Aus dem

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Validierung eines PCR-basierten Lateral Flow Assays zum qualitativen Nachweis von Koi-Herpesvirus DNA in verschiedenen Probenmatrizes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Finn Niklas Loose
aus Kiel

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Dieter Steinhagen, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 15.06.2021

Inhalt

1 Einleitung 1
2 Literaturübersicht 2
2.1 KHV Taxonomie 2
2.2 KHV-Genom 2
2.3 Virusmorphologie 3
2.4 Epidemiologie 3
2.5 Klinik der KHV-Erkrankung 5
2.6 Pathogenese der KHV-Erkrankung 6
2.7 Pathologisches Bild der Koi-Herpesvirus-Erkrankung 6
2.8 Einfluss der Temperatur auf die Koi-Herpesvirus-Erkrankung 7
2.9 Latenz der Koi-Herpesvirus-Infektion 8
2.10 Prophylaxe und Behandlung 8
2.11 Diagnostik 9
2.11.1 Direkter Virusnachweis 9
2.11.2 Indirekter Virusnachweis 10
3 Material und Methoden 12
3.1 Prinzip des verwendeten PCR-basierten Lateral Flow Immunoassays (PCR-LFA) 12
3.2 Material 15
3.2.1 Viren und Virusstämme 15
3.2.2 Bakterien und Einzeller 16
3.2.3 Zellkulturen 16
3.2.4 Fischgewebe 16
3.2.5 Chemikalien und Reagenzien 18
3.2.6 Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien 19
3.2.7 Geräte 19
3.3 Methoden 20
3.3.1 Kultivierung der FHM-Zellen 20
3.3.2 Kultivierung der EPC-Zellen 20
3.3.3 Virusanzucht von VHSV, PFRV, SVCV, IHNV 21
3.3.4 DNA-Aufreinigung 21

3.3.5 RNA-Aufreinigung aus Viren ... 22
3.3.6 KHV-Plasmidstandard ... 22
3.4 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von KHV ... 23
3.5 KHV-PCR-LFA ... 24
3.6 Validierung des KHV-PCR-LFA ... 25
3.6.1 Analytische Sensitivität ... 26
3.6.2 Analytische Spezifität ... 27
3.6.3 Intra-Assay Präzision ... 27
3.6.4 Inter-Assay Präzision ... 27
3.6.5 Diagnostische Sensitivität und Spezifität ... 28
4 Ergebnisse ... 31
4.1 Bestimmung der Analytischen Sensitivität mittels Probit-Analyse ... 31
4.2 Analytische Spezifität ... 32
4.3 Intra-Assay Präzision ... 33
4.4 Inter-Assay Präzision ... 35
4.5 Diagnostische Sensitivität und Spezifität ... 36
5 Diskussion ... 46
6 Zusammenfassung ... 53
7 Summary ... 55
8 Literaturverzeichnis ... 57
9 Danksagung ... 68
10 Anhang ... 69

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AE Puffer	DNA Elutionspuffer
A. hydrophila	*Aeromonas hydrophila*
B. cereus	*Bacillus cereus*
bp	Basenpaar
kbp	kilo (tausend)-Basenpaare
BBQ	black berry quencher
CEV	Carp edema virus
CNGV	Carp interstitial nephritis and gill necrosis virus
cpe	cythopathischer Effekt
Ct	cycle-treshold
CyHV 1-3	Cyprinides Herpesvirus 1-3
d	day(s)/Tag(e)
dd	Aqua bidestillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	Epithelioma papulosum cyprini
et al.	und andere
EU	Europäische Union
F	forward/vorwärts
FAM	6-Carboxyfluorescein
FHM	fathead minnow/Fettköpfige Elritze
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
IAC	Internal Amplification Control/Interne Amplifikationskontrolle

IHNV	Infectious hematopoetic necrosis virus/Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose
KHV	Koi-Herpesvirus
konv.	konventionell
L.	Linné (Kürzel der zoologischen Taxonomie)
LFA	Lateral Flow Assay
LOD	Limit of Detection/absolute Nachweisgrenze
LfULG	Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie Sachsen
MEM	Minimum Essential Medium
MIQUE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NEAA	non-essential amino acids/nicht-essentielle Aminosäuren
NPC	Positivkontrolle
NTC	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OIE	Office International des Epizooties/ Weltorganisation für Tiergesundheit
ORF	open reading fragment
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	post infectionem
PFRV	Pikefry rhabdovirus
q	quantitative
R	reverse/rückwärts
RPA	Recombinase polymerase amplification
RT	real-time
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
STARD	Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies
sp.	Spezies
spp.	mehrere Spezies
subsp.	Subspezies

SMUL	Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft
SVCV	Spring viraemia of carp virus/Virus der Frühlingsvirämie der Karpfen
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TK-Gen	Thymidinkinase-Gen
TiHo Hannover	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
UDG	Uracil-D-Glycosylase
VO	Verordnung
VHSV	Viral hemorrhagic septicemia virus/Virus der hämorrhagischen Septikämie
VMF Leipzig	Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

1 Einleitung

Die Koi-Herpesvirus-Infektion ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, die zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen kann. Entsprechend der gültigen Rechtsnormen (EU-Richtlinie 2006/88/EG; Durchführungsbeschluss der Kommission (EU) 2015/1554) sowie der „Amtlichen Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Untersuchungsmaterial tierischen Ursprungs im Hinblick auf anzeigepflichtige Tierseuchen“ des FLI, ist der Erregernachweis mittels PCR als Goldstandard anzusehen. Die zu verwendenden PCR-Protokolle sind zwar einerseits sehr sensitiv, benötigen jedoch geschultes, fachkundiges Personal für die Durchführung und sind zeitaufwendig.

Ein „point of care“ (POC) Testsystem für einen schnellen Koi-Herpesvirus (KHV) Nachweis direkt am Teich würde die Zeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses maßgeblich reduzieren. Auf Grundlage eines zuverlässigen Testergebnisses wäre eine sofortige Einleitung von tierseuchenrechtlichen Bekämpfungsmaßnahmen möglich. Ein Zeitverlust durch Bearbeitung, Versand und Testung entnommener Proben in Untersuchungseinrichtungen entfällt. Im Rahmen des ProAnimalLife Kooperationsprojektes „VirusDetect“ wurde von der Firma Milenia Biotech GmbH ein Diagnostik-Prototyp für den Nachweis von KHV-DNA in verschiedenen Probenmatrizes entwickelt. Der Test basiert auf einer Multiplex-PCR, die an einen Lateral Flow Immunoassay gekoppelt ist. Aus der KHV-DNA diagnostischer Proben werden FITC-markierte DNA-Stränge reproduziert. Während einer sich anschließenden Hybridisationsphase binden Biotin markierte Sonden an die KHV-spezifischen PCR-Produkte. Die Auswertung erfolgt durch einen eingesetzten Teststreifen. Der Nachweis von KHV DNA wird durch ein qualitatives Signal in Form einer Testlinie nachgewiesen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Validierung des neuen Diagnostikprototypen anhand eines definierten Probenpanels. Die Validierung orientierte sich an den MIQUE-Richtlinien (BUSTIN et al 2009) und STARDS Empfehlungen (COHEN et al 2016). Sie umfasste die Bestimmung der Analytischen Sensitivität und Spezifität, die Überprüfung der Intra-Assay Präzision und Inter-Assay Präzision von Testergebnissen sowie die Überprüfung der Diagnostischen Sensitivität und Spezifität.

