren Röhrchen in stoßfesten Behältern (z. B. dickwandige Styroporkästen) zu versenden.

- II.3.4. Sofern die Proben nicht gefroren wurden, muss so bald wie möglich und nicht später als 72 Stunden nach der Probenahme mit der virologischen Untersuchung begonnen werden. Die Probe für die Bestätigungsanalyse ist beim Eintreffen im Labor bei -20 °C oder darunter zu lagern.
- II.3.5. Fische können unzerteilt (ganz) zum Labor gesandt werden, sofern die unter Nummer II.3.1 festgelegten Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt werden können. Ganzer Fisch muss mit Saugpapier umhüllt und wie vorstehend beschrieben gekühlt in einem Kunststoffbeutel versandt werden.
- II.3.6. Lebende Fische dürfen nur unter Aufsicht der amtlichen Stelle versandt werden.
- II.3.7. Für die RT-PCR-Analyse von in RNAlater konserviertem Gewebematerial muss die RNA-Extraktion je nach Lagertemperatur der Proben innerhalb folgender Zeiträume vorgenommen werden:
- | | |
|-------------------|-------------------|
| — 37 °C | 1 Tag, |
| — 25 °C | 1 Woche, |
| — 4 °C | 1 Monat, |
| — -20 °C | keine Begrenzung. |
- II.3.8. Alle Sendungen sind nach den geltenden nationalen und internationalen Transportbestimmungen zu verpacken und zu etikettieren.

II.4. *Entnahme von zusätzlichem Probenmaterial*

Nach Vereinbarung mit dem betreffenden Diagnoselaboratorium kann weiteres Gewebematerial entnommen und für Zusatzuntersuchungen aufbereitet werden.

III. **Virologische Untersuchung**

III.1. *Aufbereitung der Proben*

- III.1.1. Sollten praktische Schwierigkeiten auftreten, die eine Beimpfung der Zellen innerhalb von 72 Stunden nach der Probenahme verhindern, so kann das Gewebe bis zu 28 Tage bei -80 °C eingefroren werden. Das Gewebe darf nur einmal eingefroren und vor der Untersuchung aufgetaut werden.
- III.1.2. Jede Probe (Gewebepool in Transportlösung) wird mit einem Stomacher, Mixer oder Mörser und Pistill vollständig homogenisiert und 15 Minuten bei 2 000 bis 4 000 x g und $0-6\text{ °C}$ zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein $0,45\text{-}\mu\text{m}$ -Filter filtriert und mit dem gleichen Volumen eines angemessen verdünnten Pools von Antiseren gegen die einheimischen IPNV-Serotypen inkubiert. Bei einem 50%igen Plaquetest muss der Antiserumtiter mindestens 1:2 000 betragen. Die Mischung wird 1 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 CPE bei beimpften Zellkulturen. Dadurch werden die Dauer der virologischen Untersuchungen und die Zahl der Fälle reduziert, bei denen ein CPE 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.

III.2. *Beimpfen der Zellkulturen*

- III.2.1. SHK-1-Zellen (Passage 80 oder niedriger) oder TO-Zellen werden in L-15-Medium mit 5 % Rinderfötenserum, 2 % (v/v) 200 mM L-Glutamin und 0,08 % (v/v) 50 mM 2-Mercaptoethanol in 12er- oder 24er-Mikrotiterplatten kultiviert. 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. 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 $40\ \mu\text{l}$ Inokulum in ein Well mit 2 ml Kulturmedium gegeben. Um einer Kreuzkontamination vorzubeugen, wird empfohlen, für Proben von unterschiedlichen Zuchtbetrieben getrennte 12er- oder 24er-Mikrotiterplatten zu verwenden.

III.2.2. 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 KID₅₀/ml⁻¹) werden in das erste Well geimpft und gut vermischt. Ein Volumen dieses Materials wird vom ersten in das zweite Well überführt, so dass eine 1:10-Verdünnung entsteht, und gut vermischt. Dies wird über die gesamte Platte wiederholt, so dass sich sechs 10fache Verdünnungen ergeben. Stamm-ISAV kann bei - 80 °C mindestens zwei Jahre gelagert werden, muss aber nach dem Auftauen innerhalb von drei Tagen verwendet werden. Anmerkung: Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Kreuzkontamination der Testplatten durch positives Kontrollmaterial kommt. Diesem Risiko ist vorzubeugen, indem positive Kontrollen getrennt von den Testplatten bearbeitet werden.

