

**Aus der Klinik für Fische und Reptilien  
(Kommissarische Leitung: Univ.-Prof. Dr. J. Braun)  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter Anleitung von  
Univ.- Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

**Nachweis von Antikörpern gegen das Cyprine Herpesvirus-3 (CyHV-3)  
bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) mittels ELISA \***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde eines Dr. rer. biol. vet.  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Claudia Gangl  
aus Greifswald

München 2008

\* Die Untersuchungen wurden mit Mitteln des  
Bayerischen Landesfischereiverbandes unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hoffmann  
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meinem Mann Armin

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>A Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>B Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
1 Erreger	3
1.1 Herpesviren (allgemein)	3
1.2 Klassifizierung und Nomenklatur	4
1.3 Morphologie und Genomorganisation von KHV	5
2 Epidemiologie	8
2.1 Erregereintrag	8
2.2 Einfluss der Wassertemperatur	9
2.3 Wirtsspektrum und Vektoren	11
2.4 Latenz und Carrier	13
3 Pathogenese	15
4 Klinische Symptome	16
5 Pathologisch-anatomische Veränderungen	18
6 Viruserkrankungen aufgrund verwandter Erreger	19
7 Differentialdiagnostik	22
8 Kreuzreaktivität	24
9 Fischimmunologie	24
9.1 Immunsystem bei Fischen	24
9.1.1 Angeborenes System	25
9.1.2 Erworbenes System	26
9.2 Einflüsse auf die Immunantwort bei Fischen	29
10 Krankheitsdiagnostik	30
10.1 Diagnose von KHV	30
10.1.1 Direkter Nachweis von KHV	30
10.1.1.1 KHV in der Zellkultur	30
10.1.1.2 Molekularbiologische Methodik	32
10.1.1.3 Weitere direkte Nachweisverfahren	34
10.1.2 Indirekter Nachweis von KHV	35
10.1.2.1 Der Enzymimmunoassay oder ELISA	37
10.1.2.2 KHV-ELISA	38
10.1.2.2.1 Methodik des ELISAs	38
10.1.2.2.2 Validierung	40
11 Etablierte Labordiagnostik	42

12 Krankheitsmanagement	43
12.1 KHV mit Seuchencharakter	43
12.2 Anzeigepflicht für KHV	43
12.3 Immunisierung	44
12.4 Bekämpfung und Therapie	46
<b>C Material und Methoden</b>	<b>49</b>
1 Material	49
1.1 Geräte	49
1.2 Verbrauchsmaterialien	49
1.3 Chemikalien	50
1.4 Medien und Pufferlösungen	51
1.5 Herstellung von Gebrauchsmedien	51
1.6 „Biostoffe“	52
1.7 Referenzproben und Antigen-Präparationen	53
1.8 Probenherkünfte, - gewinnung und Untersuchungsregime	53
2 Methoden	58
2.1 Zellkultur	58
2.1.1 KF-1- und CCB-Zellkultur	58
2.1.2 Kryokonservierung	58
2.1.3 Kultivierung der Zellen	59
2.1.4 Subkultivierung der Zellen	59
2.1.5 Zellzählung	60
2.2 Virus	60
2.2.1 Charakterisierung der Virusisolate	60
2.2.2 Virusanzucht	61
2.2.2.1 Verimpfen von Organmaterial in der Diagnostik	61
2.2.2.2 Verimpfen von Virusisolat zur Virusvermehrung	62
2.2.2.3 Verimpfen der Leukozytenfraktion	63
2.2.3 Virustitration von KHV-191	63
2.2.4 Virusisolierung und Präparation	64
2.2.5 Leukozytengewinnung	65
2.3 Molekularbiologischer Nachweis von KHV	66
2.3.1 Probengewinnung	66
2.3.2 DNA-Extraktion	67
2.3.3 Spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration	68
2.3.4 PCR-Ansatz	69
2.3.4.1 Herstellung des Master-Mix	69
2.3.4.2 Amplifikation der DNA	70
2.3.4.3 PCR-Analyse	72
2.4 ELISA	73
2.4.1 Untersuchungsmaterial	74
2.4.2 Referenzproben	74
2.4.3. Antigen-Präparation	74
2.4.4 Testvorbereitung	75
2.4.5 ELISA-Protokoll	75
2.4.5.1 Durchführung	75
2.4.5.2 Berechnung	77
2.4.5.3 Bewertung	78

---

2.4.6 Validierungsuntersuchung	80
2.4.6.1 Voruntersuchung	80
2.4.6.2 Laborvergleichsuntersuchung	81
2.4.6.3 Vergleich von Antigen-Präparationen	81
2.4.6.4 Überprüfung einer möglichen Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen CyHV-1	81
2.4.6.5 Überprüfung möglicher unspezifischer Reaktionen	81
2.4.6.6 Testung auf „Reproduzierbarkeit“	82
2.4.6.7 Regressionsanalyse	82
<b>D Ergebnisse</b>	<b>84</b>
1 Zellkultur und Virus	84
1.1 Zelllinien	84
1.2 Virus	85
1.2.1 Virusanzucht	85
1.2.2 Virustitration	86
2 Untersuchungsreihen I-III	88
2.1 Statusvalidierung anhand ausgewählter Koi-Teiche (I)	88
2.2 Verlaufsuntersuchung bei Fischen aus einem Teich mit KHV-Historie (II)	92
2.3 Stuserhebung im Rahmen eines freiwilligen Monitorings (III)	110
3 Validierung	118
3.1 Laborvergleichsuntersuchung	118
3.2 Vergleich von Antigen-Präparationen aus unterschiedlichen KHV-Isolaten	119
3.3 Validierung der Ergebnisse mit 9 unterschiedlichen FLI-Präparationen	122
3.4 Überprüfung möglicher Kreuzreaktionen	125
3.4.1 Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen CyHV-1	125
3.4.2 Überprüfung von unspezifischen Reaktionen bei Beschichtung mit naiver Zellkultur	125
3.5 Zwischen-Platten-Validierung	126
3.6 Innerhalb-Platten-Validierung	128
3.7 Regressionsanalyse	131
<b>E Diskussion</b>	<b>132</b>
<b>F 1 Zusammenfassung</b>	<b>154</b>
<b>F 2 Summary</b>	<b>156</b>
<b>G Literaturverzeichnis</b>	<b>158</b>
<b>H Anhang</b>	<b>172</b>
<b>I Danksagung</b>	<b>185</b>
<b>J Lebenslauf</b>	<b>187</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AB	Antibiotikum
Abb	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum
AG	Antigen (eng: Ag)
AK	Antikörper (eng: Ab)
bp	Basenpaar(e)
BSA	eng.: Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CCB	Common Carp Brain- Zelllinie
CCG	Common Carp Gill- Zelllinie
CCV	Channel Catfish Virus
Cefas	Centre of Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth (UK)
CyHV-1	Cyprines Herpesvirus 1(CHV, Herpesvirus cyprini, Carp Pox Virus)
CyHV-2	Cyprines Herpesvirus 2 (Virus der hämatopoetischen Nekrose der Goldfische)
CyHV-3	Cyprines Herpesvirus 3 (KHV, Koi-Herpesvirus)
CPE	eng.: cytopathic effect (Zytopathogener Effekt)
d	Tag
DNA	eng.: Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ds DNA	eng.: double stranded (Doppelstrang-)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	eng.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)
ELMI	Elektronenmikroskopie
et al	lat.: et alii (und andere)
EPC	Epithelioma Papilloma Carposum- Zelllinie oder Epithelioma Papulosum Cyprini- Zelllinie (Karpfenepithelzelllinie)
FKS	Fetales Kälberserum
fg	Femtogramm
FHM	Fat Head Minnow-Zelllinie
FLI	Friedrich Loeffler Institut-Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
g	Gramm bzw. Erdschwerebeschleunigung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N(2-ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettich- Peroxidase
h	Stunde
IcHV-1	Ictalurid Herpesvirus-1 (CCV)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase(n)

---

KHV	Koi-Herpesvirus
KF-1	Koi Fin- Zelllinie (Koiflossenzelllinie)
LUA	Landesuntersuchungsamt
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
MEM	Minimum Essential Medium
μ	Mikro
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m <sup>3</sup>	Kubikmeter
MEM	Minimal Essential Medium
mmol	Millimol
mM	Millimolar
MS 222	Tricain Methan Sulfonat (Betäubungsmittel für Fische)
MTP	Mikrotiterplatte
NEA	eng.: Non Essential Aminoacid (nicht essentielle Aminosäure)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OIE	Office International des Epizooties
PBS	eng.: Phosphate- buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	PBS+Tween <sup>®</sup>
PCR	eng: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	lat.: post infectionem (nach Infektion)
RT	Raumtemperatur
RTG-2	Rainbow Trout Gonad-2-Zelllinie
s	Sekunde
SPF	eng.: specific pathogen free (spezifisch pathogen frei)
SVC	Spring Viraemia of Carp
Tab	Tabelle
TAE	Tris- Acetat- EDTA Puffer
Taq	Gen einer DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose 50 %
TMB	Tetramethylbenzidin
Tween <sup>®</sup>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VO	Verordnung
W/V	eng : Masse pro Volumen
ZK	Zellkultur

---



## A Einleitung

In den USA, Europa und Israel kam es 1997 und 1998 zu Massensterben bei Karpfen (*Cyprinus carpio carpio*) und Koi (*Cyprinus carpio koi*) unbekannter Genese. Bretzinger et al. (1999) und Hoffmann (2000) beschrieben erste Fälle in Deutschland mit Hinweisen auf eine virale Beteiligung an diesen Geschehen. In Israel wurde 1998 aus erkrankten Koi ein bis dato unbeschriebenes Herpesvirus isoliert, das später eindeutig mit den klinischen Geschehen in Verbindung gebracht werden konnte (Hedrick et al., 2000). Dieses Virus unterschied sich hinsichtlich der kulturellen und chemisch-physikalischen Eigenschaften eindeutig vom bereits beschriebenen Herpesvirus cyprini 1 (CyHV-1). Der Erreger wurde zunächst als „Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus“ (CNGV), später als Koi-Herpesvirus (KHV) bzw. Cyprines Herpesvirus 3 (CyHV-3) bezeichnet (Hedrick et al., 2000; Ronen et al., 2003; Waltzek et al., 2005).

KHV-Infektionen sind seither sowohl in der Karpfenteichwirtschaft als auch in der Koi-Haltung zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten zu zählen (Swain, 2003; Haenen et al., 2004; Ilouze et al., 2006).

Die intensive Fischereiwirtschaft und der globale Handel mit Koi haben zu einer weltweiten Verbreitung des Virus geführt (Bretzinger et al., 1999; Hedrick et al., 2000; Neukirch und Kunz, 2001; Perelberg et al., 2003; Way et al., 2004a; Sano et al., 2004; Tu et al., 2004), welche in betroffenen Fischereien und Fischhaltungen mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten einhergeht (Way, 2004b).

Das Hauptproblem im Umgang mit KHV liegt in der Biologie des Erregers begründet. Die Etablierung von Latenzen im Wirtsorganismus, die für Herpesviren typisch ist (Fraser et al., 1981; Rock und Fraser, 1983), wurde ebenso für das Koi-Herpesvirus bestätigt (Gilad et al., 2004; St-Hilaire et al., 2005; Meyer, 2007).

Obwohl man durch Erhöhen der Wassertemperatur in betroffenen Beständen ein Eindämmen der Mortalität erreichen kann (Ronen et al., 2003), ist die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung des Virus auf naive Tiere und eine Manifestation einer latenten Infektion hoch. Da ein virustragendes Tier nicht immer die für KHV typischen Krankheitsmerkmale aufweist, sogar klinisch völlig unauffällig sein kann, muss man immer vom Auftreten von sogenannten Carrierfischen ausgehen (Haenen et al., 2004).

Durch diese als Carrier bezeichneten Virusträger, die oftmals als solche nicht erkannt werden, ist die weite Verbreitung bedingt (Walster, 1999).

Auf Grund seiner Bedeutsamkeit wurde KHV 2005 in die Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen aufgenommen (TierSG, §1 VO über anzeigepflichtige Tierseuchen; Fischseuchen-VO, Richtlinie 91/67/EWG, Anhang A).

Die Methoden zum Nachweis von KHV-Infektionen beschränken sich bislang auf direkte Erregernachweise, z.B. PCR oder Anzucht in der Zellkultur. Beide Nachweismethoden haben den Nachteil, dass die Tötung des Tieres zur Organentnahme notwendig ist. Dies ist besonders bei wertvollen Koi nicht unproblematisch. Der indirekte Erregernachweis mittels serologischer Nachweismethoden stellt eine Alternative oder eine Ergänzung zu o.g. Verfahren dar.

Der indirekte ELISA-Test, der über den Nachweis von Antikörpern Rückschlüsse auf einen vorangegangenen Kontakt mit KHV erlaubt, ist ein Indikator für das Vorliegen von latenten Virusträgern ohne die Manifestation einer Koi-Herpesviruserkrankung. Tiere, die Antikörperpositiv sind, stellen demnach im Handelsverkehr ein Infektionsrisiko dar. Das serologische Ergebnis ist eine zusätzliche Information über den KHV-Status eines Fisches, wenn die üblichen virologischen Nachweise unbefriedigend verlaufen (Adkison et al., 2005).

Immundiagnostische Methoden, wie Immunfluoreszenz und ELISA-Techniken, die laut OIE (2007) für eine erste Diagnosestellung bei SVC, einer anderen viralen Erkrankung, hilfreich sind, wurden für KHV bisher nicht ausreichend validiert und untersucht.

Für eine Eindämmung der Ausbreitung von KHV ist eine sensitive und spezifische Infektionsdiagnostik von Nöten.

Da für die serologische Untersuchung von Blutproben bislang kein kommerzielles Testsystem zur Verfügung steht, musste ein Testsystem, in diesem Fall ein „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA), erarbeitet und präpariert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein indirekter ELISA zum Nachweis von KHV-Antikörpern evaluiert und in ersten Schritten validiert, um seine Eignung als Nachweisinstrument für ein Routine-Monitoring herauszuarbeiten.

## **B Literaturübersicht**

### **1 Erreger**

#### **1.1 Herpesviren (allgemein)**

„Herpein“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „kriechen“. Damit wird das Vermögen der Vertreter der Familie Herpesviridae beschrieben, sich in Organe zurückzuziehen und sich so unmittelbar einem Nachweis zu entziehen. Folge einer Herpesvirusinfektion ist, dass der Wirtsorganismus zu einem permanenten Virusträger wird.

Eine lebenslange Persistenz, ein latentes Stadium und rezidivierende Erkrankungen sind vermutlich den meisten Herpesviren eigen (Fraser et al., 1981; Kirchner, 1982; Rock und Fraser, 1983; Davison, 2002). Von vielen Herpesvirusinfektionen bei Tieren und Menschen ist bekannt, dass sie latente Infektionen etablieren (Fraser et al. 1981; Rock und Fraser 1983; Van Nieuwstadt et al. 2001). Herpesviren verursachen bei verschiedenen Spezies Krankheiten, die mit gutartigen Hautveränderungen bis hin zu hochgradigen systemischen Verläufen einhergehen (Hedrick und Sano, 1989).

Unter Einwirkung bestimmter Stressfaktoren (Gilad et al., 2004; Meyer, 2007) können die Viren aktiviert werden, um dann ein akutes Krankheitsgeschehen (Way, 2004) zu verursachen.

Herpesviren konnten bisher bei den meisten Wirbeltierklassen, auch bei den Knochenfischen nachgewiesen werden (Roizman und Pellet, 2001). Von den 120 bekannten Spezies der Herpesviren sind die humanen Herpesviren und solche, die Nutztiere befallen, am besten erforscht. Ihre stammesgeschichtliche Entwicklung verrät, dass sie sich kontinuierlich mit ihren Wirtsorganismen entwickelt und sich im Laufe der Zeit hervorragend angepasst haben (Rock, 1993).

Für die meisten der bekannten Herpesviren sind mehrere Wirtsspezies empfänglich. Es ist laut Davison (1994, 2002) davon auszugehen, dass eine viel größere Anzahl als bis dato beschriebener Herpesviren existiert.

## 1.2 Klassifizierung und Nomenklatur

Innerhalb der Familie *Herpesviridae* gibt es drei Unterfamilien, die *Alpha-, -Beta- und Gamma-Herpesvirinae* sowie „nicht klassifizierte *Herpesviridae*“ mit unterschiedlichen Merkmalen bezüglich der Biologie, Pathogenität, Antigenität, Tropismus und Vermehrungseigenschaften (Roizman und Pellet, 2001).

Herpesviren sind die am häufigsten vorkommenden DNA-Viren bei Knochenfischen [Teleoster] (Hedrick et al., 1990). Unter den piscinen Herpesviren sind das Channel Catfish Virus (CCV) (Plumb, 1978; Wise und Boyle, 1985; Nussbaum und Grizzle, 1987; Davison 1994) und die Salmoniden Herpesviren 1 und 2 (Wolf et al., 1978; Yoshimizu et al., 1995) am intensivsten erforscht und beschrieben worden. Die älteste bekannte Viruserkrankung bei Fischen ist das Karpfenepitheliom, verursacht durch das Cyprine Herpesvirus 1 (CyHV-1, CHV), welches von Sano et al. (1985a) isoliert wurde. Neben Herpesviren, die Aale und Hechte befallen – Herpesvirus *anguillae* (Sano et al., 1990) und Northern Pike Herpesvirus (Yamamoto et al., 1984), ist das Cyprine Herpesvirus 2 (CyHV-2) des Goldfisches (*Carassius auratus*) zu nennen, welches bei dieser Spezies eine hämatopoetische Nekrose verursacht (Jung und Miyazaki, 1995).

Die taxonomische und molekulare Charakterisierung der bekannten Herpesviren der Teleoster ist nach wie vor unvollständig. Von den 9 existierenden Herpesviren der Knochenfische ist nur CCV vollständig klassifiziert (Beever, 2004).

Das Koi-Herpesvirus wurde ursprünglich aus Koi mit Herkunft Israel und USA 1998 isoliert, und aufgrund von morphologischen und biologischen Kriterien und nach dem Wirtsorganismus, aus welchem die Erstisolierung gelang, von Hedrick et al. (2000) als Koi-Herpesvirus (KHV) bezeichnet. Genomische Sequenzanalysen bestätigten die Zugehörigkeit zu einer Gruppe von Fisch-Herpesviren in der Familie der *Herpesviridae* (Hedrick et al., 2000; Yuasa et al., 2005). Sequenzanalysen von KHV haben zudem eine große Ähnlichkeit mit Herpesviren bei Säugern und Vögeln ergeben (Hedrick et al., 2004).

Nach Sequenzanalysen der DNA-Polymerase und anderer Gene von KHV und von 11 Fisch- und Amphibienherpesviren lassen sich die Viren entsprechend ihrer bevorzugten Wirtsorganismen einteilen. Dabei besitzt KHV den größten Ähnlichkeitsgrad zu CyHV-1 und CyHV-2 (Hedrick et al., 2004).

Die enge Verwandtschaft von KHV mit CyHV-1 und CyHV-2 wurde von Waltzek et al. (2005) nach einer Sequenzanalyse von vier Genen bestätigt. Außerdem konnten die Autoren

bei 11 KHV-Isolaten aus verschiedenen Regionen identische Sequenzen in einem Gen für eine DNA-Polymerase nachweisen.

Aufgrund dieser genetischen Verwandtschaft und der Tatsache, dass es sich bei den vorrangig betroffenen Wirtsfischen um Karpfenartige (*Cyprinidae*) handelt, wird das Koi-Herpesvirus auch als Cyprines Herpesvirus 3 (CyHV-3) bezeichnet (Waltzek et al., 2005; Adkison et al., 2005). Diese Bezeichnung ersetzte die in Israel anhand der auftretenden Krankheitssymptome deklarierte vorausgegangene Benennung des Virus als *Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus* (CNGV) durch Ronen et al. (2003), Pikarsky et al. (2004) and Hutoran et al. (2005).

Der Abgleich von Translationsprodukten der DNA- Sequenzen mittels einer Proteindatenbank zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit anderen Viren der *Poxviridae* und *Herpesviridae*. Jedoch erlauben das hohe Molekulargewicht der KHV-DNA und die Verschiedenheit der Proteinsequenzen keine phylogenetische Klassifizierung (Hutoran et al., 2005). KHV ist laut NCBI Taxonomy database (2007) der Familie „*Unassigned Herpesviridae*“ zugeordnet. Viren, die zu dieser Gruppe gehören, sind noch nicht näher bestimmt.

### **1.3 Morphologie und Genomorganisation von KHV**

Das Koi-Herpesvirus (KHV, CyHV-3) gehört aufgrund seiner Struktur, es ist ein großes, komplexes DNA-Virus, zur Familie *Herpesviridae* (Hedrick et al., 2000; Roizman und Pellet, 2001). Waltzek *et al.*, (2004) bestätigte diese Zuordnung durch Arbeiten zur Morphologie und Genetik des Koi Herpesvirus.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kann die für Vertreter der Familie *Herpesviridae* typische Morphologie und Größe der Virionen gezeigt werden (Hedrick et al., 2000; Hoffmann, 2001; Neukirch und Kunz, 2001; Ronen et al., 2003; Perelberg et al., 2003) [Abb. 1 und 2]. Im Gegensatz zu vielen anderen behüllten Viren (Rixon, 1993) stellt die äußerste Struktur eines Virions eine Lipidhülle mit einer großen Anzahl an relativ kleinen Glykoproteinspikes dar (Beevers, 2004).

CyHV-3 ist ein behülltes DNA-Virus mit einer Größe von 170-230 nm (Hedrick et al., 2004; Pokorova et al., 2005), im Vergleich dazu weisen die meisten Vertreter der *Herpesviridae* Größen von 100 -180 nm auf. Neben der Virushülle (Hedrick et al., 2000; Tu et al., 2004; Hutoran et al., 2005) enthält es das Tegument und ein Nukleokapsid mit durchschnittlich 100-110 nm (Hedrick et al., 2004), eine ca. 277-295 kbp große lineare, doppelsträngige DNA

(Hedrick et al., 2004, Dishon et al., 2007), die im ikosaedrischen Kapsid (Hedrick et al., 2000) an Fibrillen fixiert ist und 156 Gene aufweist, die 31 virale Proteine codieren. Elf weisen identische Molekulargewichte zu Proteinen von CHV auf, 10 sind identisch mit CCV-Proteinen (Gilad et al., 2002). Das Virusgenom ist mit ca. 277 kbp (Ronen et al., 2004; Hutoran et al., 2005) bzw. 295 kbp (Waltzek et al., 2005) größer als bei anderen Vertretern der *Herpesviridae* mit durchschnittlich 250 kbp (Ronen et al., 2003) und beinhaltet DNA-Sequenzen, die Polypeptide kodieren wie bei anderen großen ds DNA-Viren (Hutoran et al., 2005).

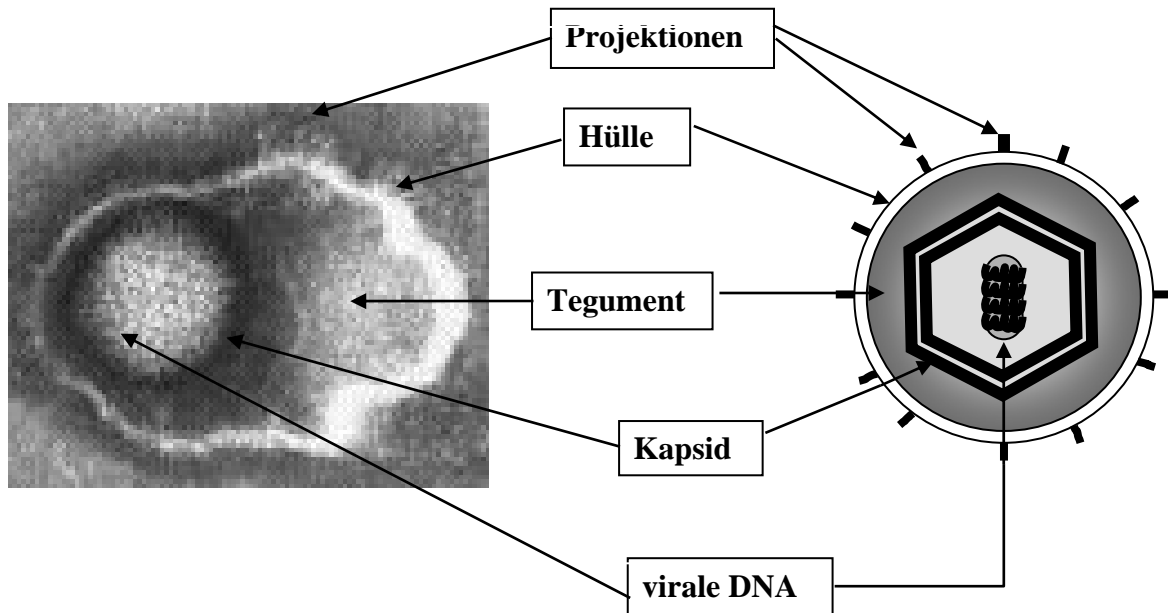
Ronen et al. (2003) zeigte auf, dass nur ein kleiner Teil der genomischen Sequenz mit dem Genom anderer verwandter Herpesviren übereinstimmt. Way et al. (2004) konnten Gene beim Koi-Herpesvirus identifizieren, die mit homologer Sequenz auch beim CyHV-1 vorkommen. Aminosäuresequenzen, welche durch KHV-DNA-Fragmente kodiert werden, haben Ähnlichkeit mit denen anderer Vertreter der *Poxviridae* und *Herpesviridae* (Hutoran et al., 2005).

Vergleiche zwischen den Genomen von KHV-Isolaten mit unterschiedlicher geographischer Herkunft durch Restriktionsanalyse (Gilad, et al., 2002; Haenen, et al.2004) oder Nukleotid-Sequenzanalyse (Sano et al., 2004a; Gunimaladevi, et al.2004; Tu et al. 2004; Ishioka et al., 2005) haben sie als nahezu identisch ausgewiesen, wenn auch einige Unterschiede in der Anzahl von Polypeptiden vorkommen können (Gilad, et al, 2002 und 2004), so dass Gilad et al. (2002) Polymorphismen trotz eines gemeinsamen Ursprungs in Erwägung ziehen.

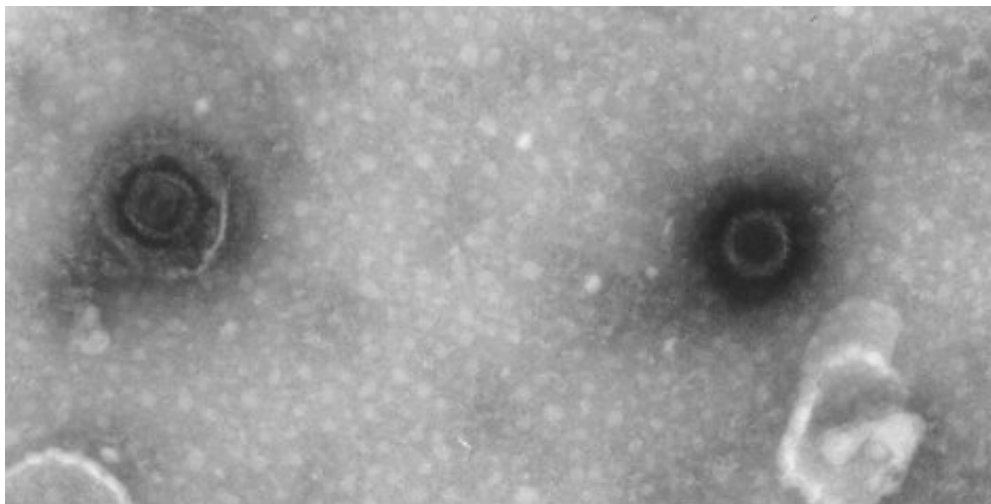
Aoki et al. (2007) konnten zeigen, dass drei KHV Stämme aus Japan, USA und Israel ein jeweils 295 kbp großes Genom mit einer endständigen 22 kbp Wiederholungssequenz aufwiesen und alle einem Eltern-Wildtyp zuzuordnen sind. Das Genom wies eine Anzahl an Mutationen auf, die zu einer fehlenden Funktionalität von Genen führten, was die Autoren als Ursache für die unterschiedliche Virulenz des Erregers und damit die Ausprägung der Koi-Herpesvirusinfektion ansehen.

Im Versuch erwiesen sich europäische Isolate im Vergleich zu Stämmen aus Asien und Israel als weniger virulent. Bergmann (2007) zieht eine mögliche Anpassung an unsere klimatischen Verhältnisse in Erwägung, auch der Immunstatus des Wirts und weitere fakultativ vorkommende Pathogene am Ausbruchsort scheinen laut Antychowicz et al. (2005) eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Sequenzanalyse eines 484 bp großen KHV-DNA Fragments konnte in 3 von 4 Fällen als komplett identisch angegeben werden, in einem Fall wies die DNA Substitutionen von 5 Nukleotiden auf. Es erscheint wahrscheinlich, dass einfache Deletionen oder Substitutionen von Nukleotiden ohne Auswirkungen auf den

Phänotyp des Virus bleiben, was auf die Lokalisation in nichtkodierenden Bereichen der DNA zurückzuführen ist (Antychowicz et al., 2005). So kann auf einen hohen Grad an Homogenität bzw. einen gemeinsamen Ursprung geschlossen werden.



*Abbildung 1:* Schematischer Aufbau und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Koi-Herpesvirions (Dr. D. Fichtner, FLI Riems)



*Abbildung 2:* Elektronenmikroskopische Aufnahme von Koi-Herpesvirionen (gewonnen durch Ultrazentrifugation aus einer KF-1 Zellkultur 14 d p.i.) [A. Jahnke, Inst. f. Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät, LMU München]

## 2 Epidemiologie

### 2.1 Erregereintrag

KHV-Infektionen sind in der Karpfenteichwirtschaft, vielmehr jedoch in der Koihaltung ein großes Problem (Swain, 2003; Haenen et al., 2004; Ilouze et al., 2006). Die intensive Fischereiwirtschaft und der weltweite Handel mit Koi sowie Zierfischausstellungen haben sehr wahrscheinlich zu einer Verbreitung des Virus um die ganze Welt geführt, so dass inzwischen ein Großteil der Länder Europas und Asiens, ebenso Länder des afrikanischen Kontinents und die USA betroffen sind, wo es in betroffenen Fischereien und Fischhaltungen zu erheblichen Verlusten mit hohem finanziellen Aufwand gekommen ist (Gilad et al., 2003; Way, 2004).

Genetische Analysen von Virusisolaten aus unterschiedlichen Regionen der Welt haben einen hohen Grad an Homogenität ergeben, was für die weltweite Verbreitung, ausgehend von einem gemeinsamen Ursprung, spricht (Gilad et al., 2002).

Klinische Erkrankungen treten in der Regel nach Zukauf und Zusetzen von Karpfen aus anderen Herkünften auf. Dabei sind Nutzkarpfenbestände ebenso gefährdet wie Populationen von Wildkarpfen. Durch Carrierfische, die unbemerkte Virusträger sind, wurde das Virus in die Bestände eingeschleppt (Walster, 1999). Diese symptomlosen Carrierfische stellen ein erhebliches Risiko für die Verbreitung von KHV dar (Gilad et al., 2002, 2003). Walster (1999), Bretzinger et al. (1999) und Neukirch und Kunz (2001) sahen den Zukauf von Fischen in einen Bestand als Auslöser für einen KHV-Ausbruch an. Überlebende Karpfen können nach bisherigen Erfahrungen über Monate für andere Fische infektiös bleiben. Über die genaue Persistenz ist jedoch noch nicht genügend bekannt (Hoffmann, 2005).

Perelberg et al. (2003) vermuten, dass die Übertragung über das Wasser erfolgt, in welchem der Erreger über mehrere Stunden seine Infektiösität behalten kann. Walster (1999) macht vorrangig Gerätschaften und den Menschen bei mangelnder Betriebshygiene für die Übertragung und Einschleppung des Virus verantwortlich .



## 2.2 Einfluss der Wassertemperatur

Die Wassertemperatur wird als Umweltfaktor mit dem größten Einfluss auf die Häufigkeit und das Erscheinungsbild von KHV-Ausbrüchen angesehen. Die meisten Ausbrüche erfolgen bei Wassertemperaturen von 18-26°C (Bretzinger et al., 1999; Walster et al., 1999; Hedrick et al., 2000; Perelberg et al., 2003; Ronen et al., 2003; Dishon et al., 2007). Die Inkubationszeit erstreckt sich in der Regel von 7 bis 21 Tagen, in der kalten Jahreszeit kann sich ein klinischer Ausbruch deutlich länger hinziehen (Hedrick et al., 2000; Denham, 2003; Perelberg et al., 2003; Sano et al., 2004a; Terhune et al., 2004; Tu et al., 2004).

Einzelne Infektionsgeschehen konnten auch bei einer Wassertemperatur von 16°C beobachtet werden, allerdings scheinen hier klinische Symptome weniger ausgeprägt zu sein (Bretzinger et al., 1999).

Gilad et al. (2003) gibt die Wassertemperatur als den wichtigsten Umweltfaktor an, der den Ausbruch bzw. das Erscheinungsbild der Erkrankung beeinflusst. Bei Temperaturen von 4-10°C (Gilad et al., 2003), 30°C (Gilad et al., 2003; Hutoran et al., 2005; Perelberg et al., 2005) oder 37°C (Gilad et al., 2003) konnte in zahlreichen Infektionsversuchen unterschiedlicher Forschergruppen kein Ausbruch induziert werden.

Die Mortalität ist ebenfalls stark abhängig von der Wassertemperatur, bei optimalen Temperaturen kann sie bis zu 90 % betragen (Way, 2004). St-Hilaire et al. (2005) gaben an, dass es vereinzelt auch zu Todesfällen bei Wassertemperaturen gekommen ist, die unterhalb des für die Replikation bzw. Reaktivierung des Virus bedeutsamen Temperaturbereichs lagen. In Polen, als größter Speisekarpfenproduzent Europas, ist es in den Jahren 2002 -2005 zu etlichen Fällen von Massensterben in Karpfenfischzuchten aufgrund von KHV-Infektionen bei niedrigeren Temperaturen von 18-20°C gekommen (Antychowicz et al., 2005).

Nach Gilad et al. (2003) führen natürliche und experimentelle Infektionen von Koi mit KHV im permissiven Temperaturbereich von 16-28°C zu Sterblichkeitsraten von 70-100 % über einem Zeitraum von 7-21 Tagen. Die höchste Mortalität geben Gilad et al. (2003) für eine Wassertemperatur von 23°C an. Fische, die die Infektion überlebt haben, und, die erhöhten Wassertemperaturen nach der Infektion ausgesetzt waren, entwickelten teilweise eine komplette Resistenz gegenüber einer Reinfektion (Gilad et al., 2003; Ronen et al., 2003).

Der Hintergrund dieses Resistenzgeschehens ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt, jedoch sind Antikörper, die im Serum die Infektion Überlebender detektiert werden können, ein Beweis für eine Auseinandersetzung mit KHV (Ronen et al., 2003). Tests, die KHV-Antikörper detektieren, sind deshalb zur Feststellung des Immunstatus und als Indikator für eine vorausgegangene KHV-Infektion von großer Bedeutung (Hedrick et al., 2004; Adkison et al., 2005).

Bei Wassertemperaturen, die unterhalb des sogenannten permissiven Temperaturbereiches liegen, können sich Fische infizieren ohne Krankheitssymptome zu zeigen und einen Carrierstatus entwickeln (Hedrick et al., 2000; Neukirch, 2003b). Ansteigende Wassertemperaturen, die in dem permissiven Temperaturfenster liegen und eine Virusvermehrung erlauben, können einen Ausbruch der Krankheit fördern (Bretzinger et al., 1999; Gilad et al., 2003, 2004).

KHV scheint symptomlos über einen langen Zeitraum in Koi und Karpfen bei niedrigen Wassertemperaturen (<13°C) zu persistieren. Erst mit ansteigenden Wassertemperaturen im jahreszeitlichen Rhythmus wird die Krankheit offenkundig. St-Hilaire et al. (2005) konnten zeigen, dass infizierte Fische, die für 200 Tage bei 12°C Wassertemperatur gehalten wurden, bei Verbringen in den „optimalen“ Temperaturbereich von 22°C infektiöses Virus ausschieden.