2 Literaturübersicht

2.1 KHV Taxonomie

Das KHV (Cyprines Herpesvirus 3) ist der Auslöser der Koi-Herpesvirus-Erkrankung bei Koi Karpfen und Karpfen (GILAD et al. 2004). In der Literatur findet sich für KHV auch die Bezeichnung Carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (DISHON et al. 2005). Diese Bezeichnung basiert auf den pathologischen Veränderungen, ausgelöst durch die Virusinfektion in Kiemen und Niere. HEDRICK et al. (2000) beschrieben den Erreger erstmalig als Herpesvirus. Der Literatur entsprechend sind insgesamt 14 Herpesviren in der Lage Fische zu infizieren (HANSON et al. 2011).

Das Koi-Herpesvirus wird zusammen mit den Cyprinen Herpesviren 1 und 2 (CyHV-1 und CyHV-2) taxonomisch der Familie Alloherpesviridae in der Ordnung Herpesvirales zugeordnet (WALTZEK et al. 2009; MICHEL et al. 2010; KING et al. 2011; HEDRICK et al. 1990; HANSON et al. 2011; BRUNO und WOO 2011). Innerhalb der Alloherpesviridae zählt es zum Genus Cyprinivirus. Cyprine Herpesviren besitzen einen hohen Verwandtschaftsgrad (WALTZEK 2005). Das CyHV-1 ist der Auslöser der Karpfenpocken-Erkrankung (HEDRICK et al. 1990). CyHV-2 löst eine hämatopoetische Nekrose bei Goldfischen aus (JUNG und MIYAZAKI 1995).

2.2 KHV-Genom

Mit einer Genomgröße von 295.000 Basenpaaren (295 kbp) besitzt das KHV das größte Genom innerhalb der Ordnung der Herpesvirales (AOKI et al. 2007; KING et al. 2011). Das Genom codiert 156 ORFs. ORFs sind Nukleotidsequenzen, welche ausschließlich aus Aminosäuren codierenden Nukleotidtriplets bestehen. Jeder ORF ist von einem Start- und Stopp-Codon flankiert (AOKI et al. 2007).

Das KHV-Genom exprimiert 40 Strukturproteine. Diese Proteine fungieren zum einen als virale morphologische Bestandteile, zum anderen besitzen sie aber auch immunogene Wirkungen (MICHEL et al. 2010; HANSON et al. 2011).

Zwölf konservierte Genregionen finden sich im KHV-Genom. Diese Areale exprimieren Proteine mit unterschiedlicher Funktion. Die Peptide sind essentiell für den Kapselaufbau, die DNA-Replikation und die DNA-Faltung. Das Gen der DNA-Polymerase ist eine der am besten konservierten Genregionen im KHV-Erbgut (HANSON et al. 2011; ENGELSMA et al. 2013).

Das Genom von 11 KHV Isolaten konnte bis heute komplett sequenziert werden (AOKI et al. 2007; LI et al. 2015; GAO et al. 2018). Mit > 99% besteht ein hoher Grad genetischer Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Isolaten. Isolate aus den USA und Israel scheinen genetisch eng verwandt zu sein. Vergleichende Genomanalysen der Japanischen Isolate zeigen deutliche Abweichungen (AOKI et al. 2007; RAKUS et al. 2013). Aufgrund dessen schlugen AOKI et al. (2007) vor, die Virus-Isolate in eine europäische und eine asiatische Genomgruppe einzuteilen. Vertreter der asiatischen Genomgruppe konnten jedoch auch in Europa identifiziert werden (BIGARRÉ et al. 2009). Darüber hinaus stellten GAO et al. (2018) die Vermutung einer dritten noch unbekannten Genomgruppe auf. BIGARRÉ et al. (2009) und KURITA et al. (2009) konnten Virus-Isolate als Intermediär-Typen mit Eigenschaften beider Genomgruppen beschreiben.

2.3 Virusmorphologie

Als Vertreter der Ordnung Herpesvirales zeigen Koi-Herpesviren einen grundsätzlichen gleichen Aufbau. Die Virionen bestehen immer aus den folgenden Bestandteilen: Viruskern, Viruskapsid, Tegument und einer Virushülle (KING et al. 2011).

Im zentralen Kern befindet sich die virale lineare doppelsträngige DNA (HEDRICK et al. 2000; WALTZEK 2005; HANSON et al. 2011). Der Durchmesser der viralen Partikel variiert dabei in Abhängigkeit von der infizierten Wirtszelle zwischen 167 und 230 nm (HEDRICK et al. 2000; MIYAZAKI et al. 2008).

2.4 Epidemiologie

Die KHV-Erkrankung (KHVE) ist eine weltweit auftretende Fischseuche. Die ersten Todesfälle betroffener Tiere wurden Ende der 1990er Jahre in den USA und Israel dokumentiert (HEDRICK et al. 2000). Zeitgleich wurde ein Anstieg von Seuchenausbrüchen bei Karpfen und Koi Karpfen in Deutschland und Großbritannien beschrieben (BRETZINGER et al. 1999; WALSTER 1999; NEUKIRCH und KUNZ 2001). Internationaler Fischhandel begünstigte die weltweite Verbreitung der Erkrankung. Ausbrüche der KHVE bei Tieren wurden weltweit in 28 Staaten identifiziert (OIE Kapitel KHV).

Das KHV verursacht bei Karpfen (*Cyprinus carpio carpio*) und Koi Karpfen (*Cyprinus carpio koi*) ein klinisches Infektionsgeschehen (GILAD et al 2004). Diverse weitere Fischarten können sich mit dem Virus infizieren (BERGMANN et al. 2010a). Diese zeigen keine klinische Erkrankung, fungieren aber als Virus-Carrier und -Vektoren. Mehrere Autoren wiesen mittels molekularbiologischer Diagnostikmethoden KHV-DNA in Geweben vom Goldfisch (*Carassius auratus auratus*) nach (EL-MATBOULI et al. 2007; SADLER et al. 2008). BERGMANN et al.

(2010a) erbrachten in ihrer Studie den Nachweis einer KHV-Infektion beim Goldfisch. In der Studie waren Goldfische in der Lage, das KHV auf karpfenartige Spezies zu übertragen, ohne klinisch erkrankt zu sein. Der Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) und die Karausche (*Carassius carassius*) zeigten nach gemeinschaftlicher Haltung mit infizierten Karpfen ebenfalls keine Krankheitsanzeichen. Epidemiologisch spielen Sie jedoch als Virus-Carrier eine wichtige Rolle für die Infektionsroute von KHV (RONEN et al. 2003; EL-MATBOULI et al. 2007).