III.2.3. Die Proben werden bis zu 15 Tage bei 14 ± 2 °C inkubiert.

III.3. Mikroskopische Untersuchung

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, ist sofort ein Virusnachweisverfahren einzuleiten (III.6). Wird bis Tag 14 kein CPE festgestellt, so ist ein Hämadsorptionstest (III.4) durchzuführen.

III.4. Hämadsorption

Die Replikation von ISAV in Zellkulturen führt nicht immer zu einem CPE. Daher ist jedes Well dem nachstehend beschriebenen Hämadsorptionstest oder alternativ dem unter Nummer III.6.1 beschriebenen IF-Test zu unterziehen.

III.4.1. Aus jedem Well, auch denen mit den positiven und negativen Kontrollen, wird Zellkulturmedium entnommen, das in etikettierte sterile Röhrchen überführt wird. Jedem Well werden 500 µl einer 0,2 % (v/v) Suspension gewaschener Erythrozyten vom Kaninchen oder Pferd oder eine 0,05 % (v/v) Suspension gewaschener Erythrozyten von der Regenbogenforelle oder vom Atlantischen Lachs hinzugefügt, und es wird 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erythrozyten werden entnommen, und jedes Well wird zweimal mit L-15-Medium gewaschen. Die einzelnen Wells werden unter dem Mikroskop untersucht.

III.4.2. An der Oberfläche von SHK-1- oder TO-Zellen anhaftende Cluster von Erythrozyten sind ein Indiz für eine Infektion mit einem Orthomyxovirus. Bei einem positiven Hämadsorptionstest ist sofort ein Virusnachweisverfahren vorzunehmen (III.6).

III.5. Anlegen einer Subkultur oder Passage

III.5.1. Subkulturen sind zwischen Tag 13 und Tag 15 anzulegen. 225 µl des Kulturüberstands werden in die Wells überführt, die frische, aktiv wachsende SHK-1-Zellen in 12er-Platten 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 einzuleiten (III.6). Wird bis Tag 14-18 kein CPE festgestellt, so ist ein Hämadsorptionstest (III.4) durchzuführen.

III.5.2. 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.

III.5.3. Kommt es in der Primärkultur zu Bakterienkontamination, so ist der Test unter Verwendung des bei - 80 °C gelagerten Gewebehomogenats neu anzusetzen. Vor der Beimpfung wird das Gewebehomogenat 30 Minuten bei $4\ 000 \times g$ und 0-6 °C zentrifugiert, und der Überstand wird durch ein 0,22-µm-Filter filtriert. Kommt es in der Phase der Subkultur zu Bakterienkontamination, so ist der Überstand durch ein 0,22-µm-Filter zu filtrieren, auf frische Zellen zu impfen und weitere 14-18 Tage zu inkubieren.

III.6. Virusnachweisverfahren

Wird in einer beliebigen Phase ein CPE beobachtet oder ergibt der Hämadsorptionstest einen Positivbefund, so ist ein Virusnachweisverfahren vorzunehmen. Die Methoden der Wahl für den ISAV-Nachweis sind IF (III.6.1) und RT-PCR (Teil IV). Wird vermutet, dass andere Viren vorhanden sind, so wird empfohlen, zusätzliche Virusnachweisverfahren durchzuführen. Haben diese Tests innerhalb einer Woche keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, so ist der Überstand zum sofortigen Nachweis an ein nationales Referenzlaboratorium oder an das EU-Referenzlaboratorium für Fischseuchen weiterzuleiten.