Dagegen konnte keine virale DNA oder infektiöses Virus von Ronen et al. (2003) in „natürlich immunisierten“ Fischen nachgewiesen werden. Die Autoren konnten zeigen, dass Karpfen, die sich durch Kohabitation bei 17-28°C Wassertemperatur mit KHV-Fischen infiziert hatten und anschließend bei einer Wassertemperatur von 30°C gehalten wurden, resistent gegenüber einer neuerlichen Infektion mit KHV waren und erhöhte Antikörpergehalte aufwiesen. Jedoch scheinen Antikörper allein nur einen geringen immunologischen Schutz zu gewährleisten, so dass zellgekoppelte Immunmechanismen zu einem vollständigen Schutz gegenüber einer erneuten Infektion mit KHV führen müssen (Ronen et al., 2003).

### 2.3 Wirtsspektrum und Vektoren

Davison (2002) postulierte, dass sich jedes Herpesvirus eng an eine bestimmte Wirtsspezies adaptiert hat. Die in der Literatur verwendete Bezeichnung „Koi-Herpesvirus-Infektion der Cypriniden“ bezieht sämtliche Karpfenartige als mögliche Wirtsorganismen ein.

Obwohl es sich bei der KHV-Infektion um eine virulente und hochkontagiöse Krankheit handelt, beschränken sich Krankheitsgeschehen mit Morbidität und Mortalität auf Koi- und Karpfenpopulationen (Ariav et al., 1999; Walster, 1999).

Karpfen werden oft gemeinsam mit anderen Fischarten kultiviert, jedoch konnten bisher unter üblichen Aquakulturbedingungen und auch bei KHV-Ausbrüchen keinerlei Anzeichen einer Erkrankung und Todesfälle bei anderen Fischarten beobachtet werden (Hoffmann et al., 2000). Das mögliche Wirtsspektrum beinhaltet vor allem die Spezies Goldfisch (*Carassius auratus*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idellus*), Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*), Schleie (*Tinca tinca*), Stör (*Acipenser sp.*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Zander (*Bidyanus bidyanus*) und Katzenwels (*Ictalurus punctatus*) (Bretzinger et al., 1999; Hedrick et al., 2000; Perelberg et al., 2003; Takashima et al., 2005; Hedrick et al., 2006). Vertreter der den Karpfen nahe verwandten Spezies Goldfisch sind in früheren Experimenten nach einer Vergesellschaftung mit kranken Fischen über mehrere Monate symptomlos geblieben (Hutoran et al., 2004).

Haenen und Hedrick (2006) konnten bei Goldfischen, die in Kohabitationsexperimenten infiziert worden waren, mit der PCR spezifische KHV-Sequenzen nachweisen und über die Zellkultur Virus isolieren.

Durch Bergmann (2007) und Meyer (2007) wurde Virus-DNA bisher in Graskarpfen, Goldfischen, Karauschen (*Carassius carassius*), Welsen (*Silurus glanis*), Goldorfen (*Leuciscus idus*) und Stören, die aus KHV- Karpfenbeständen stammten, nachgewiesen. Bergmann konnte Virus-DNA mit der PCR noch 1 Jahr p.i. in Leukozyten von Karauschen und Goldfischen detektieren.

Mit diesen Tieren gelang es wiederum, Virus auf naive Karpfen zu übertragen und sie anzustecken. Bei allen untersuchten Fischarten, ebenso wie im Gewebe der naiven Kontrollkarpfen, die mit den Latenzträgern vergesellschaftet wurden, ließ sich KHV-DNA nachweisen. Andere Cypriniden als Koi und Karpfen (*Cyprinus carpio*) erkrankten laut Meyer (2007) und Bergmann (2007) nicht.

Natürlich vorkommende KHV-Infektionen sind beim Nutzkarpfen (*Cyprinus carpio carpio*) sowie beim Koikarpfen (*Cyprinus carpio koi*) nachgewiesen.

Eine unterschiedlich starke Resistenz scheint bei verschiedenen Nutzkarpfenlinien zu bestehen (Shapira et al., 2005). Verpaarungen von domestizierten Karpfen mit Wildtypen haben in Kreuzungsexperimenten (teil-)resistente Fische hervorgebracht, die Infektionen mit KHV überlebten.

Hedrick et al. (2006) untersuchten verschiedene Hybridlinien auf ihre Empfänglichkeit für Infektionen und stellten fest, dass sich bei einigen Kreuzungsspezies kein Mortalitätsgeschehen nach experimenteller Infektion auslösen ließ.

Sämtliche Altersklassen der Fische scheinen eine gewisse Empfänglichkeit gegenüber dem Erreger zu besitzen (Bretzinger et al., 1999; Sano et al., 2004a; Terhune et al., 2004).

Walster (1999) gab an, dass die am stärksten betroffenen Fische häufig eine Größe von 25-30 cm hatten.

Unter experimentellen Bedingungen sind laut Perelberg et al. (2003) Fische mit einem Gewicht bis 10g empfindlicher als Tiere mit einem Gewicht über 200g.

Die Morbidität in derart betroffenen Populationen kann 80-100% und die Mortalität 70-80 % bei einem perakuten bis akuten Verlauf betragen (Walster, 1999; Bretzinger et al., 1999), jedoch kann letztere bis auf 90-100 % ansteigen (Walster, 1999; Hoffmann et al., 2000; Tu et al., 2004b).

Laut Perelberg et al. (2003) scheint sich hier eine altersabhängige abnehmende Empfänglichkeit zu bestätigen.

Inwieweit andere Spezies (nicht nur andere Fischarten) auch als Vektoren dienen können, ist noch ungeklärt (Hoffmann, 2005).

Die Infektiosität kann im Wasser mehrere Stunden betragen, d.h. eine Übertragung des Erregers ist auch ohne Beteiligung belebter Vektoren möglich (Perelberg et al., 2003).

Walster (1999) schreibt im Zusammenhang mit mangelnder Betriebshygiene der Verwendung kontaminierter Gerätschaften sowie dem Faktor Mensch eine große Bedeutung zu.

Auch sieht der Autor einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Karpfenlaus (*Argulus sp.*) als bekannten Überträger viraler Infektionen und Ausbrüchen von KHV.

## 2.4 Latenz und Carrier

Eine der bedeutendsten Eigenschaften der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, sich im Organismus zurückzuziehen und damit Verursacher von latenten Infektionen zu sein und Fische hervorzubringen, die als Carrier fungieren können. Diese können nach einer stressbedingten Virusaktivierung und –ausscheidung die Übertragung des Virus auf naive Fische verursachen (Gilad et al., 2004; St-Hilaire et al., 2005).

Latenz ist definiert als „eine reversible, nicht produktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco und Cullen, 1991). Als latent infiziert wird also ein Fisch bezeichnet, der ohne Krankheitsanzeichen zu zeigen, Träger eines inaktiven Virus ist, das unter Umständen reaktiviert und dann wirtspathogen werden kann. Man kann deshalb zwischen der KHV- Infektion und der KHV- Erkrankung unterscheiden (Bergmann, 2007).

Für die Ausbildung von Latenzen scheint vor allem die physiologische Verfassung des Wirtsorganismus verantwortlich zu sein (Roizman und Pellet, 2001). Stress bzw. Immunsuppression führt möglicherweise zu einer Virusaktivierung mit akuter Virusreplikation und vermehrter Ausscheidung, in dessen Verlauf sich eine ausgeprägte Klinik, aber auch nur eine gering lokalisierte Symptomatik entwickeln kann (Bergmann 2007). In Folge können Viren innerhalb einer Art als auch auf andere Spezies gut übertragen werden (Plumb, 1978; Wise et al., 1988).

Meyer (2007) konnte in Belastungsversuchen zeigen, dass bei latent infizierten Karpfen unter Stresseinwirkung, z.B. Transport eine Virusreaktivierung und erneute Virusausscheidung mit subklinischem Verlauf induziert werden kann, wie es Glaser et al. (1999) und Metha et al. (2004) für andere Herpesviren beschrieben.

Laut St-Hilaire et al. (2005) konnte in latent infizierten Karpfen, bei welchen ein Nachweis von Virus-DNA mittels PCR nicht gelang, durch Schwankungen der Wassertemperatur (12-23°C) eine erneute Ausscheidung von infektiösem Virus induziert und andere, zugesetzte Karpfen infiziert werden, wobei es bei diesen häufig zu subklinischen Infektionen kam.

St-Hilaire et al. (2005) rieten deshalb aufgrund der Gefahr der Erregerverbreitung von einer Erzeugung „natürlich“ immuner Fische durch Konfrontation mit dem Virus und Erhöhung der Temperatur ab.

In Abhängigkeit von der Wassertemperatur kann KHV im Fisch für eine lange Zeit persistieren, ohne dass es zu einem Ausbruch kommt. Mit ansteigenden Wassertemperaturen im Jahreszeitenrhythmus kann es dann zu einem Krankheitsausbruch kommen (Adkison et al., 2005). Das kann ursächlich in der herabgesetzten Replikationsfähigkeit des Virus bei niedrigen Temperaturen begründet sein (Gilad et al., 2002, 2003).

Lange war wenig über eine mögliche Latenz von KHV bekannt (Gray et al., 2002; Walster, 2003). Die meisten KHV-Ausbrüche resultieren augenscheinlich aus dem Eintrag von gesund erscheinenden Fischen aus Beständen mit KHV-Vergangenheit in naive Populationen von Koi oder Karpfen (Gilad et al., 2002; Haenen et al., 2004; Sano et al., 2004; Adkison et al., 2005). Für einen Zusammenhang von internationalem Fischhandel und dem weltweiten Vorkommen von KHV-Infektionen spricht das Auftreten von Latenzen und Carrierfischen (Hedrick et al., 2004). Sowohl nach natürlichem Kontakt mit KHV, als auch nach experimenteller Infektion können Fische, die die Erkrankung überlebt haben, als potentielle Carrier angesehen werden (Gilad et al., 2004; Hedrick et al., 2005; Way, 2005). Als Beweis für eine natürliche oder experimentelle Auseinandersetzung von klinisch unauffälligen Fischen mit dem Koi-Herpesvirus dient der Nachweis dieser latenten Infektionen oder eines Carrier Status durch die Detektion von Virus-DNA in der PCR (Gilad et al., 2004) bzw. der Nachweis von Antikörpern, die Fische nach einer überstandenen Infektion bilden (Adkison et al., 2005). Da es bei einer latenten Infektion zu keiner Expression von viruskodierenden Proteinen kommt, ist der Nachweis derartiger Trägertiere mit direkten und sehr sensitiven Nachweismethoden, wie PCR dennoch erschwert (Gilad et al., 2002, 2003).

Ebenso wurde durch Sano et al. (1985, 1991, 1993) das mit KHV nahe verwandte Cyprine Herpesvirus 1 (CyHV-1) als Verursacher von latenten Infektionen aufgedeckt. Das Erscheinen der charakteristischen „Karpfenpocken“ als Ausdruck einer Neuinfektion mit CyHV-1 bzw. einer Reinfektion bei latenten Virusträgern wird ebenso mit dem Vorliegen von verschiedenen Umweltfaktoren in Verbindung gebracht. Bei CyHV-1 werden im Gegenzug niedrige Wassertemperaturen und das geschwächte Immunsystem für das Auftreten der Hautläsionen, der charakteristischen „Pocken“, als Ausdruck des Wiederaufflammens der Infektion verantwortlich gemacht (Sano et al., 1993; Adkison et al., 2005).

### 3 Pathogenese

Bei einer akuten primären Infektion hat sich der Fisch über die Haut und die Kiemen, jedoch in erster Linie über den Verdauungstrakt mit dem Virus nach direktem Kontakt mit infizierten Fischen und über Ausscheidungsprodukte aus dem umgebenden Wasser infiziert. Von dort verteilt sich der Erreger über die Blutbahn im gesamten Organismus (Bergmann, 2007).

Bergmann (2007) konnte in Leukozyten hohe Virusgehalte nachweisen, die im Laufe des Infektionsgeschehens erheblich abnahmen. Virus, das über eine körperoberflächennahe Eintrittspforte wie die Kiemen über die Blutbahn zu einer Generalisierung in inneren Organen führt, kann eine virusinduzierte Mortalität zur Folge haben (Gilad et al., 2004).

Pikarsky et al. (2004) vermuteten, dass der Viruseintrag über die Kiemen erfolgt, wobei es im Verlauf der Virusvermehrung zu Kiemenschädigungen, wie Nekrosen kommt. Mit dem Blutstrom, wobei besonders die Leukozyten beteiligt sind, gelangt der Erreger in die Organe. Außerdem kann er wieder direkt über die Kiemenoberfläche an das umgebende Wasser abgegeben werden.

Die systematische Ausbreitung des Virus von anfänglichen Eintrittspforten auf innere Organe und Nervengewebe zeigt sich bei Herpesvirusinfektionen der Spezies Zwergwels (*Ictalurus punctatus*), Karpfen, Aal (*Anguilla anguilla*) und auch bei KHV (Hedrick et al., 2000; Gilad et al., 2004).

Der Nachweis viraler DNA in Geweben ist laut Gilad et al. (2004) bereits einen Tag p.i. möglich und zeigt auf, wie schnell die Verbreitung im Organismus abläuft. Auch scheint die Wassertemperatur einen größeren Einfluss auf die Manifestierung im Fischkörper zu haben, als die Virusmenge selbst. Bei 23°C Wassertemperatur konnten in Kiemen, Niere und Milz die höchsten DNA-Mengen detektiert werden.

Dishon et al. (2005) beschrieben, dass Niere und Darm Orte der Virusvermehrung darstellen, da im Kot infizierter Tiere Virus nachgewiesen werden konnte. Dabei scheint sich das Virus in der Niere am effektivsten zu vermehren.

Einige Herpesviren, z.B. das Herpes simplex-Virus beim Menschen können latente Infektionen in Ganglien und Neuronen etablieren (Rolle und Mayr, 1993). Momentan ist es noch unklar, ob dieses Phänomen auch für KHV zutrifft (Gray et al., 2002), obgleich der

Nachweis viraler DNA im Nervensystem bzw. Gehirn der Fische stellenweise gelingt (Pikarsky et al., 2004).

Der Nachweis von Virusgenom im Schleim der Haut und des Kiemenepithels gibt laut Meyer (2007) einen Hinweis auf den Weg der Übertragung einer Infektion und zeigt die Rolle des Schleims in der viralen Pathogenese auf. Infektiöses Virus im Schleim ist eine Quelle für die Infektion naiver Fische. Von der Haut kann infektiöses Virusmaterial an das Wasser abgegeben werden (Gilad et al., 2004).

Diese bedeutende Rolle von Oberflächengewebe bei Herpesinfektionen ist bei den meisten Tieren, auch bei Fischen bekannt (Hedrick und Sano, 1989). Die Überträgerrolle der Haut und der Kiemen konnte schon mit IchV-1 infizierten Zwergwelsen, mit CyHV-1 infizierten Karpfen und bei Japanischen Aalen, die mit dem Anguilliden Herpesvirus infiziert waren, gezeigt werden. (Wise und Boyle, 1985; Nusbaum und Grizzle, 1987; Sano et al., 1993; Kobayashi und Miyazaki, 1997; Gray et al., 1999; Lee et al., 1999).

Die Virusreplikation in der Haut erklärt die Hypersekretion von Schleim bei einer akuten Infektion und das damit verbundene klinische Erscheinungsbild wie blasse, farblose und sandpapierartige Hautareale (Bretzinger et al., 1999; Hedrick et al., 2000; Perelberg et al., 2003).

#### **4 Klinische Symptome**

In akut erkrankten Beständen wird zunächst das klinische Erscheinungsbild und der rasante Krankheitsverlauf als typisch angesehen (ter Höfte et al., 2004).

Das Krankheitsbild einer Erkrankung kann durch die Wassertemperatur und-qualität, das Alter und die Kondition der Fische, sowie Populationsgröße und einfließende Stressfaktoren bestimmt werden (Walster, 1999). Der Immunstatus eines Fisches ist ebenfalls ein bedeutender Faktor (Adkison et al., 2005).

Bei einer manifestierten Infektion zeigen die Fische auffällige Verhaltensänderungen, wie Lethargie, schwankende Schwimmbewegungen und eine gesteigerte Atmung (Luftschnappen). Äußerlich fallen opake Hautveränderungen sowie deutlich geschwollene, teils hyperämische, teils blasse Kiemen auf, bei längerem Krankheitsgeschehen sind weite Teile der Lamellen nekrotisch (*H, Abb. A 7*), die Kiemen sehen dann wie „abgefressen“ aus (Bergmann, 2007). Dieses Bild spricht für eine initiale Infektion über die Kiemen nach



Kontakt mit dem Virus über das Wasser sowie über den Verdauungstrakt direkt, wie Hedrick et al. (2000) in Badexperimenten nachweisen konnte.

Endophthalmus, Anorexie, Flossenschäden mit Hämorrhagien (*H, Abb. A 8*) am Flossengrund, Entfärbung der Haut und vermehrte Schleimbildung (*H, Abb. A 9*), wobei die darunter liegende Haut eine Sandpapier ähnliche Struktur annehmen kann, sind weitere Symptome (Walster, 1999; Hedrick et al., 2000; Hoffmann, 2005).

Kommen zu den Anzeichen einer schweren Kiemenerkrankung (massive Kiemenschäden bis hin zur Kiemennekrose), Appetitverlust, Apathie und Hautveränderungen hinzu, rechtfertigt dieses Erscheinungsbild den Verdacht auf eine KHV-Infektion. Jedoch müssen vorher alle anderen Ursachen für derartige Kiemenschäden ausgeschlossen werden. Darunter sind vor allem schlechte Wasserwerte (Ammoniak, O<sub>2</sub>-Mangel), Überfütterung und mangelhaft arbeitende Filteranlagen, aber auch bakterielle Krankheiten zu nennen (Lechleitner, 2003).

Ariav et al. (1999) und Bretzinger et al. (1999) stellten fest, dass erkrankte Fische sehr empfänglich für einen Befall mit bakteriellen und parasitären Sekundärerregern waren, was eine Verschlechterung des Krankheitsbildes begünstigt. Auch Haenen et al. (2004) postulierten, dass Sekundärinfektionen eine nicht unerhebliche Rolle im Krankheitsgeschehen spielen und das klinische Erscheinungsbild und die Mortalität bei KHV-infizierten Tieren erheblich beeinflussen können.

Die Inkubationszeit ist temperaturabhängig und wird von mehreren Autoren verschieden angegeben.

Innerhalb weniger Stunden nach Auftreten der ersten Symptome können die Tiere sterben, bei niederen Temperaturen ist der Krankheitsverlauf jedoch von abgeschwächter Symptomatik (Way, 2004a).

Walster (1999) gibt ein Temperaturfenster von 15-28°C und einen Zeitrahmen von wenigen Tagen bis zu drei Wochen an, bevor es zum Auftreten von Krankheitsanzeichen kommt. Hoffmann (2001) gab ebenfalls eine Inkubationszeit von einigen Tagen an, bevor die Erkrankung bei Tieren eines Bestandes in Erscheinung getreten war.

In der Regel treten bei einem akuten Krankheitsverlauf 7-10 Tage nach der Infektion die ersten Symptome und Todesfälle auf (Bergmann, 2007).

Bei voll empfänglichen Spezies ist die Überlebensrate gering (Hoffmann, 2005). Als Todesursache wird von Gilad et al. (2004) die Kiemenschädigung durch Nekrosen, eine

mögliche Nierenfunktionsstörung oder Irritationen des Nervensystems durch Virusanreicherung angesehen. Dafür sprechen auch intranukleare Einschlusskörperchen in den Neuronen des Gehirns (Hedrick et al., 2000). Zudem konnten im Experiment naive Fische mit Virus, welches aus dem Gehirn gewonnenen wurde, erfolgreich infiziert werden (Hedrick et al., 2000).

In Laborversuchen sind von der völlig symptomlosen Infektion des kompletten Fischbestandes bis hin zum Totalverlust unterschiedlichste Verläufe beobachtet worden. In dieser Hinsicht unterscheidet sich das Virus kaum von anderen fischpathogenen Viren (Bergmann, 2007).

Die Besonderheit liegt in der Eigenschaft von Herpesviren, latente Stadien auszubilden (Fraser et al. 1981; Rock und Fraser 1983; Van Nieuwstadt et al. 2001).

Meyer (2007) konnte nach Kohabitation von naiven Karpfen mit an KHV erkrankten Koi oder latent infizierten Virusträgern im Laborexperiment größtenteils nur symptomlos verlaufende Infektionen induzieren. Dies zeigt, dass es nach Exposition mit dem Virus nicht regelmäßig bzw. zwangsläufig zu einer klinisch in Erscheinung tretenden Erkrankung kommen muss.

## **5 Pathologisch-anatomische Veränderungen**

Histopathologische Veränderungen sind bei einer KHV-Erkrankung nicht immer bzw. diskret vorhanden. Die deutlichsten pathologischen Veränderungen werden an den Kiemen sichtbar. So kommt es meistens zu Hyperplasien und Hypertrophien des Kiemenepithels und Verschmelzungen von Kiemenlamellen. Schwerwiegendere Kiemenschäden reichen von einzelnen Nekroseherden bis hin zum Verlust ganzer Kiemenareale, so dass oft nur noch das knorpelige Grundgerüst sichtbar ist (ter Höfte et al., 2004).

Während die Schädigung des Kiemengewebes mit Entzündungsreaktionen einhergeht, sind die inneren Organe meist unauffällig und entzündliche Reaktionen wenig ausgebildet (Hoffmann, 2005). Vereinzelt treten petechiale Blutungen in Leber und Niere auf, stellenweise ist ein Aszites ausgebildet (Walster, 1999). Außerdem können die inneren Organe miteinander „verbacken“ sein und eine untypische Färbung aufweisen. Leber und Niere sind manchmal sichtbar vergrößert (OIE, 2007).

Ronen et al. (2004) konnten vor allem in der Niere experimentell infizierter Fische hohe Virusgehalte ab dem 2. Tag p.i. mit Immunfluoreszenz nachweisen.

Pikarsky et al. (2004) diagnostizierten am 2. Tag p.i. eine interstitielle Nephritis, Degenerationserscheinungen am Epithel der Tubuli traten nach 8 Tagen p.i. auf.

Schwere Kiemenschäden mit einer großflächigen Zerstörung des Kiemengewebes waren am 6. Tag p.i. zu verzeichnen.

Histologisch fallen in den deutlich vergrößerten Epithelien intranukleäre azidophile Einschlusskörper auf. In Leber, Niere, Darm und Milz lassen sich kleine Nekrose- oder Degenerationsherde nachweisen, die sehr häufig intranukleäre Einschlüsse aufweisen.

Elektronenmikroskopisch finden sich in diesen Einschlüssen zahlreiche Herpesvirus-ähnliche Partikel (Bretzinger et al., 1999; Ariav et al., 1999; Hoffmann et al., 2000; Hedrick et al., 2000; Perelberg et al., 2003).

## **6 Viruserkrankungen aufgrund verwandter Erreger**

Verschiedene genetische Studien demonstrieren die Verwandtschaft von KHV zu zwei anderen cyprinen Herpesviren - CyHV-1 und 2 (Waltzek et al., 2005; Hedrick et al., 2005). Gensequenzierungen belegen, dass diese Vertreter einige gleiche Gene besitzen. Proteine und Glykoproteine, die aufgrund der Verwandtschaft von CyHV-1 und KHV ähnlich sind und immunogen bei Koi und Karpfen wirken, scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen und werden für das Vorliegen von Kreuzreaktivitäten bei Serumantikörpern verantwortlich gemacht, was sich in der Antikörperaktivität und Immunreaktion widerspiegelt und in verschiedenen serologischen Untersuchungen bestätigt werden konnte (Hedrick et al., 2004; Adkison et al., 2005). Diese Proteine scheinen als Komponenten der Virushülle oder des Kapsids eine Schlüsselrolle in der anti-viralen Immunität zu spielen (Adkison et al., 2005).

Vor dem Auftreten von KHV war vor allem die seit dem Mittelalter bekannten „Karpfenpocken“, verursacht durch das Cyprine Herpesvirus 1 (CyHV-1) (*Abb. 3*), von Bedeutung. CyHV-1 und KHV haben einige physikalische und biologische Gemeinsamkeiten, sie lassen sich unter anderem in der Zellkultur anhand ihres CPE und auch über ihre antigenen Eigenschaften unterscheiden (Hedrick et al., 2000).

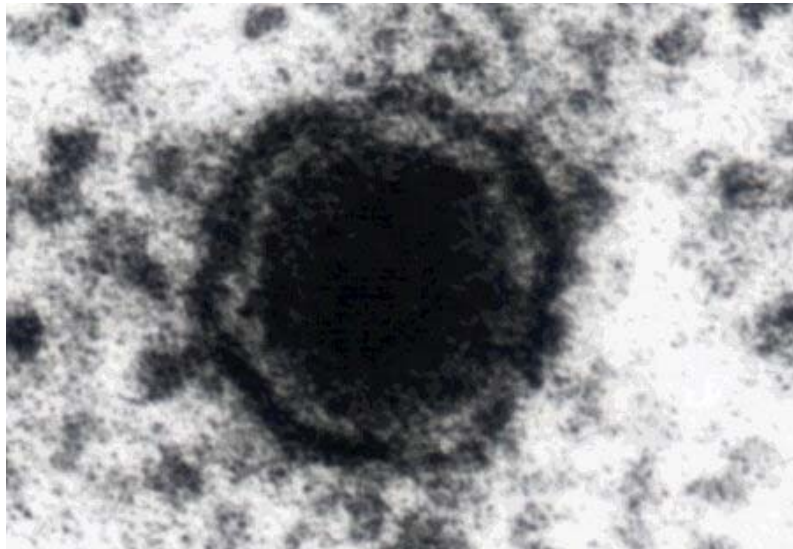


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines CyHV-1-Virions (N. Beevers, Cefas, UK)

Das durch CyHV-1 verursachte Karpfenepitheliom ist eine chronisch hyperplastische Hauterkrankung, die durch weiße, wachsartige Hautveränderungen (*H, Abb. A 6*) bei *Cyprinus carpio* sichtbar wird und in Europa, Japan und Nordamerika verbreitet ist (Hoffmann, 2005).

Schubert (1964, 1966) beschrieb die tumorösen Gewebeveränderungen und die im ELMI identifizierten Viruspartikel. Erst im Jahre 1985 folgte der kulturelle Nachweis aus verändertem Gewebe durch Sano et al. (1985a).

Das saisonale Auftreten der Karpfenpocken ist vermutlich auf eine Reaktivierung des Virus aus dem latenten Stadium nach einer Immunsuppression aufgrund von verschiedenen Stressfaktoren, wie z.B. absinkende Temperaturen zurückzuführen (Sano et al., 1993).

Die Übertragung erfolgt horizontal, möglicherweise auch vertikal. Meist werden keine Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden der Fische beobachtet, bei Eiern und Brütlingen können aber durchaus hohe Verluste eintreten. Bei älteren Tieren sind bei starkem Befall verlangsamtes Wachstum und bei experimentellen Infektionen sogar Todesfälle beschrieben (Hoffmann, 2005).

Überlebende Fische entwickeln in der Regel die typischen Papillom-ähnlichen Strukturen innerhalb von 5-6 Monaten nach dem Erregerkontakt (Sano, 1991).

Während es früher zu epidemieartigen Verlaufsformen mit hohen wirtschaftlichen Verlusten kam, handelt es sich heute um ein meist nur sporadisch auftretendes Problem. Dieser Wandel im Seuchenverlauf kann in der Herauszüchtung resistenter Karpfenlinien, dem Verschwinden vieler lokaler Rassen, die eine möglicherweise höhere Empfänglichkeit besaßen, oder einem Pathogenitätsverlust des Virus begründet sein (Hoffmann, 2005).

Die Bekämpfung erfolgt durch Anheben der Wassertemperatur auf das jeweilige Fischoptimum und der Gabe von Immunpräparaten, beschränkt sich aber in der Karpfenhaltung vorrangig auf die Vermeidung der Einschleppung von erkrankten Karpfen sowie die sorgfältige Eliminierung betroffener Tiere (Hoffmann, 2005).

In Koihaltungen müssen erwachsene Tiere nicht zwingend behandelt werden, da sich die Tiere mit Verbesserung ihres Immunstatus von selbst wieder erholen. Chirurgische Maßnahmen können als kosmetische Behandlung verstanden werden. Aber auch hier ist aufgrund der Viruspersistenz mit latenten Infektionen zu rechnen (Lechleiter, 2003).

## 7 Differentialdiagnostik

Zur Abgrenzung der KHV-Infektion von Erkrankungen mit ähnlicher oder übereinstimmender Symptomatik werden in der Regel differentialdiagnostische Untersuchungen (z.B. PCR, Histologie, ELMI) zur Diagnosefindung durchgeführt, damit entsprechende Direktiven bzw. Behandlungsmaßnahmen getroffen werden können (Tab. 1).

	Virale Erkrankungen		
<b>Englische Bezeichnung</b>	<b>Koi Herpesvirus Disease</b>	<b>Spring Viremia of Carp Disease</b>	<b>Carp Pox Disease</b>
<b>Deutsche Bezeichnung</b>	<b>Koi-Herpesvirus Infektion</b>	<b>Frühjahrsvirämie der Karpfen</b>	<b>Karpfepocken</b>
<b>Synonyme</b>	Koi Seuche, Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus (CNGV), Cyprinides Herpesvirus 3 (CyHV-3)	Infektiöse Bauchwassersucht der Karpfen	Cyprinides Herpesvirus 1 (CyHV-1), Koi Pocken, Karpfen Herpesvirus, Herpesvirale, epidermale Proliferation der Karpfen (HEPC), Herpesvirale Septikämie der Karpfen (HSC)
<b>Abkürzung</b>	KHV (früher: CNGV), CyHV-3	SVC, SVCV	CHV, CyHV-1, CHV-1
<b>virales Agens</b>	Herpesvirus (DNA-Virus)	Rhabdovirus (Rhabdovirus carpio, RNA-Virus)	Herpesvirus (Herpesvirus cyprini, DNA-Virus)
<b>Spezies</b>	Cyprinus carpio (und andere Karpfenartige ?)	Cyprinus carpio, Goldfisch	Cyprinus carpio
<b>Übertragung</b>	direkter Kontakt, Faeces, infiziertes Wasser und Schlamm, horizontale und vertikale Übertragung	Faeces, infiziertes Wasser und Schlamm, vertikale Übertragung	direkter Kontakt
<b>Alter</b>	jüngere Fische sind anfälliger	jüngere Fische sind anfälliger	jüngere Fische sind anfälliger

Tab. 1 – Teil 1: Vergleich von viralen Erkrankungen bei Vertretern der Gattung *Cyprinus carpio* (Hartmann et al., 2004)

	<b>Virale Erkrankungen</b>		
<b>Englische Bezeichnung</b>	<b>Koi Herpesvirus Disease</b>	<b>Spring Viremia of Carp Disease</b>	<b>Carp Pox Disease</b>
<b>Deutsche Bezeichnung</b>	<b>Koi-Herpesvirus Infektion</b>	<b>Frühjahrsvirämie der Karpfen</b>	<b>Karpfenpocken</b>
<b>Klinische Anzeichen</b>			
Verhalten	Lethargie, Schwimmen nahe der Oberfläche, vermehrte Atmung, unkoordinierte Bewegungen	Lethargie, Liegen auf dem Gewässergrund, unkoordinierte Bewegungen	keine
extern	variable Anzeichen, wie Kiemennekrose, Endophthalmus, bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen	Septikämie, Exophthalmus, Blutungen in der Haut, Haemorrhagien, abdominale Umfangsvermehrung	glatte, erhabene und watteartige Hautläsionen
intern	wenige, variable Anzeichen	Ascites, ödematöse Organe, blutige Entzündungen des Verdauungstraktes	
<b>Bestätigungstest</b>	CPE in der ZK (KF-1) und PCR	CPE in der ZK (FHM, KF-1) und PCR	CPE in der ZK (FHM)
<b>Behandlung</b>	keine	keine	keine
<b>Vorbeugung</b>	Vernichtung infizierter Populationen (Carrier!), keine Vergesellschaftung empfänglicher Arten, Schutzmaßnahmen, Quarantäne, gesicherte Herkünfte etc.	Vernichtung infizierter Populationen, keine Vergesellschaftung empfänglicher Arten, Schutzmaßnahmen, Temperaturerhöhung (>20°C)	Ältere Fische sind wenig gefährdet, aber können lebenslange Überträger bleiben--> Achtung Carrier!
<b>Desinfektion</b>	Chlorid in best. Konz., Ammoniumverbindungen	Chlorid in best. Konz., Hitze, Gamma- u. UV-Strahlung, pH <4 oder >10	Chlorid in best. Konz., Ammoniumverbindungen, Temp.erhöhung >20°C reduziert Hautschädigungen
<b>Gesetzgebung</b>	Anzeigepflichtige Infektionskrankheit	Meldepflichtige Infektionskrankheit	

*Tabelle 1- Teil 2:* Vergleich von viralen Erkrankungen bei Vertretern der Gattung *Cyprinus* (Hartmann et al., 2004)

## 8 Kreuzreaktivität

Aufgrund seiner Verwandtschaft muss CyHV-1 als Kreuzreagent angesehen werden. Jedoch gibt es keine publizierten Daten zu Untersuchungen bezüglich der Immunität von Fischen gegen CyHV-1 (Fijan, 1999).

Ron Hedrick von der University of California, Davis, konnte bei experimentell mit CyHV-1 infizierten Fischen Antikörper nachweisen, die in dem von ihm entwickelten KHV-ELISA zu Kreuzreaktivitäten führten. Dem Auftreten von Kreuzreaktionen konnte durch Wahl einer geeigneten Serumverdünnung bei der ELISA-Durchführung Rechnung getragen werden. Verdünnungen ab 1:1600 sollen eine mögliche Kreuzreaktivität mit dem cyprinen Herpesvirus CyHV-1 ausschließen und unspezifische Reaktionen eliminieren (Adkison et al., 2005).

## 9 Fischimmunologie

### 9.1 Immunsystem bei Fischen

Die evolutionäre Geschichte eines jeden aquatischen Organismus bestimmt die individuellen Immunfaktoren und das Ausmaß und den Erfolg der jeweiligen Immunantwort (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004). Für das Überleben in einer aquatischen Umwelt wird ein Immunsystem benötigt, das sich konstant gegen Pathogene aus dem Milieu zur Wehr setzen kann. Aquatische Organismen entfalten unverzüglich eine allgemeine Antwort, um der Einwirkung entgegenzutreten und initiieren eine verzögerte spezifische Antwort, wobei die Entwicklung der erworbenen Immunität Zeit benötigt (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

Grundsätzlich unterscheiden sich die komplexen immunologischen Vorgänge bei Fischen nicht wesentlich von denen höherer Vertebraten (Ellis, 1982).

Die erste Abwehr des Immunsystems beinhaltet Substanzen im Schleim, die von Epithelzellen sezerniert werden, Makrophagen, die Pathogene direkt attackieren sowie diverse lytische und agglutinierende Faktoren (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).



Die bedeutendsten immunokompetenten Organe bei Fischen, die durch Immunostimulanzen beeinflusst werden, sind die Niere mit dem hämatopoetischen Gewebe sowie Thymus, Leber, Milz (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

### **9.1.1 Angeborenes System**

Fische stehen in einem sehr engen Kontakt zu ihrer Umwelt, welche große Mengen an Infektionserregern aufweisen kann. Unter normalen Bedingungen ist der Fisch jedoch in der Lage, seinen Gesundheitszustand aufrechtzuerhalten, indem er sich mittels komplexer angeborener Abwehrmechanismen gegenüber potentiellen Eindringlingen verteidigt (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

Bei der angeborenen bzw. unspezifischen Abwehr unterscheidet man in physikalisch-chemische (Magensäure, Mucus, Körpertemperatur etc.), zelluläre und humorale Mechanismen.

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Leukozyten-Zelltypen, wie Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und unspezifische zytotoxische Zellen (ähnlich Killerzellen bei Säugetieren) spielen bei unspezifischen, zellulären Abwehrmechanismen in Fischen die entscheidende Rolle (Secombes, 1996).

Nach Vallejo et al. (1992) stellen Makrophagen die Primärzellen von Antigen präsentierenden Zellen in Knochenfischen und eine Verbindung zwischen unspezifischem und erworbenem Immunsystem dar.