Karpfenartige Zuchthybride sind empfänglich für eine KHV-Infektion. BERGMANN et al. (2010b) kreuzten Fisch-Spezies, um die Resistenz hinsichtlich einer KHV-Infektion zu untersuchen. Die Hybride aus Koi Karpfen und Karauschen zeigten nach einer Infektion eine deutlich höhere Mortalität. Die Zuchthybride von Koi Karpfen und Goldfischen erwiesen sich deutlich resistenter.

In Australien wird die Wirtspezifität des KHV ausgenutzt, um die für die heimische Fauna bedrohliche Karpfenpopulation einzudämmen (MCCOLL et al. 2017).

Die Kiemen galten in der Literatur lange Zeit als alleinige Eintrittspforte des Virus bei Karpfenartigen (GILAD et al. 2004; PIKARSKY et al. 2004; DISHON et al. 2005). Infektionsstudien zeigten eine hohe Viruslast in untersuchten Kiemengeweben verendeter Tiere (GILAD et al 2004). Außerdem zeigten sich frühzeitig pathologische Veränderungen in den Kiemen (PIKARSKY et al. 2004). Infizierte Fische scheiden erhebliche Virusmengen über die Kiemenöffnungen in das Wasser aus. Die Kiemen sind somit ein zentraler Ort der Virusreplikation (MOUCHIRA M. und EL-DIN MOHI 2011).

COSTES et al. (2009) widerlegten diese Hypothese. In ihrer Studie konnte mit Hilfe von Biolumineszenz Untersuchungen gezeigt werden, dass die Haut der Fische die Eintrittspforte des Virus darstellt. Die Viruspartikel replizieren sich nach einer erfolgten Infektion in den oberen Hautschichten. Der direkte Kontakt zwischen Fischen führt somit zu einer rasanten Virusverbreitung innerhalb einer Population.

Das Virus ist im Kot von infizierten Tieren nachweisbar. DISHON et al. (2005) konnten virale Antigene 4 bis 8 Tage nach der Infektion im Magen-Darm-Trakt identifizieren. KHV wird ab dem 5. Tag p.i. in den Kot sezerniert. Eine Virusverbreitung findet somit auch über den Kot statt.

Nach seiner Ausscheidung ist das Virus bis zu 4 Stunden im Wasser infektiös (PERELBERG et al. 2003; DISHON et al. 2005). Das KHV wird auf empfängliche Spezies über das Wasser übertragen. Infektionsversuche belegen eine erfolgreiche Infektion von Karpfenartigen durch das alleinige Eintauchen in infektiöses Wasser. So erfolgte eine Infektion empfänglicher Spezies nach gemeinschaftlicher Beckenhaltung mit infizierten Fischen (RONEN et al. 2003; PERELBERG et al. 2003; ST-HILAIRE et al. 2005).

2.5 Klinik der KHV-Erkrankung

Die KHVE tritt weltweit mit Sterblichkeitsraten von 80 bis 100 % in betroffenen Beständen auf. Einflussfaktor ist das Alter der infizierten Tiere. Hohe Sterblichkeitsraten wurden primär in Beständen jüngerer Tiere beschrieben (WALSTER 1999; BRETZINGER et al. 1999; HEDRICK et al. 2000; PERELBERG et al. 2003). Als Ursache vermuten PERELBERG et al. (2003) ein schwächer ausgeprägtes Immunsystem.

Die Mortalität erreicht zwischen dem 8. und 12. Tag der Infektion ihr Maximum (HEDRICK et al. 2000; PERELBERG et al. 2003).

Betroffene Tiere zeigen 2 bis 3 Tage p.i. klinische Symptome. Infizierte Fische verharren zunächst regungslos am Teichboden mit deutlicher Appetitlosigkeit. Auffällige Hautläsionen in Form von Ulzerationen sowie Hämorrhagien sind charakteristisch und leicht zu erkennen (WALSTER 1999; MICHEL et al. 2010).

Nekrosen, Farbveränderungen sowie eine Hypersekretion im Bereich der Kiemen können beobachtet werden. Die Literatur beschreibt außerdem eine Hyperämie im Bereich des Abdomens und der Flossenansätze. Ebenfalls dokumentiert sind abnormale Schwimmbewegungen aufgrund von Schäden im infizierten Nervengewebe (WALSTER 1999; BRETZINGER et al. 1999; HEDRICK et al. 2000; PERELBERG et al. 2003; MIYAZAKI et al. 2008; MOUCHIRA M. und EL-DIN MOHI 2011).

PERELBERG et al. (2003) beschreiben ophthalmologische Veränderungen in Form eines bilateralen Enophthalmus. Die Infektion mit dem KHV ist die Grundlage für eine Reihe an sekundären Infektionen durch weitere Pathogene. BRETZINGER et al. (1999) und HEDRICK et al. (2000) diagnostizierten bei infizierten Fischen Co-Infektionen mit Bakterien aus den Gattungen Aeromonas und Pseudomonas.

2.6 Pathogenese der KHV-Erkrankung

COSTES et al. (2009) konnten durch Bioluminiszenz-Untersuchungen die Haut als primäre Eintrittspforte für das Virus charakterisieren. Das epitheliotrope Herpesvirus dringt zu Beginn der Infektion in die Epidermis der Tiere ein und repliziert sich dort. Nach GOTESMAN et al. (2013) sind Areale zerstörten Epithels sowie Regionen der Wundheilung besonders sensibel für die Virusinfiltration.

EIDE et al. (2011) und REED et al. (2014) konnten die Infektion von weißen Blutkörperchen beschreiben. Eine Aufnahme von KHV mit Adsorption an die pharyngeale peridontale Mukosa und das Intestinum sind möglich (ILOUZE et al. 2011; GOTESMAN et al. 2013). Die Viruslast in unterschiedlichen Organen variiert deutlich während der Erkrankung. Einflussfaktoren sind der Infektionszeitpunkt sowie die den Fisch umgebende Wassertemperatur. Der Zusammenhang zwischen Umgebungstemperatur und klinischer Erkrankung wird nachfolgend beschrieben. Herpesvirus-DNA ist bereits ab dem ersten und zweiten Tag p. i. nachweisbar, z.B. in sezerniertem Kiemenmukus, Kieme, Niere, Leber, Haut, im Intestinum und im Gehirn (GILAD et al. 2004; DISHON et al. 2005; GAEDE et al. 2017). Ab dem 5. Tag nach der Infektion sind Viruspartikel im Kot zu finden DISHON et al. (2005). Das KHV persistiert lange im Wirtskörper. In experimentellen Studien nach GILAD et al. (2004) war es bis 64 Tage p.i. zu identifizieren. GAEDE et al. (2017) berichteten von KHV-positiven PCR-Ergebnissen nach 90 Tagen. Selbst nach 30 Wochen im Wirtskörper konnte das Virus nachgewiesen werden (ST-HILAIRE et al. 2005).