III.6.1. IF

III.6.1.1. SHK-1-Zellen (Passage 80 oder niedriger) oder TO-Zellen werden in L-15-Medium mit 5 % Rinderfötenserum, 2 % (v/v) 200 mM L-Glutamin und 0,08 % (v/v) 50 mM 2-Mercaptoethanol in 24er- oder 96er-Mikrotiterplatten kultiviert und verwendet, wenn mehr als 50 % Konfluenz erreicht ist. Andere Zelllinien oder Medien mit erwiesener Wirksamkeit können ebenfalls verwendet werden. In zwei Wells je 225 µl des mutmaßlich virusinfizierten Kulturüberstands überführen, mischen und je 225 µl in zwei weitere Wells überführen (1:5-Verdünnung). Zwei zusätzliche Wells bleiben als Kontrollen unbeimpft. Proben von jedem Fischzuchtstandort werden auf getrennten Platten untersucht, ebenso die Viruskontrolle. Für die Viruskontrolle wird ein Referenzisolat von ISAV verwendet.

III.6.1.2. Die Platten werden bei 14 ± 2 °C inkubiert und bis zu 7 Tage mikroskopisch untersucht. Wenn ein früher CPE beobachtet wird oder wenn innerhalb von sieben Tagen kein CPE beobachtet wird, ist der nächste Schritt die Fixierung. Hierbei werden die Wells mit PBS gewaschen und durch 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 80 % Aceton fixiert. Die Platten werden luftgetrocknet und entweder unmittelbar angefärbt oder vor dem Anfärben höchstens 24 Stunden bei 0-6 °C gelagert.

III.6.1.3. Die Wells werden mit dem in PBS verdünnten monoklonalen Antikörper 3H6F8 oder mit anderen monoklonalen Antikörpern, deren Sensitivität und Spezifität nachgewiesen wurde, überschichtet und 30 Minuten bei 37 ± 4 °C inkubiert. Die monoklonalen Antikörper werden abgesaugt, und die Platten werden dreimal mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen. Jedem Well wird in PBS verdünntes Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat zugegeben und 30 Minuten bei 37 ± 4 °C inkubiert. Anmerkung: Die Verdünnungen verschiedener Chargen monoklonaler Antikörper und FITC-Konjugat sind in jedem Labor zu optimieren. Die Antikörper werden abgesaugt, und die Platten werden dreimal mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen.

III.6.1.4. Die Wells sind unverzüglich mit Hilfe eines für Fluoreszenzmikroskopie eingerichteten Inversmikroskops mit einem geeigneten Filter für FITC-Anregung zu untersuchen. Ein Test gilt als positiv, wenn fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Ein Test ist nur dann gültig, wenn die positiven Kontrollen einen Positivbefund und die negativen Kontrollen einen Negativbefund ergeben.

IV. Untersuchung der Proben durch RT-PCR

IV.1. *In diesem Abschnitt werden die Verfahren für die PCR-Amplifikation eines Teils von Segment 8 des ISAV-Genoms erläutert, die an Fischgewebe oder ISAV-Kultur vorgenommen werden kann*

IV.1.1. RNA-Extraktion

a) RNAlater wird aus jeder Probe entfernt. Jedem Röhrchen wird 1 ml DEPC-behandeltes dH₂O zugegeben, und die Röhrchen werden fünf Minuten bei 13 000 rpm und 0-6 °C zentrifugiert.

b) Der Überstand wird von jeder Probe abgenommen, und 800 µl TRIzol (Invitrogen) oder ein anderes Reagenz, das erwiesenermaßen mindestens ebenso wirksam ist, wird jeder Probe und einem Kontrollröhrchen zugegeben, das ein geeignetes Kontrollmaterial enthält (400 µl dH₂O oder Nierenhomogenat von spezifiziert pathogenfreien Fischen). Die Gewebe sind erforderlichenfalls durch wiederholtes Pipettieren zu lösen. Die Röhrchen werden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jedem Röhrchen werden 160 µl Chloroform zugegeben; die Röhrchen werden 3 Minuten lang kräftig geschüttelt und dann 15 Minuten bei 13 000 rpm und 0-6 °C zentrifugiert.

c) Die obere wässrige Schicht wird in ein etikettiertes 1,5 ml-Microfuge-Röhrchen überführt, das 500 µl Isopropanol enthält, und die Röhrchen werden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 6 500 rpm und 0-6 °C zentrifugiert.