Makrophagen und Granulozyten sind bewegliche phagozytotische Zellen im Blut und in fast allen Geweben und spielen eine große Rolle bei Entzündungsprozessen als Antwort auf das Eindringen von Mikroorganismen und Verletzungen des Gewebes, indem immunpharmakologische Stoffe freigesetzt werden und es zu einer lokalen Ansammlung von Leukozyten und Gewebsflüssigkeit kommt. Die Bewegung von Immunzellen durch Chemokinese und Chemotaxis stellt den ersten Schritt der Phagozytose als den einfachsten Abwehrmechanismus dar. Nach Anlagerung und Umschließen des fremden Agens erfolgt das Abtöten und der Verdau mittels pH-Wert-Absenkung und Enzymen (Secombes, 1996).

Durch das Fehlen von Spezifität bei diesen Mechanismen können eine Vielzahl von Zellen schnell mobilisiert werden. Da jedoch bei der unspezifischen Immunantwort die „Memory-

Komponente“ fehlt, führt die erneute Konfrontation mit denselben Pathogenen nicht zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems interagieren mit denen des spezifischen Systems, in dem sie sich gegenseitig und durch ihre Produkte stimulieren (Secombes, 1996).

### **9.1.2 Erworbenes System**

Die individuell erworbene, spezifische Immunabwehr, die sich aus humoralen und zellulären Mechanismen zusammensetzt, spielt eine große Rolle beim Schutz gegen wiederkehrende Infektionen durch die Anwesenheit von Gedächtniszellen (zellvermittelte Immunität), lösliche und membrangebundene Rezeptoren (humorale Abwehr), wie T-Zell-Rezeptoren und Antikörper (Immunoglobuline), welche die Erkennung von fremden Antigenen und die schnelle und effiziente Eliminierung von spezifischen Pathogenen erlauben (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

Bis eine effiziente erworbene Immunantwort entwickelt wird, ist das angeborene Immunsystem meist in der Lage, mikrobielle Angriffe zu kontrollieren oder abzuwehren (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

Beim spezifischen, erworbenen System kann zwischen zellulären und humoralen Mechanismen unterschieden werden.

Zu den zellulären Komponenten gehören sowohl Lymphozyten, die zu Plasmazellen transformiert die freien Antikörper der humoralen Abwehr produzieren, als auch solche, die Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen (Ellis, 1977).

Die humorale Immunantwort kann in zwei Typen eingeteilt werden: die Primär- und Sekundärantwort, welche von dem Immunstatus des Wirtes und dem Vorhandensein geeigneter Immunzellen abhängig ist. Die Primärantwort wird durch eine erste Exposition gegenüber einem Immunogen induziert und resultiert in einem starken Anstieg von Immunglobulinen eines bestimmten Typs, bis ihr Gehalt nach einer gewissen Zeit wieder absinkt. Bei Spezies, die mehrere Typen von Immunglobulinen aufweisen, würden bei einer erneuten Exposition weitere Antikörper gebildet werden, welche die Sekundärreaktion anzeigen. Das Immunsystem stellt die Gedächtniszellen bereit, die Informationen über einen

erstmaligen Kontakt mit einem Immunogen speichern (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004).

Maßgeblich scheint die primäre wie sekundäre Immunantwort von der Art des Antigens, der Erregerdosis und der Art und Weise der Infektion abzuhängen (Ellis, 1982).

Corbel (1975), Ellis (1982) und Richter (1985) beschrieben einen endogenen Rhythmus der Antikörperproduktion, hervorgerufen von saisonalen und endokrinen Einflüssen.

Wenn Phagozyten den Infektionserreger nicht erkennen, weil entsprechende Rezeptoren fehlen oder die Aktivierung von Komplement ausbleibt, werden Antikörper als „Verbindungsstück“ zwischen Mikroorganismus und Phagozyten bereitgestellt.

Die Antikörper oder Immunglobuline sind eine Gruppe von Glykoproteinen im Serum und Körperflüssigkeiten, die in großer Menge von Plasmazellen produziert werden und den Kontakt zwischen infektiösem Agens und Phagozyten vermitteln. Antikörper gehören zu den komplexesten Strukturmolekülen (Roitt et al., 1987).

Grundsätzlich hat jedes Immunglobulinmolekül zwei Aufgaben; ein Teil des Moleküls bindet das Antigen (fremde Proteine oder Zellen), während ein anderer Teil die Bindung des Immunglobulins an das Wirtsgewebe vermittelt, d.h. an verschiedene Zellen des Immunsystems, wie phagozytierende Zellen (Makrophagen), und spezifische Reaktionen aktiviert, die im Zusammenspiel mit Komplement zu einer Virolyse führen (Roitt et al., 1987).

Während man bei Säugern 5 Immunglobulinklassen unterscheidet, wurde bei den meisten Fischen nur ein IgM-ähnlicher Antikörper nachgewiesen, der teils als Monomer, teils als Tetra- bzw. Pentamer (Marchalonis, 1971; Corbel, 1975) oder Hexamer (Ellis und Schlotfeldt, 1985) vorliegt (*Abb. 4*). Der Aufbau ähnelt dem der Säuger-Immunglobuline (Ellis, 1982; Ellis und Schlotfeldt, 1985; Kaattari und Piganelli, 1996). Die Lungenfische (Dipnoi) sind die einzige Gruppe, bei der zusätzlich eine weitere Immunglobulinklasse- ein Antikörper IgW- nachgewiesen wurde (Cisar und Fryer, 1974; Ellis, 1982). Außerdem besitzen Goldfische (*Carassius auratus*) laut Trump und Hildemann (1970) ein IgG-ähnliches Antikörpermolekül.

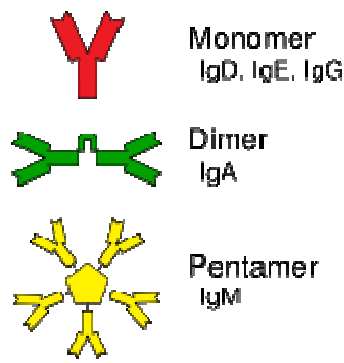


Abbildung 4: Strukturelle Vielfalt der Immunglobuline (Brändli, 2006)

Antikörper verschiedener Knochenfische weisen strukturelle Unterschiede, z.B. bei der Vernetzung der einzelnen Untereinheiten (Ghaffari und Lobb, 1989; Sanchez und Dominguez, 1991) und unterschiedliche Bindungsstellen (Blackwell und Alt, 1988) auf.

Babes und Riegler (1903) und Noguchi (1903) berichteten als erste über die Existenz von Antikörpern bei Fischen, die sich laut Ellis (1982) in den meisten Gewebsflüssigkeiten nachweisen lassen. Im Gegensatz zu den Säugetieren ist die Gefäßwand der Fische für Immunglobuline durchlässig (Macki und Wardle, 1971; Ellis, 1982). Immunglobuline konnten bei verschiedenen Fischarten außer im Serum auch im Schleim auf der Körperoberfläche und im Verdauungstrakt nachgewiesen werden (Hildemann, 1962; Fletcher und Grant, 1969; Harrell, 1973).

Der spezifische Abwehrmechanismus gegenüber Infektionskrankheiten mittels Antikörpern ist bei Fischen der am besten untersuchte Mechanismus (Kaattari und Piganelli, 1996).

Jedoch gibt es große Unterschiede in der Immunfunktion zwischen den einzelnen Klassen der Knochen- und Knorpelfische. Bei der humoralen Immunantwort finden sich in Ansätzen Gemeinsamkeiten mit dem Mechanismus bei Säugetieren. Diese Gemeinsamkeiten beinhalten die Struktur der Immunglobuline und deren Aktivitäten, wie Neutralisation, Komplementbindung und die Präsentation der Antigene den Killerzellen durch das Andocken von Antikörpern [Opsonierung] (Kaattari und Piganelli, 1996).

Antikörper werden nach experimenteller und natürlicher Infektion von Fischen gebildet. Adkison et al. (2005) konnten mit einem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Antikörper bei Koi nach einem KHV-Ausbruch nachweisen. Diese Antikörpertiter waren noch 7 Wochen nach der akuten Infektion bei den überlebenden Tieren messbar.

Durch eine passive Immunisierung über Verabreichung von Antikörpern gegen KHV konnte jedoch nur einen teilweiser Schutz gegenüber einer Belastungsinfektion im Experiment erreicht werden. So vermuten die Autoren, dass Tiere, bei welchen ein Antikörperspiegel über eine Dauer von bis zu einem Jahr nachweisbar ist, Carrierfische sein könnten, wobei deren Resistenz wohl vor allem über eine zellvermittelte Immunität erreicht wird.

## **9.2 Einflüsse auf die Immunantwort bei Fischen**

Fische zeigen eine klassische Stressantwort auf Umweltproblematiken (Wassertemperatur, Sauerstoffwerte, Toxine, soziale Interaktionen etc.). Die Empfänglichkeit gegenüber Infektionskrankheiten ist erhöht, wenn die Fische gestresst sind (G.-Villegas und Hosokawa, 2004).

Die Temperatur beeinflusst im Fisch als aquatischer Organismus und poikilothermes Tier sowohl humorale als auch zelluläre Immunmechanismen (Galindo-Villegas und Hosokawa, 2004). Von den Faktoren, die die Immunantwort, insbesondere die Antikörperbildung bei Fischen beeinflussen, ist die Temperatur bisher am besten untersucht.

Ellis (1982) stellte fest, dass höhere Temperaturen die Latenzzeit zwischen Antigenkontakt und Reaktion verkürzen und auch zu einer höheren Antikörperproduktion führen. Grundsätzlich gilt, je höher die Temperatur im physiologisch tolerierten Bereich ist, desto rascher und stärker erfolgt die Immunantwort. Mit niedrigerer Temperatur ist eine verlangsamte Immunantwort verbunden, die von Ellis (1982) mit erniedrigter Stoffwechselaktivität im Fisch und verminderter Plasmazellaktivität erklärt wird. Die Temperatur hat zu Beginn der Antikörper-Produktion, also wenige Tage nach der Stimulation durch ein Antigen, den bedeutendsten Einfluss auf die Immunantwort (Avtalion et al., 1976).

## **10 Krankheitsdiagnostik**

### **10.1 Diagnose von KHV**

#### **10.1.1 Direkter Nachweis von KHV**

##### **10.1.1.1 KHV in der Zellkultur**

Die Entwicklung spezieller Zelllinien machte die Virusanzüchtung in der Zellkultur möglich. Neukirch et al. (1999) gelang es, über die Anzüchtung einer Kiemenbioptatverreibung von einem erkrankten Koi in der CCG-, CCB- und EPC-Zellkultur unter Bildung von Synzytien Virus zu isolieren.

Hedrick (2000) gelang die Erstisolierung von dem als Herpesvirus charakterisierten Virusstamm aus Probenmaterial des initialen KHV-Ausbruchs in Israel in der KF-1-Zellkultur (Koi fin cell). Neukirch und Kunz (2001) konnten ebenfalls das Herpesvirus aus Gewebe erkrankter Koi über die CCB (Common carp brain cell)- und KF-1-Zellkultur isolieren.

Laut Body et al. (2000) und Oh et al. (2001) sind noch weitere Fischzellkulturen, wie EPC- oder FHM-Zellkulturen für die Isolierung von KHV verwendbar; die sehr robuste RTG-2-Zellkultur, die in der Krankheitsdiagnostik bei Salmoniden angewendet wird, erwies sich als unempfindlich.

Engelsma und Haenen (2004) ist es gelungen, in wenigen Fällen KHV erfolgreich in der robusten EPC Zellkultur anzuzüchten. Die Verreibung von Kiemen und gepoolten inneren Organen erbrachte in der 2. Passage der Kultivierung den charakteristischen CPE.

KF-1 und CCB-Zellen erwiesen sich laut Way (2004) als besonders empfindlich gegenüber KHV. Jedoch bereitet das langsame Wachstum der KF-1- Zellen und die Aufrechterhaltung der Vitalität manchmal Schwierigkeiten, so dass sich die Isolierung über die ZK nur bedingt eignet, um als Nachweismethode in der Routinediagnostik zu dienen.

Bei der Virusvermehrung über die Zellkultur sind laut Lindl (2002) und Gilad et al.(2002) Degenerationserscheinungen und ein Unempfindlichwerden der Zellen gegenüber dem Virus sowie die Wandlungsfähigkeit des Erregers problematisch. Einige Labore haben zudem von einem „pseudo-zytopathogenen Effekt“ in negativen Zellkulturen berichtet (Haenen et al., 2004).

Durch die Aufnahme und Vermehrung der Viren in empfänglichen Zellkulturen kommt es meist zu morphologischen Zellveränderungen, die als „zytopathogener Effekt“ (CPE)

bezeichnet werden (Mayr et al., 1974; Lindl, 2002) und als Hinweis für eine erfolgreiche Infektion mit einem Virus dienen. Je nach Form des CPE, die Zeitdauer bis zur Ausprägung und die Zelllinie, auf der die Isolierung gelingt, kann ein Schluß auf den möglichen Erreger gezogen werden.

Als Reaktion auf die Inokulation der Zellkultur mit dem Koi-Herpesvirus zeigt sich in der Regel nach 5-14 Tagen bei 20-25°C, je nach Pathogenität des Virus und der Virusmenge, ein zytopathogener Effekt (CPE) mit Synzytienbildung und Vakuolisierung im Monolayer bis zur vollständigen Ablösung der Zellen vom Untergrund durch Zelllysis und Plaquebildung (Neukirch et al., 1999; Hedrick et al., 2000; Haenen et al., 2004; Adkison et al., 2005). Befinden sich die KF-1-Zellen und das Virus in guter Verfassung, erscheint der CPE in der Regel nach 10-12 Tagen; in der CCB-Zellkultur tritt er deutlich früher (5-8 d) mit Bildung von Synzytien bzw. Riesenzellen in Erscheinung (Haenen et al., 2004).

Hedrick et al. (2004) beschrieben die Anzeichen eines CPE nach der Anzüchtung einer Organverreibung kranker Fische mit Zellfusion und ausgeprägter Vakuolisierung innerhalb von 5 d nach Infektion bei 20°C, nach 14 d waren sämtliche Zellen betroffen und die Kultur zerstört. Hutoran et al. (2005) beschrieben eine erfolgreiche Ausbildung eines CPE nach 4-6 Tagen nach Infektion der Koi- und Karpfenflossenzellen (KFC, CFC) und Isolierung des Virus, welches nach intraperitonealer Injektion bei naiven Karpfen eine Erkrankung ausgelöst hatte.

Während es Gilad et al. (2003) nicht gelungen war, bei Temperaturen über 30°C und unter 4°C das Virus zu vermehren und einen CPE zu erhalten, konnten Dishon et al. (2007) das Virus in der Zellkultur für 30 Tage bei 30°C in einem infektiösen Zustand kultivieren. Die infizierten, morphologisch degenerierten CCB-Zellen regenerierten und erlangten ihre typische Form zurück. Beim Zurückführen in einen niedrigeren Temperaturbereich fand eine Virusreplikation statt und in der Zellkultur bildete sich erneut ein CPE mit Vakuolisierung und Plaquebildung aus.

Gilad et al. (2003) sehen eine Inkubationstemperatur von 20°C als optimal für den Erhalt hoher Viruskonzentrationen an. Bei 4°C und 10°C konnten die Autoren nur einen geringen Virustiter im Versuch ermitteln, bei Temperaturen über 30°C fand keine Virusvermehrung statt.

Die Isolierung von KHV mittels Zellkultur stellt jedoch nach wie vor ein großes Problem dar, weil die Konzentration von Virus in Fischen, die lange tot sind, eingefroren oder in Alkohol

konserviert waren, oft zu gering ist, um eine Zellkultur erfolgreich zu infizieren oder der Virusstamm nicht virulent genug ist bzw. sich das Virus in vitro nicht vermehrt (Gilad et al., 2002 und 2004; Bergmann, 2007). Außerdem müssen die verwendeten Zellen empfänglich genug sein und sollten sich nicht im Verlauf ihrer Passagierung so adaptiert haben, dass sie unempfindlich geworden sind (Gilad et al., 2004).

Die Sensitivität der Virusisolation ist geringer als die der PCR, weshalb ein negatives Ergebnis in der Zellkultur nicht allein ausschlaggebend sein darf (Haenen et al., 2004). Die Autoren sehen den zellkulturellen Nachweis daher als Testmethode in der Routinediagnostik als wenig geeignet an. Deshalb erscheint es Ihnen zwingend nötig, zur Verbesserung der KHV-Diagnostik mindestens zwei derzeit etablierte Nachweismethoden parallel einzusetzen. Im Anschluss an die Kultivierung in der Zellkultur kann einer der drei Standard- PCR-Ansätze von Gilad et al., (2002) und Gray et al., (2002) bzw. von Bercovier et al. (2005) zur Bestimmung von Virusgenom durchgeführt werden.

#### **10.1.1.2 Molekularbiologische Methodik**

Die zuverlässigste Methode KHV-DNA in Geweben von Fischen nachzuweisen, ist die PCR (Gilad et al., 2001, 2002, 2004; Gray et al., 2002; Gunimaladevi et al., 2004; Pikarsky et al., 2004; Hutoran et al., 2005; Ishioka et al., 2005; Yuasa et al., 2005; Bercovier et al., 2005). Sie ist als einziges aussagekräftiges Diagnostikinstrument zur Beweisführung einer KHV-Infektion empfohlen (OIE, 2007).

Die Mehrzahl von Diagnostiklabors nutzt die schnelle und sensitive PCR-Technik zur Amplifikation und Detektion spezifischer KHV-DNA Sequenzen.

Die bekanntesten sind die Protokolle von Gilad et al. (2002) und Gray et al. (2002) aus den USA und eine neu entwickelte Methodik von Bercovier et al. (2005). Die hier verwendeten Primer sind aus DNA-Restriktionsfragmentsequenzen nicht-kodierender Bereiche des Genoms konzipiert. Andere PCR-Protokolle benutzen Primer, die auf Nukleotidsequenzen proteinkodierender DNA-Bereiche basieren (Haenen et al., 2004).

Zusätzlich gibt es PCR-Protokolle vom Typ einer Nested-PCR, die empfindlicher und sensitiver Erregergenom identifizieren.

Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher PCR-Protokolle resultiert die Notwendigkeit für eine Validierung und Standardisierung des verlässlichsten und sensitivsten Assays.



PCR-Untersuchungen in den verschiedenen Untersuchungseinrichtungen ergeben häufig unterschiedliche Ergebnisse. Es erscheint jedoch schwierig, die vielen möglichen Reaktionsbedingungen in einem einzigen PCR-Protokoll zu standardisieren bzw. zu vereinheitlichen (Haenen und Hedrick, 2006).

Mit den gängigen PCR-Verfahren gelingt der Nachweis der Infektion, bzw. das Vorhandensein von Virusgenom in den meisten Fällen nur in akuter Phase, d.h. in den ersten 4 Wochen nach einer Infektion (Gilad et al., 2002; Bergmann, 2004), wenn eine große Virusmenge vorliegt, so dass eine Weiterentwicklung hin zu sensitiveren Verfahren nötig ist, um Latenzzustände aufzudecken (Bergmann, 2007).

Während der latenten Phase einer Herpesvirusinfektion kann es jedoch unmöglich sein, ein Virus aus Gewebe zu isolieren und nachzuweisen (Wise et al., 1985; Boyle und Blackwell, 1991; Sano et al., 1993). PCR-Verfahren der Routine- KHV-Diagnostik sind derzeit nicht in der Lage, die verdächtigen latenten Virusträger in jedem Fall erfolgreich aufzudecken, was jedoch für die Überwachung der Verbreitung der Infektion bedeutsam ist.

Bisher wurden in verschiedenen Laboren weltweit eine Vielzahl sehr sensibler Nachweismethoden entwickelt, der Nachweis einer latenten Infektion nach einer überstandenen akuten Phase gelingt jedoch nicht immer. Das mag zum einen an der geringen Erregermenge während einer Latenzphase liegen, zum anderen darf eine räumliche Strukturänderung der DNA, wie es beim Channel Catfish Herpesvirus (CCV) nachgewiesen ist, nicht ausgeschlossen werden (Bergmann, 2007).

In der Routinediagnostik werden als Ausgangsmaterial für einen KHV-Nachweis Kiemen, Niere, Milz, Gehirn und Leber im Einzelansatz oder als Organpool verwendet, da hier im Anschluss an Infektionsversuche von Bretzinger et al. (1999) und Hedrick et al. (2002) Viruspartikel nachgewiesen werden konnten und diese Organe die stärksten histopathologischen Veränderungen aufwiesen

Misserfolge in der Detektion von Virus-DNA in Organen, wie Milz, Niere, Kiemen potentieller Carrierfische können ein Indiz dafür sein, dass Monate nach einem Erregerkontakt diese Organe keine Rückzugsorte für das Virus darstellen. Möglicherweise ist hier die Erregermenge zu gering und liegt unter der Nachweisgrenze (Gilad et al., 2002). Virusisolation bzw. die PCR-Analyse nach üblicher Methodik von Gilad et al. (2002) und Gray et al. (2002) sind nur bedingt für die routinemäßige Diagnoseerstellung einer KHV-

Infektion bei Carriern geeignet, was jedoch ein bedeutender Faktor für die Eindämmung der Ausbreitung von KHV ist (Gilad et al., 2004).

Die von Bercovier et al. (2005) beschriebene PCR, die ein auf dem Thymidinkinase-Gen basierendes Primerpaar benutzt, erwies sich als 10-1000 mal sensitiver als herkömmliche Methoden beim Nachweis einer mehrere Monate zurückliegenden Infektion (Meyer, 2007).

Der Nachweis des Virusgenoms ist auch mit den derzeit sensitiven PCR-Methoden schwieriger, je weiter der Kontakt mit dem Erreger zurückliegt.

Die von Gilad et al. (2002) und Bercovier et al. (2005) entwickelten PCR-Nachweise sind in der Lage, virale DNA auch erfolgreich in gefrorenem und Formalin-fixiertem Gewebe zu detektieren.

Herkömmliche PCR-Protokolle sind nicht geeignet, quantitative Schätzungen der Viruskonzentration in Geweben, Wasser, Sediment und anderen Materialien abzugeben. Die TaqMan PCR von Gilad et al. (2004) stellt eine Untersuchungsmethode für eine quantitative Bestimmung der Virus-DNA in verschiedenen Geweben experimentell infizierter Koi dar. Nach 62-64 Tagen nach einem Kontakt mit KHV konnte in verschiedenen Geweben von klinisch gesunden Fischen in geringeren Konzentrationen als bei einer akuten Infektion virale DNA nachgewiesen werden.

Mangelnde Sensitivität der Methode, ungeeignetes Untersuchungsmaterial oder ein ungünstiger Untersuchungszeitpunkt führen zu falsch-negativen Ergebnissen, so dass es zu Krankheitsausbrüchen und einer vermeidbaren Verschleppung des Erregers kommen kann. Ein negatives Ergebnis besagt, dass kein Virus-Genom detektiert wurde, es bescheinigt jedoch keine Virusfreiheit bzw. den Status der Krankheitsfreiheit. Ein positiver Befund dagegen weist das Vorliegen von Erreger-DNA im untersuchten Gewebe nach (Meyer, 2007).

### **10.1.1.3 Weitere direkte Nachweisverfahren**

Die Herpesviruspartikel lassen sich in infiziertem Gewebe bei entsprechender Erregermenge durch Elektronenmikroskopie sichtbar machen. So konnten herpesvirenähnliche Partikel in Zellkernen und Zytoplasma von Kiemenepithelzellen, Darm, Leukozyten nachgewiesen

werden (Bretzinger et al., 1999; Hoffmann, 2000; Hedrick et al., 2000; Pikarsky et al., 2004; Hutoran et al., 2005).

Histologische Untersuchungen von fixiertem Kiemengewebe zeigen eine vermehrte Zellproliferation und Epitheldegeneration der Kiemen bis hin zur Nekrose auf (Walster, 1999; Hedrick et al., 2000). In den Epithelzellen von Kiemen und Niere bei einer akuten KHV-Infektion und klinischen Manifestation mit interstitieller Nephritis lassen sich intranukleäre, azidophile Einschlusskörperchen ausmachen, die als Beweis für eine Herpesinfektion dienen (Way, 2004; Hoffmann, 2005).

### **10.1.2 Indirekter Nachweis von KHV**

Serologische Techniken zum Nachweis von Antikörpern, wie Immunoassays (z.B. die ELISA-Technik) sind in der Diagnostik zur Krankheitsüberwachung weit verbreitet (La Patra, 1996; Swain, 2003).

Ronen et al. (2003) und Hedrick et al. (2004) konnten die Antikörperbildung gegen KHV bei Karpfen durch die ELISA-Technik bestätigen.

Adkison et al. (2005) beschrieben einen ELISA, der Antikörper gegen KHV noch bis zu einem Jahr p.i. nachweist. Besonders die Erfassung symptomloser Tiere ist wichtig, da sie als Einträger des KHV in Bestände gelten, wie es Ausbrüche bei bis dato nativen Populationen in der Vergangenheit gezeigt haben (Walster, 1999; Neukirch und Kunz, 2001; Gilad et al. 2002, 2003).

Derzeit gestaltet sich die Entdeckung von möglichen Carrierfischen in einer Population, die einen KHV-Ausbruch überlebt haben, mit Routinediagnostika (auch molekularbiologische Testmethoden) noch schwierig (Bergmann, 2007). Die Produktion von Antikörpern, die auf die Auseinandersetzung mit einem viralen Agens hindeutet, ist ein möglicher Hinweis auf den Carrierstatus (La Patra, 1996; Crawford et al. 1999). Produziert ein Fisch Antikörper, welche über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Fisch sich mit dem Pathogen auseinandergesetzt hat und das Virus unter Umständen noch im Körper beherbergt (Ronen et al., 2003; Beevers, 2004; Adkison et al., 2005). Spezifische Antikörper werden von einer Vielzahl von Fischen einer Population über einen bestimmten

Zeitraum gebildet. Hedrick et al. (2004) konnte Antikörper in Fischen nachweisen, die Überlebende der Infektion waren. Damit lassen sich Populationen identifizieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit Carrierfische beinhalten.

Studien über Antikörper gegen Herpesviren sind vor allem für den Amerikanischen Wels (Channel Catfish) erfolgt. Hier konnte von Plumb (1973) gezeigt werden, dass in Fischen die eine Infektion mit dem Ictalurid Herpesvirus 1 (IcHV-1) überlebt haben, entsprechende Serum-Antikörper detektiert werden konnten. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass der Antikörpergehalt in Abhängigkeit von saisonalen Verhältnissen und Umweltbedingungen (z.B. Wassertemperatur) sehr variabel ist (Hedrick et al., 1987; Crawford et al., 1999). Auch bei dieser Spezies konnte nachgewiesen werden, dass latente Virusträger (Carrier) existieren, die das Virus verschleppen können (Wise et al., 1988; Boyle and Blackwell, 1991; Gray et al., 1999; Thompson et al., 2005). Es bleibt aber zu bedenken, dass ein Carrierstatus nicht unbedingt mit einer klinischen Manifestation oder der Anwesenheit von Antikörpern korreliert, wie es von Wise et al. (1985) bei CCV gezeigt werden konnte.

Es gibt verschiedene Testmethoden, um Antikörper gegen ein Virus nachzuweisen. Studien haben gezeigt, dass Individuen einer Population spezifische Antikörper, die über einen bestimmten Zeitraum messbar sind, produzieren können (Hattenberger- Baudouy et al., 1995; St-Hilaire et al., 2001). Diese Antikörper können durch verschiedene Methoden, wie Neutralisationstest, Agglutinationstest und im ELISA nachgewiesen werden (La Patra, 1996). Der Neutralisationstest weist Antikörper im Serum nach, die das Virus in vitro neutralisieren (Plumb, 1973). Das setzt eine Anzucht in der Zellkultur voraus. Die Schwierigkeit eines Nachweises von KHV durch die Anzüchtung in Zellkulturen aufgrund der Wandlungsfähigkeit des Erregers bzw. einer Desensibilisierung einiger Zelllinien beschreibt Gilad et al. (2002).

Im Gegensatz zum Serumneutralisationstest bietet der ELISA zum Nachweis von neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern (Lindsey, 2005) und zur Quantifizierung bei Fischen (Lorenzen und La Patra, 1999) die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben in kurzer Zeit mit hoher Spezifität und Sensitivität und in Wiederholung zu bearbeiten.

### 10.1.2.1 Der Enzymimmunoassay oder ELISA

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das dazu dient, mittels einer enzymatischen Farbreaktion das Vorliegen einer Substanz zu ermitteln, was durch die Wechselwirkung von Antigen (Krankheitserreger) und Antikörper (Immunglobulin) ermöglicht wird (Tijssen, 1985).

Ein ELISA hat wie alle serologischen Testverfahren den Vorteil, dass eine Diagnostik am lebenden Tier möglich ist. Darüber hinaus können Massenuntersuchungen über eine einfache, schnelle, standardisierte und kostengünstige Durchführung im Vergleich zu anderen immunologischen und serologischen Nachweisverfahren (Kemeny 1994; La Patra, 1996) erfolgen. Das Testverfahren erlaubt bereits den Nachweis geringer Mengen des zu detektierenden Antigens (Yolken, 1985). Ein derartiger Test ermöglicht eine erste Aussage über die Kondition und den Immunstatus des untersuchten Individuums und lässt u.a. Rückschlüsse auf einen Infektionsstatus einer Population, z.B. der Fische eines Teiches zu (Yolken, 1985; Ronen et al., 2003).

Das Prinzip im ELISA, ein immobilisiertes Antigen an eine Plastikoberfläche (Feste Phase) zu binden, führt zu einer höheren Sensitivität gegenüber dem Neutralisationstest (Oelsen et al., 1991). Jedoch besteht hier die Gefahr, eine größere Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktionen zu erhalten, was die Anwendung in der Praxis beschränken könnte.

Wegen ihrer universellen Anpassbarkeit und der Standardisierung der ELISA-Platten werden Immunoassays heute sehr häufig und vielseitig in der Diagnostik eingesetzt (Kemeny 1994; La Patra, 1996).

Bevor ein Test als Diagnostikmethode verwendet werden kann, muss er entsprechend validiert werden. Das beinhaltet auch, den Einfluss der Temperatur auf die Antikörperproduktion zu beachten und die Anzahl an Reagenten und die Dauer der Antikörperbildung festzustellen (Beevers, 2004). Vor der Etablierung eines solchen Diagnostikverfahrens müssen zudem standardisierte Viruspräparationen und Kontrollseren entwickelt werden.

### **10.1.2.2 KHV-ELISA**

Der erste beschriebene ELISA-Test für Serumantikörper bei Koi gegen KHV wurde von Ronen et al. (2003) beschrieben. Sie entwickelten einen ELISA, um zu demonstrieren, dass experimentell infizierte Koikarpfen Antikörper gegen KHV bilden und Titer über einen Zeitraum von 50 Tagen nach dem Viruskontakt nachweisbar sind und sogar ansteigen. Laut Adkison et al. (2005) ist dies noch bis zu einem Jahr nach dem Auftreten der letzten klinischen Symptome möglich. Die Spezifität der Serumantikörper gegen CyHV-3 konnte in entsprechenden Infektionsversuchen nachgewiesen werden.

Der ELISA erlaubt als serologisches Verfahren bei Einzelindividuen, aber auch im Rahmen von Bestandsuntersuchungen den Nachweis von Serumantikörpern, um eine vorausgegangene Konfrontation mit dem Virus zu belegen und eventuelle Carrierfische ohne direkten Erregernachweis aufzudecken. Das Verfahren kann somit im Zusammenhang mit dem Tierhandel helfen, die potentielle Gefahr, die von Antikörper-positiven Fischen als mögliche Virusträger ausgeht, zu minimieren. Mit der ELISA-Methode können zusätzliche Informationen für ein potentielles Risiko einer Verbreitung von KHV gewonnen werden, wenn PCR und andere virologische Methoden das Vorliegen von KHV nicht ausschließen können (Adkison et al., 2005).

#### **10.1.2.2.1 Methodik des ELISA**

Der Test beinhaltet vereinfacht folgende zwei Reaktionen: die Komplexbildung der Immunreagenten Antikörper und Antigen und der Nachweis dieser Reaktion mittels eingesetzter Indikator-Enzyme (*Abb. 5*).

Bei allen Varianten wird ein biologischer Stoff an eine Matrix (=feste Phase) gebunden. Als Matrix werden 96-well Mikrotiterplatten (Festphasen-Enzym-Immunoassay) verwendet, an denen das Antigen immobilisiert wird. Da bestimmte Kunststoffe Proteine anlagern, lassen sie sich gut beschichten. Das anschließende Auswaschen der Kunststoffvertiefungen der ELISA-Platte dient dazu, ungebundenes Antigen zu entfernen.

Das immobilisierte Antigen fängt den Antikörper aus dem Test-Serum, welcher dann durch ein enzymmarkiertes anti-Immunglobulin erkannt wird. Der Detektorantikörper muss nicht immer direkt markiert sein, manchmal wird ein zweiter enzymmarkierter Antiglobulin-Antikörper verwendet, der gegen den Nachweisantikörper gerichtet ist. Der „Brücken-

Antikörper“ wird verwendet, um den Enzym-Antikörper-Komplex mit dem primären (Test-) Antikörper zu verbinden. Als Detektionsantikörper wird ein monoklonaler Ak eingesetzt („Brücken-Methode“), so dass der zweite ein Antikörper sein muss, der gegen z.B. Maus-Immunglobulin gerichtet ist. Man spricht in diesem Fall von einem monoklonalen Fangantikörper und einem polyklonalen Detektorantikörper. Der „Brücken-Antikörper“ soll in ausreichender Menge zugegeben werden, damit sowohl der erste, als auch der enzymtragende Antikörper gebunden werden kann. Dieses Prinzip bringt einen hohen Grad an Spezifität und Sensitivität mit sich und es lässt sich die Detektierbarkeit erhöhen. Es erfolgt die Zugabe der farblosen Substrat/Chromogen- Lösung, unter Zugabe von  $H_2O_2$  spaltet das Enzym den Farbstoff (TMB) und es entsteht eine blaue Färbung. Wenn die Kontraste gut sichtbar sind, wird die Reaktion durch Zerstörung des Enzyms (mit Schwefelsäurelösung) gestoppt, ein stabiler, gelber Farbkomplex entsteht.

In einem Photometer wird dann die enzymatische Farbreaktion durch Messung der optischen Dichte erfasst, die sich in diesem Fall proportional zur Ak-Konzentration in der Probe verhält (Extinktionsmessung). Mithilfe eines Messprogramms erfolgt die Berechnung der Antikörperkonzentrationen der Proben. Daraufhin lässt sich der Status der Proben bewerten.