2.7 Pathologisches Bild der Koi-Herpesvirus-Erkrankung

Aufgrund pathologischer Veränderungen in Niere und Kiemen wird das KHV auch als Carp interstitial nephritis and necrosis virus bezeichnet (PIKARSKY et al. 2004; MIYAZAKI et al. 2008).

Die Kieme und Niere gelten als die Zielorgane einer KHV-Infektion. Im infizierten Kiemengewebe zeigen die respiratorischen Epithelien der Kiemenfilamente eine starke lymphozytäre Infiltration (BRETZINGER et al. 1999). Die Zellen erscheinen stark vakuolisiert mit zunehmender benachbarter Zellfusion. Die Zellkerne sind stark degeneriert und durch eine Karyorrhexis gekennzeichnet (BRETZINGER et al. 1999; MIYAZAKI et al. 2008; MOUCHIRA M. und EL-DIN MOHI 2011). Resultate sind massive Nekroseareale und ein Verlust der physiologischen Kiemenstruktur. Diese Veränderungen wurden durch PIKARSKY et al. (2004) bereits ab dem 6. Tag p. i. beschrieben.

Die Niere zeigt 6 Tage nach der Infektion zunehmend dilatierende Blutgefäße. PIKARSKY et al. (2004) beschrieben eine lymphozytäre Gewebsinfiltration mit anschließender Degeneration

der Tubulusepithelzellen. Die Degeneration mündet ab dem 11. Tag p. i. in einer Hyperplasie betroffener Zellen. Die Infektion des Organs mündet in einer chronischen Glomerulonephritis mit ausgeprägter periglomerulärer Fibrose (MIYAZAKI et al. 2008; MOUCHIRA M. und EL-DIN MOHI 2011).

MIYAZAKI et al. (2008) führten in ihrer Studie pathologische Veränderungen im Herzgewebe auf, wie z.B. die Gewebsinfiltration durch Makrophagen und Lymphozyten.

Die Folgen einer KHV-Infektion äußern sich ebenfalls durch pathologische Veränderungen der Milz und des zentralen Nervensystems. Die Milzpulpa weist lichtmikroskopisch massive Nekrosen und Hämorraghien auf. Die Ursache für die abnormalen Schwimmbewegungen können pathologische Veränderungen im Bereich des Gehirns bei erkrankten Koi Karpfen und Karpfen sein. (MIYAZAKI et al. 2008). Eine Infiltration von Lymphozyten der Meningen wurde durch PIKARSKY et al. (2004) beschrieben.

MOUCHIRA M. und EL-DIN MOHI (2011) untersuchten weitere Organe auf pathologische Veränderungen und beschrieben eine glanduläre Hyperplasie des Magenepithels sowie eine Hyperplasie im Bereich der Darmzotten.

2.8 Einfluss der Temperatur auf die Koi-Herpesvirus-Erkrankung

Die Wassertemperatur beeinflusst die Infektion von Karpfenartigen mit KHV. Sowohl die Viruslast der einzelnen Organe als auch die Inkubationszeit der Infektion variiert in Abhängigkeit zur Umgebungstemperatur. Die Sterblichkeitsrate ist ebenfalls temperaturabhängig (WALSTER 1999; BRETZINGER et al. 1999; GILAD et al. 2004; DISHON et al. 2005; RAKUS et al. 2013). PERELBERG et al. (2008) konnten bei Versuchen zur Impfstoffentwicklung einen Zusammenhang zwischen Wassertemperatur und Sterblichkeitsrate durch KHV beschreiben. So zeigten infizierte Fische ab 30 Grad Celsius eine geringere Sterblichkeitsrate als Tiere, die bei 23 Grad Wassertemperatur infiziert wurden.

Infizierte, für KHVE empfängliche Spezies zeigen Krankheitssymptome bei Wassertemperaturen zwischen 18 und 28 Grad Celsius. Entsprechend der Literatur ist dies die optimale Temperatur für die erfolgreiche Virusreplikation (GILAD et al. 2004; DISHON et al. 2005; DISHON et al. 2007). Mit steigenden Gewässertemperaturen im Frühjahr und Sommer ist somit die Zunahme seuchenhafter Ausbrüche zu erklären, wohingegen Wassertemperaturen unter 13 Grad Celsius ein Krankheitsgeschehen bei empfänglichen Spezies verhindern (GILAD 2003).

2.9 Latenz der Koi-Herpesvirus-Infektion

Alle Mitglieder der Familie Herpesviridae zeigen einen zweiphasigen Infektionszyklus: den lytischen Replikationszyklus (Absorption, Injektion, Replikation und Expression der viralen DNA sowie Lyse der Wirtszelle) und die Latenz (RAKUS et al 2013). Typisch für Herpesvirus-Infektionen ist ein latentes Krankheitsbild. Es zeichnet sich durch Phasen scheinbarer Inaktivierung aus, welche von plötzlichen Krankheitsausbrüchen geprägt sein kann.

Ohne die zentrale Eigenschaft der Viruslatenz hätte sich das KHV nicht so schnell und weitreichend ausbreiten können (ST-HILAIRE et al. 2005).

Viruspartikel sind in ihrer latenten Phase unter anderem in den Leukozyten (v.a. B-Lymphozyten) als auch in den Epithelzellen der gastrointestinalen Mukosa zu identifizieren (EIDE et al. 2011; REED et al. 2014; BAUMER et al. 2013). EIDE et al. (2011) konnte selbst in klinisch gesunden Tieren Virus-DNA nachweisen. Nach BAUMER et al. (2013) variieren die Virusbelastungen in Geweben latent infizierter Karpfen von < 10 - 10^5 Viruskopien pro Diagnostiklauf. Einflussfaktoren sind die Wassertemperatur und das Alter der Tiere. (BAUMER et al. 2013).

Diverse Parameter können jederzeit zu einer Reaktivierung der latenten KHV-Infektion führen (EIDE et al. 2011). Eine massenhafte Ausscheidung von infektiösem Material über Kiemen und Kot sind die Folge (BERGMANN et al. 2017a). Als Ursachen kommen das Handling der Tiere, Tiertransporte, schlechte Haltungsbedingungen (z.B. restriktive Fütterung), hormonelle Veränderungen im Frühjahr und ein Anstieg der Wassertemperatur des Fischhabitats in Betracht (BERGMANN et al. 2017a; GILAD 2003; ST-HILAIRE et al. 2005). Überlebende Fische einer KHV-Infektion sind ihr Leben lang potentielle Überträger des Virus (ST-HILAIRE et al. 2005).

2.10 Prophylaxe und Behandlung

Das KHV verursacht massive wirtschaftliche Schäden in kommerziellen Karpfen- und Koi-Zuchten (HEDRICK et al. 2000). Eine Behandlung ist bis dato nicht möglich (OIE CHAPTER KHV). Ein allgemein verfügbarer Impfstoff existiert nicht.