- d) Der Überstand wird abgenommen, und dem RNA-Pellet wird 1 ml Ethanol (75 %) zugegeben. Daraufhin werden die Röhrchen 5 Minuten bei 6 500 rpm und 0-6 °C zentrifugiert.
- e) Der Überstand wird abgenommen, und die Röhrchen werden etwa 3 Minuten offen gelassen, damit das restliche Ethanol evaporieren kann. Zur Resuspension des Pellets 15 µl DEPC-behandeltes dH₂O zusetzen und erforderlichenfalls kurz im Vortexer mischen.
- f) Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit der Proben wird ein Spektrophotometer verwendet. Die optischen Dichten werden bei 260 und 280 nm gemessen.
- g) RNA, die sofort (am selben Tag) verwendet werden soll, kann vorübergehend bei 0-6 °C gelagert werden. Nicht sofort verwendete RNA ist bei - 80° C zu lagern.

IV.1.2. RT

- a) 2 µg RNA werden in 1,5 ml Microfuge-Röhrchen in DEPC-behandeltem dH₂O verdünnt. Ist die RNA-Konzentration einer Probe so gering, dass keine 2 µg für die RT-Reaktion verwendet werden können, so ist die größtmögliche Menge RNA zu verwenden. Verdünnte RNA wird 10 Minuten bei 55-60 °C inkubiert.
- b) Die Röhrchen mit der RNA werden dann auf Eis gelegt und die RT-Reagenzien werden zugegeben, so dass sich Endkonzentrationen von 1x Pufferlösung, 1 mM dNTPs, 100 ng Random Hexamer, 20 U RNase Inhibitor und 200 U MMLV-RT in einem Gesamtvolumen von 20 µl ergeben.
- c) Die Röhrchen werden eine Stunde bei 37 °C inkubiert.
- d) cDNA ist bei 0-6 °C zu lagern, bis sie benötigt wird, und baldmöglichst in der PCR zu verwenden.

IV.1.3. PCR

- a) Zu 45 µl PCR-Mix werden 5 µl cDNA zugegeben, so dass sich Endkonzentrationen von 1x Pufferlösung, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM jedes dNTP, 25 pmol jedes Primers und 1U Taq Polymerase ergeben. Die Primer sind ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (forward primer) und ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverse primer). Bei der Extraktion, RT und PCR sind negative Kontrollen vorzusehen.
- b) Die Röhrchen werden 5 Minuten in einen auf 94 °C eingestellten Thermocycler gestellt; darauf folgen 35 Zyklen von 1 Minute bei 94 °C, 1 Minute bei 55 °C und 1 Minute bei 72 °C mit einer abschließenden Inkubation von 5 Minuten bei 72 °C.
- c) Die Ergebnisse der PCR werden nach Elektrophorese mit einem 2%-Agarosegel, das mit Ethidiumbromid angefärbt wurde, und Größenmarkern parallel zu den Proben und negativen Kontrollen der RT- und PCR-Schritte beurteilt. Ein einziges PCR-Produkt von 155bp gilt als Hinweis darauf, dass ISAV-RNA vorliegt. Proben, die ein weiteres Produkt (von 310bp) enthalten, sind ebenfalls als ISAV-RNA enthaltend anzusehen. Proben, die zahlreiche PCR-Produkte ergeben, darunter mindestens eines von annähernd 155bp, können ISAV-RNA enthalten. Diese Proben können mit Hilfe von DNA-Sonden oder durch Nukleotidsequenzierung näher untersucht werden.

IV.1.4. PCR-Bestätigung der ISAV-Isolierung in Gewebekultur

Ist bei der virologischen Untersuchung von Gewebeproben in SHK-1-Zellen ein vollständiger CPE eingetreten, so werden 400 µl Überstand aus dem Well entnommen und in ein steriles 1,5-ml-Röhrchen überführt. Die RNA wird wie unter III.1 beschrieben aus der Probe extrahiert, und die RT-PCR wird durchgeführt. Werden Kulturen ohne vollständigen CPE verwendet, so ist der Überstand zu entnehmen und die Zellen sind von der Oberfläche des Wells oder Gefäßes abzulösen und zur RNA-Extraktion und RT-PCR in ein steriles 1,5-ml-Röhrchen zu überführen.