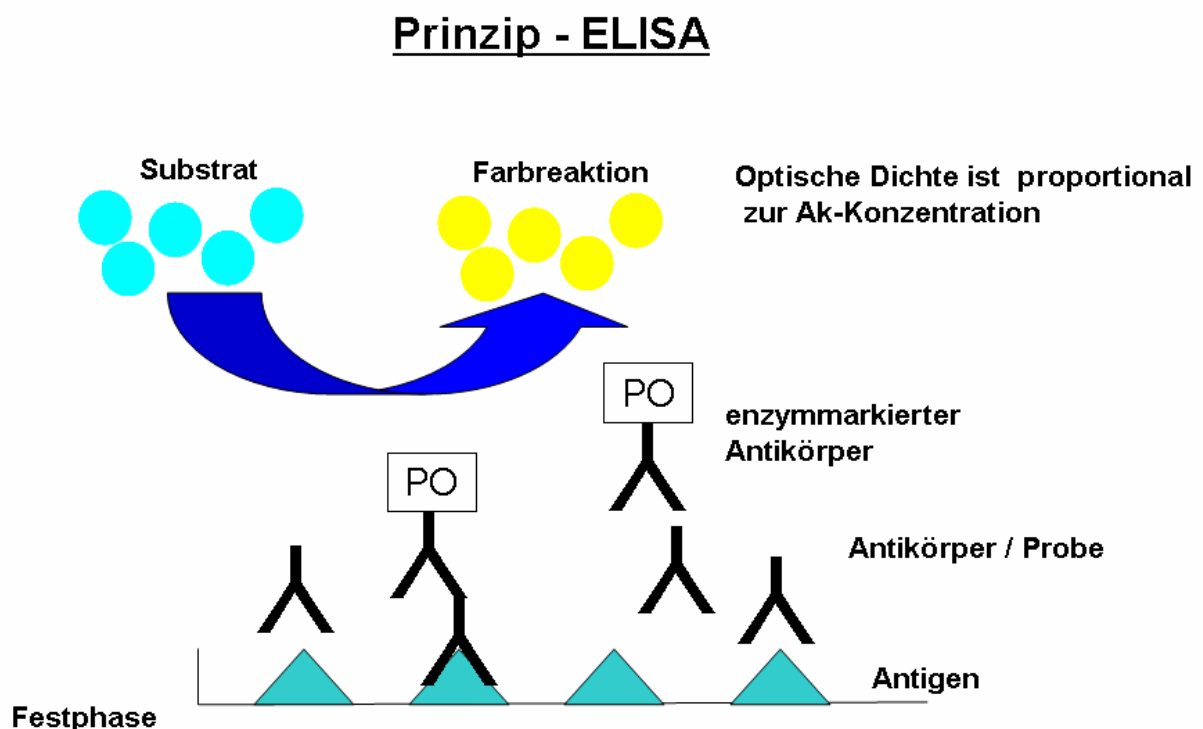


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines ELISA-Tests

### 10.1.2.2 Validierung

(nach: Tijssen, 1985)

Der Zweck einer Validierungsstudie ist es, die „Fitness“ eines Tests für eine bestimmte Anwendung herauszuarbeiten und zu zeigen, dass das analytische Verfahren geeignet ist, die Konzentration eines bestimmten Analyten, z.B. von KHV Antikörpern in individuellen Seren zu bestimmen.

Ein validierter Assay erstellt Testergebnisse, die ein Tier als *positiv* oder *negativ* für einen Nachweisanalyten identifizieren, woraus sich der Infektionsstatus mit einer gewissen statistischen Sicherheit bestimmen lässt. Um Fehleinstufungen (falsch-positiv, falsch-negativ) zu vermeiden, werden Kontrollseren (negative und positive Seren) und oft auch Referenzproben (nicht infizierte und infizierte Tiere mit verschiedenen Serumtiterstufen) im Test verwendet.

Um eine Differenzierung zwischen positiv/negativ vorzunehmen, d.h. einen Cut Off- Wert festzulegen, ist es ebenso erforderlich, die Verdünnungsreihen auch für negatives Probenmaterial durchzuführen, da vor allem bei niedrigen Verdünnungsstufen unspezifische Reaktionen und Inhibitoren im Serum zu verfälschten Ergebnissen führen. Ein geeigneter ausgewählter Bereich ist deshalb erforderlich, um falsche Bewertungen zu minimieren. Dabei wird die Grenze je nach Hintergrund der Untersuchung sowohl nach oben als auch nach unten verschoben, je nachdem, ob ein falsch-positives bzw. falsch-negatives Ergebnis höhere Konsequenzen erbringt. Ergebnisse, die dazwischen liegen, werden als „fraglich/verdächtig“ eingestuft (Heck et al., 1980). Diese Testproben sollten einer erneuten Testung (mehrmalige Wiederholung) unterzogen werden.

Voraussetzung für eine optimale Testdurchführung sind optimal passende Reagenzien, die richtige Technik sowie eine gut konzipierte Durchführung. Es gilt, diese auch immer wieder auf Funktionalität und Richtigkeit zu überprüfen.

Nach Changhong et al. (2005) sollen folgende Sachverhalte in einer Validierungsstudie überprüft werden:

Zur Feststellung der Präzision eines Tests sollen identische Platten mit ausgewählten Seren an verschiedenen Tagen getestet werden. Diese Serumproben sollen sein:

1. Proben mit bekanntem Antikörpergehalt werden verwendet, um den vorgegebenen Antikörpergehalt zu bestätigen.



2. Bekannt positive Seren sollen wiederholt getestet werden und annähernd identische Ergebnisse erbringen.
3. „Innerhalb Test-Genauigkeit“
  - Mehrere identische Platten mit ausgesuchten Testseren werden am selben Tag getestet.
  - Einige ausgewählte Seren werden auf einer Platte wiederholt getestet.
4. „Zwischen Test- Genauigkeit“
  - Ein identischer Assay mit ausgewählten Seren wird an 2-3 verschiedenen Tagen wiederholt.

## 11 Etablierte Labordiagnostik

Die Methoden, die derzeit zur Überwachung, Detektion und Diagnose einer KHV-Erkrankung eingesetzt werden, sind in der folgenden *Tabelle 2* zusammengefasst:

- A = Methode, die momentan wegen ihrer Anwendbarkeit, ihres Nutzens und ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität empfohlen ist
- B = Standardmethode mit guter diagnostischer Sensitivität und Spezifität
- C = Methode von eingeschränkter Anwendbarkeit, limitiert durch hohen Kostenfaktor und/oder Ungenauigkeit
- D = Methode, momentan nicht empfohlen

Methode	Überwachung zum Nachweis des „Freiseins“ von einer Infektion	Vorläufige Diagnose einer Infektion bzw. Krankheit	Bestätigung der Diagnose einer Infektion bzw. Krankheit
Klinik	D	B	D
Histopathologie	D	B	C
Isolierung in der Zellkultur	D	C	D
Immunochemische Ag-Assays (ELISA)	D	B	C
Elektronenmikroskopie	D	B	C
PCR aus Geweben	C	A	A
Nachweis von AK gegen KHV (ELISA)	C	C	D

*Tabelle 2:* KHV - Bestätigung, Detektion und diagnostische Methoden (OIE, 2007)

Obwohl nicht alle Testmethoden mit A oder B einer Standardisierung oder Validierung unterzogen wurden, sind sie durch ihren routinemäßigen Einsatz mit guten Ergebnissen weltweit anerkannt (OIE, 2007).

## **12 Krankheitsmanagement**

### **12.1 KHV mit Seuchencharakter**

Der Erreger der Koi-Herpesvirus-Infektion erfüllt mit seinen Eigenschaften, wie Infektiösität, krankmachende Wirkung, hohe Kontagiosität und Widerstandsfähigkeit und aufgrund seines biologischen Übertragungsverhaltens (v.a. lebende Vektoren) alle Merkmale eines Seuchenerregers, so dass die KHV-Erkrankung damit Seuchencharakter bekommt (Mayr, 2007).

Laut Tierseuchengesetz (TierSG) greifen bei einem Verdacht oder Ausbruch einer Tierseuche staatliche Maßnahmen, um eine Weiterverbreitung zu verhindern bzw. eine Tilgung der Seuche zu erreichen. Es werden Untersuchungen durch die zuständige Behörde, tierhygienische Aufwendungen (wie Desinfektion, unschädliche Beseitigung von Tiermaterial und Abfällen) angeordnet und die Bekämpfung eingeleitet, indem eine Beschränkung oder ein Verbot von Tierhandel, Personenverkehr, Inverkehrbringen tierischer Produkte bzw. die Unterbindung des Verkehrs mit Kontaktgegenständen und sogar die Keulung des Bestandes erlassen wird (Mayr, 2007).

### **12.2 Anzeigepflicht für KHV**

KHV ist in § 1 der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen seit Dezember 2005 als anzeigepflichtige Tierseuche aufgelistet. Derzeit gibt es noch keine in der Fischseuchen-VO (geänderte Fassung vom 20.12.2005) verankerten Durchführungsbestimmungen, d.h. keine bestimmten Maßnahmen, die bei einem Ausbruch durchzuführen sind. Dieser Maßnahmenkatalog wird jedoch im Zuge der Umsetzung der neuen Aquakultur- Richtlinie 2006/88/EG 2008 erwartet.

Fischhaltungsbetriebe im Sinne der Definition nach § 1 der Fischseuchen-VO müssen gemäß § 5 der Fischseuchen-VO einmal jährlich klinisch und virologisch untersucht werden. Entsteht bei Kontrolluntersuchungen der Verdacht einer Erkrankung oder wird die Fischseuche nachgewiesen, werden veterinärämtliche Maßnahmen in Kraft treten müssen. Dabei kommt es zum Beispiel nach Informationen vom LAVES in Niedersachsen zu Betriebssperren. Der betroffene Betrieb erhält dann den Status eines Seuchenbetriebes. Dieser Status wird aufgehoben, wenn der Verdacht sich nicht bestätigt oder wenn nach Leerung und Desinfektion der Teiche das Virus im Bestand nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die

Fischseuchen-VO sieht aber als Restriktionsmaßnahmen in Karpfenhaltungen vor, dass Koikarpfen weder gemeinsam mit anderen Cypriniden transportiert, noch vergesellschaftet werden dürfen. Die mit dem Virus befallenen Fische sind als Lebensmittel unbedenklich und dürfen vermarktet werden, solange keine offensichtlichen Krankheitssymptome (z.B. Blutungen in der Muskulatur) vorhanden sind (LAVES, Kleingeld, 2007).

Falls der Ausbruch einer KHV-Infektion staatlich bekämpft werden muss, kann dies aufgrund des § 79 Abs. 4 des Tierseuchengesetzes (TierSG) geschehen, bis Regelungen des Bundes aufgrund § 79 Abs. 1 oder 1a oder der Länder aufgrund des § 79 Abs. 3 TierSG getroffen werden.

Für exportierende und Fischhandel betreibende Länder besteht keine Verpflichtung zum Nachweis einer Freiheit von dieser Krankheit, es bemühen sich aber immer mehr Organisationen des Zierfischhandels die Verbreitung dieser Infektionskrankheit durch geeignete Quarantänemaßnahmen, freiwillige Untersuchungen und die krankheitsfreie bzw. erregerefreie Fischzucht zu kontrollieren.

Die Anzeigepflicht für Tierseuchen soll bewirken, dass Seuchenausbrüche frühzeitig erkannt und getilgt werden können, bevor die Tierseuche weiterverbreitet wird. Im Rahmen der Anzeigepflicht ist jeder Verdacht der zuständigen Behörde (Veterinäramt) laut § 9 TierSG zu melden. Tierseuchen können in ihrem Erscheinungsbild so verschieden auftreten, dass bereits jeder Tierseuchenverdacht umgehend durch entsprechende Untersuchungen abgeklärt werden muss.

### **12.3 Immunisierung**

Derzeit gibt es keine in Deutschland zugelassene Vakzine gegen KHV.

Die Impfung gesunder Tiere kann zu einem Impfschutz führen, der jedoch nicht garantiert, dass das geimpfte Tier nicht beim Kontakt mit dem Herpesvirus zu einem unerkannten Virusträger wird, der das Virus an naive und empfängliche Tiere weitergeben kann (Neukirch, 2003b). Problematisch ist, dass man es bei herpesvirusinfizierten Tieren mit lebenslänglichen Virusträgern zu tun hat und eine Vakzine ist daher nicht geeignet, die Krankheit aus Tierbeständen zu eliminieren (Lechleitner, 2003).

Ronen et al. (2003) konnten in Impfversuchen, in welchen Karpfen eine attenuierte Vakzine intraperitoneal verabreicht wurde, hohe Antikörpertiter induzieren. In anschließenden Infektionsversuchen zeigten sich die Fische immun gegen KHV.

Perelberg et al. (2005) entwickelten eine Lebendvakzine, die bei Impftieren nur bei Wassertemperaturen von 23°C eine ausreichende Immunität ausbildete und sie in anschließenden Belastungsversuchen nicht erkranken ließ.

Bei KHV-Lebendimpfstoffen ergibt sich grundsätzlich das Problem, dass sie unter europäischen Bedingungen noch nicht überprüft wurden und unter Umständen durch Mutation veränderlich und damit pathogen/virulent werden können (Neukirch, 2003c). Grundsätzlich ist zu fordern, dass eine Unterscheidungsmöglichkeit von Impfviren und Feldviren gegeben sein muss (Bergmann, 2007).

Yasumoto et al. (2006) entwickelten eine oral zu verabreichende Vakzine, die formalininaktiviertes KHV enthielt, und konnten die nach einer Belastungsinfektion erwartete Mortalität durch die Immunisierung reduzieren.

Meyer (2007) konnte in Infektionsversuchen im Anschluss an eine Vakzinierung mit einem durch Formalin bzw. Hitze inaktiviertes Virus zeigen, dass reinfizierte Virusträger nicht sicher vor einer erneuten Infektion geschützt sind; ein Immunschutz besteht offenbar nicht immer ausreichend, um eine erneute Exposition mit KHV zu überstehen.

Ein inaktivierter wirksamer Impfstoff ist derzeit nicht vorhanden (Neukirch, 2003c).

Nach einer „natürlichen Immunisierung“ von Fischen durch Inkontaktbringen mit einem schwach-virulenten Virusstamm und anschließender Erhöhung der Wassertemperatur auf ca. 28-30°C konnte von Gilad et al. (2003) und Ronen et al. (2003) in betroffenen Beständen ein Eindämmen der Mortalität beobachtet werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung des Virus auf naive Tiere durch eine Manifestation einer latenten Infektion ist hoch und diese Maßnahme nicht angeraten. Da ein virustragendes Tier nicht immer die für KHV typischen Krankheitsmerkmale aufweisen muss, es kann sogar klinisch völlig unauffällig sein, muss man immer vom Auftreten von Carrierfischen ausgehen, die bei Vergesellschaftung naive Tiere anstecken können. Im Hinblick auf diese Erkenntnisse ist das Immunisieren von Fischen, indem man sie in Kontakt mit infektiösem Virus bringt, mit Vorsicht zu betrachten (St-Hilaire et al., 2004).

Im privaten Hobbyteich und Koiahaltungen können prophylaktische Maßnahmen zur Stärkung und Unterstützung des Immunsystems der Fische durch Gabe von Stimulanzen und

Erwärmung des Wassers vorgenommen, d.h. optimale Bedingungen für die Fischgesundheit sollen geschaffen werden. Fische sollten nur aus kontrollierten Herkünften und Haltungen zugekauft und die notwendigen Hygienemaßnahmen getroffen werden. Hygienemaßnahmen können ähnlich wie für SVC erfolgen und beinhalten die regelmäßige Desinfektion der Becken und Anlagen, der Gerätschaften sowie die Vernichtung toter Fische und jegliche Vermeidung von Stresssituationen durch ein geregeltes Krankheitsmanagement (OIE, 2007). Eine Herabsetzung der Populationsgrößen und die Behandlung von Sekundärinfektionen gehören ebenso zu den geeigneten Maßnahmen (Takashima et al., 2005). Tiere aus verschiedenen Ländern und Zuchten zu halten bzw. zusammenzubringen, stellt schon allein wegen unterschiedlicher Bakterien- und Parasitenvorkommen ein nicht zu unterschätzendes Risiko dar (Bergmann, 2007).

#### **12.4 Bekämpfung und Therapie**

Aufgrund der Gesetzeslage sind auch private Koihalter dazu angehalten, im Falle eines Ausbruchs die seuchenhygienischen Maßnahmen einzuleiten bzw. die Krankheit und deren Ausbreitung durch Desinfektionsmaßnahmen unter Kontrolle zu bekommen und die oftmals sehr wertvollen Überlebenden als Carrier anzusehen und nicht in andere Hände weiterzugeben und auf Zukäufe, die einem Infektionsrisiko ausgesetzt werden, zu verzichten.

Da das Virus bei 30°C offenbar nicht vermehrt wird, kann der Krankheitsverlauf bei noch nicht akut geschädigten Fische durch eine drastische Temperaturerhöhung auf 30°C unter Umständen abgemildert und das Immunsystem unterstützt werden. Von den überlebenden Fischen eines Teiches, vom Wasser und Gerätschaften geht jedoch eine erhebliche Infektionsgefahr aus, so dass hier möglicherweise nur unter Auflagen Fische im Heimatteich verbleiben können. Das Überstehen einer Infektion schützt den Fisch jedoch nicht davor, zu einem späteren Zeitpunkt zu erkranken (Bergmann, 2007).

Für infizierte Bestände empfiehlt sich jedoch die unschädliche Beseitigung gestorbener und die Tötung kranker Fische mit anschließender Desinfektion von Teich, Filtereinrichtungen und Gerätschaften. Da jedoch auch Tierschutzaspekte zu berücksichtigen sind und rechtliche Vorgaben für eine Tötungsanordnung fehlen, ist diese Entscheidung nur von Fall zu Fall zu treffen (Merkblätter der LUA, Rheinland- Pfalz, 2004 und LAVES, Niedersachsen, 2006).

Israelische und japanische Forscher fanden heraus, dass das Virus bis 4 Wochen und länger im Gewässer viabel bleibt und Fische infizieren kann (Shimizu et al., 2006). Herpesviren

können in einem pH-Bereich von 5-8 über Wochen stabil bleiben, Temperaturen über 25°C schwächen die Erreger erst allmählig ab (Rolle und Mayr, 1993).

Gegenüber gängigen Desinfektionsmitteln zeigt sich der Erreger jedoch wenig widerstandsfähig, so dass die Inaktivierung mit in der Fischerei- und Teichwirtschaft gebräuchlichen Desinfektionsmitteln, z.B. Benzalkoniumchlorid, Natriumhypochlorid, Ethanol und eine Jod-Verbindung erfolgen kann (siehe Merkblatt „Desinfektion in der Fischzucht, LAVES 2007). UV-Strahlung und Temperaturen von 50°C für eine Minute können das Virus ebenfalls inaktivieren (Kasai et al., 2005).

Nach der Keulung eines Bestandes sollte sicherheitshalber für mindestens 3 Monate kein Neubesatz erfolgen. Nach einer Quarantänezeit von mindestens 2-3 Wochen und idealerweise in Vergesellschaftung mit Pilotfischen kann ein Neubesatz vorgenommen werden (Waltzek 2005; Bergmann, 2007). Zuvor sollten die Fische jedoch in ausreichender Anzahl beprobt werden. Bergmann (2007) empfiehlt als Stichprobe 10 Fische von 100 ab einem Alter von 3-4 Monaten in 2 Poolansätzen zu untersuchen. Analog zu den Vorgaben der Fischseuchen-VO in Bezug auf die Probennahme zur Überwachung von Forellenseuchen empfiehlt sich die Untersuchung von mindestens 10 Fischen pro Charge.

Der Einsatz von Pilotfischen in der Quarantäne ist abzuwägen, da der Ablauf unter Umständen die Kriterien eines nach dem Tierschutzgesetz genehmigungspflichtigen Tierversuchs erfüllen kann (Bergmann, 2007).

Da sich der Nachweis bzw. die Aufdeckung von latenten Infektionen auch mit den derzeit etablierten Methoden im Labor schwierig gestaltet, geht von einer fachgerechten Quarantäne auch keine 100 % ige Sicherheit aus (LAVES, Niedersachsen, 2006).

Wegen der Natur der Herpesviren ist es schwierig, das Virus in seinem latenten Stadium zu detektieren, weshalb Kontroll- und Präventionsmechanismen hauptsächlich Anwendung finden müssen (Haenen et al., 2004).

Die Industrie unternimmt Maßnahmen, um die Quelle eines Viruseintrags aufzudecken und weitere Importe zu stoppen. Zudem wird der zuständige Amtstierarzt sein Augenmerk auf die Ermittlung der Erregerherkunft richten (epidemiologische Erhebung).

Es muss außerdem ein Augenmerk auf die Öffentlichkeitsarbeit gerichtet werden, um Halter und den Handel von der Notwendigkeit geeigneter Quarantänemaßnahmen zu überzeugen (Haenen et al., 2004).

Viele Vereine und Verbände empfehlen ihren Mitgliedern Stichprobenuntersuchungen importierter Koi vorzunehmen (LUA, Rheinland- Pfalz, 2004; LAVES, Niedersachsen, 2006).

Zu diesem Zweck wird entweder eine Probennahme, z.B. einzelne Kiemenstücke vor Ort durchgeführt oder die Fische werden möglichst lebend an ein Untersuchungslabor gesandt.

Es ist abzuwarten, ob mit Einführung tierseuchenrechtlicher Vorschriften auf Ebene der EU in Bezug auf das Koi-Herpesvirus auch Vorgaben hinsichtlich der Probenahme und Untersuchung erlassen werden (Kleingeld, 2006).



## **C Material und Methoden**

### **1 Material**

#### **1.1 Geräte**

- Tiefkühltruhe Hera freeze (-80°C), Heraeus
- Waage BP 410 S, Sartorius
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge Typ Biofuge Stratos, Heraeus Instruments GmbH
- Sicherheitswerkbank Hera safe Flow HS 12, Heraeus
- Zentrifuge Primus 25, MWG Biotech
- BioPhotometer 6131, Eppendorf
- Thermocycler Mastercycler gradient<sup>®</sup>, Eppendorf
- Photosystem- Bio Print DS Fotodokumentationssystem mit Software Bioprint V 98.01 Windows und Bio-Capt Version 1997, LTF Labortechnik
- Amplifier Power Pac 300, Bio Rad
- Elektrophoresekammer Sub Cell GT, Bio Rad
- Probenkamm, Bio Rad
- Mikrowelle 800 W, MTC
- Photometer "Sunrise Basic" (Absorbance Reader) mit Software Magellan 5.0 (Detection Suite V 1.60), Tecan Crailsheim
- Gefrierbehälter Apollo SX-18, MVE Cryogenics
- Nalgene<sup>™</sup> Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene Brand Products
- div. Multipetten und Pipetten, Eppendorf
- div. Serologische Pipetten, Greiner bio-one und nunc
- Zählkammer nach Neubauer, Diagonal

#### **1.2 Verbrauchsmaterialien**

- Gewebekulturplatte 96 K, F-Form, TC, steril + Abdeckplatte, Greiner bio-one
- Gewebekulturflasche (25, 75, 175 cm<sup>2</sup>), Cellstar
- EIA/RIA Plate, 96 well, easy wash<sup>™</sup>, no lid, high binding, Polystyrene, Corning costar

- Petrischalen, Nunc
- Nunclon™ Röhrchen, Greiner bio-one
- Abdeckfolie easy seal™, Greiner Bio-one
- Spritzen Omnifix 1 ml, Braun
- Kanülen Sterican (0,6x25mm, 0,8x40mm), Braun
- Cent Tubes (15 und 50 ml), Nunc
- Cryo Tube™ Vials, Nunc
- Cellstar Cryos, Greiner bio-one
- Nalgene Syringe Filter (0,2 µm), Nalgene Brand Products
- Küvette (UVette, 50-2000 µl), Eppendorf
- Pasteurpipetten, Diagonal

### 1.3 Chemikalien

- QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen
- Reddy Superladder low 100bp, Abgene
- KHV-Primer, Bio TeZ Berlin-Buch GmbH
- Hot Star Taq DNA Polymerase (5 Units/µl), Qiagen
- 10 x PCR-Puffer (mit Taq Polymerase mitgeliefert)
- Coral Load PCR Buffer (10x), Qiagen
- Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade (4 x 25 µmol), Roche
- BCA™ Protein Assay Kit, Pierce
- Skim Milk Powder, Oxoid
- D(+)-Sucrose, Fluka Bio Chemika
- Tween® 20, Sigma mit Natrium Perborat, Sigma
- 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine Tablets, Sigma
- Bovine Serum Albumine (min. 98 %), Sigma
- Schwefelsäure (95-98 %), Sigma
- TAE Elektrophorese-Puffer 50 x, Sigma-Aldrich
- Wasserstoffperoxid (30 %), Applichem
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Applichem
- Isopropanol, Roth

- Trypanblau, Applichem
- Ethidiumbromid Lösung (10 mg/ml), Bio Rad
- Agarose, Applichem
- Fertignährböden, Oxoid
- MS 222, Thomson & Joseph Ltd Norwich
- CuSO<sub>4</sub>, Applichem
- Natriumcarbonat (100mM), Gibco
- Partricin (50 µg/ml), Biochrom AG
- Non essential Amino Acids (100 x), Biochrom AG
- Penicillin/ Streptomycin (10000 Units/ 10000 µg/ml), Biochrom AG
- Trypsin/ EDTA Lösung, in PBS w/o Ca<sup>2+</sup> u. Mg<sup>2+</sup> (0,05 %/0,02 %), Biochrom AG
- L-Glutamin (200 mM), Gibco
- Baytril<sup>®</sup>, Bayer

#### 1.4 Medien und Pufferlösungen

- Natrium Pyruvat (100 mM), Gibco
- HEPES Buffer (10 M), Biochrom AG
- MEM with Earle's, 25 mM HEPES, w/o L-Glutamine, Gibco
- Ultra pure water, Biochrom AG
- PBS Dulbecco (1x), Biochrom AG
- Fetales Kälberserum, Biochrom AG
- Percoll, isotonisch (Dichte 1,077 g/ml), Biochrom AG

#### 1.5 Herstellung von Gebrauchsmedien

- Serumfreies Mischmedium (zur Herstellung vom Medium-Perkoll-Gemisch mit Dichte 1,075)

HAM's F-12 Medium, Gibco:	10,69 g
Dulbecco's Medium (IMDM), Gibco:	17,82 g
NaHCO <sub>3</sub> , Gibco:	4 g

Es werden jeweils 10,69 g von F-12 in 1 l Aqua dest. und 17,82 g IMDM in 1 l Aqua dest. gelöst. Beide Lösungen werden gemischt und 4 g NaHCO<sub>3</sub> hinzugefügt. Über einen Vakuum-Filter wird das Gemisch sterilfiltriert und in Flaschen abgefüllt. Bei -20°C ist die Lösung bis zum Gebrauch mehrere Monate lagerfähig.

- Carbonatpuffer („Coating buffer“)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Gibco:	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub> , Gibco:	2,93 g

Die angegebenen Mengen werden in 1 Liter Aqua dest. gelöst und auf einen pH von 9,6 mit Schwefelsäure eingestellt.

- TAE-(Tris-Acetat-EDTA-)-Elektrophoresepuffer 50x

Tris Base, Applichem:	242 g
Essigsäure (100 %), Applichem:	57,1 g
EDTA, Applichem:	37,2 g
Aqua dest (steril):	1 l

- TAE-Gebrauchslösung 1x

TAE 50 x:	20 ml
Aqua dest (steril):	980 ml

## 1.6 „Biostoffe“

- Monoclonal anti-KHV, BioX Diagnostics
- FITC anti-mouse Ig, BioX Diagnostics
- Anti-Carp/Koi Carp IgM MAb, Aquatic Diagnostic Ltd.
- Rabbit Anti- Mouse Polyklonaler Antikörper /HRP (PAb), DAKO Ltd.

## 1.7 Referenzproben und Antigenpräparationen

- Positives Referenzserum, Cefas Weymouth (von Karpfen aus KHV-Expositionsversuch)
- Negatives Referenzserum, Cefas Weymouth (von SPF-Karpfen)

Folgende unterschiedliche KHV-Virusaufreinigungen (Monat/Jahr) wurden als Antigenpräparation (mit Virusproteinkonzentration in  $\mu\text{g/ml}$ ) im ELISA verwendet:

- |                            |     |           |                               |
|----------------------------|-----|-----------|-------------------------------|
| • FLI Isolat KHV-191       | Nr. | <b>1</b>  | 01/06 (25 $\mu\text{g/ml}$ )  |
|                            |     | <b>2</b>  | 01/06 (200 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>3</b>  | 04/06 (140 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>4</b>  | 04/06 (150 $\mu\text{g/ml}$ ) |
| • Cefas Isolat D-132 UK    | Nr. | <b>5</b>  | 04/06 (180 $\mu\text{g/ml}$ ) |
| • FLI Isolat KHV-191       | Nr. | <b>6</b>  | 05/06 (238 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>7</b>  | 06/06 (140 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>8</b>  | 09/06 (180 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>9</b>  | 11/06 (250 $\mu\text{g/ml}$ ) |
|                            |     | <b>10</b> | 12/06 (220 $\mu\text{g/ml}$ ) |
| • Thai Isolat (Vet Suisse) | Nr. | <b>11</b> | 12/06 (250 $\mu\text{g/ml}$ ) |
- Negativ-Präparation: naive KF-1-Zellkultur (380  $\mu\text{g/ml}$ )

## 1.8 Probenherkünfte, -gewinnung und Untersuchungsregime

Für die gesamte Untersuchung im ELISA standen 210 Fische aus verschiedenen Bundesländern mit ganz unterschiedlicher Historie zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Untersuchungsreihen mit verschiedenen Fragestellungen durchgeführt:

- I. Statusvalidierung anhand ausgewählter Koi-Hobbyteiche
- II. Verlaufsuntersuchung bei Fischen aus einem Teich mit KHV-Historie
- III. Stuserhebung im Rahmen eines freiwilligen Monitorings

Das für diese Studie eingesandte Probenmaterial waren lebende Zucht- bzw. Speisekarpfen sowie Tierkörper aus privaten kleineren oder rein kommerziellen Fischzuchten und Teichwirtschaften und Koi aus Privathaltungen in Bayern und anderen Bundesländern.

Aufgrund der mitgelieferten Vorberichte zur Bestandshistorie mit möglichen Hinweisen auf einen KHV-Ausbruch in der Vergangenheit und eventuell zurückliegende PCR-Untersuchungen der Bestände konnte eine erste Einteilung in „erwartet positive“, „erwartet negative“ Populationen und Populationen mit „unbekanntem“ KHV-Status vorgenommen und daraufhin nach möglichen Antikörpern gesucht werden.

Für die Untersuchungsreihe I stand nur Serum zur Untersuchung im ELISA zur Verfügung.

### **I. Statusvalidierung anhand ausgewählter Koi-Hobbyteiche**

In der ersten Untersuchungsreihe sollte überprüft werden, inwieweit es möglich ist, mit dem serologischen Test „KHV-positive Teiche“ von „Teichen ohne KHV-Historie“ zu unterscheiden. Hierzu wurden insgesamt 50 Blutproben aus 10 privaten Koi-Haltungen (1 – 10) untersucht. Der Teich 5 setzte sich aus 3 getrennten Einzelteichen (5/1-3) zusammen, wodurch sich rechnerisch eine Beprobung von insgesamt 12 Teichen ergab. Die Blutproben wurden im Oktober 2005 durch einen Tierarzt gewonnen, zentrifugiert und das Serum in gefrorenem Zustand an unser Labor geschickt.

Laut den Vorberichten, die für jeden Teich vorhanden waren, gab es in etlichen Teichen KHV-Ausbrüche in der Vergangenheit. Diese Infektionsgeschehen wurden mittels PCR-Untersuchungen durch andere Labors attestiert. Daraus resultierte eine „Einstufung“ der Teiche.

In nachfolgender *Tabelle 3* sind die Untersuchungsteiche nach bestimmten Parametern charakterisiert.

Teich	aktuelle Bestandsgröße	untersuchte Tiere			Vorbericht			
		Anzahl/Art	Alter	Größe/Gewicht	KHV-Ausbruch	Diagnostik	Mortalität	Infektion nach Neuzugang
1	15 Koi	6 Koi	3 Jahre	---	ja	Klinik PCR	20 %	ja
2	3 Koi 1 Stör	3 Koi 1 Stör	3 Jahre	45 – 45 cm	ja	Klinik PCR	55 %	ja
3	10 Koi 1 Stör 1 Hybrid	6 Koi 1 Stör 1 Hybrid	---	45 – 60 cm 80 cm 20 cm	ja	Klinik PCR	58 %	ja
4	17 Koi + Goldfische	3 Koi 1 Goldfisch	---	20 – 35 cm 20 cm	ja	Klinik PCR	82 %	ja
5/1	---	2 Koi	---	---	ja	Klinik PCR	60-70 %	---
5/2	2 Koi	2 Koi	---	---	nein	---	---	---
5/3	2 Koi	2 Koi	---	---	ja	---	---	---
6	---	4 Koi	5 – 10 Jahre	2,5 – 10 kg	ja	Klinik PCR	80 %	ja
7	13 Koi	5 Koi	---	50 – 70 cm	ja	Klinik PCR	50 %	ja
8	---	4 Koi	2 – 4 Jahre	1 – 7 kg	ja	Klinik PCR	5 %	---
9	29 Koi + Goldfische	4 Koi	3 – 5 Jahre	1 – 2,5 kg	nein	---	---	---
10	10 Koi	4 Koi	---	25 – 40 cm	nein	---	---	---

--- = keine Angaben

*Table 3.:* Charakterisierung der Untersuchungsteiche

Laut Vorbericht hatten 9 der 12 Teiche (Teich 1-5/1, 5/3-8) einen KHV-Ausbruch in der Vergangenheit gehabt. Bei drei Teichen fand ein KHV-Geschehen 2004, in einem anderen Teich 2005 statt. Zwei Teiche hatten Ausbrüche 2000 und 2005 bzw. 2001, 2003 und 2005. Von drei weiteren Teichen war der Zeitpunkt der aufgetretenen KHV-Infektion nicht bekannt. Die Teiche mit einem nachgewiesenen KHV-Ausbruch wurden als „definiert positiv“ bzw. „verdächtig“ eingestuft. Hier lag die Vermutung nahe, auf Antikörper im Serum zu stoßen. Die verbleibenden 3 Teiche (Teich 5/2, 9 und 10) ohne Hinweise auf eine vorausgehende KHV-Infektion wurden als „definiert negativ“ bzw. „unverdächtig“ angesehen.

Die Bestandsgröße und die Zusammensetzung der Fischbestände der verschiedenen Teiche hat sich über die Jahre nach Aussagen des behandelnden Tierarztes verändert.

## II. Verlaufsuntersuchung bei Fischen aus einem Teich mit KHV-Historie

Für die Überwachung der Antikörperbildung in einem definierten Zeitraum standen 9 Koi aus einem KHV-positiven Bestand, die einen KHV-Ausbruch überlebt hatten, zur Verfügung.

Der gesamte Bestand von 16 Tieren kam im Oktober 2005 während einer akuten KHV-Erkrankung in die Untersuchungseinrichtung. Innerhalb von 14 Tagen verstarben 7 Tiere bzw. mussten euthanasiert werden. Es wurden jeweils die Organe entnommen, gepoolt und in der PCR auf KHV-Genom untersucht sowie eine Verreibung dieser Organpools in der Zellkultur angezüchtet.

Die klinischen Anzeichen, die an den erkrankten Fischen beobachtet werden konnten, stimmten überein mit denen, die von Hedrick et al. (2000) und von Ronen et al. (2003) sowie von deutschen Wissenschaftlern (Bretzinger et al., 1999; Hoffmann, 2000) als typische Anzeichen einer KHV-Erkrankung beschrieben wurden.

Die überlebenden Tiere waren zu Beginn der Untersuchung klinisch gesund und es konnte auch kein Ausbruch einer KHV-Infektion im Versuchszeitraum festgestellt werden.

Während der wärmeren Monate (Mai-September) erfolgte die Hälterung der Fische in einem unbeheizten Außenbecken mit ständigem Frischwasserzulauf, so dass die Wassertemperatur auch im Sommer nicht über 18°C anstieg. Zur Überwinterung wurden die Tiere in Durchlaufaquarien im Innengebäude gehalten, hier lag die Wassertemperatur im Bereich von 8-12°C. Die Fütterung erfolgte entsprechend dem jahreszeitlichen Biorhythmus mit handelsüblichem, pelletiertem Koifutter.

Von den Tieren wurde für die Zeit-Reihen-Untersuchung/Verlaufsuntersuchung über einen Zeitraum von 10 Monaten (Nov.-Aug.) an 7 Entnahmetermenen Blut genommen und das Serum innerhalb von 48 h im ELISA untersucht sowie jeweils eine Kiementupferprobe zur Anzucht in der ZK und für die PCR-Untersuchung gewonnen. Aus dem Blut wurde ebenfalls die Leukozytenfraktion gewonnen und molekularbiologisch untersucht.

Da die Tiere aufgrund ihrer Farbzeichnung individuell unterscheidbar waren, wurden sie der Einfachheit halber im Folgenden mit den Buchstaben A-I benannt.

Für die Blutentnahme wurden die Tiere in ein Betäubungsbad (MS 222) verbracht und anschließend nach üblicher Praxis das Blut entnommen. Anschließend wurden sie in ein Becken mit Frischwasser überführt und nach Erlangung ihrer Vitalität wieder in das Hälterungsbecken entlassen.