Bestrebungen einer Impfstoffentwicklung sind in der Literatur zahlreich beschrieben. Es gibt weltweit keinen kommerziell zugelassenen Impfstoff gegen die Koi-Herpesvirus-Infektion. In Israel existiert eine attenuierte Lebendvakzine für die Impfung von Karpfenartigen (Israel KV3, KoVAX Ltd Israel) (EMBREGTS et al. 2019). RONEN et al. (2003) konnten durch ELISA-Untersuchungen zeigen, dass mit einem attenuierten Lebendimpfstoff geimpfte Fische einen höheren Antikörper-Titer aufweisen. Die Tiere wurden nach der Injektion infiziert und zeigten eine reduzierte Sterblichkeitsrate. PERELBERG et al. (2005) attenuierten in ihrer Studie das

Impfvirus durch UV-Strahlung. Nach der Challenge-Infektion zeigten die geimpften Tiere dieser Studie ebenfalls geringere Sterblichkeitsraten.

Attenuierte Lebendvakzinen weisen deutliche Nachteile auf. Eine Unterscheidung zwischen Feldvirus und Impfvirus ist nicht möglich. Die Impfung mit Lebendvakzinen verhindert weder die Reinfektion noch verhindert es die Ausscheidung des Impfvirus (ZHOU et al. 2014; STEINBRÜCK 2017). Hohe Kosten und Stress durch den Impfprozess kommen hinzu. YASUMOTO et al. (2006) untersuchten die Möglichkeit einer oralen Vakzinierung über lipidhaltige Futterpellets.

In einer neueren Studie konnte eine DNA-Plasmid-Vakzine basierend auf einem viralen ORF entwickelt werden. Ein Anstieg neutralisierender Antikörper und eine geringe Sterblichkeitsrate zeigten sich (ZHOU et al. 2014). Die Kollegen um EMBREGTS et al. (2019) bauten das ORF 25 des KHV Genoms in ihre DNA-Plasmid-Vakzine ein. Nach einem Infektionsversuch überlebten 80 bis 87,5 % der geimpften Tiere.

Der Einsatz von Desinfektionsmitteln im Zuge der Tierseuchenprävention ist essentiell. Das Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie in Sachsen empfiehlt im Rahmen der Teichkonditionierung im Frühjahr den Einsatz von Branntkalk (Untersuchungen zur Koi-Herpesvirus-Infektion, Schriftenreihe, Heft 34/2011). Nach BERGMANN et al. (2017b) werden Desinfektionsmittelregime im Wasser bereits erfolgreich gegen parasitäre und bakterielle Fischerreger eingesetzt. Der Einsatz von Desinfektionsmitteln in der Aquakultur ist schwierig. Bisherige Dosierungsempfehlungen reichen häufig nicht für eine erfolgreiche Virusinaktivierung aus. Zu hohe Konzentrationen im Wasser können zum Tod der Tiere führen. Die Lebensmittelsicherheit für den Menschen kann außerdem nicht mehr garantiert werden (BERGMANN et al. 2017b).

Ein geschicktes Management der Wassertemperaturen in Aquakulturen führt zu einer natürlichen „Resistenz“ gegen die virale Fischseuche. Junge Fische wurden durch Kohabitation mit kranken Fischen dem Virus ausgesetzt. Nach einem Transfer in Wasserbecken mit über 30 Grad Celsius reduzierte sich die Mortalität von 80 bis 90 % auf circa 40 % (RONEN et al. 2003).

2.11 Diagnostik

2.11.1 Direkter Virusnachweis

Der direkte Nachweis von Virus ist nur über die Anzucht von CyHV-3 in Zellkulturen möglich (RAKUS et al. 2013). In der Literatur wurden verschiedene Zelllinien wie etwa die Common Carp Brain Zellen (CCB) beschrieben, welche besonders geeignet erscheinen (NEUKIRCH und KUNZ 2001). HEDRICK et al. (2000) und RONEN et al. (2003) entwickelten eine neuartige Zelllinie basierend auf Koi-Flossengewebe (KF-1). Für die Virusanzucht bewährt haben sich

Fathead minnow-Zellen (FHM) und Epithelioma papulosum cyprini (EPC)-Zellkulturen (HEDRICK et al. 2000; GRAVELL und MALSBERGER 1965; FIJAN et al. 1983). Die Anzucht in der Zellkultur ist effektiv, aber zeitintensiver (MICHEL et al. 2010).

2.11.2 Indirekter Virusnachweis

Unter den indirekten Nachweismethoden besitzt die PCR eine hohe Sensitivität und Spezifität; sie ist kostengünstig und schnell (ADAMS und THOMPSON 2011). Sie ist auch als Diagnostikmethode für latent infizierte Fische geeignet (KIRSTEN MEYER 2007).

Zur Detektion von viralem Genmaterial gibt es eine Vielzahl an molekularbiologischen Techniken. Die Tabelle 1 zeigt die PCR-basierten Nachweismethoden im Hinblick auf ihre Sensitivität.

Tabelle 1 Molekularbiologische Nachweistechniken für das Koi-Herpesvirus
Quelle: Eigene Darstellung

PCR Technik	Autor	Amplifikatlänge
konv. PCR	Gray et al. 2002	365/290 bp
konv. PCR	Gilad et al .2002	484 bp
konv. PCR	Bercovier et al. 2005	409 bp
TaqMan RT-PCR	Gilad et al .2004	78 bp
nested PCR	Bergmann et al .2006	Keine Angabe
nested PCR	El Matbouli et al. 2007	529bp /379 bp
semi-nested PCR	Bergmann et al. 2010	464bp/372 bp/182bp

Die Anwendung serologischer Diagnostika kann ebenfalls für den KHV-Nachweis eingesetzt werden. DISHON et al. (2005) konnten ebenfalls KHV-Antigen im Kot infizierter Fische mittels ELISA-Verfahren nachweisen. Weiterhin entwickelten BERGMANN et al. (2017a) erfolgreich einen KHV-Antikörper spezifischen ELISA als serologisches Diagnostikum.

Ein direkter Immunfluoreszenztest auf Basis von anti-rabbit-KHV Antikörpern ist ebenfalls eine Möglichkeit zum Virusnachweis in infizierten Fischen (PIKARSKY et al 2004).

3 Material und Methoden

3.1 Prinzip des verwendeten PCR-basierten Lateral Flow Immunoassays (PCR-LFA)

Beim sogenannten Lateral Flow Assay, auch als „Sol Particle Immunoassay“ bezeichnet, handelt es sich um eine schnelle und einfache Nachweismethode. Sie besitzt ein breites Anwendungsspektrum und ermöglicht beispielsweise den Nachweis von Hormonen, Metaboliten und Pathogenen (POSTHUMA-TRUMPIE et al. 2009; BAHADIR und SEZGINTÜRK 2016). In dieser Arbeit kamen Milenia® HybriDetect 2T Dipsticks (MGHD2, Milenia Biotec GmbH, Gießen) zum Einsatz. Es handelt sich dabei um einen gebrauchsfertigen, universellen Teststreifen (Dipstick), welcher auf der Lateralfluss-Technologie mittels Goldpartikeln basiert. Der Dipstick kann zur Entwicklung von qualitativen oder quantitativen Schnelltestsystemen für den gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Analyten wie Proteinen, Antikörpern oder Gen-Amplifikaten (z.B. PCR-Produkt und interne PCR-Kontrolle) verwendet werden (Milenia Biotec GmbH, MGHD2_N / A / 2010-05-19). Diese Testplattform wurde für die Entwicklung eines Prototyps zum Nachweis von KHV-DNA genutzt. Grundlage des Nachweises war das PCR-Protokoll nach (GILAD et al. 2004). Der Teststreifen (Abbildung 1) zeigt 3 verschiedene Testlinien im Auswertefenster an: Target-Testlinie – zeigt den Nachweis von Ziel-DNA an; IAC – interne Amplifikationskontrolle zur Überprüfung, ob die PCR ordnungsgemäß funktioniert hat; Hybridisierungskontrolle – Funktionskontrolle zur Überprüfung der Hybridisierungsreaktion. Die interne Amplifikationskontrolle kann beim Einsatz von Proben mit einer hohen Ausgangskonzentration oder durch Inhibitoren in der Probe ausbleiben.