IV.1.5. Bestätigung von PCR-Produkten mit Hilfe von DNA-Sonden

- a) Die Spezifität eines 155bp-PCR-Produkts kann mit Hilfe einer Oligonukleotid-Sonde beurteilt werden, die an eine Region des PCR-Produkts in den Primern hybridisiert. Die PCR-Produkte werden mit Größenmarkern sowie einer positiven Kontrolle und den negativen Kontrollen der RT- und PCR-Schritte in einem 1 %-Agarosegel elektrophoretisch untersucht.

- b) Die DNA wird auf eine Membran übertragen (Southern Blot) und das markierte Oligonukleotid (5'-CGGGAGTTGATCAGACA TGCCTGAAGGTG-3') wird nach geeigneten Prähybridisierungsschritten mit der Membran inkubiert.
- c) Nicht gebundene und unspezifisch gebundene Sonden werden von der Membran gewaschen, und die gebundenen Sonden werden sichtbar gemacht.
- d) Sondenbindung an ein Fragment von 155bp (und 310bp, falls vorhanden) gilt als Nachweis der Spezifität der PCR und deutet darauf hin, dass die Probe ISAV-RNA enthielt.

IV.1.6. Nukleotidsequenzierung von PCR-Produkten

Die Spezifität der PCR kann durch Untersuchung der Nukleotidsequenz des 155bp-PCR-Produkts beurteilt werden.

- a) Das PCR-Produkt wird von Agarosegel oder -lösung gereinigt.
- b) Das Fragment wird mit denselben Primern, die bei der PCR verwendet wurden, oder mit Vektorprimern sequenziert, wenn es vor der Sequenzierung in einen Vektor geklont wurde.
- c) Die Nukleotidsequenz wird mit den in der EMBL-Nukleotidsequenz-Datenbank für das ISAV-Segment 8 verfügbaren Angaben verglichen (Zugangsnummern Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Das Vorliegen einer Sequenz, die der des ISAV-Segments 8 entspricht, gilt als Nachweis dafür, dass die Probe ISAV-RNA enthielt.

V. Untersuchung von Abklatschpräparaten der Niere durch IFAT

V.1. *Das folgende Protokoll wurde für die Untersuchung von Abklatschpräparaten der Niere durch IFAT aufgestellt*

V.2. *Aufbereitung und Anfärbung von Abklatschpräparaten*

V.2.1. Die Objektträger werden 3 Minuten in Aceton oder Methanol/Aceton (1:1) fixiert und luftgetrocknet. Vor dem Anfärben wird jeder Objektträger geprüft, und geeignete Regionen werden mittels ImmEdge™-Stift oder auf ähnliche Weise abgegrenzt und luftgetrocknet. Die Objektträger werden dann in Blockierungslösung (6 % Magermilch in PBS mit 0,2 % Tween 20) gelegt und unter leichtem Schütteln 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Objektträger abtropfen lassen und horizontal in einen Objektträger-Kasten legen, der zur Erhaltung der Luftfeuchtigkeit feuchtes Tissue-Papier enthält.