### III. Stuserhebung im Rahmen eines freiwilligen Monitorings

Die Anzahl der an dieser Untersuchungsreihe freiwillig teilnehmenden Betriebe stellte nur eine kleine Auswahl teichwirtschaftlicher Betriebe dar. Diese Untersuchung kann somit die Praxistauglichkeit des Tests zur Stuserhebung in Teichen zunächst nur in kleinerem Umfang überprüfen, aber als Modell für künftig zu planende, flächendeckende Monitorings dienen. Es konnten 19 kommerzielle Betriebe und Hobbybetriebe einbezogen werden. In den untersuchten Betrieben wurden 12 reine Karpfenteiche, 3 Koiteiche und 4 Teiche mit gemischter Population (Karpfen, Koi und andere Cypriniden) beprobt. Die Probeneinsendungen erfolgten durch die Betriebe auf freiwilliger Basis, so dass auf die Anzahl der zur Verfügung gestellten Proben kein Einfluss bestand und die Probengröße zwischen den Betrieben variierte.

Insgesamt wurden 180 Serum- und Organproben bzw. Leukozytenproben aus bayerischen Betrieben und 30 aus anderen Bundesländern (Sachsen, Baden-Württemberg, Hessen und Nordrhein-Westfalen) im Zeitraum August - Dezember 2005 untersucht (Tab. 4).

<b>Bundesland/ Regierungsbezirk</b>	<b>Probenanzahl n Fische</b>	<b>n untersuchte Betriebe</b>
<b>Bayern</b>	<b>180</b>	<b>19</b>
Unterfranken	10	1
Mittelfranken	58	6
Oberfranken	16	2
Oberbayern	30	2
Schwaben	12	1
Oberpfalz	54	3
<b>Sachsen</b>	<b>11</b>	<b>1</b>
<b>Baden-Württemberg</b>	<b>9</b>	<b>1</b>
<b>Nordrhein-Westfalen</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Hessen</b>	<b>7</b>	<b>1</b>

Tabelle 4: Herkunft der untersuchten Proben

## **2 Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 KF-1-und CCB-Zellkultur**

Zur Vermehrung und Titration des KH- Virus wurde die KF-1-Zellkultur, durch Hedrick et al. (2000) aus dem Flossengewebe von Koikarpfen isoliert, von der Zellbank des FLI, Insel Riems mit entsprechender Subkulturpassage erworben. Ein Teil der Zellen wurde nach erfolgreicher Vermehrung kryokonserviert, während die verbleibenden Zellen fortlaufend passagiert wurden.

Die ausgewachsenen Zellkulturen wurden nach Dichtwachsen entweder mit Virusmaterial beimpft oder subkultiviert.

Für die Virusisolierung stand ebenfalls eine CCB- Zelllinie (Neukirch et al., 1999) der Zellbank des FLI, Insel Riems zur Verfügung. Diese Zellkultur wurde über mehrere Passagen subkultiviert, ein Teil kryokonserviert und ebenfalls zur Virusisolierung verwendet.

#### **2.1.2 Kryokonservierung**

Für eine langdauernde Konservierung der Zellen durch Tiefgefrieren wurde den Zellen 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Konservierungsmittel zugegeben, um die Kristallisationsgeschwindigkeit zu verändern und im kritischen Temperaturbereich, der mit 0 bis -46°C angegeben ist (Mayr et al., 1974), die Kristallbildung des Wassers zu verhindern.

Für die Zellkonservierung wurden zwei dicht bewachsene 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen geerntet, um 6 Röhrchen mit je 1 ml Zellsuspension zu erhalten. Dazu wurden die Flaschen mit der Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) gespült, anschließend verblieben 1 ml auf dem Zellrasen, bis die Zellen sich durch Abklopfen lösten. Die Zellsuspensionen wurden zusammen in 6 ml Anzuchtmedium (MEM mit 10 % FKS, 5 % DMSO) aufgenommen und die Kryoröhrchen mit jeweils 1 ml befüllt. Anschließend wurden die Röhrchen in einen Nalgene™ Freezing Container verbracht, der die Temperatur mittels Isopropylalkohol bei -70°C über Nacht um 1°C pro Minute herunterkühlte, so dass die gefrorenen Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt werden konnten.

Tiefgefrorene Zellen wurden in Behältern mit flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen sofort nach der Entnahme aus dem Kühlbehälter in ein Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) für ca. 1 min gebracht, um so eine Kristallbildung in den Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen aus 2 Röhrchen ( $2 \times 1 \text{ ml}$ ) mit Medium verdünnt, zentrifugiert ( $800 \times g$ , 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand mit dem zelltoxischen DMSO entfernt, das Zellpellet in Medium (MEM mit 10 % FKS) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) eingesät. Eine Sterilitätskontrolle erfolgte durch Kultivierung des Zellkulturmaterials auf Columbia-Agar mit 5 % defibriniertem Schafblut und Sabouraud-Agar mit 2 % Glukose (Fertignährböden, Oxoid). Die Bebrütung erfolgte bei  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Columbia-Agar) bzw.  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Sabouraud-Agar) über 48 bzw. 72 h.

### **2.1.3 Kultivierung der Zellen**

Die naiven KF-1 Zellen wurden bei  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in MEM mit einem Zusatz von 10 % FKS in speziellen Zellkulturflaschen (Cellstar) mit unterschiedlicher Wachstumsflächengröße ( $25$ ,  $75$  und  $175 \text{ m}^2$ ) im Brutschrank kultiviert. Dem Medium wurden zuvor jeweils 1 % der folgenden Supplemente zugesetzt: Penicillin/Streptomycin, Partricin, NEA, HEPES und Natriumcarbonat sowie L-Glutamin.

### **2.1.4 Subkultivierung der Zellen**

Zur Erhöhung der Zellausbeute und für die Virusvermehrung wurde ein Anteil der Zellen nach 4-6 Tagen mit einer Teilungsrate von 1:2 subkultiviert.

Im Abstand von 10 Tagen wurden die verbleibenden Zellen umgesetzt, um durch fortwährende Zellteilung dem Altern und Degenerieren der Kulturen vorzubeugen. Derartig passagierte Kulturen erhielten entsprechend der Flaschengröße nur Erhaltungsmedium (MEM mit obigen Zusätzen und 5 % FKS).

Zum Ansatz einer Zellpassage wurde das Kulturmedium abgenommen und mit PBS (enthält 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Partricin) gespült. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer an die Flaschengröße angepassten Menge ( $0,5$ - $4 \text{ ml}$ ) Trypsin/EDTA-Lösung ( $0,05 \%$ / $0,02 \%$ ) bei Raumtemperatur ( $22$ - $25^{\circ}\text{C}$ ) inkubiert. Nach 2-5 Minuten lösten sich die Zellen

vom Gefäßboden ab. Eine Menge von 10 ml Zellkulturmedium wurde zugegeben, die Zellen durch wiederholtes Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und anschließend im Verhältnis 1:2 geteilt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Schließlich wurden die Flaschen mit einer entsprechenden Menge an bereitgestelltem Medium (z.B. 6 ml Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> Flasche) aufgefüllt.

### **2.1.5 Zellzählung**

Für die Bestimmung der Zellkonzentration und zum Einstellen eines gewünschten Zellgehalts (z.B. 50000 Z/ml für 25 cm<sup>2</sup>) für die Neu-Beimpfung von ZK-Flaschen bzw. für die Virustitration wurde die Zählung mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Vor der Zählung wurde die Suspension kräftig mit einer Pipette durchgemischt, damit sich die Zellaggregate auflösen konnten. Aus drei getrennten Zellzählungen wurde der Mittelwert berechnet. Die gezählte Zellzahl pro ml, dividiert durch die gewünschte Zellzahl, ergab den entsprechenden Verdünnungsfaktor. Für eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> wurde eine Anzahl von ca.  $6,6 \times 10^6$  Zellen ermittelt.

Für die Vitalitätsprüfung wurde 1 ml Zellsuspension einer Flasche (25 cm<sup>2</sup>) mit 1 ml einer 0,25 %igen Trypanblaulösung und 1 ml Medium gemischt und unter dem Mikroskop mit 400-facher Vergrößerung sofort gezählt. Angefärbte, folglich abgestorbene Zellen wurden nicht mitgezählt.

## **2.2 Virus**

### **2.2.1 Charakterisierung der Virusisolate**

#### *Isolat 1*

Für sämtliche Untersuchungen wurde ein Koi-Herpesvirusisolat verwendet, welches nach sechsmaliger Passagierung in der CCB Zellkultur vom FLI, Riems unter der Nummer KHV-191 (Virustiter 10<sup>5</sup>/ml) zur Verfügung gestellt wurde. Das ursprüngliche Stammreferenzvirus ist ein Isolat aus Koi nach einem KHV-Ausbruch in Israel (Hedrick et al., 2000). Dieses Isolat wurde zur Verwendung im ELISA-Test vermehrt und auch als positives Kontrollvirus in der PCR eingesetzt.

### *Isolat 2*

Über eine Anzüchtung in KF-1-Kulturen einer Organverreibung eines mit KHV thailändischer Herkunft experimentell infizierten Karpfens, zugesandt vom Institut für Tierpathologie der Vetsuiss-Fakultät der Universität Bern, konnte das Koi-Herpesvirus vermehrt und experimentell untersucht werden. Dieses Virusisolat kam vor allem bei der ELISA-Validierung als Vergleichsvirus zum Einsatz.

### *Isolat 3*

Zur Überprüfung des ELISA-Protokolls und der Reaktionsbedingungen im Institut wurde mit einem englischen Virusisolat (KHV D-132 UK) und Kontrollseren von Cefas, Weymouth der ELISA-Test mit ausgewählten Proben durchgeführt und anschließend die erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen unseres Kooperationspartners verglichen.

## **2.2.2 Virusanzucht**

### **2.2.2.1 Verimpfen von Organmaterial in der Diagnostik**

Die Anzucht der Organverreibung des mit einem thailändischen KH-Virus infizierten Karpfens und von Organmaterial- bzw. Kiementupferproben, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, erfolgte auf KF-1 Zellen. Die Zellen wurden bei  $24\pm 1^\circ\text{C}$  mit Viruserhaltungsmedium (FKS 2 %) im Brutschrank kultiviert.

Dazu wurde frisches oder eingefrorenes Organmaterial (Leber, Niere, Gehirn, Kiemen) mit einer Schere zerkleinert und mit sterilem Seesand und 10 ml PBS, das jeweils 1 % eines AB-Gemisches und Partricin enthielt, versetzt und in einem Mörser verrieben. Das Homogenat wurde anschließend bei  $3000 \times g$  für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Dieser Überstand und auch die Aufschwemmung des Kiementupfers wurde mittels eines Spritzenfilters ( $0,2 \mu\text{m}$ ) sterilfiltriert. Anschließend wurden Verdünnungen des Filtrats von  $1: 10^1$  und  $1: 10^2$  hergestellt und jeweils  $200 \mu\text{l}$  der Suspensionen (unverdünnt,  $1: 10^1$ ,  $1: 10^2$ ) im Doppelansatz in Zellkulturröhrchen, die einen 2-Tage alten KF-1 Zellrasen und 2 ml Medium enthielten, gegeben und im Brutschrank bei  $24\pm 1^\circ\text{C}$  bebrütet. Pro Charge wurden jeweils zwei unbeimpfte Kulturen (Negativkontrolle) zeitgleich bebrütet. Die Kulturen wurden täglich auf die Ausbildung eines CPE mittels eines Phasen-Kontrastmikroskops untersucht. Dabei wurde die Zytotoxizität des Untersuchungsmaterials berücksichtigt. Wenn zytotoxische Wirkungen

(sie treten gewöhnlich schon nach kurzer Zeit p.i. auf) zu verzeichnen waren, wurde zur Identifikation des Virus eine PCR durchgeführt und Zellen mit dem Medium in einer höheren Verdünnungsstufe subkultiviert.

Wenn nach 14 d kein zytopathogener Effekt zu verzeichnen war, wurde die Stammkultur mit dem Überstand und einem Zusatz an frischem Medium in entsprechend größeren ZK-Flaschen erneut subkultiviert.

Nach Ausbildung eines CPE und dem Gewinnen der Virussuspension wurde das PCR-Protokoll (*Kap. 2.3*) und teilweise auch die Elektronenmikroskopie zur Virusidentifikation angewendet.

#### **2.2.2.2 Verimpfen von Virusisolat zur Virusvermehrung**

Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurde das Virusisolat KHV-191 geerntet und gereinigt.

Die initiale Portion Virusisolat (1,5 ml) wurde nach Erhalt vom FLI, Riems in Portionen zu je 100 µl aufgeteilt, die einzeln je nach Bedarf zur Inokulation von naiven Zellkulturen verwendet wurden.

Nach erfolgreicher Virusvermehrung wurde die Virusernte zur Hälfte gereinigt und für den ELISA, die andere Hälfte für die erneute Anzucht verwendet. Eine Virusanzucht wurde als gelungen angesehen, wenn innerhalb von einer Woche ein CPE erschien. Nach einer Ausbreitung von 80-90 % wurde die infizierte Kultur geerntet.

Für die Beimpfung wurden möglichst junge Zellkulturen mit konfluentem Zellmonolayer verwendet.

Zu Beginn wurden die Zellen direkt mit einer geringen Menge des Virusisolats beimpft (0,5 ml/Flasche 75 cm<sup>2</sup>), während in der Folgezeit naive Zellkulturen ausschließlich mit der geernteten, virushaltigen Zellsuspension beimpft (75 cm<sup>2</sup>/3 ml) wurden [von der OIE (2003b) für die Verimpfung von CCV empfohlene Inokulummenge: 100 µl pro 2 cm<sup>2</sup>].

Vor einer Infektion wurde das Anzuchtmedium abgegossen und die Kulturen mit PBS (enthielt 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Partricin) gewaschen, um Serumreste zu entfernen.

Nach Zugabe der Virussuspension direkt auf den Zellrasen und Adsorption des Inokulums für ca. 0,5-1h bei RT unter vorsichtigem Schwenken wurden die Zellkulturflaschen mit Viruserhaltungsmedium (2 % FKS) versetzt und bei  $24\pm 1^\circ\text{C}$  im Brutschrank bebrütet.

Die Zellkulturen wurden täglich mikroskopisch auf morphologische Veränderungen kontrolliert.

Wenn nach Ausbildung eines CPE mindestens 80 % des Monolayers von den Veränderungen betroffen waren, wurden die Zellkulturflaschen geerntet, die noch verbliebenen und anhaftenden Zellen mechanisch abgeklopft und das so gewonnene virushaltige Medium anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  über Nacht gelagert.

Nach dem Auftauen bei RT wurde der Inhalt mehrerer Flaschen vereinigt, bei  $3500 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand erneut bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

Ausgehend von dieser Prozedur konnte so eine größere Menge an infizierter Zellkultur gewonnen, gereinigt und für den ELISA-Test bereitgestellt werden.

### **2.2.2.3 Verimpfen der Leukozytenfraktion**

Die aus dem Vollblut über dem Percoll-Gradienten gewonnene Leukozytenfraktion wurde mit PBS so verdünnt, dass Verdünnungen von  $1: 10^1$  und  $1: 10^2$  erhalten wurden. Mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Suspensionen (unverdünnt;  $1: 10^1$  und  $1: 10^2$ ) wurden im Doppelansatz Zellkulturröhrchen mit 2-Tage altem KF-1-Monolayer und 2 ml Medium beimpft und im Brutschrank bei  $24\pm 1^\circ\text{C}$  bebrütet. Pro Charge wurden jeweils zwei unbeimpfte Kulturen (Negativkontrolle) zeitgleich bebrütet. Die Kulturen wurden täglich auf die Ausbildung eines CPE mittels eines Phasen-Kontrastmikroskops untersucht.

### **2.2.3 Virustitration für KHV-191**

Die Virustitration wurde in Anlehnung an die Endpunktverdünnungsmethode nach Kärber (1931) mit dem KHV Isolat 1 in der Mikrotiterplatte durchgeführt.

Bei dieser Methode wurden log 10-Verdünnungen ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) einer Virussuspension und eine Zellsuspension (150.000 Z/ml) auf einer 96-well Platte ausgebracht und die positiven und negativen Reagenten bestimmt, indem über die Häufigkeit eines zytopathogenen Effekts (positives Ergebnis) die Auswertung vorgenommen und die mittlere Infektionsdosis anhand der sichtbaren Viruswirksamkeit auf 50 % der Zellen ( $\text{KID}_{50}$ ) geschätzt wurde. Dabei wurde

die Verdünnung so angegeben, dass die Hälfte der Plattenvertiefungen ein positives Ergebnis, die andere Hälfte ein negatives Ergebnis ergab. Dabei wurde die höchste Verdünnung der Virussuspension ermittelt, wo sich in Kulturen ein zytopathogener Effekt zeigte.

Da das Auftreten eines CPE laut Hedrick et al. (2000) in der Regel nicht vor 7 Tagen bei einer Bebrütungstemperatur von 20°C zu erwarten ist, wurden die Platten mit einer atmungsaktiven Folie verklebt und in einer feuchten Kammer über einem mit einer 1 % igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung angefeuchteten Tuch zur Unterdrückung des Wachstums von Mikroorganismen bei 24°C inkubiert. Der Zellrasen wurde täglich mikroskopisch auf Veränderungen, wie Ablösung und Abkuglung von Zellen, Plaquelöcher im Zellrasen bzw. Verfärbungen des Zellkulturmediums überprüft.

#### **2.2.4 Virusisolierung und Präparation**

Zur Pelletierung des Virus wurde nach Auftauen der Überstand bei 28000 x g 1h in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Viruspellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und auf eine 10-60 % (w/w) Saccharose-Gradientensäule geladen. Durch Zentrifugieren bei 28000 x g für 1h bei 4°C konnte das Virus konzentriert werden. Die sichtbare weiß-bläuliche Bande bei einem Saccharoseanteil von 40-50 % im Gradientenröhrchen, worin nach Angaben von Beevers (2004) der höchste Virusanteil zu erwarten ist, wurde mit einer Einwegspritze abgezogen und der Proteingehalt bestimmt.

##### *Herstellung des Saccharosegradienten*

Jeweils 100 ml Saccharoseverdünnungen von 10, 20, 30, 40, 50 und 60 % wurden mit PBS (w/w) hergestellt. Anschließend wurden 1 ml jeder Verdünnung, beginnend mit der geringsten Verdünnung, in einem Gradientenröhrchen mit einer Pipette übereinander geschichtet und so der Gradient hergestellt.

Für jede Viruspräparation wurden die Saccharoseverdünnungen neu angesetzt.

##### *Quantifizierung des Virusproteins*

Zur Bestimmung der Menge an Virusprotein nach der Aufreinigung über den Saccharosegradienten wurde ein BCA Protein Assay Kit TM (PIERCE LTD) verwendet. Als



Standard diente eine Lösung aus Bovinem Serum Albumin von 2000 µg/ml. Verschiedene Verdünnungen dieser Stammlösung wurden als weitere Standards mit PBS hergestellt (1500, 1000, 750, 250, 125 und 0 µg/ml). In die Kavitäten einer MTP wurden jeweils im Doppelansatz 25 µl der verschiedenen Standardkonzentrationen hineinpipettiert. 25 µl der Viruslösung wurden ebenfalls in 2 Kavitäten gegeben. Um eine Referenzfarbe zu erhalten, wurde das in dem Kit enthaltene *Reagenz A* im Verhältnis von 50:1 zu dem ebenfalls enthaltenen *Reagenz B* gemischt und jeweils 200 µl des leicht grünlichen Testgemisches in jede der Kavitäten gegeben. Anschließend wurde die Platte bei 37°C für 45 min inkubiert. Durch einen Farbumschlag (violett) wird das Vorliegen von Protein angezeigt. Die Extinktion (Optische Dichte) wurde in einem Photometer bei 450 nm gemessen und die Rohdaten mit der Anwendersoftware (Magellan) bearbeitet und bewertet. Die ermittelten Werte wurden mit Hilfe einer Standardkurve geblottet und die Menge des vorhandenen Proteins angegeben. Anschließend lässt sich durch entsprechende Verdünnungsschritte die gewünschte Virusproteinkonzentration zum Beschichten der Platten einstellen. Die in dieser Arbeit verwendete Arbeitskonzentration betrug 10 µg/ml.

### **2.2.5 Leukozytengewinnung**

Das in heparinisierten Gefäßen gewonnene Blut wurde im Verhältnis von 1:6 mit kaltem Zellkulturmedium ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), versetzt mit Baytril (1 ml/500 ml), unter Zusatz von 10 % FKS gemischt. Zwei Teile des Gemischs wurden nun über einen Teil Percoll geschichtet und bei 4°C für 40 min bei 650 x g zentrifugiert.

Die entstehende Bande in der Interphase, bestehend aus peripheren Blutleukozyten (PBL), wurde gesammelt. Dabei sollte so wenig Percoll wie möglich mit abgezogen werden. Es wurde 2 x mit Medium gewaschen und jeweils zentrifugiert (200 x g, 4°C, 5-10 min). Anschließend wurde die Vitalität der Zellen in der Zählkammer mittels Trypan-Blau-Färbung (0,5 % ig) überprüft.

Die Leukozytenfraktion wurde anschließend auf das Vorhandensein von KHV-Antigen in der PCR mit der Gilad-Methode (Gilad et al., 2002) getestet bzw. für die Anzucht in der Zellkultur bereitgestellt.

## 2.3 Molekularbiologischer Nachweis von KHV

Die PCR für das Koi-Herpesvirus diente zum molekularbiologischen Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen der Spezies KHV in Organen, Zellkulturüberständen und in den Leukozytenfraktionen.

Aus Probenmaterial wurde mittels geeigneter Methoden DNA (*Kap. 2.3.2*) extrahiert. Die Amplifizierung der gesuchten DNA-Sequenz erfolgte mittels geeigneter Primer (*Kap. 2.3.4.2*) im Thermocycler unter standardisierten Bedingungen. Zum Nachweis der Bildung von PCR-Produkten wurden die PCR-Gemische anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und mittels Längenstandard auf die erwarteten Produktgrößen überprüft.

Um Kontaminationen weitgehend auszuschließen, waren die Arbeitsschritte DNA-Extraktion, PCR-Ansatz und Analyse der PCR-Produkte räumlich getrennt, für jeden Arbeitsschritt wurden eigene Pipettensets verwendet.

### 2.3.1 Probengewinnung

Für die PCR wurde sowohl eingesandtes Organmaterial als auch Organe und Blut gestorbener bzw. euthanasierter und am Institut sezierter Fische verwendet.

Dabei handelte es sich sowohl um Fische, die mit klinischen Krankheitssymptomen eingeliefert wurden, als auch um solche, die zur Routinekontrolle kamen und daher klinisch völlig unauffällig waren.

Zum Töten der Fische wurde 1g des Narkosemittels MS 222 auf 1l Wasser verwendet. Die Tiere wurden in das Narkosebad eingesetzt und abgewartet, bis keine Atembewegungen mehr sichtbar waren.

Nachdem den Tieren durch Punktion der kaudalen Hohlvene Blut abgenommen wurde, erfolgte die endgültige Entblutung durch einen Kiemenschnitt. Aus dem aufgefangenen Blut wurden später die Leukozyten gewonnen und für die Anzucht in der Zellkultur und für die PCR bereitgestellt (*Kap. 2.2.5*).

Bei allen Fischen wurden im Zuge einer Sektion innerlich und äußerlich abweichende Befunde der Haut, Kiemen und inneren Organe erhoben. Gehirn, Leber, Niere, Milz und ein Kiemenstück wurden der virologischen Untersuchung (Anzucht und PCR) zugeleitet. Das Untersuchungsmaterial wurde entweder bis zur unmittelbaren Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt oder längerfristig bei -20°C gelagert.

Gewebeproben von Karpfen ohne KHV-Historie (SPF-Tiere, FLI Riems) wurden aufgereinigt und als negative Kontrolle in der PCR mitgeführt.

Da in einigen Fällen als Untersuchungsmaterial nur Blut zur Verfügung stand, wurden hier in der PCR ausschließlich die Leukozyten untersucht.

Von den institutseigenen Testfischen (Untersuchungsreihe II) wurden neben der Blutprobe für die Leukozytengewinnung am selben Tag auch Kiementupfer gewonnen.

Die Kiementupferproben wurden in Medium aufgeschwemmt, die erhaltene Suspension sterilfiltriert und zur Anzucht auf die Zellkultur gegeben und zusätzlich in der PCR auf das Vorhandensein von Virus-Genom untersucht.

### **2.3.2 DNA Extraktion**

#### *Extraktion von Organmaterial (1)*

Organmaterial (Kiemen, Leber, Niere, Milz und Gehirn) gefroster oder frisch getöteter Fische wurde entnommen, in einem Mörser homogenisiert und ca. 25 mg davon nach dem Protokoll vom QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit „Extraktion von DNA aus tierischen Organen, Geweben und Kulturmaterial“ aufgereinigt. Dazu wurden zu dem zerkleinerten Material in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen 180 µl ATL-Puffer (Gewebe-Lyse-Puffer) und 20 µl Proteinase K gegeben und bei 56°C bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Anschließend wurde die Probe nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer (Lyse-Puffer) für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %ig) und Vortexen für einige Sekunden wurden maximal 700 µl der Probe auf eine Säule („spin column“) aufgetragen und bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, auf die Säule 500 µl Waschpuffer 1 gegeben und bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats wurden bei einem 2. Waschschrift 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und bei 20000 x g für 1 min zentrifugiert. Wiederum wurde das Filtrat verworfen. Zur Eluierung der DNA wurden nun 200 µl des Eluierungspuffers AE gegeben. Nach einer Inkubation bei RT für eine Minute wurde die Probe bei 6000 x g zentrifugiert. Ein Teil des gewonnenen Eluats wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, der Rest bei -20°C gelagert.

*Extraktion von Zellkulturüberstand / Blut bzw. Leukozyten (2)*

Infiziertes Zellkulturmaterial aus der diagnostischen Virusisolierung wurde nach Protokoll (2) aufgereinigt.

Zur DNA-Extraktion wurde für Zellkulturüberstand/ Blut bzw. Leukozyten der QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit von Qiagen verwendet.

In ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen wurden entsprechend der Herstellerangaben (Protokoll zur „Aufreinigung von DNA in Blut und Flüssigkeiten“) 20 µl Proteinase K pipettiert. Dazu wurden 200 µl des Überstandes bzw. der Leukozytenfraktion gegeben. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer und Vortexen für 15 sec wurde das Gemisch für 10 min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 % ig) und Vortexen für einige Sekunden wurden maximal 700µl der Probe auf eine Säule („spin column“) aufgetragen und bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, auf die Säule 750 µl Waschpuffer 1 gegeben und bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats wurden bei einem 2. Waschschrift 750 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und bei 20000 x g für 1 min zentrifugiert. Wiederum wurde das Filtrat verworfen. Zur Eluierung der DNA wurden 200 µl des Eluierungspuffers AE zugegeben. Nach einer Inkubation bei RT für eine Minute wurde die Probe bei 6000 x g zentrifugiert. Ein Teil des gewonnenen Eluats wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, der Rest bei -20°C gelagert.

**2.3.3 Spektroskopische Bestimmung der DNA Konzentration**

Um die Empfindlichkeit der eingesetzten PCR-Methode zu überprüfen, wurden DNA-Konzentrationen der Positivkontrolle in verschiedenen Verdünnungsstufen spektroskopisch ermittelt. Dazu wurde die Optische Dichte mit dem BioPhotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260-280 nm gemessen. Die Messung wurde mit einem Küvettenvolumen von 60 µl vorgenommen. Dafür wurden 10 µl DNA-Lösung bzw. des PCR-Produkts mit 50 µl Eluierungspuffer (AE-Puffer oder Wasser) verdünnt.

Für DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

### 2.3.4 PCR-Ansatz

Der Nachweis des Virus-Genoms aus dem extrahierten Gewebe von Diagnostikproben und speziellen Projektproben erfolgte hauptsächlich mittels eines Oligonukleotid-Primer-Sets nach Gilad et al. (2002) und unter Berücksichtigung einer modifizierten Verfahrensanweisung nach Gaede (2005, persönliche Mitteilung), Landesuntersuchungsamt für Gesundheits-, Umwelt- und Verbraucherschutz, LAV Sachsen-Anhalt, Stendal.

Die für die PCR erforderlichen Reaktionslösungen wurden in der Regel aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Da die PCR eine sehr empfindliche Nachweismethode darstellt, die falsch-negative wie auch falsch-positive Ergebnisse produzieren kann (OIE, 2003a), wurde eine negative Kontrolle (naive Zellkultur, Organpool von SPF-Karpfen) und eine Reagenzienkontrolle (alle Bestandteile des Mastermix plus Wasser) zusammen mit den zu untersuchenden Proben extrahiert und dem PCR-Programm unterzogen. Ebenfalls wurde eine Positivkontrolle (Virusisolat) mitgeführt.

#### 2.3.4.1 Herstellung des Mastermix

Für jede Probe wurde ein Mastermix (20  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz) hergestellt:

- 14,75  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 2,5  $\mu\text{l}$  PCR-Puffer
- 0,5  $\mu\text{l}$  dNTP
- 1,0  $\mu\text{l}$  Primer 1 (KHV 9-5F, 10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 1,0  $\mu\text{l}$  Primer 2 (KHV 9-5R, 10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 0,25  $\mu\text{l}$  Polymerase (Hot Star Taq DNA Polymerase, Qiagen)

Dafür wurde die Primer-Stammlösung (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) entsprechend verdünnt, um die gewünschte Arbeitskonzentration (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) zu erhalten.

Eine Desoxynukleotid-triphosphat (dNTP)-Lösung, die dATP, dCTP, dGTP, dTTP ( $\Sigma$  dNTP) enthalten soll, wird aus den Einzelbestandteilen (jeweils  $c=10$  mmol/l) hergestellt.

Die DNA-Polymerase wurde während der Vorbereitungen im Eisrack aufbewahrt, um ihre Stabilität zu gewährleisten.

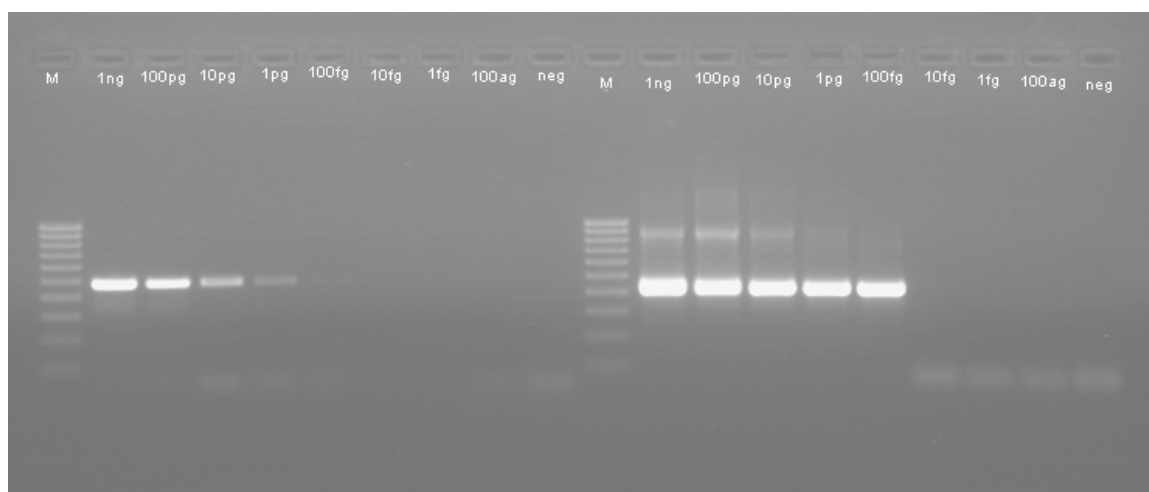
Der fertiggestellte Mastermix wurde anschließend kurz anzentrifugiert, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln, und dann in die einzelnen Ansätze aufgeteilt.

#### 2.3.4.2 Amplifikation der DNA

Zu 20 µl Mastermix wurden 5 µl der zu untersuchenden Probe pipettiert und die Zielsequenz der Virus-DNA im Thermocycler vervielfältigt.

Zur Erhöhung der Spezifität beim Nachweis der KHV-DNA unterhalb des Detektionslimits von 1 pg Virus-DNA/100 ng Wirts-DNA bei der Single-Primer-PCR nach Gilad et al. (2002) und zur Bestätigung *fraglicher*/positiver Proben wurde eine zweite PCR mit dem Reaktionsprodukt der ersten PCR als „template“ angewandt. Dazu wurden geschachtelte (inner primer), die innerhalb des zuerst mit äußeren Primern (outer primer) amplifizierten Fragments liegen, eingesetzt. Die Primer für diese Nested-PCR wurden von S. Bergmann (FLI, Insel Riems) auf der Grundlage der Gilad-Primer entwickelt.

Die nachfolgende *Abbildung 6* zeigt Verdünnungsreihen der Virus-DNA-Konzentration von unverdünnt bis 1:10<sup>9</sup> nach PCR-Untersuchung und elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Nachweisgrenze der Single Gilad-PCR lag bei 1 pg, die der Nested-PCR bei 100 fg.



*Abbildung 6:* Nachweisgrenzen der Single-PCR (li) und der Nested-PCR (re)



### 2.3.4.3 PCR-Analyse

Bei der Agarose-Elektrophorese trennen sich die in der PCR amplifizierte DNA-Fragmente aufgrund der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe auf. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols.

Durch das bereits dem Gel zugegebene Ethidiumbromid, das sich zwischen die Basen des DNA-Doppelstranges einlagert und den Abstand der beiden Stränge zueinander verändert, konnte die Auftrennung durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Um die Größe des PCR-Produkts abschätzen zu können, wurden geeignete Molekulargewichtsmarker analog zu den zu untersuchenden DNA-Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

Nachdem sich die entsprechende Menge Agarose (für ein 1,3 % iges Gel) in der TAE-Pufferlösung durch Kochen vollständig aufgelöst hatte, wurde die Lösung auf etwa 60-65°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (5 µl auf 100 ml Gel) versetzt. Nach dem Gießen der Lösung auf den Gelträger und Einsetzen des Probenkammes wurde gewartet, bis das Gel erstarrt war. Der Probenkamm wurde gezogen und die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt, bis die Kontakte bedeckt waren. Es wurden jeweils 5 µl des farblosen PCR-Produkts mit 1 µl Ladepuffer zur Visualisierung gemischt und in die Probenfächer eingefüllt. Auf jedes Gel wurde sowohl eine Negativ- und/oder Reagenzienkontrolle als auch eine Positivkontrolle aufgetragen. Anschließend wurden 4 µl des DNA-Markers, der als Größenstandard diente, in eine Probenfächer gegeben.

Bei einer Stromstärke von 80 Volt betrug die Laufzeit 40 min.

Das Gel wurde in eine UV-Kammer gelegt und die entstandenen Banden mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht, mit einer digitalen Fotoeinrichtung abfotografiert und auf einen Computer übertragen.

Vor der Anzucht in der Zellkultur wurde das initiale Virusisolat KHV-191, das als Positiv-Kontrollvirus in zukünftigen PCR-Untersuchungen dienen sollte, in der PCR nach Gilad et al. (2002) bestätigt.

Das KHV-Virus-Isolat thailändischer Herkunft wurde ebenfalls nach dieser Methode bestätigt (*H, Abb. A3*).



Als positiv wurden die untersuchten Proben bezeichnet, deren Banden auf gleicher Höhe mit der Bande der Positivkontrolle lagen und somit die gesuchte DNA-Fragmentgröße von 484 bp aufwiesen (Gilad et al., 2002) [*H, Abb. A1 und 2, 4*].

Negative Proben sowie die Negativ- bzw. Reagenzienkontrolle dürfen nicht das typische Bandenmuster zeigen.

Zur Absicherung wurden die positiven PCR-Produkte sowie Produkte von Verdachtsproben, die in der ersten PCR negativ blieben, in einer zweiten PCR (Nested-PCR) nachgetestet. Die Amplifikate sollen hier 392 bp groß sein (*H, Abb. A5*).

PCR-Reaktionen, in denen die Negativ-Kontrolle ebenfalls ein Bandenmuster zeigte, wurden als kontaminationsbeeinträchtigt angesehen, nicht ausgewertet und wiederholt. Zeigte die Positivkontrolle keine typische Bande, wurde die Reaktion als fehlerhaft und unvollständig angesehen und ebenso wiederholt.

## **2.4 ELISA**

### **2.4.1 Untersuchungsmaterial**

Die für den ELISA bestimmten Fischblutproben erreichten das Institut auf postalischem Weg oder wurden selbst den eingeschickten Fischen entnommen bzw. direkt in den Testbetrieben gewonnen, in das Labor überführt und weiter verarbeitet.