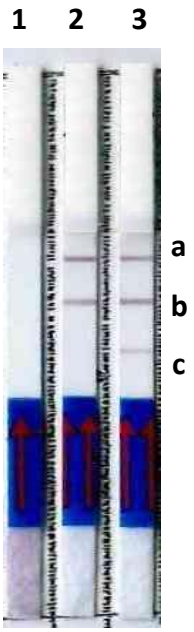

Abbildung 1. Milenia® HybriDetect 2T Dipstick – Darstellung möglicher Ergebnisse.
1) unbenutzter Testreifen; 2) Teststreifen mit negativem Ergebnis; 3) Teststreifen mit positivem Ergebnis; a) Testlinie für die Hybridisierungskontrolle; b) Testlinie für die interne Amplifikationskontrolle (IAC); c) Testlinie für den Nachweis des gesuchten Targets

Die Membran am unteren Ende des Teststreifens besteht aus Nitrocellulose, welche die Wanderung der Testflüssigkeit via Kapillarkräften ermöglicht. Auf dem Teststreifen finden sich folgende Funktionsbereiche:

Tabelle 2 Funktionsbereiche Teststreifen

Bezeichnung	**Funktion**
Proben Pad	Applikationsfläche für Probe
Konjugat Pad	Kontakt der Probenflüssigkeit mit aufgetragenen Goldpartikel-Konjugaten
Testlinien	Testlinie, Nachweislinie für die interne Amplifikations-Kontrolle, Hybridisierungskontrolle
Adsorbent Pad	Aufnahme der Restflüssigkeit

Die PCR bildet die Grundlage des Testverfahrens. Modifizierte Primer ermöglichen die Markierung der Amplifikate mit FITC. Bei der internen Amplifikationskontrolle (IAC) handelt

es sich um einen vorgefertigten Komponentenmix mit zwei Primern (FITC- und Digoxigenin-markiert) sowie einer synthetischen DNA-Sequenz. Bei einer erfolgreichen PCR-Amplifikation entsteht ein mit FITC und Digoxigenin markiertes doppelsträngiges DNA-Stück. Nach der PCR erfolgt die Zugabe eines Hybridisierungspuffers. Der Puffer enthält eine Target-spezifische Sonde (Biotin markiert) und sogenannte Hybridisierungshelfer. Die Sonde bindet an den spezifischen Bereich des Zieltargets. Der Teststreifen wird in die Testlösung (Gemisch aus Amplifikaten und Hybridisierungspuffer) eingesetzt. Anschließend wandert die Flüssigkeit via Kapillarkräfte über die verschiedenen Areale des Streifens. Im Bereich des „Konjugat Pads“ werden die Ziege-anti-FITC Antikörper gelöst. Diese Antikörper sind mit Goldpartikeln konjugiert. Stationäre Antikörper auf dem Streifen immobilisieren dabei die spezifisch markierten Amplifikate. Auf dem Teststreifen sind im Bereich der Testlinien folgende Antikörper/Liganden aufgebracht: (siehe Abbildung 2).

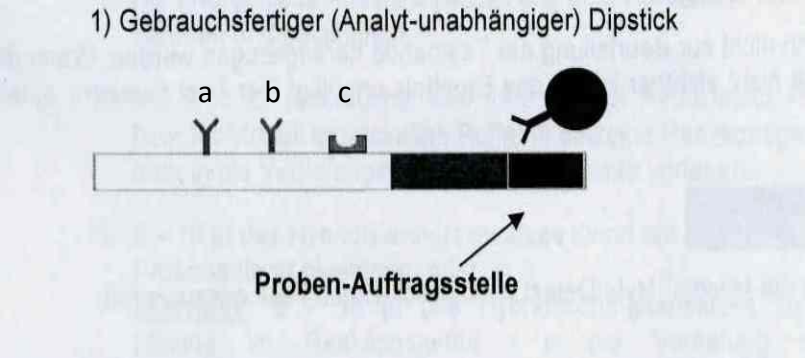

Abbildung 2. Schema der stationären Antikörper auf dem Teststreifen
a) Maus-anti-Ziege Antikörper b) Maus-anti-Digoxigenin Antikörper c) Streptavidin

3.2 Material

3.2.1 Viren und Virusstämme

Tabelle 3 Material für die Virusanzucht und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Virus/Gewebe	Herkunft
Carp edema virus-positives Kiemengewebe	LUA Dresden
CyHV 1	TiHo Hannover
CyHV 2	TiHo Hannover
CyHV 3, Taiwan (T-832)	Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Virus der Frühjahrsvirämie des Karpfens (RVB-405;)	FLI
Hechtbrut Rhabdovirus (RVB-0431)	FLI
Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (RVB-0086)	FLI
Virus der hämorrhagischen Septikämie der Salmoniden (RVB-0417)	FLI

3.2.2 Bakterien und Einzeller

Tabelle 4 Verwendete Bakterien und Einzeller

Spezies	Herkunft
Aeromonas hydrophila	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
Bacillus cereus	Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Francisella noatunensis subsp. *orientalis*-DNA	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
Pseudomonas koreensis	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung
Staphylococcus aureus DSM 2569	Leibniz-Institut DSMZ
Chlamydomonas reinhardtii (CC-124)	Institut für Biologie, Martin-Luther-Universität Halle

3.2.3 Zellkulturen

Tabelle 5 Verwendete Zellkulturen

Bezeichnung	Herkunft
Fathead minnow Zellen (FHM) (CCLV-RIE 57)	FLI
Epithelioma papulosum cyprini Zellen (EPC) (CCLV-RIE 173)	FLI

3.2.4 Fischgewebe

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von naiven und mit KHV infizierten Karpfen aus früheren Forschungsprojekten des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der VMF Leipzig verwendet (Tierversuchs-Aktenzeichen TVV A09/13 und A09/14). Es handelte sich um insgesamt 100 Gewebeproben wovon 43 KHV-negativ (Kieme n = 21, Niere n = 22) und 57 KHV-positiv (Kieme n = 33, Niere n = 24) waren. Die exakte Bezeichnung der Proben ist der Tabelle 21 zu entnehmen. Die Proben waren bei -80 °C gelagert. Diese Proben wurden vorab mit der quantitativen real-time PCR (qPCR) nach GILAD et al. (2004) untersucht. Als negativ bewertet wurden Proben, die keinen Ct-Wert in der qPCR ergaben; schwach positive Proben hatten Ct-Werte von > 36; Ct-Werte < 24 wurden als (stark) positiv gewertet. Darüber hinaus wurden Kiementupfer von Speisekarpfen entnommen, die während eines KHV-Ausbruchsgeschehens verendet waren (Tabelle 6). Die Kiementupfer wurden im Labor direkt

nach der Entnahme in 250 µl PBS für 1 Minute ausgewaschen. Die Tupfereluate lagerten bis zur weiteren Aufbereitung im Tiefkühlschrank bei -80 °C.