V.2.2. Jedes Abklatschpräparat wird mit einer Lösung monoklonaler Antikörper 3H6F8 gegen ISAV (oder anderen Antikörpern von erwiesener Spezifität und Wirksamkeit) überschichtet, und der Objektträger-Kasten wird geschlossen und unter Schütteln 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper ist in der Regel 1:10 bis 1:100 in 1 % Magermilch zu verdünnen, aber die tatsächliche Verdünnung muss für jede einzelne Charge bestimmt werden. Die Objektträger werden dreimal 2 Minuten in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Jedes Abklatschpräparat wird mit einer Lösung bedeckt, die in 1 %-Magermilch 1:1 000 verdünntes FITC-Ziege-Antimäus-Konjugat enthält, und in feuchter Umgebung 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger werden dreimal 2 Minuten in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Jeder Objektträger wird 10 Minuten mit Citifluor™-Lösung (500 µl Citifluor™ vermischt mit 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) oder einem anderen geeigneten Eindeckmedium abgedeckt. Die Objektträger werden dreimal in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Ist eine Gegenfärbung erforderlich, so kann jedes Abklatschpräparat mit Propidiumjodid (0,01 mg/ml) in PBS mit 0,1 % Tween 20 abgedeckt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Objektträger werden dreimal 2 Minuten in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Objektträger ablaufen lassen und in Citifluor™ oder einem anderen geeigneten Eindeckmedium einbetten. Vor der mikroskopischen Untersuchung werden die Objektträger bei 4 °C dunkel gelagert.

V.3. *Untersuchung durch Fluoreszenzmikroskopie*

Jeder Objektträger wird unter einem Fluoreszenzmikroskop und unter Verwendung eines geeigneten Filters untersucht, der FITC anregt und die typische grüne Fluoreszenz erkennen lässt. Alle Felder innerhalb der mit dem ImmEdge™-Stift abgegrenzten Regionen werden unter 10x- und 20x-Objektiven untersucht, und verdächtige Bereiche (die grün fluoreszieren) werden unter einem 40x-Objektiv und Phasenkontrast-/Fluoreszenzlicht weiter untersucht um sicherzustellen, dass die fluoreszierende Färbung zellbedingt ist. Die Objektisch-Koordinaten der verdächtigen Bereiche werden notiert, damit ein zweiter Prüfer später die Art der Fluoreszenz bestätigen kann. Nach der Untersuchung durch den ersten Prüfer werden positive oder verdächtige Objektträger durch einen zweiten Prüfer untersucht, um die Ergebnisse zu bestätigen.

V.4. Kontrollen

V.4.1. Jede Charge von Objektträgern, die für einen IFAT-Test angefärbt werden, muss drei Arten von Kontrollen umfassen:

- Abklatschpräparate der Niere von nicht infiziertem Atlantischem Lachs (negative Kontrolle),
- nicht infizierte SHK-1-Zellkultur oder andere empfängliche Zellkultur (negative Kontrolle),
- ISAV-infizierte SHK-1-Zellkultur oder andere empfängliche Zellkultur (positive Kontrolle)

V.4.2. Falls verfügbar, werden als zusätzliche positive Kontrolle Abklatschpräparate der Niere von einem ISAV-infizierten Atlantischen Lachs empfohlen.

V.4.3. Wird bei einer der negativen Kontrollen ein positives Ergebnis erzielt, so ist der Test für alle Objektträger dieser Charge ungültig. Ergeben alle Objektträger einer Charge, einschließlich der positiven Kontrollen, einen Negativbefund, so ist der Test für alle Objektträger dieser Charge ungültig. Ist eine Charge aus einem dieser Gründe ungültig, so sind alle Objektträger dieser Charge zu verwerfen, und es ist ein neuer Test unter Verwendung der Doppel-Abklatschpräparate durchzuführen.

V.5. Untersuchungen anderer Gewebe

Diese Technik kann auf andere Fischgewebe wie 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.

VI. Histologie

Die in Paraffin eingebetteten Abschnitte werden in 5 µm dicke Stücke geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Bei der ISA auftretende histologische Veränderungen sind in der jüngsten Ausgabe des OIE-Diagnosehandbuchs für Krankheiten von aquatischen Organismen beschrieben.

VII. Akronyme und Abkürzungen

cDNA	komplementäre DNA
CPE	Zytopathischer Effekt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
IF	Immunfluoreszenz
IFAT	Indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest
OIE	Internationales Tierseuchenamt
IPN(V)	Infektiöse Pankreasnekrose (Virus)
ISA(V)	Infektiöse Anämie der Lachse (Virus)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RT-(PCR)	Reverse Transkriptase (Polymerase-Kettenreaktion)
SHK-1	Zelllinie von der Kopfniere des Lachses
TCID ₅₀	Gewebekultur Infektionsdosis 50