Die Blutentnahme erfolgte bei den Fischen durch Herzpunktion oder Entnahme aus der kaudalen Hohlvene.

Dazu wurden die Fische in einem Betäubungsbad (MS 222, 100 mg/1l Wasser) narkotisiert und das Blut mit sterilen Einmalspritzen und Einmalkanülen (heparinisiert) entnommen. Zum Töten der Fische wurde die Dosis an dem Betäubungsmittel im Wasser erhöht (1 g/1 l). In Abhängigkeit von der Größe der Untersuchungsfische wurde Serum oder Plasma gewonnen. Bei kleinen Fischen (<100g) wurde das Blut über die kaudale Vene in heparinisierten Röhrchen gewonnen, zentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C) und das Plasma abgenommen. Bei größeren Fische konnte das Blut in Röhrchen ohne Antikoagulans aufgefangen, zentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C) und das Serum gewonnen werden.

Bei der Herzpunktion wurde die Nadel in der Medianen an der Verbindungslinie der vorderen Brustflossenränder eingestochen und schräg nach kaudo-dorsal eingeführt.

Für die Kaudalvenenpunktion wurde der Fisch in Seitenlage gebracht und etwas über der Seitenlinie in Höhe des Afters senkrecht nach unten, bis zum Erreichen der Wirbelsäule eingestochen. Durch leichtes Zurückziehen der geringfügig aspirierten Spritze konnte das Blut gewonnen werden. Durch Zentrifugieren wurde das Serum von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt und lagerte sich im Röhrchen als Überstand auf dem Zellpellet ab. Die zu untersuchenden Serumproben wurden bis zum Untersuchungszeitpunkt bei -20°C gelagert. Vollblut und hämolytisches Serum wurden nicht verwendet.

Für die Überprüfung einer möglicher Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen das cyprine Herpesvirus 1 (CyHV-1) standen 5 Seren von Karpfen zur Verfügung, die typische pathognomonische Veränderungen aufwiesen. Die Seren wurden freundlicherweise von Dr. Proske und Dr. Oberle zur Verfügung gestellt.

#### **2.4.2 Referenzproben**

Als Positivkontrolle stand ein hoch positives Serum zur Verfügung. Es wurde von Fischen eines Infektionsversuchs bei Cefas gewonnen.

Die Negativkontrolle stammte von SPF-Karpfen, die keinerlei Kontakt mit KHV hatten, und wurde vor den Belastungsversuchen gewonnen (*Kap. 1.7*). Diese negative Serumkontrolle durfte im Test in relevanten Verdünnungsstufen keinerlei Eigenreaktivität zeigen.

#### **2.4.3 Antigenpräparation**

Zur Bestimmung der Antikörperreaktion in den Seren der drei Untersuchungsmodelle I-III und in den Validierungsuntersuchungen (Ausnahme Testung verschiedener AG-Präparationen und Virus-Isolate) wurde eine einheitliche Viruspräparation FLI 2 (Isolat KHV-191, Nr. 2, 01/06) verwendet.

#### **2.4.4 Testvorbereitung**

Die Testseren wurden je nach Herkunft/Vorbericht gepoolt bzw. individuell nach Einzeltieren innerhalb von 48 h nach Erhalt bearbeitet und erhielten eine Identifikationsnummer.

Um die gewünschte Ausgangsverdünnung von 1:400 zu erhalten, wurden 2,5 µl der Probe mit 1 ml der 10 %igen Magermilch/PBST-Lösung verdünnt. In einer Leerplatte wurden die weiteren Verdünnungsstufen (1:800, 1:1600, 1:3200) hergestellt. Ebenso wurde mit dem positiven und negativen Referenzserum bzw. der Leerprobe verfahren. Als Blank bzw. Leerprobe wurde PBS verwendet.

#### **2.4.5 ELISA-Protokoll**

##### **2.4.5.1 Durchführung**

Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach einem Protokoll von Cefas, Weymouth. Der Test war ein indirekter, nicht-kompetitiver ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Koi-Herpesvirus bei *Cyprinus carpio*.

Da hier ein Antigen an eine feste Phase gebunden wird, wird er auch als „antibody capture assay“ bezeichnet. Der „antibody capture assay“ kommt hauptsächlich zur Anwendung, wenn der Immunstatus eines Individuums untersucht werden soll (Kemeny, 1994).

In einem ersten Schritt wurde eine 96 well Mikrotiterplatte (Costar), die Träger- bzw. feste Phase in diesem Assay, mit der gereinigten Viruspräparation beschichtet. Entsprechend der Proteinbestimmung im BCA-Assay (PIERCE Ltd.) wurde die Viruslösung mit Carbonatpuffer verdünnt, so dass 50 µl pro Vertiefung der gewünschten Arbeitskonzentration (10 µg/ml) hinein pipettiert werden konnten.

Die Inkubation erfolgte bei  $25\pm 1^\circ\text{C}$  über Nacht (ca. 16 h).

Bei einem ersten Waschschrift wurde die ELISA-Platte mit PBS 3 mal gespült, die Waschlösung für jeweils 1 Minute belassen und anschließend ausgeklopft.

Nachdem das Antigen über Nacht an die Mikrotiterplatte (MTP) gebunden hatte, wurden vorhandene freie Bindungsstellen mit einem Protein abgesättigt, damit Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen können.

Zum Blocken wurden 100 µl eines 10 % igen Magermilchpulvers (in PBST) in jede Vertiefung gegeben und für 1h bei  $37\pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert.

---

Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBST.

Danach wurden 50 µl der verdünnten Proben im Doppelausatz entsprechend eines erstellten Probenbelegungsplanes (*Abb. 8*) auf die Platte gebracht und für 1h bei  $37\pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert. Währenddessen wurde der im nächsten Schritt zum Einsatz kommende Monoklonale Antikörper (MAK), der mit dem Immunoglobulin M (IgM) vom Karpfen und Koi reagiert, laut Vorgaben des Herstellers verdünnt und dann entsprechend dem ELISA-Protokoll verwendet. Dazu wurden 1 ml PBS zu den 200 µg im Fläschchen enthaltenen lyophilisierten Proteins gegeben und gelöst. Anschließend wurde die Lösung in 32 ml eines Antikörper-Puffers überführt. Dieser wurde durch Zugabe von 1g BSA zu 100 ml PBS erhalten. Auf einen erneuten Waschschrift mit PBST folgte dann die Zugabe des Anti-Koi Carp IgM mit 50 µl pro Vertiefung. Die Inkubation erfolgte wiederum bei  $37\pm 1^\circ\text{C}$  für 45 min im Brutschrank. Während der Inkubation wurde der zweite Antikörper, ein Rabbit Anti-Mouse Polyklonaler Antikörper (PAK), konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, zur Erkennung der gebundenen Anti-Karpfen-Ig 1:1000 in PBST mit 10 % Magermilchpulver verdünnt. Dazu wurden 12 µl der Ig zu 12 ml des Lösungsmittels gegeben.

Nach einem Waschschrift wurde in jede Vertiefung 50 µl dieser Immunoglobulin-Verdünnung pipettiert und die Platte für 45 min bei  $37\pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Sichtbarmachung der gebundenen Rabbit Anti-Mouse-Antikörper wurde der Substratpuffer für das konjugierte Enzym hergestellt, indem in 100 ml Aqua dest. (molecular grade water) eine Kapsel Natriumperborat gelöst wurde. Anschließend wurde 1 Tablette Tetramethylbenzidin in 10 ml des Substratpuffers gelöst.

Die Platte wurde wiederum 3 x mit Waschpuffer (PBST) gewaschen.

Anschließend wurden 100 µl dieser Endlösung in die Vertiefungen pipettiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die stattfindende Reaktion mit jeweils 50 µl 10 % iger Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt.

Die Messung der Extinktion/ OD erfolgte bei 450 nm in einem Photometer bzw. ELISA Reader und der Ausdruck in einem entsprechenden Protokoll.



Abbildung 8: MTP mit Probenbelegungsplan

### 2.4.5.2 Berechnung

Die Berechnung der Messdaten erfolgte nach folgender Formel (1):

Formel:  $Y = X - (MWNK + 3 \cdot \text{Stabw}(NK))$ ,

wobei  $X =$  gemessener OD-Wert der Probe bei Verdünnung 1:1600,  
 $MWNK =$  Mittelwert der Negativkontrolle,  
 $3 \cdot \text{Stabw} =$  dreifache Standardabweichung,  
 $Y =$  **Netto-OD-Wert**

darstellt.

Der Mittelwert der Negativkontrolle zuzüglich der dreifachen Standardabweichung stellt den Cut off dar.

Laut Arbeitsprotokoll muss im ELISA ein „positives Testserum“ folgende Kriterien erfüllen:

1. Der gemessene OD-Wert liegt bei einer Verdünnung von 1:1600 über dem Mittel der OD-Werte aller Verdünnungsstufen der Negativkontrolle zuzüglich der dreifachen Standardabweichung.
2. Bei den Testseren und den Positivkontrollen wird ein Verdünnungseffekt deutlich, der sich in abfallenden OD-Werten bei Verdünnungen von 1:400 bis 1:3200 zeigt.
3. Negative Referenzseren dürfen eine geringe Reaktivität bei 1:400 aufweisen, wobei jedoch kein Verdünnungseffekt (variable OD-Werte) in den höheren Verdünnungsstufen auftreten darf.

In der Validierungsuntersuchung wurden die Messwerte unter Berücksichtigung der Positivkontrolle alternativ mit folgender Formel (2) berechnet:

Formel: 
$$Y = (X - \text{MWNK}) / (\text{PK} - \text{MWNK}) * 100,$$

wobei  $X =$  gemessener OD-Wert der Probe,  
 $\text{NK} =$  Negativkontrolle,  
 $\text{PK} =$  Positivkontrolle,  
 $Y =$  prozentualer OD-Wert

darstellt.

### **2.4.5.3 Bewertung**

Nach Angaben des Testsystementwicklers erfolgt die Berechnung der Ergebnisse (Netto-OD) durch Subtraktion des Mittelwertes der Negativkontrolle aus den Verdünnungsstufen 1:400-1:3200 zuzüglich der dreifachen Standardabweichung vom Rohdaten-OD-Wert (bei 1:1600).

Alle Netto-OD-Werte  $\geq 1$  werden als positiv bewertet.

Um die weite Spannbreite der Reaktionshöhen differenzierter bewerten zu können, wurden 7 Kategorien gebildet und die Ergebnisse eingeteilt (*Tab. 5*).

Eine erste Beurteilung erfolgte durch die Unterscheidung zwischen negativen und positiven Ergebnissen.

<b>Kategorie</b>	<b>Netto-OD</b>	<b>Bewertung</b>
<b>1</b>	< 1	negativ
<b>2</b>	1 – 50	POSITIV
<b>3</b>	51 – 100	
<b>4</b>	101 – 200	
<b>5</b>	201 - 300	
<b>6</b>	301 – 400	
<b>7</b>	> 400	

*Tabelle 5:* Einteilung und Bewertung der serologischen Ergebnisse (Netto-OD) in Abhängigkeit ihrer Reaktionshöhen

Eine Charakterisierung der untersuchten Teiche bzw. Betriebe zeigte, dass eine Differenzierung der bis dato positiv bewerteten Ergebnisse notwendig ist.

Den Bewertungsstufen „negativ“ und „positiv“ wurde die Stufe „*fraglich*“ hinzugefügt. Als „*fragliche*“ Reaktionshöhen wurden die Netto-OD-Werte von 1 bis 100 definiert (*Tab. 6*).

<b>Kategorie</b>	<b>Netto-OD</b>	<b>Bewertung</b>
<b>1</b>	< 1	negativ
<b>2</b>	1 – 50	<i>fraglich</i>
<b>3</b>	51 – 100	
<b>4</b>	101 – 200	POSITIV
<b>5</b>	201- 300	
<b>6</b>	301 – 400	
<b>7</b>	> 400	

*Tabelle 6:* Einteilung und Bewertung der serologischen Ergebnisse (Netto-OD) in Abhängigkeit ihrer Reaktionshöhen unter Miteinbeziehung eines „*fraglichen*“ Bereiches

## 2.4.6 Validierungsuntersuchung

### 2.4.6.1 Voruntersuchungen

In Vorversuchen, die im Kooperationslabor Cefas in Weymouth durchgeführt wurden, wurden optimale Konzentrationen jedes eingesetzten Reagenten (Antigenkonzentration zur Beschichtung, Verdünnung der Immunglobuline und des Konjugats) und temporäre (optimale Inkubationszeit), physikalische (optimale Inkubationstemperatur) und chemische Variablen (Puffer und Verdünnungsmittel) festgelegt.

Bevor die eigentlichen praxisnahen Tests im Labor der Klinik für Fische und Reptilien der LMU München durchgeführt werden konnten, war es notwendig, die bereitgestellten Kontrollen, Referenzseren sowie die Virusisolate und daraus hergestellten Antigenpräparationen (*Kap. 1.7*) auf ihre „Reproduzierbarkeit“ (nach „Manual of Diagnostic Tests of Aquatic Animals“ der OIE) zu überprüfen. Es standen drei verschiedene Virusisolate (Cefas, D-132 UK; FLI Riems, KHV-191; Vet-Suisse-Uni Bern, Thai-Isolat) und eine definiert negative und positive Referenzprobe zur Verfügung.

Prinzipiell müssen Kontrollseren und eine optimale Antigenpräparation ausgewählt und die erhaltenen Ergebnisse ausschließlich auf diese Standardgrößen bezogen werden. Ändern sich die Bedingungen (Kontrollen, AG-Präparation), sind die Untersuchungen und Bewertungen nur innerhalb dieser „Charge“ vorzunehmen.

Nach Auswahl einer geeigneten Antigenpräparation zum Beschichten und Kontrollseren können die weiteren Testläufe mit Feldproben durchgeführt werden.

Die Stabilität der verwendeten Reagenzien wurde nicht überprüft, da für jeden Ansatz Testlösungen nach einer identischen Rezeptur und Verfahrensanweisung neu hergestellt wurden. Die Stammlösungen wurden entsprechend der Vorschrift bzw. Testanweisung gelagert.

Die Stabilität der Testseren wurde nicht überprüft, da zu Beginn der Untersuchung die Testproben und Kontrollseren in 20-50 µl-Portionen aufgeteilt wurden. Diese wurden unmittelbar vor Testbeginn aufgetaut.



#### **2.4.6.2 Laborvergleichsuntersuchung**

Die Viruspräparation von Cefas (Isolat D-132 UK) mit einer Arbeitskonzentration von 10 µg/ml, eine definierte Positiv- und Negativkontrolle und ausgewählte Testproben wurden im deutschen und englischen Labor parallel nach identischer Verfahrensanweisung eingesetzt, der ELISA durchgeführt und die (Netto-OD)-Ergebnisse verglichen.

#### **2.4.6.3 Vergleich von Antigenpräparationen**

Serumproben der Versuchsteiche 1 bis 12 wurden in ELISA-Tests mit jeweils unterschiedlichen Viruspräparationen (Nr. 1-11) zur Beschichtung getestet und die Ergebnisse verglichen.

Hier sollte überprüft werden, ob auf Teich- wie auch auf Probenebene identische Resultate erzielt werden können.

#### **2.4.6.4 Überprüfung möglicher Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen CyHV-1**

5 Seren von Fischen, die augenscheinlich eine Infektion mit CyHV-1 überstanden hatten und die typischen papillomatösen, weißlichen Strukturen auf der Haut aufwiesen, wurden im ELISA mit Viruspräparation FLI 2 und 2-facher Wiederholung getestet. Hier galt es zu untersuchen, ob ein positives Ergebnis als Hinweis auf konkurrierende Antikörper, die kreuzragieren, gewertet werden kann.

#### **2.4.6.5 Überprüfung möglicher unspezifischer Reaktionen**

Zur Überprüfung von Störeffekten, die durch unspezifische Bindungen von Substanzen mit der MTP auftreten können, wurden als Negativkontrolle 2 Platten mit einer Suspension naiver Zellen, die nach der identischen Prozedur wie für infizierte Kulturen aufgereinigt wurden, beschichtet und das gesamte ELISA-Protokoll anhand randomisierter Proben durchgeführt.

Zur Beschichtung wurde der ganze Inhalt des Gradientenröhrchens verwendet.

#### **2.4.6.6 Testung auf „Reproduzierbarkeit“**

##### *Innerhalb-Test-Genauigkeit (Innerhalb-Platten-Validierung)*

Aus dem vorhandenen Probenpool wurden 3 Seren ausgewählt, die in ersten Untersuchungen als negativ, schwach positiv (Kategorie 4), hoch positiv (Kategorie 6) bewertet wurden.

Auf einer ELISA-Platte wurden die drei ausgewählte Testseren in jeweils 10 Ansätzen getestet und die Ergebnisse verglichen (Innerhalb-Platten-Test). Diese Testung wurde 2 x an unterschiedlichen Tagen wiederholt. Beurteilt wurde die Übereinstimmung der entsprechenden Bewertung (negativ, positiv) sowie die unterschiedliche Zuordnung zu den einzelnen Kategorien.

##### *Zwischen-Test-Genauigkeit (Zwischen-Platten-Validierung)*

An unterschiedlichen Tagen wurde ein ELISA mit ausgewählten Seren wiederholt (Zwischen-Platten-Test). Die Ergebnisse wurden hinsichtlich ihrer Bewertung (negativ, positiv) und Zuordnung zu den einzelnen Kategorien verglichen.

#### **2.4.6.7 Regressionsanalyse**

Alternativ zur Berechnung der Netto-OD-Werte soll die Anwendbarkeit der Formel 2, in welcher die Positivkontrolle Berücksichtigung findet, untersucht werden. Dazu werden die Ergebnisse aus den gemessenen Reaktionshöhen von 50 Seren der Untersuchungsreihe I mit Formel 1 und 2 berechnet und in einer Regressionsanalyse ausgewertet. Je größer ein funktionaler Zusammenhang zwischen den beiden Wertereihen ist, desto näher wird der errechnete Korrelationskoeffizient bei  $|r| = 1$  liegen.

## **D Ergebnisse**

### **1 Zellkultur und Virus**

#### **1.1 Zelllinien**

Die permanente und stationäre KF-1-Zelllinie zeigte sich wachstumsfreudig und unkompliziert in dem verwendeten Medium. Sie wies in der Regel einen konfluenten, einschichtigen Zellrasen, bestehend aus Zellen vom epitheloiden, polymorphen Typ, bei einer Teilungsrate von 1:2 nach ca. 48 h auf. Bei einem optimalen Inkubationstemperaturbereich von  $24\pm 1^\circ\text{C}$  und einem mehrmaligen Mediumwechsel zeigten sich die Kulturen ca. 14 Tage in einer Art Ruhestadium bei vollständig geschlossenem Monolayer mit den typischen morphologischen Eigenschaften stabil. Eine bei zunehmender Reifung der Kulturen erkennbare feine Körnung markierte die Zellgrenzen.

Die Zellzählung und Anfärbung der Zellen erbrachte den Nachweis der Vitalität der verwendeten Zellkulturen.

Mit zunehmender Inkubation wiesen die Kulturen dann vermehrt Alterungserscheinungen (Stagnation im Wachstum, absolutes Dichtwachsen) auf und es kam zur Ablösung und Abkugeln einer Vielzahl von Zellen.

Die für die KHV Isolierung ebenfalls verwendete CCB Zelllinie zeigte sich bei höherer Teilungsrate zwar wachstumsfreudiger und bei der Kultivierung stabiler als KF-1 Zellkulturen, jedoch vermehrten die Zellen das eingesetzte Virus nur unzureichend, was auf eine erworbene Unempfindlichkeit gegenüber dem Riemser KHV Isolat zurückgeführt wurde. Daher wurde diese Zelllinie nach fünf erfolglosen Infektionsversuchen nicht weiter kultiviert.

Zellen, die über die Kryokonservierung gewonnen und passagiert werden sollten, zeigten nach empfohlener Einsaat von 1 Kryoröhrchen (je 1 ml Zellsuspension) pro zwei  $25\text{ cm}^2$  ZK Flaschen eine verminderte Neigung zum Anheften und Dichtwachsen, so dass frische Zellen bis Versuchsende nur noch durch fortlaufende Subkultivierung (bis 20 Passagen) gewonnen wurden.

## 1.2 Virus

### 1.2.1 Virusanzucht

#### *Verimpfen von Virusisolat*

Für die Infektion wurden sowohl junge (ca. 2-4 Tage alt) als auch alte KF-1-Kulturen (> 1Woche) (*Abb 9.*) verwendet. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Bereitschaft zur Vermehrung des Virus festgestellt werden.

Während nach Beimpfung der naiven Kulturen mit Original-FLI-Isolat kein CPE sichtbar wurde, zeigten sich ab der 2. Passage in weiterführenden Passagen zytopathogene Effekte, die in einem Zeitraum von 5-10 Tagen auftraten (*Abb. 10, 11, 12*).

Für die Ausprägung eines CPE schienen die Infektionspassage und auch die infektiöse Dosis eine Rolle zu spielen. Je nach eingesetzter Inokulationsmenge wurde das Erscheinen des CPE nach 5 Tagen bzw. mit etlichen Tagen Verzögerung sichtbar. Wenn die Inokulationsmengen zur Beimpfung der Zellkulturflaschen deutlich höher (5 ml Virus/75 cm<sup>2</sup>) als die von der OIE (2003b) für die Isolierung von CCV in der Zellkultur empfohlene Menge (100 µl pro 2 cm<sup>2</sup>) waren, trat die Virusvermehrung, die in Form eines CPE sichtbar wurde, früher in Erscheinung.

Bis zur 9. Viruspassage konnte Virus in der KF-1-Kultur vermehrt werden.

#### *Verimpfen von Organmaterial*

In keinem Fall konnte Virus aus KHV- PCR-positiven Organen, Kiementupfern und Leukozytenfraktionen von klinisch sichtbar erkrankten Karpfen und Koi erfolgreich in der Zellkultur isoliert werden. Nach wiederholtem Passagieren der infizierten Zellkulturen und des gewonnenen Mediums wurden die Virusanzüchtungen abgebrochen.

Nach Verreibung von positivem bzw. verdächtigem Organmaterial trat oft ein sogenannter „Pseudo-CPE“, der sich in einer Degeneration der Zellen, Abkugeln und Zytolyse darstellte, gleich ab der 1. Passage auf.

Diese Veränderungen, die anscheinend auf eine Zellzytotoxizität zurückzuführen waren, zeigten sich dann 1-2 Tage nach der Beimpfung mit der Verreibung aus Organmaterial (nach Beimpfung mit unverdünnter Organsuspension und mit einem Inokulum von 1:10<sup>1</sup>). In

Röhrchen, die mit einer Verdünnung von  $1:10^2$  beimpft waren, gab es diese zytotoxischen Veränderungen nicht.

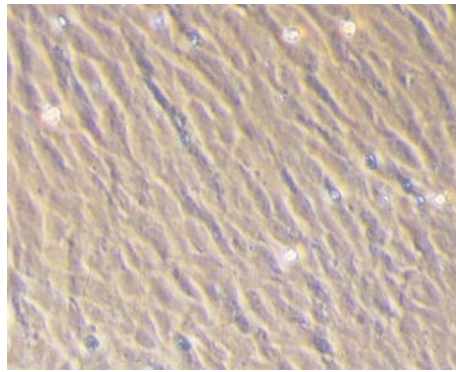
Da in der Regel ein CPE erst mit fortlaufender Subkultivierung erwartet wurde, konnte der Einfluss von Zytotoxizitäten durch weitere Passagierung reduziert werden. Weitere Passagen führten jedoch nicht zu einer erfolgreichen Virusvermehrung. Es konnte kein zytopathogener Effekt dokumentiert werden, die Kulturen blieben stabil.

Aus diesem Grund konnte routinemäßig keine Virustitration durchgeführt werden.

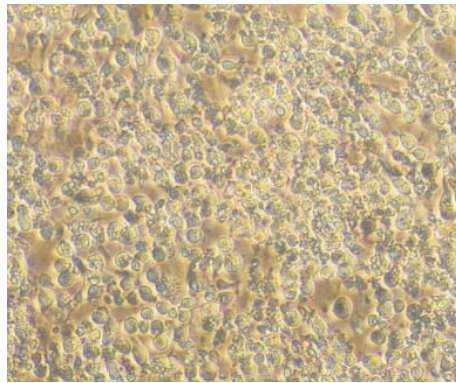
Die Infektion von Kulturen mit Organmaterial des Karpfens, infiziert mit einem Thai-KHV-Virusstamm, fand bis zur 2. Passage ohne CPE-Geschehen statt. Fortlaufendes Passagieren und Verwendung eines Inokulums von mindestens 4 ml/25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche führte zur Ausbildung eines CPE nach 5 Tagen. In der PCR konnte auch in den weiterführenden Passagen Koi-Herpesvirusgenom nachgewiesen werden. Die virushaltigen Medien wurden vereinigt, die Viruspräparation hergestellt und für eine vergleichende Untersuchung zurückgestellt.

### **1.2.2 Virustitration**

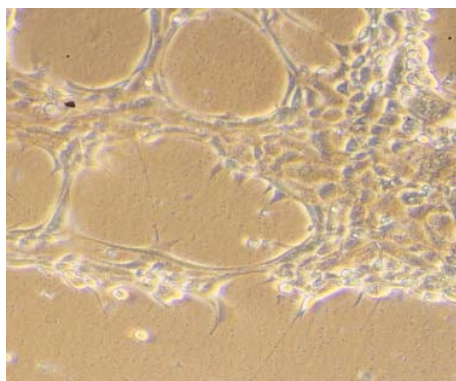
Mit einem Inokulum des initialen Referenzvirus KHV I (FLI KHV-191) konnten erfolgreich neue Kulturen infiziert und eine Virusendpunkttitration (Reed und Münch, 1938) durchgeführt werden. Schwierigkeiten bereitete eine Milieuänderung (Farbänderung) in den einzelnen Vertiefungen der 96-well MTP vor allem im Randbereich, so dass morphologische Veränderungen an der Kultur, die oft auch die Negativkontrolle (naive, unbeimpfte Zellen) betrafen (Pseudo-CPE), deshalb nicht immer eindeutig mit einer Vermehrung des Virus in Verbindung gebracht wurden. Der Virustiter wurde nach wiederholter Titration mit  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml angegeben. Das Ergebnis der Titration wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen des infizierten Zellkulturüberstandes bestätigt.



*Abbildung 9:* Naive KF-1-Zellkultur (7 d); 200-fache Vergrößerung



*Abbildung 10:* KF-1 Zellkultur 4 d p. i. mit KHV-191; beginnende Abkuglung; 200-fache Vergrößerung



*Abbildung 11:* Fortgeschrittener CPE bei KF-1 Zellen 16 d p. i. mit KHV-191; Vakuolisierung, Plaques und Abkuglung; 200-fache Vergrößerung

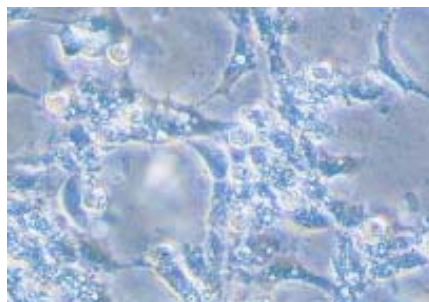


Abbildung 12: KF-1 Zellkultur 9 d p. i. mit KHV-191; Riesenzellbildung und Vakuolisierung; 200-fache Vergrößerung

## 2 Untersuchungsreihen I-III

### 2.1 Statusvalidierung anhand ausgewählter Koi-Teiche (I)

Bei Fischen in 9 von 12 Teichen konnten im ELISA Antikörper nachgewiesen werden. Teich 1-4, 5/1+3 sowie 6-8 sind demzufolge als „positive“ Teiche anzusehen. Bei 4 dieser Teiche waren alle jeweils untersuchten Seren Antikörper-positiv. Die Teiche 5/2, 9 und 10 waren negativ, in keinem der untersuchten Seren wurden Antikörper detektiert. Insgesamt waren 35 von 50 Serumproben Antikörper-positiv, 15 Seren negativ (Tab. 7).

n	Teich											ges.
	1	2	3	4	5/1+3	5/2	6	7	8	9	10	
<b>ges.</b>	6	4	8	4	4	2	4	5	4	4	5	<b>50</b>
<b>POS</b>	5	3	8	3	4	0	4	4	4	0	0	<b>35</b>
<b>neg</b>	1	1	0	1	0	2	0	1	0	4	5	<b>15</b>

Tabelle 7: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf KHV-Antikörper  
Die „negativen“ Teiche sind farblich gekennzeichnet.

In *Tabelle 8* sind die Netto-OD-Werte aufgeführt, die für jede untersuchte Serumprobe ermittelt wurden.

Die einzelnen Seren der „negativen“ Teiche wiesen ausschließlich Ergebnisse unterhalb des Cut off auf. Hier waren keine Antikörper vorhanden.

In den „positiven“ Teichen 1, 2, 4 und 7 wurden in jeweils einem der untersuchten Seren keine Antikörper nachgewiesen, sie wiesen ein negatives Netto-OD-Ergebnis auf. Die übrigen Seren zeigten positive Netto-OD-Werte in unterschiedlichen Reaktionshöhen. Die Werte lagen in einem Bereich zwischen „6“ und „412“.

Um die Ergebnisse in dieser Spannweite besser gewichten zu können, wurden zur differenzierten Beurteilung 7 Bewertungskategorien gebildet (*C, Kap. 2.4.5.3, Tab. 5*).

Probe	Teich										
	1	2	3	4	5/1+3	5/2	6	7	8	9	10
1	-14	-1	19	-28	72	- 11	6	-42	22	- 12	- 62
2	18	40	42	23	164	- 28	55	6	30	- 14	-68
3	35	64	145	174	239		143	13	59	- 42	- 69
4	59	80	164	299	320		245	371	331	- 45	- 73
5	182		241					384			- 75
6	412		255								
7			312								
8			396								

*Tabelle 8:* Einzelergebnisse der serologischen Untersuchungen auf KHV-Antikörper, angegeben in Netto-OD-Werten. Die negativen Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Die *Abbildung 13* gibt die Verteilung der Ergebnisse in den einzelnen Teichen an. Der Cut off wird durch die Linie aufgezeigt.

Proben, die darüber lagen und einen Netto-OD-Wert von  $\geq 1$  aufwiesen, sind positiv. Die Verteilung der einzelnen Ergebnisse in den Teichen ist unterschiedlich.

„Positive“ Teiche wiesen mindestens eine Probe auf, die über dem Schwellenwert lag. In „negativen“ Teichen konnten keine Antikörper bei Fischen nachgewiesen werden.



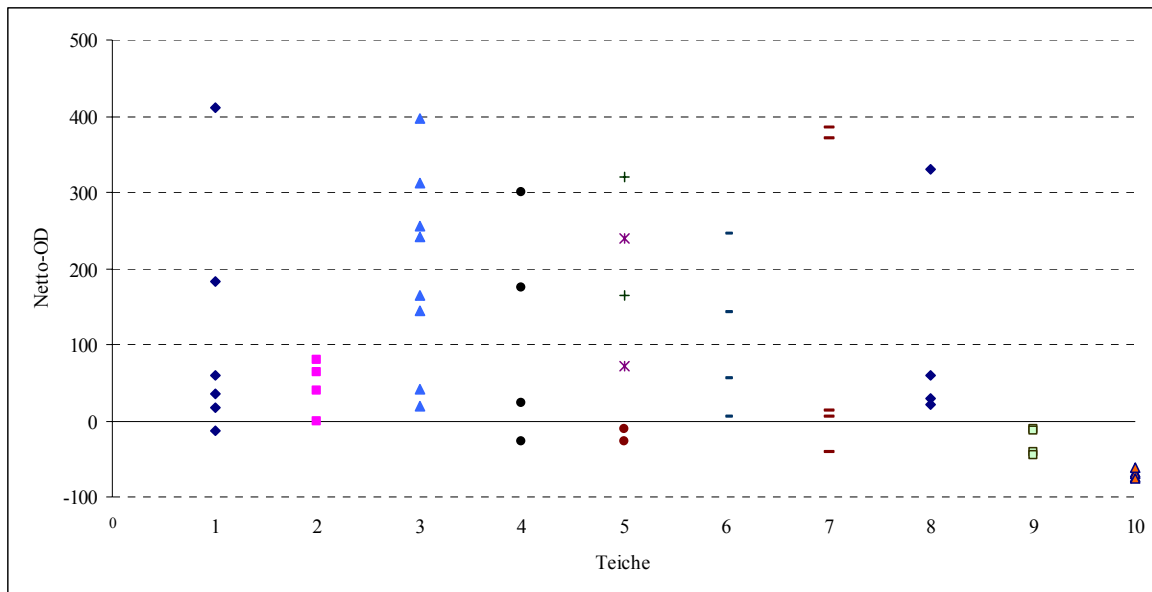


Abbildung 13: Einzelergebnisse (Netto-OD-Werte) der serologischen Untersuchung auf KHV-Antikörper

Die *Tabelle 9* gibt eine Übersicht über die Verteilung der erzielten Kategorien in den jeweiligen Teichen aufgrund der Kategorisierung der Einzeleren entsprechend der ermittelten Netto-OD-Ergebnisse.

Dabei wiesen die „negativen“ Teiche 5/2, 9 und 10 nur Werte auf, die der Kategorie 1 ( $< 1$ ), d.h. negativ, zuzuordnen sind. 8 von 9 „positiven“ Teiche wiesen Werte auf, die unter Kategorie 4 und höher fallen. Lediglich Teich 2 wies Maximal-Werte der Kategorie 3 auf. Dadurch unterschied er sich deutlich von den übrigen Teichen.

Teich	n	n Nachweise in Kategorie						
		1	2	3	4	5	6	7
1	6	1	2	1	1			1
2	4	1	1	2				
3	8		2		2	2	2	
4	4	1	1		1	1		
5/1+3	4			1	1	1	1	
5/2	2	2						
6	4		1	1	1	1		
7	5	1	2					2
8	4		2	1				1
9	4	4						
10	5	5						

*Tabelle 9:* Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf KHV-Antikörper unter Berücksichtigung der Reaktionshöhen/Kategorien.  
Die „negativen“ Teiche sind grau hinterlegt.

Den Vorberichten zu den einzelnen Teichen war zu entnehmen, dass 9 der 12 Teiche (1-5/1+3, 6-8) in der Vergangenheit einen KHV-Ausbruch hatten. Von den hier untersuchten 39 Proben wurden 35 (89,7 %) als positiv eingestuft, da Antikörper nachgewiesen werden konnten. Lediglich 4 Proben waren negativ (10,3 %).

Die untersuchten 11 Seren in den „negativen“ Teichen wiesen keine Antikörper auf und sind als negativ anzusehen (*Tab. 10*).

Teiche	n unter- suchte Proben	POS		neg	
		n	%	n	%
<b>mit KHV-Historie</b>	<b>39</b>	35	89,7	4	10,3
<b>ohne KHV-Historie</b>	<b>11</b>	0	0	11	100

*Tabelle 10:* Auswertung der serologischen Ergebnisse unter Berücksichtigung der vorberichtlichen KHV-Historie

*Tabelle 11* gibt die kalkulierte Sensitivität und Spezifität auf Proben- und Teichebene wieder. Entsprechend der Vorberichte konnten alle „verdächtigen“ Teiche (1-5/1+3, 6-8), d.h. diejenigen, in welchen in der Vergangenheit ein KHV-Geschehen nachweislich stattgefunden hat, als „positiv“ eingestuft werden. In den Fischen „negativer“ Teiche, die laut Vorbericht keinerlei Hinweise auf einen Kontakt mit KHV hatten und als „unverdächtig“ galten, wurden keine Antikörper nachgewiesen. Von den 39 untersuchten Seren aus den „positiven“ Teichen konnten 35 (89,7 %) als positiv deklariert werden, hier wurden Antikörper nachgewiesen, 4 Seren waren ohne Antikörpernachweis. Die 11 Seren aus den Teichen 5/2, 9 und 10 sind zu 100 % negativ getestet.