Tabelle 6 Adspektorische Beurteilung der Fische bei der Entnahme der Kiementupferproben

Probenbezeichnung	Makroskopische Beurteilung des Fischkadavers
Kiementupfer 1	nicht autolytisch
Kiementupfer 2	nicht autolytisch
Kiementupfer 3	nicht autolytisch
Kiementupfer 4	nicht autolytisch
Kiementupfer 5	nicht autolytisch
Kiementupfer 6	Autolytisch
Kiementupfer 7	Autolytisch
Kiementupfer 8	Autolytisch
Kiementupfer 9	Autolytisch
Kiementupfer 10	fortgeschritten autolytisch
Kiementupfer 11	fortgeschritten autolytisch
Kiementupfer 12	fortgeschritten autolytisch
Kiementupfer 13	fortgeschritten autolytisch
Kiementupfer 14	nicht autolytisch
Kiementupfer 15	nicht autolytisch
Kiementupfer 16	nicht autolytisch
Kiementupfer 17	nicht autolytisch
Kiementupfer 18	nicht autolytisch
Kiementupfer 19	nicht autolytisch
Kiementupfer 20	nicht autolytisch

Für die Extraktion von DNA wurden darüber hinaus Filets von Regenborgenforelle, Lachs und Rotbarsch im Lebensmitteleinzelhandel erworben.

3.2.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7 Auflistung Chemikalien & Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA, Deutschland
0,25 % Trypsin-EDTA Lösung	Gibco/Life Technologies, USA
AE-Pufferlösung	Qiagen GmbH, Deutschland
Carrier-DNA	Qiagen GmbH, Deutschland
Ethanol für die Molekularbiologie	VWR Deutschland GmbH, Deutschland
Laufpuffer (enthält die KHV-109 Sonde und Hybridisierungshelfer)	Milenia Biotech GmbH, Deutschland
Minimum Essential Medium, Earl's salts, 2,2 g/l $NaHCO_3$, 1 g/l Glucose, 292 mg/l L-Glutamin	Gibco/Life Technologies, USA
Minimum Essential Medium, Hank's balanced salts, 3,5 g/l $NaHCO_3$, 4,5 g/l Glukose, stabiles Glutamin	Gibco/Life Technologies, USA
$NaHCO_3$ 7,5 %	Gibco/Life Technologies, USA
Na-Pyruvat	Gibco/Life Technologies, USA
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 100 x	Gibco/Life Technologies, USA
Nuklease-freies PCR Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS)	Rezeptur siehe Anhang
Primer-Mix MGPKHV (enthält KHV 86F und KHV 163R)	Milenia Biotech GmbH, Deutschland
Primer KHV86 Forward	TIBMolbiol GmbH, Deutschland
Primer KHV163 Reverse	TIBMolbiol GmbH, Deutschland
Polymerase-Mix MGPOL (enthält weitere PCR Bestandteile)	Milenia BioTech GmbH, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
Sonde KHV 109	TIBMolbiol GmbH, Deutschland
Teststreifen Milenia HybriDetect 2T	Milenia Biotech GmbH, Deutschland

3.2.6 Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 Auflistung Laborbedarf & Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Herkunft
Biosphere© Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl	Sarstedt, Deutschland
Biosphere© Pipettenspitzen mit Filter 100 µl	Sarstedt, Deutschland
Biosphere© Pipettenspitzen mit Filter 10 µl	Sarstedt, Deutschland
PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Serologische Einmal-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe Seal 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm^2, 75 cm^2	TPP AG, Schweiz

3.2.7 Geräte

Tabelle 9 Auflistung Geräte

Bezeichnung	Herkunft
Einkanalpipette Research Plus	Eppendorf, Deutschland
Feinwaage Sartorius R160P	Sartorius GmbH, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Schweiz
Minizentrifuge/Minispin Sprout	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Nanodrop 2000c	Thermofisher Scientific Inc, USA
Puls-Vortexer Minishaker MTS 2/4	VWR Deutschland GmbH, Deutschland
SensoQuest Labcycler 48	SensoQuest GmbH, Deutschland
Thermocycler Stratagene Mx3000P	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Deutschland
Thermoshaker Block SC-24-PEQLAB-TS-100	Thermofisher Scientific Inc, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermofisher Scientific Inc, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Kultivierung der FHM-Zellen

FHM-Zellen (FHM) wurden in Minimum Essential Medium mit Hank's balanced salts (MEM'H) angezüchtet. MEM'H enthielt 10 % FKS. Des Weiteren wurde $NaHCO_3$ hinzugegeben und auf 850 mg/l eingestellt. Die zu passagierenden Zellkulturen wurden makroskopisch und mikroskopisch auf Kontamination und Wachstum kontrolliert. Zu Beginn der Zellpassage wurde das verbrauchte Nährmedium aus der Zellkulturflasche dekantiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2-3 ml Trypsin-EDTA. Die Zellkulturflasche wurde mehrmals geschwenkt, um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Die Zellkulturflasche wurde mit den Händen leicht angewärmt, um den Prozess zu beschleunigen. Unter dem Mikroskop wurde die Ablösung der Zellen kontrolliert. Nach Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde der Ablösungsprozess gestoppt. Die Zellen wurden entsprechend des Zelllliniendatenblattes des FLI im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet. Die FHM Zellen wuchsen bei Raumtemperatur zu einem geschlossenen Monolayer nach 5 bis 7 Tagen. Täglich wurde das Wachstum via Lichtmikroskop geprüft und dokumentiert.

3.3.2 Kultivierung der EPC-Zellen

EPC-Zellen wurden in einem 1+1-Gemisch aus MEM'H und Minimum Essential Medium mit Earl's Salzen (MEM'E) angezüchtet. Weitere Zusätze waren 10 % fetales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren und 1x Natrium-Pyruvat. Der $NaHCO_3$-Gehalt wurde auf 150 mg/l eingestellt. Die zu passagierenden Zellkulturen wurden makroskopisch und mikroskopisch auf Kontamination und Wachstum kontrolliert. Zu Beginn der Zellpassage wurde das verbrauchte Nährmedium aus der bestehenden Zellkulturflasche dekantiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2-3 ml Trypsin-EDTA. Die Zellkulturflasche wurde mehrmals geschwenkt, um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Die Zellkulturflasche wurde mit den Händen gewärmt, um den Prozess zu beschleunigen. Unter dem Mikroskop wurde die Ablösung der Zellen kontrolliert. Nach Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde der Ablösungsprozess gestoppt. Die Zellen wurden entsprechend des Zelllliniendatenblattes des FLI im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet passagiert. Die EPC-Zellen wuchsen bei Raumtemperatur zu einem geschlossenen Monolayer-Zellrasen nach 5 bis 7 Tagen. Täglich wurde das Wachstum im Lichtmikroskop geprüft und dokumentiert.