<b>kalkulierte</b>	<b>auf Probenebene</b>	<b>auf Teichebene</b>
<b>- Sensitivität</b>	89,7 %	100 %
<b>- Spezifität</b>	100 %	100 %

*Tabelle 11:* Kalkulierte Sensitivität und Spezifität unter Berücksichtigung der vorberichtlichen KHV-Historie

## 2.2 Verlaufsuntersuchung bei Fischen aus einem Teich mit KHV-Historie (II)

Von dem 2005 in die Klinik eingelieferten Bestand von insgesamt 16 Koi sind 7 Tiere innerhalb von 14 Tagen nach Einlieferung verstorben bzw. mussten euthanasiert werden. Fünf Tiere zeigten in diesem Zeitraum eine typische KHV-Symptomatik. Vorherrschend waren ein gestörtes Allgemeinbefinden, Hämorrhagien in Haut und Flossenbasis, Endophthalmus sowie Kiemenschäden. Zwei der verstorbenen Fische waren klinisch unauffällig.

*Tabelle 12* zeigt die Ergebnisse der virologischen und serologischen Untersuchungen dieser Tiere.

In Organpools der fünf Tiere, die die typische KHV-Symptomatik aufwiesen, konnte mittels PCR Koi-Herpesvirusgenom detektiert und damit eine akute KHV-Infektion diagnostiziert werden. Bei zwei weiteren verstorbenen Fischen ohne erkennbare Klinik war die PCR-Untersuchung negativ. Über die Zellkultur gelang es weder aus den Organen, noch aus Blutleukozyten dieser Fische Virus zu isolieren. Im ELISA-Test konnten hier keine Antikörper nachgewiesen werden.

Koi	Symptome	Zellkultur		PCR		AK-ELISA
		Organpool	Leukozyten	Organpool	Leukozyten	
1	typisch	neg	neg	POS	neg	neg
2	typisch	neg	neg	POS	neg	neg
3	typisch	neg	neg	POS	neg	neg
4	typisch	neg	neg	POS	neg	neg
5	typisch	neg	neg	POS	neg	n.u.
6	keine	neg	neg	neg	neg	n.u.
7	keine	neg	neg	neg	neg	neg

n.u. = nicht untersucht

*Tabelle 12:* Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen der zu Versuchsbeginn verendeten bzw. euthanasierten Versuchsfische

Die überlebenden 9 Tiere wurden von November 2005 bis August 2006 an 7 Terminen beprobt (*Tab. 13*). Nach Möglichkeit wurden zu jedem Zeitpunkt Blutproben und Kiementupferproben gewonnen.

Diese Tiere wurden jeweils bis zu ihrem Tod gehältert. Die verstorbenen Tiere wurden sezziert, nur von 4 Tieren konnten sowohl Organ- als auch Blutproben entnommen werden (Termin 8). Organ- und Blutproben der übrigen 5 Tiere konnten aufgrund einer fortgeschrittenen Autolyse weder für die zellkulturelle Anzucht noch im ELISA-Test verwendet werden. So wurden in der weiteren Ergebnisdarstellung nur die Tiere aufgeführt (Termin 8), von denen Untersuchungsmaterial sowohl in der ZK, in der PCR als auch im ELISA untersucht werden konnte.

<b>Probenentnahmen</b>		
<b>Termin</b>	<b>n untersuchte Fische</b>	<b>Zeitabstand in Tagen</b>
<b>1</b>	3	0
<b>2</b>	8	36
<b>3</b>	9	70
<b>4</b>	9	110
<b>5</b>	9	150
<b>6</b>	8	190
<b>7</b>	8	240
<b>8</b>	4	nach Tod

*Tabelle 13:* Zeitliche Abfolge der Probeentnahmen

Die Ergebnisse der virologischen und serologischen Untersuchungen werden für die einzelnen Koi (A-I) in den *Tabellen 14 bis 22* und in *H, Tabelle A 5* dargestellt. Die Antikörperverläufe sind aus den *Abbildungen 14 – 22* ersichtlich.

Die Bewertung der Ergebnisse aus dem ELISA-Test erfolgte entsprechend der in *Tabelle 5, C, Kapitel 2.4.5.3* genannten Kategorisierung.

### **Koi A**

Zu keinem Zeitpunkt konnte bei diesem Fisch das Virus über die Zellkultur oder in der PCR nachgewiesen werden. Im ELISA konnten an jedem Probenentnahmeterrnin Antikörper im Serum detektiert werden. Der Antikörpergehalt lag am Entnahmezeitpunkt 5 und 6 deutlich über den Werten, die an den anderen Entnahmetagen erzielt wurden. Hier wurden Werte gemessen, die unter Kategorie 5 bzw. 6 eingestuft werden konnten.

Insgesamt lagen die Messwerte an 5 von 7 Entnahmeterrninen in der Kategorie 4 und höher (*Tab. 14*).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	POS	4
2	neg	neg	POS	3
3	neg	neg	POS	2
4	neg	neg	POS	4
5	neg	neg	POS	5
6	neg	neg	POS	6
7	neg	neg	POS	4

*Tabelle 14:* Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi A

An jedem Blutentnahmeterrnin konnten im Serum Antikörper detektiert werden, d.h. die Netto-OD-Werte lagen stets oberhalb des Cut off.

Am ersten Termin konnte ein Netto-OD-Wert von 185 ermittelt werden (Kategorie 5). Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass der Antikörpergehalt im untersuchten Serum bis zum 3. Entnahmezeitpunkt auf einen Netto-OD-Wert von 26 abfiel. Der Kurvenverlauf verdeutlicht, dass der Antikörpergehalt bis zum 6. Termin deutlich zunahm (Netto-OD 306) und damit eine Einstufung in Kategorie 6 erfolgte. Am letzten Termin lag der Netto-OD-Wert bei 197 (Kategorie 5, *Abb. 14*).

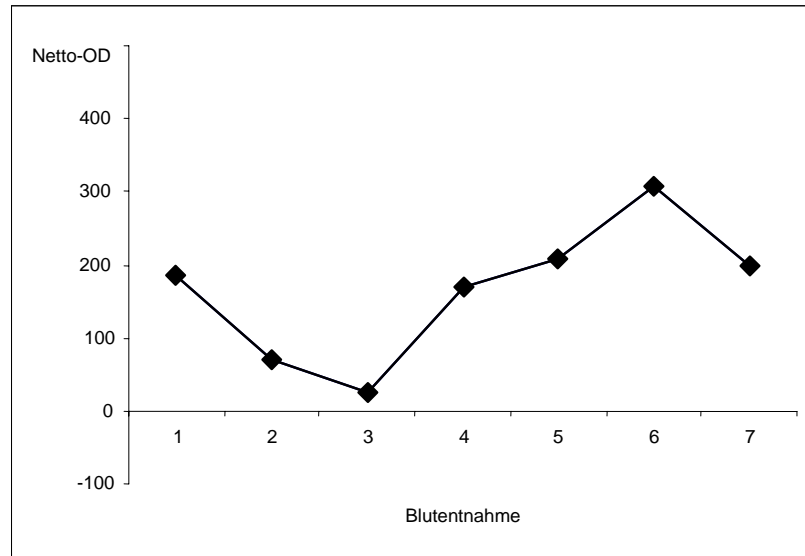


Abbildung 14: Antikörperverlauf bei Koi A

### Koi B

Bei dem Koi B verlief die Anzucht von KHV in der Zellkultur sowie die PCR-Untersuchung negativ.

Ausreichend Blut konnte nur an 4 Terminen gewonnen werden.

Am 2. und 3. Entnahmetag wurden im Serum Antikörper detektiert. Die Werte konnten in Kategorie 3 und 4 eingestuft werden. An den nachfolgenden zwei Terminen wurden im Serum keine Antikörper nachgewiesen (Tab. 15).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	POS	3
3	neg	neg	POS	4
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	n.u.	
7	neg	neg	n.u.	

Tabelle 15: Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen von Koi B

Der Kurvenverlauf (Abb. 15) zeigt einen Anstieg des Antikörpergehalts zwischen 2. (Netto-OD 77) und 3. Entnahmeterrn (Netto-OD 159) an. Zwischen dem 3. und 4. Termin wird die Abnahme deutlich, die Netto-OD-Werte lagen nur an Termin 4 und 5 unterhalb des Cut off und damit im negativen Bereich.

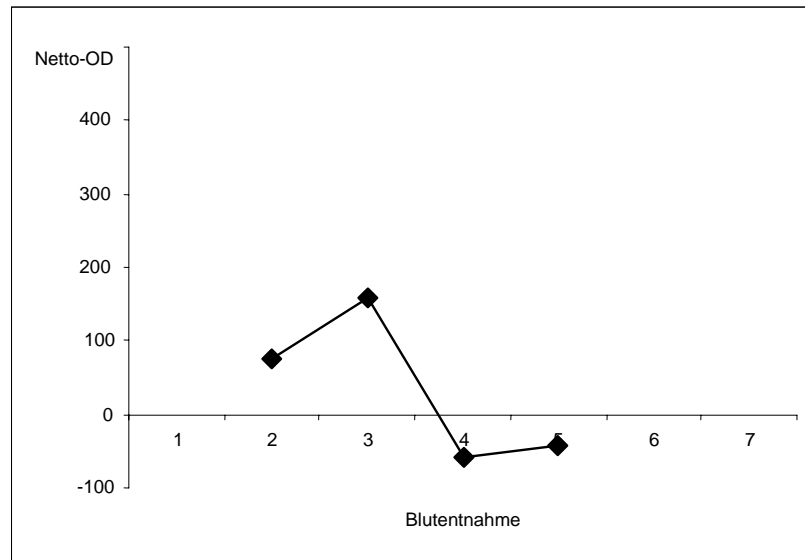


Abbildung 15: Antikörperverlauf bei Koi B

### Koi C

Die Anzucht in der Zellkultur und die Untersuchung in der PCR auf KHV verliefen negativ.

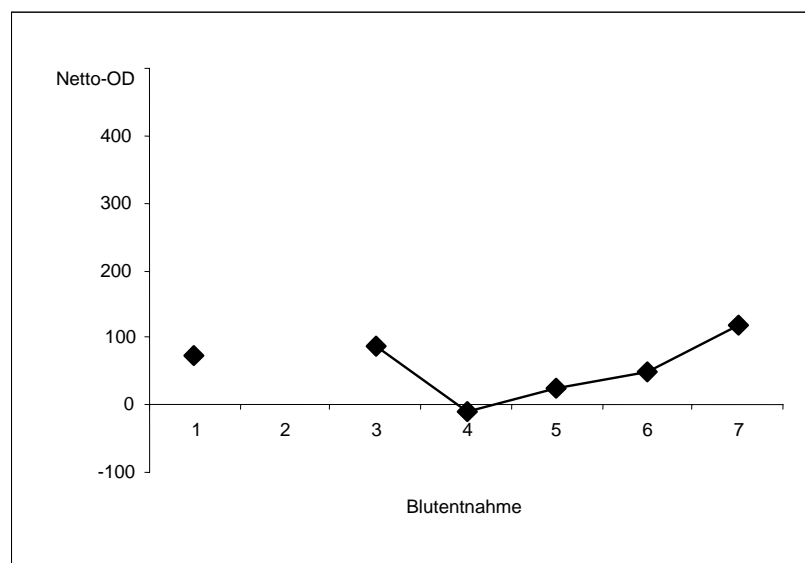
In 5 von 6 Untersuchungen konnten Antikörper detektiert werden. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde mit Ausnahme von Entnahmetag 7 eine Einstufung in Kategorie 2-3 (Netto-OD 1-100) vorgenommen (Tab. 16).



Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	POS	3
2	neg	neg	n.u.	
3	neg	neg	POS	3
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	POS	2
6	neg	neg	POS	2
7	neg	neg	POS	4

*Tabelle 16:* Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi C

Die Netto-OD-Werte lagen an den Entnahmetagen 1, 3-7 mit Ausnahme des 4. Termins (Entnahmetag 2 nicht untersucht) oberhalb des Cut off (Netto OD 25-119). Dem Kurvenverlauf ist zu entnehmen, dass es zu einer Abnahme im Antikörpergehalt zwischen Termin 3 und 4 in den leicht negativen Bereich kam. Bis zum letzten Entnahmetag erfolgte dann ein kontinuierlicher Wiederanstieg (*Abb. 16*).



*Abbildung 16:* Antikörperverlauf bei Koi C

**Koi D**

Die virologische Untersuchung von Probenmaterial der Entnahmetermine 1-7 verlief für Koi D negativ. Im ELISA-Test konnten an 5 Entnahmezeitpunkten (2, 3, 5-7) Antikörper nachgewiesen werden, zweimal erbrachte der Test ein negatives Ergebnis. Die ermittelten Ergebnisse konnten insgesamt den Kategorien 2 und 3 zugeordnet werden, lagen folglich im leicht positiven Bereich (Tab. 17).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	neg	1
2	neg	neg	POS	2
3	neg	neg	POS	2
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	POS	2
6	neg	neg	POS	3
7	neg	neg	POS	2

Tabelle 17: Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi D

Der Kurvenverlauf (Abb. 17) zeigt mit Ausnahme der Messdaten an Entnahmetermin 4 und 5 eine leicht steigende Tendenz. Die ermittelten Netto-OD-Werte lagen mit  $-40$  an Tag 1 und mit  $-21$  an Tag 4 deutlich im negativen Bereich. Mit Ausnahme des ermittelten Ergebnisses am 6. Probenahmetag (Netto-OD 119) lagen die Werte im leicht positiven Bereich (Netto-OD 20-90).

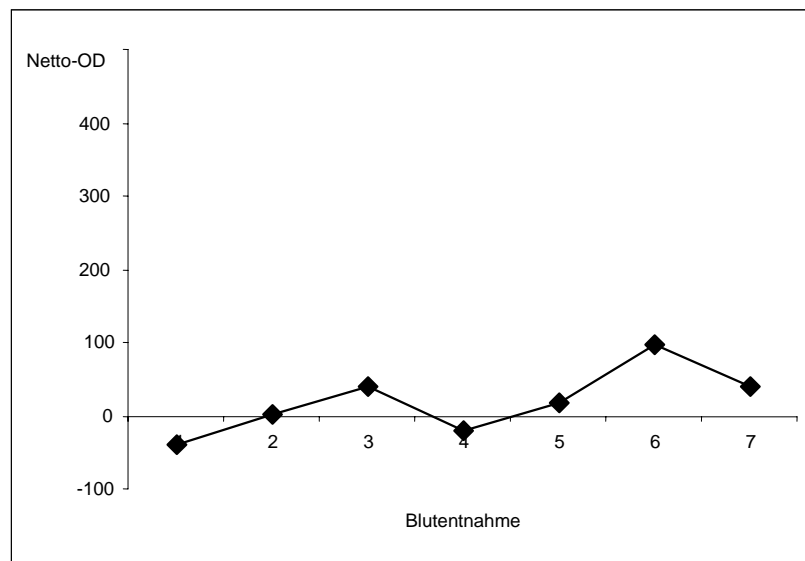


Abbildung 17: Antikörperverlauf bei Koi D

### Koi E

Die virologische Untersuchung, d.h. Virusanzucht in der Zellkultur und PCR, verlief negativ. Der ELISA-Test war mit Ausnahme von Entnahmetag 7 negativ, es konnten keine Antikörper detektiert werden. Am Tag 7 wurde ein geringer Wert oberhalb des Cut off ermittelt, weshalb die Einteilung in Kategorie 2 erfolgte (Tab. 18).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	neg	1
3	neg	neg	neg	1
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	neg	1
7	neg	neg	POS	2
8	neg	neg	neg	1

Tabelle 18: Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi E

Der Kurvenverlauf (Abb. 18) verdeutlicht die obige Einstufung in Kategorie 1, mit Ausnahme des Netto-OD-Wertes 5 bei Entnahme 7 lagen alle Werte unterhalb des Cut off im negativen Bereich.

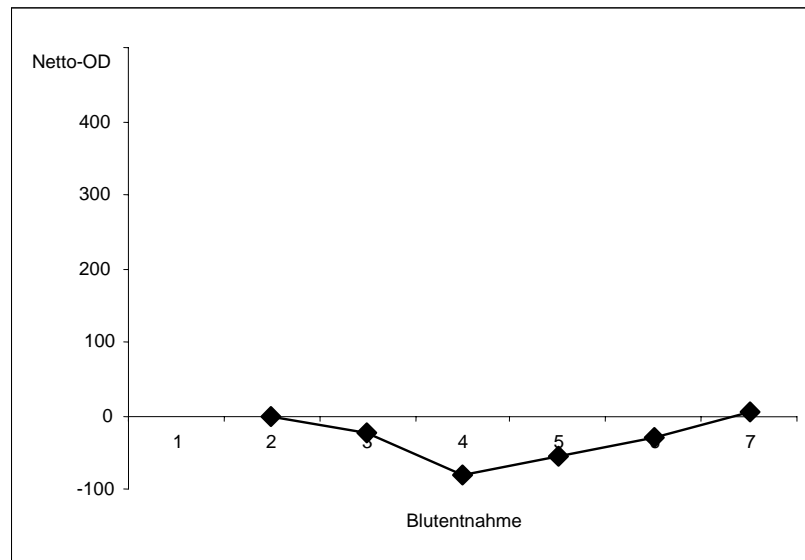


Abbildung 18: Antikörperverlauf bei Koi E

### Koi F

Für diesen Koi (Tab. 19) verlief die virologische Untersuchung an den Entnahmetagen 1-7 negativ.

Insgesamt wurde an 6 Entnahmetagen das Serum im ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern untersucht, an 3 Tagen konnten Antikörper detektiert werden. Die Einstufung in Kategorie 2 zeigt an, dass die ermittelten Netto-OD-Werte im leicht positiven Bereich lagen. Nach dem Tod des Fisches wurde die virologische Untersuchung außerdem mit Organmaterial vorgenommen, es konnte kein Virusgenom in der PCR detektiert werden. Der Antikörpergehalt war niedrig, weshalb die Werte in Kategorie 2 eingestuft wurden.

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	POS	2
3	neg	neg	POS	2
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	neg	1
7	neg	neg	POS	2
8	neg	neg	POS	2

Tabelle 19: Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi F

Der Kurvenverlauf (Abb. 19) verdeutlicht, dass an 3 Entnahmetagen die Messwerte unterhalb des Cut off nachgewiesen werden konnten, an den übrigen Terminen (2, 3, 7 und 8) wurde nur ein minimaler Antikörpergehalt (Netto-OD 4-17) gemessen.

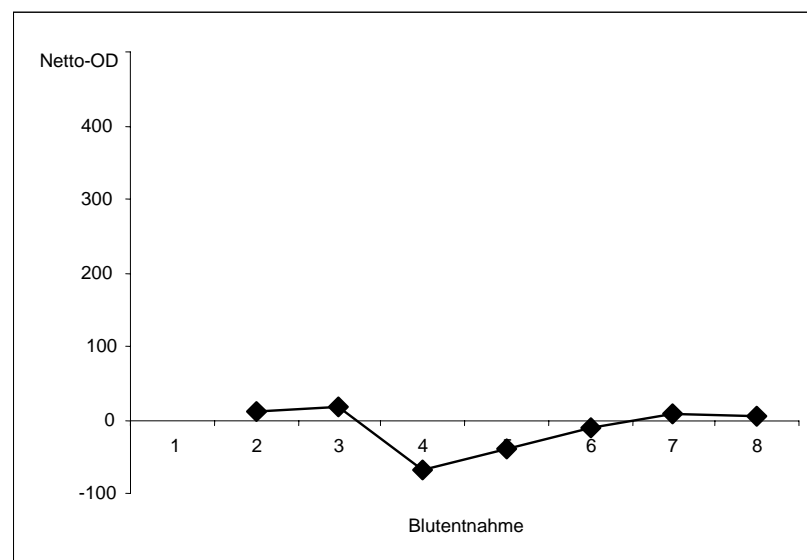


Abbildung 19: Antikörperverlauf bei Koi F

**Koi G**

Die virologische Untersuchung verlief für diesen Fisch vom Entnahmetag 1-7 negativ. Eine nach seinem Tod durchgeführte PCR erbrachte ein positives Ergebnis, d.h. Genom von KHV konnte nachgewiesen werden. Antikörper konnten in 5 von 7 Fällen (Termin 2, 3 und 6-8) nachgewiesen werden, die Einstufung der erhaltenen Werte erfolgte in Kategorie 3 und 4 (Tab. 20).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	POS	3
3	neg	neg	POS	4
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	POS	3
7	neg	neg	POS	3
8	neg	POS	POS	3

Tab. 20: Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi G

Dem Kurvenverlauf (Abb. 20) ist zu entnehmen, dass im Fischserum mit Ausnahme von Entnahmetag 4 und 5 Antikörper detektiert werden konnten. Die ermittelten Netto-OD-Werte lagen im Bereich von 70-184 und erhielten demzufolge die Einstufung in Kategorie 3 und 4. Es fällt auf, dass auf einen Antikörperanstieg zu Beginn des Versuchszeitraumes (Termin 2 und 3) ein Abfall unterhalb des Cut off erfolgte. Ab dem 5. Termin serokonvertierte der Fisch, so dass an den drei letzten Untersuchungsterminen Netto-OD-Werte im unteren positiven Bereich (70-84) ermittelt werden konnten.

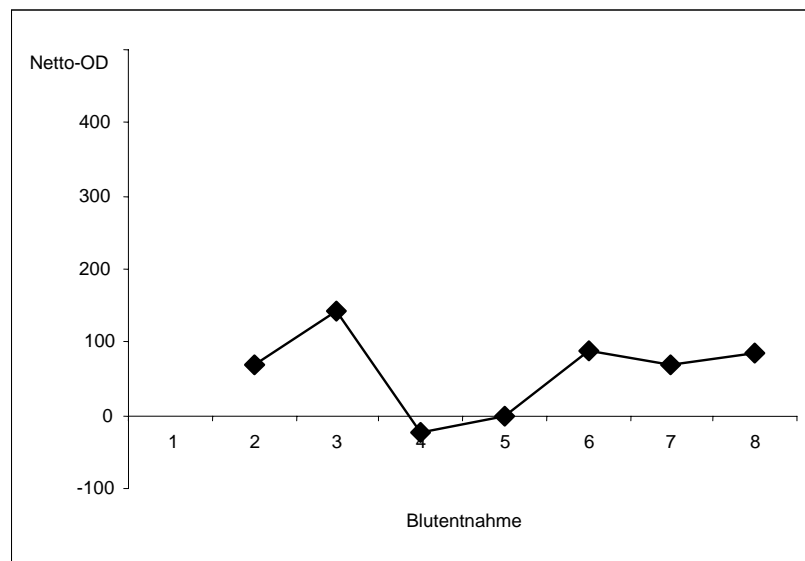


Abbildung 20: Antikörperverlauf bei Koi G

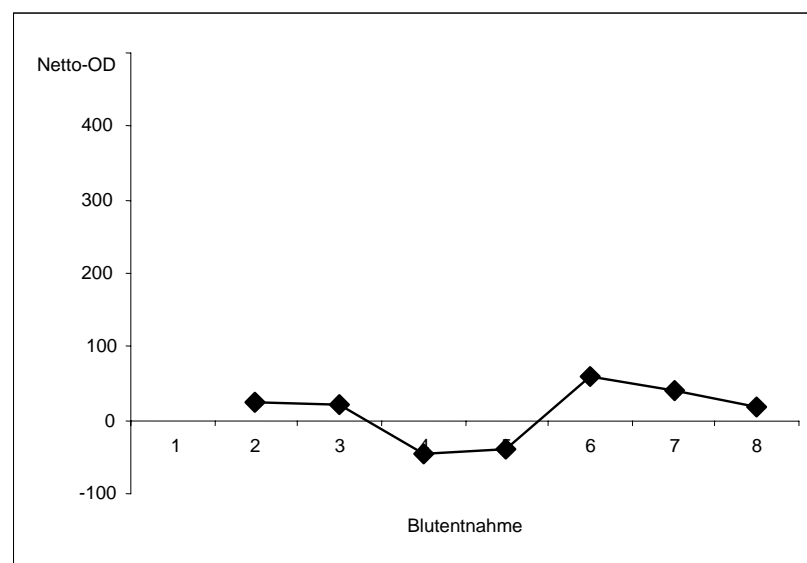
### Koi H

Die virologische Untersuchung verlief für den Koi H von Entnahmeterrn 1-7 negativ. Eine nach seinem Tod durchgeführte Anzucht von Organmaterial in der Zellkultur und die PCR-Untersuchung erbrachten ebenfalls ein negatives Ergebnis, d.h. es konnte kein Virus nachgewiesen werden. Antikörper konnten in 5 von 7 Fällen (Termin 2, 3 und 6-8) nachgewiesen werden, die Einstufung der erhaltenen Werte erfolgte in Kategorie 2 und 3 (Tab. 21).

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	POS	2
3	neg	neg	POS	2
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	POS	3
7	neg	neg	POS	2
8	neg	neg	POS	2

*Tabelle 21:* Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi H

Die Verlaufskurve (*Abb. 21*) zeigt entsprechend der Kategorisierung (2-3) Netto-OD-Werte, die mit Ausnahme von Tag 4 und 5, oberhalb des Cut off im Bereich von >1- 100 in einem relativ engen Bereich lagen (Netto-OD 19-59). An 5 von insgesamt 7 Probenentnahmetagen konnten Antikörper detektiert werden, an zwei Entnahmetagen (4 und 5) verlief der Antikörpernachweis negativ.



*Abbildung 21:* Antikörperverlauf bei Koi H



**Koi I**

Aus der *Tabelle 22* wird deutlich, dass die virologische Untersuchung in der Zellkultur und mittels PCR auch bei diesem Tier keinen Nachweis von KHV erbrachte.

An 4 von 6 Entnahmetermenin konnten im Serum keine Antikörper detektiert werden. Am ersten (Entnahme 2) und letzten Termin (Entnahme 7) konnten Netto-OD-Ergebnisse ermittelt werden, die nur minimal über dem Cut off lagen.

Entnahme	ZK	PCR	ELISA	
			Bewertung	Kategorie
1	neg	neg	n.u.	
2	neg	neg	POS	2
3	neg	neg	neg	1
4	neg	neg	neg	1
5	neg	neg	neg	1
6	neg	neg	neg	1
7	neg	neg	POS	2

*Tabelle 22:* Ergebnis der virologischen und serologischen Untersuchungen des Koi I

Aus dem Kurvenverlauf (*Abb. 23*) geht hervor, dass im Serum mit Ausnahme von Entnahmetag 2 und 7 keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, die Werte lagen unterhalb des Cut off im negativen Bereich. Die Netto-OD-Ergebnisse an den Entnahmetagen 2 und 7 lagen mit 11 und 4 minimal oberhalb des Cut off.

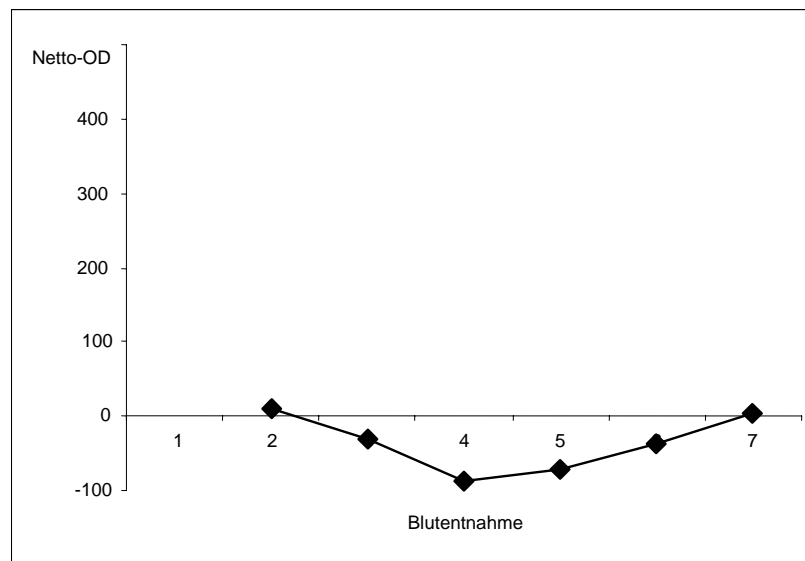


Abbildung 22: Antikörperverlauf bei Koi I

### Zusammenfassende Ergebnisdarstellung auf Teichebene

Im Folgenden soll überprüft werden, inwieweit dieser Teich bei Einführung eines „fraglichen“ Bereiches für die Ergebnisse der Kategorien 2 und 3 als „KHV-Teich“ erkannt werden kann. Mit dem ELISA kann an 6 von 7 Untersuchungsterminen (Ausnahme Termin 2) dieser Testteich aufgrund der positiven Reagenten ( $>$  Kategorie 3) als „KHV-Teich“ identifiziert werden. *Tabelle 23* gibt die prozentuale Verteilung der Bewertungsstufen **POS**, **fraglich** und **neg** auf Bestandsebene wieder.

Bewertung	Entnahmetermin						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>n ges</b>	3	8	9	9	9	8	8
<b>% POS</b>	33,3	0	22,2	11,1	11,1	12,5	25
<b>% fraglich</b>	33,3	87,5	55,5	0	22,2	50	75
<b>% neg</b>	33,3	12,5	22,2	88,8	66,7	37,5	0

*Tabelle 23:* Prozentuale Verteilung der Bewertungsstufen POS, *fraglich* und neg, auf Bestandsebene

Bei Betrachtung der Einzelbewertungen des AK-Tests über die Beobachtungsdauer zeigte sich, dass der Status „KHV-Teich“ vor allem auf die hohe Antikörperreaktion des Koi A zurückzuführen (an 5 von 7 Terminen positiv) ist. Bei Nichtberücksichtigung dieses Fisches könnte dieser Teich lediglich an 2 Terminen (3 und 7) als „positiv“ detektiert werden.

Mit Ausnahme der Ergebnisse des 4. Entnahmeterrnins (bei Nichtberücksichtigung von Koi A) könnte der Teich an 4 der verbleibenden Termine jedoch mindestens als „*fraglicher Teich*“ identifiziert werden.

Über die gesamte Untersuchungsreihe konnten vier Fische (A,B,C,G) als „positiv“ detektiert werden. Ein weiterer Fisch (E) erhielt nur an einem Untersuchungstermin den Status „*fraglich*“. Alle übrigen Koi wurden mehrmals „*fraglich*“ getestet (*Tab. 24*).

Koi	Entnahmeterrn						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	POS	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	POS	POS	POS	POS
<b>B</b>	---	<i>fraglich</i>	POS	neg	neg	---	---
<b>C</b>	<i>fraglich</i>	---	<i>fraglich</i>	neg	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	POS
<b>D</b>	neg	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	neg	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>
<b>E</b>	---	neg	neg	neg	neg	neg	<i>fraglich</i>
<b>F</b>	---	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	neg	neg	neg	<i>fraglich</i>
<b>G</b>	---	<i>fraglich</i>	POS	neg	neg	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>
<b>H</b>	---	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>	neg	neg	<i>fraglich</i>	<i>fraglich</i>
<b>I</b>	---	<i>fraglich</i>	neg	neg	neg	neg	<i>fraglich</i>

*Tabelle 24:* Übersicht über die Bewertung der Ergebnisse der serologischen Untersuchung aller 9 Koi an den 7 Entnahmeterrninen nach Einführung eines „*fraglichen*“ Bereiches

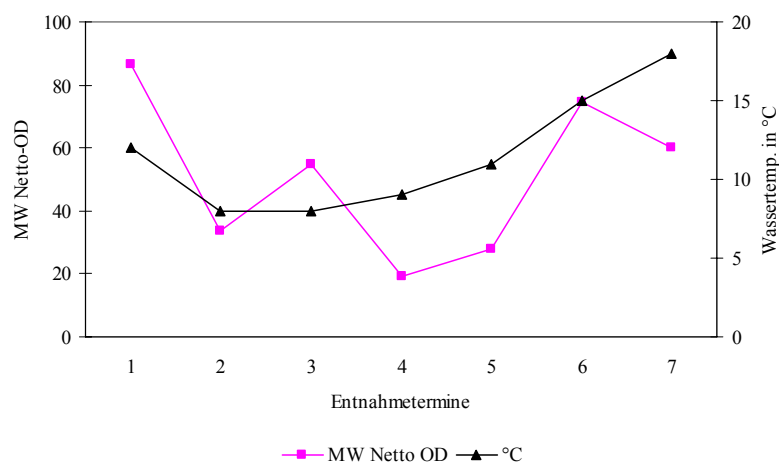
Um einen eventuellen Einfluss der Wassertemperatur auf die Reaktionshöhen im ELISA zu überprüfen, wurde an jedem Entnahmeterrn die aktuelle Wassertemperatur gemessen. *Tabelle 25* gibt die entsprechenden Temperaturen wieder. Den Temperaturwerten wurden die Mittelwerte der Netto-OD-Werte an den einzelnen Terminen gegenübergestellt (*Tab. 25*).

In die Berechnung dieses Mittelwertes gingen die Netto-OD-Werte der negativen Proben (<1) mit dem Zahlenwert „0“ ein.

	Entnahmetermin						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Wassertemp. (°C)</b>	12	8	8	9	11	15	18
<b>MW Netto-OD</b>	86	34	55	19	28	75	60

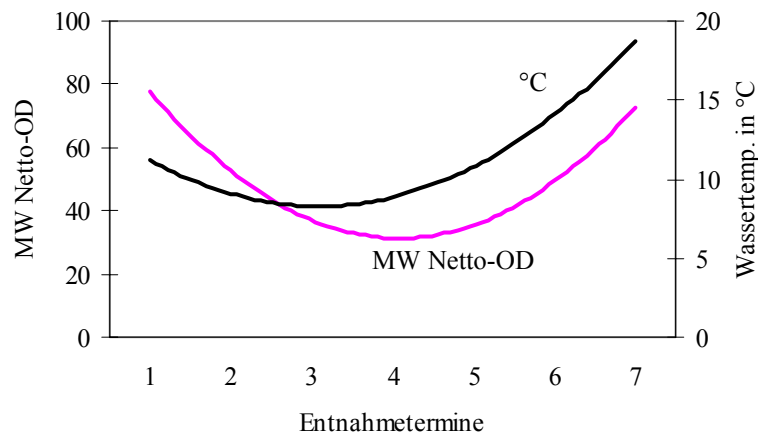
*Table 25:* Übersicht über die Wassertemperaturen an 7 Entnahmeterminen und die Mittelwerte der Netto-OD-Werte aller untersuchten Fische

Die Wassertemperatur-Kurve zeigt im Versuchsverlauf (*Abb. 23*) nur geringe Unterschiede. Dabei lagen die maximalen Unterschiede zwischen den Entnahmen 2 bzw. 3 (8°C) und Entnahme 7 (18°C). Die Reaktionshöhen zeigen grundsätzlich einen ähnlichen Kurvenverlauf. Einem anfänglichem Rückgang der Mittelwerte folgt eine Zunahme vom Entnahmetermin 4 bis 6 entsprechend dem Temperaturverlauf (*Abb. 23*).



*Abbildung 23:* Gegenüberstellung der gemittelten Netto-OD-Werte über den Versuchsverlauf (Entnahmetermine 1-7) und der entsprechenden Wassertemperatur (Liniendiagramm)

Zur Verdeutlichung der Kurvenverläufe wurde in *Abbildung 24* die polynomischen Trendlinien dargestellt.



*Abbildung 24:* Gegenüberstellung der gemittelten Netto-OD-Werte im Versuchsverlauf (Entnahmetermine 1-7) und der entsprechenden Wassertemperatur (polynomische Trendlinien)

### 2.3 Stuserhebung im Rahmen eines freiwilligen Monitorings (III)

Von den 19 untersuchten Betrieben hatten 3 Betriebe (2, 4 und 19) laut Vorbericht in der Vergangenheit Kontakt mit KHV gehabt. Diese „verdächtigen“ Betriebe konnten durch den Nachweis von Antikörpern in den jeweils untersuchten Seren als „positiv“ bestätigt werden. In den Seren der Betriebe 1, 3, 5, 15 und 17 wurden keine Antikörper nachgewiesen. Diese Betriebe wurden aufgrund der gesamten Stichprobe an Seren, worin keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, als „negativ“ eingestuft. In den verbleibenden 11 Betrieben, die mit „unbekanntem“ Status in die Untersuchung aufgenommen wurden, konnten in einigen der jeweils untersuchten Seren Antikörper detektiert werden. Diese Betriebe bekommen daher den Status „positiv“ (*Tab. 26*).

Die Netto-OD-Ergebnisse sind aus *H, Tabelle A 8* zu entnehmen.

<b>Betrieb</b>	<b>n untersucht</b>	<b>n POS</b>	<b>n neg</b>
<b>1</b>	7	0	7
<b>2</b>	5	3	2
<b>3</b>	11	0	11
<b>4</b>	12	12	0
<b>5</b>	3	0	3
<b>6</b>	9	2	7
<b>7</b>	17	12	5
<b>8</b>	12	6	6
<b>9</b>	12	2	10
<b>10</b>	21	13	8
<b>11</b>	10	8	2
<b>12</b>	13	6	7
<b>13</b>	12	2	12
<b>14</b>	9	4	5
<b>15</b>	7	0	7
<b>16</b>	16	6	10
<b>17</b>	10	0	10
<b>18</b>	20	6	14
<b>19</b>	4	3	1

*Table 26:* Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf KHV-Antikörper. Die „positiven“ Betriebe sind grau hinterlegt.

Von den 19 untersuchten Betrieben mit 210 Proben sind 5 Betriebe (26 %) mit „negativ“ bewertet, es wurden keine Antikörper nachgewiesen. In 14 Betrieben (74 %) waren im Probenmaterial Antikörper detektiert worden.

Von den insgesamt untersuchten Proben waren 125 Proben (59,9 %) Antikörper-negativ, 85 Proben (40,5 %) waren Antikörper-positiv (*Tab. 27*).

	n untersucht	POS		neg	
		n	%	n	%
<b>Betriebe</b>	<b>19</b>	14	74	5	26
<b>Proben</b>	<b>210</b>	85	40,5	125	59,5

*Tabelle 27:* Auswertung der serologischen Ergebnisse auf Betriebs- und Probenebene

Aufgrund der häufigen Statusvergabe „positiv“ für die Mehrzahl der Betriebe wurden die Kategorien durch die Einführung eines „fraglichen“ Bereiches neu bewertet (C, Kap. 2.4.5.3, Tab. 6). Aufgrund der Vorberichte war über einen Kontakt mit KHV in der Vergangenheit nichts bekannt, weshalb 16 von 19 Betrieben zu Beginn der Untersuchung als „unverdächtig“ galten. Dieser „fragliche“ Bereich umfasste nun die Kategorie 2 und 3. In diesem Bereich wurden Proben zusammengefasst, deren Netto-OD-Werte zwischen 1 und 100 lagen. Betriebe, aus denen Proben stammten, die ausschließlich ein Untersuchungsergebnis aus diesem Bereich erbrachten, wurden vorerst als „verdächtig“ eingestuft. *Tabelle 6* in C, *Kapitel 2.4.5.3* verdeutlicht diese neue Bewertung der Kategorien 2 und 3.

In *Tabelle 28* sind die aufgrund der Netto-OD-Werte vergebenen Kategorien für die einzelnen Betriebe aufgelistet. Die „negativen“ Teiche 1, 3, 5, 15 und 17 wiesen ausschließlich Nachweise in Kategorie 1 auf, d.h. in den untersuchten Proben wurden keine Antikörper detektiert. Die von den Teichen 6, 9, 13, 14, 16 und 18 untersuchte Stichprobenzahl wies Netto-OD-Werte auf, die zwischen  $\geq 1$  und 100 lagen, weshalb hier die Kategorie 2 und 3 vergeben wurde. Damit erhielten diese Teiche nun den Status „fraglich“. Die verbleibenden Teiche 2, 4, 7, 8, 10-12 und 19 wiesen dagegen Kategorien von 4 und größer auf und sind daher mit dem Status „positiv“ bewertet worden.

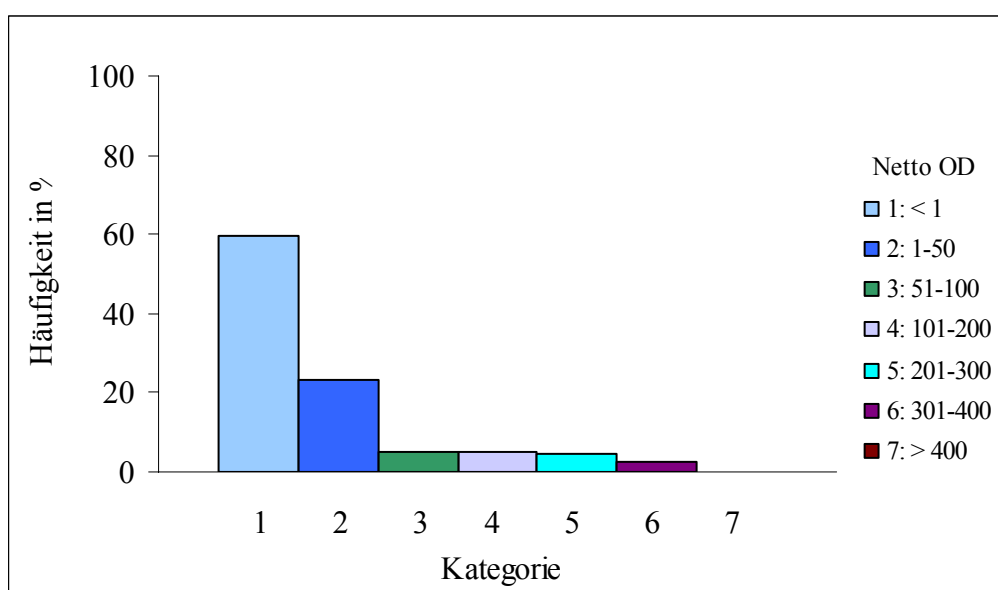
Betrieb	n unter- sucht	n Nachweise in Kategorie						
		1 neg	2 <i>fraglich</i>	3	4	5	6	7
1	7	7						
2	5	2				2	1	
3	11	11						
4	12		2	2	3	3	2	
5	3	3						
6	9	7	2					
7	17	5	10		2			
8	12	6	3	1	1			
9	12	10	1	1				
10	21	8	6	2	4	1		
11	10	2	7			1		
12	13	7	3	2	1			
13	12	10	1	1				
14	9	5	3	1				
15	7	7						
16	16	10	6					
17	10	10						
18	20	14	5	1				
19	4	1				1	2	
<b>n ges.</b>	<b>210</b>	125	49	11	11	9	5	
<b>%</b>	100	59,5	23,3	5,2	5,2	4,3	2,4	

*Tabelle 28:* Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf KHV-Antikörper unter Berücksichtigung der Reaktionshöhen/Kategorien.  
Die „*fraglichen*“ Teiche sind durch eine helle Untergrundfärbung, die „positiven“ Teiche sind farblich dunkler gekennzeichnet.



In *Abbildung 25* ist die Zuordnung der Netto-OD-Werte zu den einzelnen Kategorien graphisch dargestellt.

Der größte Anteil (59,9 %) der Proben wies keine Antikörper auf und ist damit negativ. 23,3 % der Proben lagen im leicht positiven Bereich (Kategorie 2, Netto-OD 1-50), jeweils 5, 2 % der Proben wurden den Kategorien 3 und 4 zugeordnet. 4,3 % fanden sich in Kategorie 5 und nur 2,4 % (Netto-OD 301-400) wiesen Netto-OD-Werte der Größenordnung 6 auf. Es wurden keine Ergebnisse der Kategorie 7 ermittelt.



*Abbildung 25:* Darstellung der Einteilung der Netto-OD-Werte in Kategorien und die Häufigkeit ihrer Vergabe

Die *Tabellen 29 und 30* geben einen Überblick über die Einstufung der Betriebe aufgrund der durch die erzielten Netto-OD-Ergebnisse erfolgten Kategorisierung nach Einführung eines „fraglichen“ Bereichs. Neben 5 Betrieben mit dem Status „negativ“ (1, 3, 5, 15, 17) erhielten 6 Betriebe (6, 9, 13, 14, 16, 18) den Status „fraglich“ bzw. „verdächtig“ und 8 Betriebe (2, 4, 7, 8, 10-12, 19) wurden als „positiv“ angesehen.

Von der Gesamtprobenzahl waren 125 Proben (59,5 %) negativ, 60 Proben (28,5 %) sind als *fraglich* eingestuft worden, da hier Netto-OD-Werte im Bereich von 1 - 100 vorlagen, und 25 Proben (11,9 %) sind positiv, da hier Netto-OD-Werte der Kategorie 4 und größer erreicht wurden.

Betrieb	n untersucht	n POS	n <i>fraglich</i>	n neg
1	7	0	0	7
2	5	3	0	2
3	11	0	0	11
4	12	8	4	0
5	3	0	0	3
6	9	0	2	7
7	17	2	10	5
8	12	2	4	6
9	12	0	2	10
10	21	5	8	8
11	10	1	7	2
12	13	1	5	7
13	12	0	2	10
14	9	0	4	5
15	7	0	0	7
16	16	0	6	10
17	10	0	0	10
18	20	0	6	14
19	4	3	0	1

*Tabelle 29:* Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf KHV-Antikörper nach Festlegung des „*fraglichen*“-Bereichs. Die „*fraglichen*“ Teiche sind durch eine helle Untergrundfärbung, die „positiven“ Teiche sind farblich dunkler gekennzeichnet.

	n unter- sucht	POS		<i>fraglich</i>		neg	
		n	%	n	%	n	%
<b>Betriebe</b>	<b>19</b>	8	42	6	32	5	26
<b>Proben</b>	<b>210</b>	25	11,9	60	28,5	125	59,5

*Tabelle 30:* Auswertung der serologischen Ergebnisse auf Betriebs- und Probenebene

Die nachfolgende *Tabelle 31* gibt die Ergebnisse der PCR-Untersuchung der Organ- und Leukozytenproben der 19 Betriebe wieder.

Die aus den Betrieben 1-19 stammenden und untersuchten Tierkörper wiesen nach eingehender klinischer Begutachtung und Sektion keine Anzeichen einer KHV-Infektion bzw. Erkrankung auf. Bei drei Betrieben (2, 4 und 19) konnte aufgrund des Vorberichtes auf eine Auseinandersetzung mit dem Erreger in der Vergangenheit geschlossen werden. In einem Fall (Betrieb 2) konnte in 2 der untersuchten 5 Organproben Virus-DNA nachgewiesen werden. Die PCR-Untersuchungen der Leukozytenfraktion verliefen negativ. Die PCR-Untersuchung des Probenmaterials der anderen 18 Betriebe erbrachte keinen Hinweis auf das Vorliegen von KHV.

Betrieb	n Fische	Symptome	KHV-Historie	PCR		
				n untersucht	Organpools	Leukozyten
1	7	keine	nein	7	neg	neg
2	5	keine	ja	5	2 POS / 3 neg	neg
3	11	keine	nein	11	neg	neg
4	12	keine	ja	12	neg	neg
5	3	keine	nein	3	neg	neg
6	9	keine	nein	9	neg	neg
7	17	keine	nein	17	neg	neg
8	12	keine	nein	12	neg	neg
9	12	keine	nein	12	neg	neg
10	21	keine	nein	21	neg	neg
11	10	keine	nein	10	neg	neg
12	13	keine	nein	13	neg	neg
13	12	keine	nein	12	neg	neg
14	9	keine	nein	9	neg	neg
15	7	keine	nein	7	neg	neg
16	16	keine	nein	16	neg	neg
17	10	keine	nein	10	neg	neg
18	20	keine	nein	20	neg	neg
19	4	keine	ja	4	neg	neg

*Tabelle 31:* Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (PCR) auf KHV-Genom. Die Betriebe mit vorberichtlicher KHV-Historie sind farblich gekennzeichnet.

### 3 Validierung

#### 3.1 Laborvergleichsuntersuchung

Aus dem vorhandenen Probenpool wurden 42 ausgewählte Seren zu Vergleichsuntersuchungen in das Kooperationslabor von Cefas gesandt. Die Proben wurden zeitgleich an unserem Institut mit derselben AG-Präparation - Cefas-Isolat (UK D-132) –untersucht (H, Tab. A 6).

Tabelle 32 gibt die Ergebnisse wieder.

	Ergebnis LMU			
	n POS	n neg	n gesamt	
Ergebnis Cefas	n POS	23	0	23
	n neg	0	19	19
	n gesamt	23	19	42

Tabelle 32: Anteil an detektierten n POS und n neg im Laborvergleich

Alle 42 Proben wurden von beiden Untersuchungsstellen einheitlich als positiv bzw. negativ beurteilt. Für die Beurteilung der Reaktionshöhen wurden diese in 7 Kategorien eingeteilt (C, Kap. 2.4.5.3, Tab. 5).

Bei Vergleich der Einzelproben in Bezug auf die Reaktionshöhen bzw. Kategorien ergaben sich folgende Daten, die Tabelle 33 zu entnehmen sind.

Die Tabelle gibt die Anzahl der Proben wieder, die von Cefas und LMU den einzelnen Kategorien zugeteilt wurden. Dabei wurden die negativen Proben von beiden Labors zu 100 % erkannt. Den Kategorien 2-7 wurde jeweils eine abweichende Zahl von Proben zugeordnet.

<b>Kategorie</b>	<b>Cefas n</b>	<b>LMU n</b>
<b>1</b>	19	19
<b>2</b>	12	11
<b>3</b>	1	4
<b>4</b>	6	5
<b>5</b>	1	2
<b>6</b>	2	1
<b>7</b>	1	0
<b>n gesamt</b>	42	42

*Tabelle 33:* Anzahl der von beiden Labors detektierten Proben und ihre Kategorisierung

Insgesamt wurden 6 von insgesamt 42 Proben verschiedenen Kategorien zugeordnet. Nur bei einer Probe unterschieden sich die Netto-OD-Werte derart, dass dieselbe Probe von einem Labor um zwei Kategorien höher bzw. niedriger bewertet wurde (*Tab. 34*).

<b>Abweichungen</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>keine</b>	36	85,7
<b>um 1 Kategorie</b>	5	11,9
<b>um 2 Kategorien</b>	1	2,4
<b>um &gt; 2 Kategorien</b>	0	0

*Tabelle 34:* Abweichungen um n Kategorien

### 3.2 Vergleich von AG-Präparationen aus verschiedenen KHV-Isolaten

42 der in Untersuchungsreihe I untersuchten Proben wurden in ELISA-Tests mit Antigenpräparationen aus verschiedenen Virusisolaten untersucht. Darin enthalten waren 14 negative Proben. (aus Untersuchungsreihe I), d.h. in 28 Serumproben sollten Antikörper mit wenigstens einer Antigen-Präparation detektiert werden.

- Verglichen wurden:
1. FLI 2 (Isolat KHV-191, Nr.2)
  2. Thai-Isolat (Vet-Suiss 12/06)
  3. Cefas-Isolat (UK D-132)

*Tabelle 35* gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen der Antigenpräparationen aus den drei Virusisolaten auf Probenebene.

Von 42 insgesamt untersuchten Proben aus den Untersuchungsteichen 1-3, 5/1-3, 6, 7, 9 und 10 (Teich 4 und 8 nicht untersucht) konnten mit der Antigenpräparation FLI Nr. 2 28 Proben (66,7 %), mit der AG-Präparation des thailändischen Isolats 26 (61,9 %) und mit dem englischen Virusisolat 23 Proben (54,8 %) als positiv detektiert werden.

	<i>AG-Präp.</i>		<i>FLI 2</i>		<i>Thai</i>		<i>Cefas</i>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>POS</b>	28	66,7	26	61,9	23	54,8		
<b>neg</b>	14	33,3	16	38,1	19	45,2		

*Tabelle 35:* Vergleich von drei verschiedenen Virusisolaten

Die *Tabellen 36 a-c* zeigen die direkten Vergleiche zwischen den eingesetzten Antigenpräparationen auf Probenebene.

Die Beurteilung der einzelnen Proben stimmten im Einzelvergleich zu 95,2 %, 88,1 % und 90,5 % überein.

<i>AG-Präp.</i>		<i>FLI 2</i>			Übereinstimmung
		<b>n POS</b>	<b>n neg</b>	<b>n gesamt</b>	
<i>Thai</i>	<b>n POS</b>	26	0	26	<b>95,2 %</b>
	<b>n neg</b>	2	14	16	
	<b>n gesamt</b>	28	14	42	

*Tabelle 36 a:* Vergleich von FLI 2 und Thai-Isolat

<i>AG-Präp.</i>		<i>FLI 2</i>			<b>Übereinstimmung</b>
		<b>n POS</b>	<b>n neg</b>	<b>n gesamt</b>	
<i>Cefas</i>	<b>n POS</b>	23	0	23	<b>88,1 %</b>
	<b>n neg</b>	5	14	19	
	<b>n gesamt</b>	28	14	42	

Tabelle 36 b: Vergleich von FLI 2 und CEFAS-Isolat

<i>AG-Präp.</i>		<i>Cefas</i>			<b>Übereinstimmung</b>
		<b>n POS</b>	<b>n neg</b>	<b>n gesamt</b>	
<i>Thai</i>	<b>n POS</b>	22	3	25	<b>90,5 %</b>
	<b>n neg</b>	1	16	17	
	<b>n gesamt</b>	23	19	42	

Tabelle 36 c: Vergleich von Cefas-Isolat und Thai-Isolat

Tabelle 37 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen auf Teichebene.

<b>Teiche</b>	<b>Cefas</b>	<b>FLI 2</b>	<b>Thai</b>	<b>Übereinstimmung</b>
<b>n POS</b>	7	7	7	
<b>n neg</b>	3	3	3	

Tabelle 37: Anzahl der „positiven“ und „negativen“ Teiche bei drei verschiedenen Antigen-Präparationen



Alle drei AG-Präparationen waren in der Lage, 7 der laut Vorbericht „verdächtigen“ Teiche (Teich 4 und 8 nicht in die Untersuchung einbezogen) tatsächlich als „positiv“ zu detektieren. In keinem der 3 „unverdächtigen“ Teiche wurden Antikörper nachgewiesen, sie sind „negativ“.

### 3.3 Validierung der Ergebnisse mit 9 unterschiedlichen FLI-AG-Präparationen (Nr. 1-4, Nr. 6-10, C, Kap. 1.7)

Die Tabellen 38 a und b zeigen die Validierung der Ergebnisse mit unterschiedlichen FLI-Antigen-Präparationen (C, Kap. 1.7 und 2.4.6.3) unter Verwendung der Proben aus Untersuchungsreihe I. Der Test wurde bei den Teichen 1 und 2 mit 9 verschiedenen AG-Präparationen, bei den übrigen Teichen mit 4 AG-Präparationen durchgeführt (H, Tab. A 4 a und b, Tab. A 9).

Teich	n	% POS in FLI-AG-Präparation								
		1	2	3	4	6	7	8	9	10
1	6	50	83,3	33,3	50	66,6	50	33,3	50	50
2	4	0	75	25	50	25	0	0	25	25

Table 38 a: Prozentualer Anteil positiver Proben mit 9 verschiedenen FLI-AG-Präparationen

Bei Teich 2 wurden bei 3 von 9 AG-Präparationen (1, 7 und 8) keine Antikörper nachgewiesen, d.h. hier ist der Teich „negativ“ getestet worden (Tab. 38 a).

Teich	n	% POS in			
		FLI-AG-Präparation			
		2	8	9	10
3	8	100	75	87,5	87,5
4	4	75	50	50	50
5-1	2	100	50	50	100
5-2	2	0	0	0	0
5-3	2	100	100	100	100
6	4	100	75	100	100
7	5	80	40	60	60
8	4	100	50	75	100
9	4	0	0	0	0
10	5	0	0	0	0

*Tabelle 38 b:* Prozentualer Anteil positiver Proben mit 4 verschiedenen FLI-AG-Präparationen. Die „negativen“ Teiche sind farblich gekennzeichnet.

Bei 3 Teichen (5/2, 9 und 10) konnten unter Verwendung der 4 AG-Präparationen keine Antikörper detektiert werden. Damit wurde der „negative“ Status dieser Teiche bestätigt (farbliche Markierung, *Tab. 38 b*).

Die übrigen Teiche, mit Ausnahme von Teich 2, wurden bei jeder verwendeten AG-Präparation durch den Nachweis von Antikörpern „positiv“ getestet und damit der Status bestätigt (*Tab. 38 a und b*).

Bei Betrachtung der Identifikation der „positiven“ bzw. „negativen“ Teiche konnte mit Ausnahme des Teiches 2 mit jeder AG-Präparation der entsprechende Status einheitlich detektiert werden (*Tab. 39*).

Zu 100 % konnte bei den Untersuchungsteichen 1, 3-5/1+3, 6-8 der Status „positiv“ bestätigt werden. Die Teiche 5/2, 8 und 9 sind stets „negativ“ getestet worden.

Der Teich 2 wurde nur in 67 % der Testungen als „positiv“ identifiziert.

<b>Teich</b>	<b>n</b>	<b>Übereinstimmung der Statusidentifikation in %</b>
<b>1</b>	9	100
<b>2</b>	9	67
<b>3</b>	4	100
<b>4</b>	4	100
<b>5-1</b>	4	100
<b>5-2</b>	4	100
<b>5-3</b>	4	100
<b>6</b>	4	100
<b>7</b>	4	100
<b>8</b>	4	100
<b>9</b>	4	100
<b>10</b>	4	100

*Tabelle 39:* Statusidentifikation für die Untersuchungsteiche bei verschiedenen AG-Präparationen

### 3.4 Überprüfung möglicher Kreuzreaktionen

#### 3.4.1 Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen das Karpfenpockenvirus (CyHV-1)

*Tabelle 40* zeigt die Ergebnisse des ELISA-Tests auf, der mit Serumproben durchgeführt wurde, die von 5 mit CyHV-1 infizierten Karpfen stammten. Die erzielten Netto-OD-Werte (nach 2-maliger Wiederholung) der Seren CP 1-5 sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

	<b>CP 1</b>	<b>CP 2</b>	<b>CP 3</b>	<b>CP 4</b>	<b>CP 5</b>
	34	49	88	-127	-11
<b>Netto OD</b>	31	21	62	-98	-1
	25	30	69	-105	-16
<b>Bewertung</b>	<b>POS</b>	<b>POS</b>	<b>POS</b>	<b>neg</b>	<b>neg</b>

*Tabelle 40:* Reaktionshöhen von CP 1-5 nach 2-maliger Wiederholung

3 der 5 Seren weisen vermeintliche Antikörper-Reaktionen auf und sind damit positiv. In 2 Seren konnten keine Antikörper detektiert werden, sie sind negativ (Kategorie 1). Die Netto-OD-Werte können für die Seren CP 1 und 2 der Kategorie 2, für CP 3 der Kategorie 3 zugeordnet werden und liegen damit im niedrig positiven Bereich.

#### 3.4.2 Überprüfung von unspezifischen Reaktionen bei Beschichtung mit naiver Zellkultur

Mögliche unspezifische Reaktionen („Hintergrundgeräusche“), die durch Zellkulturmaterial verursacht werden könnten, wurden in 2 Versuchsansätzen mit 18 willkürlich aus dem Probenpool ausgewählten Seren überprüft.

Alle Ansätze ergaben Reaktionen in Höhe der Leerprobe bzw. Blank (*Tab. 41*).

Testung	Netto-OD Blank	n unter- sucht	neg Netto-OD				
			n	%	MW	MIN	MAX
1	-33	18	18	100	-32	-51	-7
2	-60	18	18	100	-48	-70	-12

*Tabelle 41:* Netto-OD-Werte von Blank und Testproben bei Beschichtung mit naiver Zellkultur

### 3.5 Zwischen-Platten-Validierung

Zur Zwischen-Platten-Validierung wurden 76 Seren aus dem Probenpool der Monitoringuntersuchung (III) ausgewählt.

An drei unterschiedlichen Tagen wurden diese Seren untersucht und hinsichtlich ihrer Bewertung verglichen (*H, Tab. A 7*). Das Ergebnis als Vergleich zwischen den Testungen 1, 2 und 3 und die Angabe der Übereinstimmung sind in *Tabelle 42* ersichtlich.

Übereinstimmungen	Vergleich der Bewertungen (POS , neg) zwischen den Testungen		
	1 und 2	2 und 3	1 und 3
n beobachtete / maximal mögliche	67 / 76	71 / 76	73 / 76
%	88,2	93,4	96,1

*Tabelle 42:* Vergleich der Bewertungen zwischen den Testungen im Rahmen der Zwischen-Platten-Untersuchung

Die Übereinstimmung zwischen 1. und 2. Testung betrug 88,2 % und zwischen 2. und 3. Testung 93,4 %. Der Vergleich von 1. und 3. Testung ergab eine Übereinstimmung von 96,1 %.

Neben den Bewertungen unterschieden sich auch die Zuordnungen zu den einzelnen Kategorien. Die veränderte Zuordnung betrug mit einer Ausnahme nur jeweils 1 Stufe.

Im Zwischen-Platten-Vergleich zeigten sich zwischen 6 und 16 Abweichungen um eine Kategorie, wobei die Kategorien 2 und 3 auf Grund der geringeren Abstufung als eine Kategorie gewertet wurden (Tab. 43). Lediglich ein Ergebnis musste nach den zwei Wiederholungen um zwei Kategorien höher eingestuft werden.

Abweichungen um		Vergleich der Kategorisierungen zwischen den Testungen		
		1 und 2	2 und 3	1 und 3
<b>1</b>	<b>n</b>	16	6	10
<b>Kategorie</b>	<b>%</b>	21,1	7,9	13,2
<b>2</b>	<b>n</b>	0	0	1
<b>Kategorien</b>	<b>%</b>	0	0	1,3

Tabelle 43: Vergleich der Kategorisierungen zwischen den Testungen im Rahmen der Zwischen-Platten-Untersuchung (n=76)

Tabelle 44 zeigt die Ergebnisse der Statusidentifikation der **POS/fraglich/neg**- Betriebe in den drei unterschiedlichen Testungen im Rahmen der Zwischen-Platten-Untersuchung. In allen Testungen konnte den Betrieben zu jedem Zeitpunkt der identische Status zugeordnet werden. Daraus ergab sich eine Übereinstimmung der Statusidentifikation von 100 %.

Betriebe	Testung			Übereinstimmung
	1	2	3	
<b>n POS</b>	2	2	2	<b>100 %</b>
<b>n fragliche</b>	3	3	3	
<b>n neg</b>	4	4	4	

Tabelle 44: Statusidentifikation der untersuchten Betriebe nach 3-maliger Testung

### 3.6 Innerhalb-Platten-Validierung

Zur Innerhalb-Platten-Validierung wurden drei Testseren der Kategorie 1, 4 und 6 ausgewählt. Pro Testung wurden die Seren jeweils 10 x auf eine MTP pipettiert. Der Versuchsansatz wurde an zwei folgenden Untersuchungstagen wiederholt (*H, Tab. A 1-3*).

Die Bewertung der Seren als „negativ“ bzw. „positiv“ konnte in allen Ansätzen bestätigt werden (*Tab. 45*).

Übereinstimmungen		Vergleich der Bewertungen (POS , neg) zwischen den Ansätzen (10 pro Testung) von Seren der		
		Kategorie 1 (negativ)	Kategorie 4 (positiv)	Kategorie 6 (positiv)
Testungen 1 - 3	n / gesamt	30 / 30	30 / 30	30 / 30
	%	100	100	100

*Tabelle 45:* Vergleich der Bewertungen der Seren einer bestimmten Kategorie über drei Testungen

Abweichungen ergaben sich bei den beiden positiven Seren hinsichtlich der Kategorisierung. In 10 % - 40 % der Ansätze wurde das Ergebnis einer um 1 Stufe niedrigeren Kategorie zugeordnet (*Tab. 46*).

Serum	Kategorie	Abweichungen um 1 Stufe		
		in %		
		bei Testung		
		1	2	3
<b>negativ</b>	1	0	0	0
<b>positiv</b>	4	40	20	40
<b>positiv</b>	6	40	10	40

*Table 46:* Abweichungen von der ursprünglichen Kategorisierung der Testseren bei drei Testungen

*Table 47* zeigt den engen Bereich, in dem die Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte der Netto-OD angesiedelt sind, auf.

*Abbildung 26* verdeutlicht dieses graphisch.

Serum	Testung	MW	MIN	MAX
<b>Kategorie 1</b>	1	-39	-48	- 32
	2	-33	- 44	- 22
	3	-33	- 38	- 27
<b>Kategorie 4</b>	1	107	70	131
	2	113	79	134
	3	104	87	128
<b>Kategorie 6</b>	1	313	281	357
	2	339	302	385
	3	323	283	386

*Table 47:* Übersicht über die MW, Min- und Max-Werte der drei Testseren



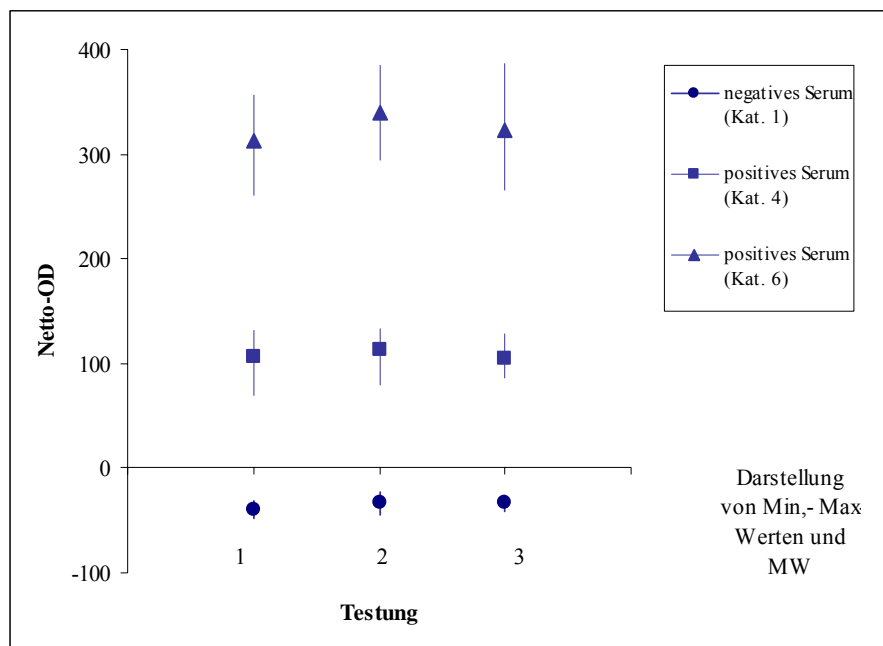


Abbildung 26: Graphische Darstellung der MW, Min und Max-Werte der drei Seren an den verschiedenen Testungen

In der nachfolgenden *Tabelle 48* sind die bei Testung 1 bis 3 erreichten Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der drei Testseren dargestellt.

Serum	Testung	MW	Stabw	Var.-Koeff. %
Kategorie 1	1	-39	5	(-13)
	2	-33	8	(-25)
	3	-33	5	(-16)
Kategorie 4	1	107	18	17
	2	113	17	15
	3	104	14	13
Kategorie 6	1	313	32	10
	2	339	37	11
	3	323	40	13

Tabelle 48: Übersicht über Mittelwert (MW), Standardabweichung (Stabw) und Variationskoeffizient (Var.-Koeff.) der Testseren

Durch den Variationskoeffizient wird die Standardabweichung in Abhängigkeit vom Mittelwert ausgedrückt, man setzt also die Streuung zum Mittelwert in Relation.

Die geringen Prozentzahlen dieses Koeffizienten für die Seren der 4. und 6. Kategorie zeigen, dass die Streuung der Einzelwerte für das entsprechende Serum in einem tolerierbaren Rahmen lag.

### 3.7 Regressionsanalyse

Um den Einfluss des positiven Kontrollserums auf die nach Formel 1 berechneten Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Serumproben der Untersuchungsreihe I mit der Formel 2 alternativ berechnet.

Die Ergebniswerte in Netto-OD (Formel 1) und OD % (Formel 2) wurden in einer Regressionsanalyse verglichen (Abb. 27).

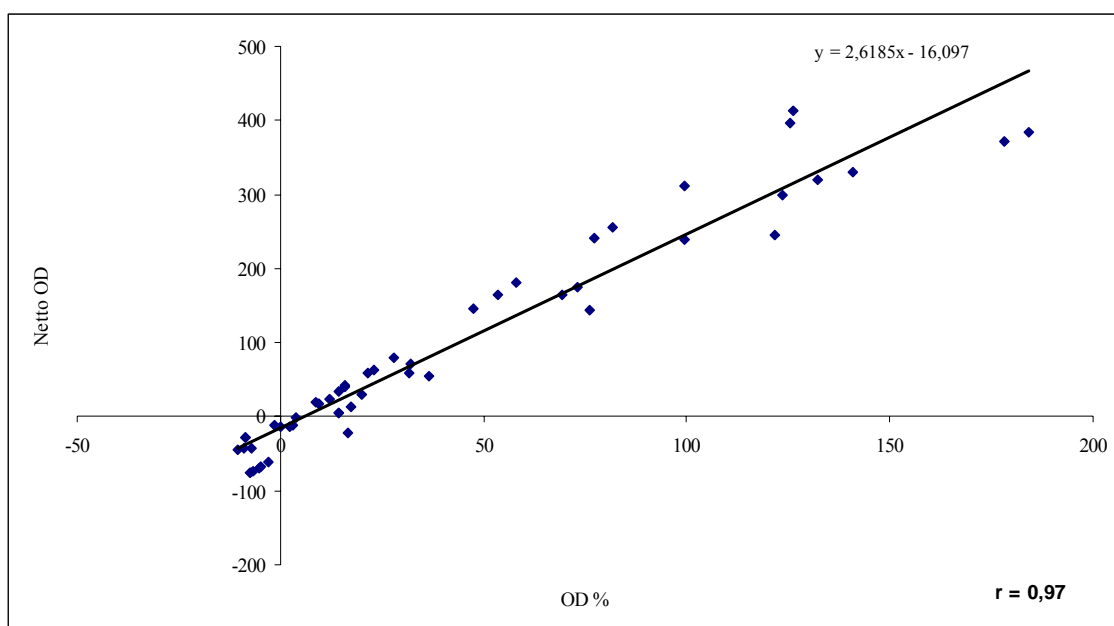


Abbildung 27: Regressionsanalyse der Ergebniswerte ohne (Netto-OD) und unter Einbeziehung der Positivkontrolle (OD %)

Die Korrelationsanalyse der errechneten Wertereihen ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,97$  eine sehr gute Korrelation.

## **E Diskussion**

Die weltweite Verbreitung von KHV innerhalb der vergangenen Jahre ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich das Virus in einer nicht nachweisbaren, latenten Phase befinden kann und somit Virus-tragende Fische unerkannt in Verkauf und Handel gelangen können (Bretzinger et al. 1999; Hedrick et al. 2000; Neukirch und Kunz 2001; Perelberg et al. 2003; Way et al. 2003; Sano et al. 2004; Tu et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, inwieweit KHV-Infektionen unter bestimmten Bedingungen latent bleiben und dennoch in virologischen und serologischen Testverfahren nachgewiesen werden können.

Direkte Nachweisverfahren besitzen dabei den Nachteil, dass die Untersuchungen mit der größten Nachweissicherheit an Organmaterial und somit nur am toten Tier erfolgen können. Darüber hinaus sind die Testverfahren sehr aufwendig, zeitintensiv und teuer und müssen in der Regel in Speziallabors durchgeführt werden.

Alternativ können Antikörper gegen KHV als Indikator dienen, um eine vorausgegangene Auseinandersetzung mit dem Erreger zu bestätigen und die Annahme, dass diese Fische potentielle Carrier sind, also das Virus in sich tragen, stützen.

Deshalb ist die Entwicklung eines indirekten Testsystems zum Infektionsnachweis am lebenden Tier von großer Bedeutung. Die Etablierung und Anwendung eines wenig invasiven Bluttests könnten schon im Vorfeld Aussagen zum Immunstatus von Tieren machen und einen vorangegangenen Kontakt mit KHV nachweisen.

Nach Swain (2003) stellt der Nachweis von Antikörpern ein vortreffliches Mittel dar, um eine zurückliegende Auseinandersetzung mit einem Pathogen zu beweisen. Da die Serologie bei Fischen im Zusammenhang mit Virusinfektionen nicht vollständig erforscht ist, findet der Nachweis von Antikörpern bei Fischen gegen Viren als diagnostische Methode noch keine Verwendung, um einen Virusstatus einer Population festzulegen. Eine Validierung serologischer Methoden soll es möglich machen, sie als diagnostische Nachweismethoden zukünftig einzusetzen.

Dies setzt ein validiertes und zuverlässiges Testsystem voraus.



























































































