3.3.3 Virusanzucht von VHSV, PFRV, SVCV, IHNV

Grundlage für die Virusanzucht waren 25 cm²-Zellkulturflaschen mit einem FHM- oder EPC-Monolayer. Vor der Inokulation des jeweiligen Virus wurden alle Zellkulturflaschen mikroskopisch kontrolliert. Nach dem Dekantieren des Zellkulturmediums aus den Zellkulturflaschen wurden diese mit je 2 ml frischem Medium ohne Zusätze vorsichtig „gewaschen“. Anschließend wurde 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums in den Flaschen belassen. Die Virus-Stockkulturen wurden in Zellkulturmedium ohne Zusätze 1:100 und 1:10 verdünnt. Jeweils 0,5 ml dieser Verdünnungen sowie 0,5 ml des unverdünnten Virus-Stocks wurden in je 1 Zellkulturflasche pipettiert. Als Negativkontrolle wurde eine der 25 cm²-Zellkulturflaschen parallel mit 0,5 ml Zellkulturmedium ohne Zusätze beimpft. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur für 1 h statt. Alle 15 min wurden das Gemisch für eine optimale Verteilung der Viruspartikel auf dem Zellrasen per Hand geschwenkt. Alle Zellkulturflaschen wurden anschließend mit 3,5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgefüllt. Die weitere Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Die mikroskopische Kontrolle des Zellrasens erfolgte täglich. Der Zellrasen wurde regelmäßig auf cytopathische Effekte wie etwa Zellablösungen, Vakuolenbildung, abgekugelte Zellen und den Anteil der abgelösten Zellen im Zellüberstand überprüft. Trat ein cpe von 80 bis 90 % im Zellrasen auf, wurden die Zellkulturüberstände geerntet und nach Zugabe von 20 % FKS bei -80 °C im Tiefkühlschrank eingefroren.

3.3.4 DNA-Aufreinigung

Gewebeproben für die Aufreinigung wurden bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Die KHV-negativen Kiemen- und Nierenproben (D-Proben), KHV positiven Kiemen- und Nierenproben, die CEV-positiven Gewebeproben, die Alge und die Fischfilets wurden mit dem QIAmp DNA Mini Kit aufgereinigt. Die Ausführung orientierte sich an dem Arbeitsprotokoll „Arbeitsanweisung für die Aufreinigung von DNA aus Geweben“ des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen VMF Leipzig (siehe Anhang). Die Aufreinigung der Bakterien-DNA erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll „Arbeitsanweisung für die Aufreinigung von DNA aus Koloniematerial von einer Agarplatte“ des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen VMF Leipzig (siehe Anhang). Verwendet wurde ebenfalls das QIAamp DNA Mini Kit. Die Bakterien waren vorher auf Columbia-Agar Platten, bestehend aus 7 % Schafblut, angewachsen. Bei jeder Aufreinigung wurde parallel eine Aufreinigungskontrolle (Kontaminationskontrolle) mitgeführt. Anstatt Organmaterial wurde hierbei PBS eingesetzt. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.5 RNA-Aufreinigung aus Viren

Die Aufreinigung von IHNV, VHSV, SVCV und PFRV-haltigen Zellkulturen wurde mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit durchgeführt. Es wurde das Protokoll „Arbeitsanweisung für die Aufreinigung von RNA“ des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen VMF Leipzig angewandt (siehe Anhang). Bei jeder Aufreinigung wurde parallel eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt. Anstatt Organmaterial wurde PBS eingesetzt. Die aufgereinigte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.6 KHV-Plasmidstandard

In der vorliegenden Arbeit wurde für die qPCR ein KHV-Plasmid (Bezeichnung: cTL 21) als Positivkontrolle verwendet. Das KHV-Plasmid lag bereits vor. Es wurde bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Es enthält ein 484 bp langes DNA-Fragment des ORF 89/90 des KHV-Genoms als Insert-Sequenz. Das KHV-Plasmid lag in folgenden Konzentrationen pro Verdünnungsstufe vor: 606 Kopien/µl, 60,6 Kopien/µl, 30,3 Kopien/µl, 6,06 Kopien/ µl, 4,55 Kopien/µl, 3,03 Kopien/µl, 1,52 Kopien/µl, 0,6 Kopien/µl und 0,06 Kopien/µl.

3.4 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von KHV

In dieser Arbeit wurde die qPCR nach GILAD et al. (2004) modifiziert nach GAEDE et al. (2017) als Referenzsystem zum Nachweis von KHV verwendet. Die nach GILAD et al. (2004) verwendeten Primer KHV 86F und KHV 163R amplifizieren ein 78 bp großes Amplifikat (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10 Primer- und Sondensequenzen GILAD et al. (2004)

Primer/Sonde	Primer/Sonden Sequenz 5´-3´Richtung
KHV-86f (forward primer)	5‘ GACGCCGGAGACCTTGTG-3‘
KHV-163r (reverse primer)	5‘-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3‘
KHV-109p (Sonde)	6FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-BBQ

Für die PCR wurde das QuantiTect Multiplex noRox Kit verwendet. Sämtliche Amplifikationskomponenten (siehe Tabelle 11) wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, mittels Vortexer gemischt und abzentrifugiert. Der Mastermix wurde vor Zugabe des Templates jeweils zu 20 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl Probenmaterial. Als Positivkontrolle wurden 5 µl des KHV-Plasmids eingesetzt. 5 µl Nuklease freies PCR-Wasser diente als Negativkontrolle.

Tabelle 11 Mastermix für PCR nach GILAD et al (2004) modifiziert nach GAEDE et al (2017)

Reagenz	Endkonzentration	µl/Reaktion
PCR NoROX Master Mix	5,5 mM $MgCL_2$	12,50
PCR-Wasser	Entfällt	5,00
KHV-86f	0,4 µM	1,00
KHV-163r	0,4 µM	1,00
KHV-109p	0,4 µM	0,50

Die PCR erfolgte im Thermocycler Stratagene Mx3000P mit folgendem Temperatur-Zeit-Profil (siehe Tabelle 12)

Tabelle 12 Modifiziertes Temperaturprotokoll nach GAEDE et al. (2017)

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zykluszahl
Denaturierung	15:00 min	95 Grad	1
Denaturierung	00:20 min	95 Grad	40
Annealing	00:30 min	60 Grad	40
Elongation	00:30 min	72 Grad	40

3.5 KHV-PCR-LFA

Dieser Assay kombiniert eine konventionelle PCR mit der Auswertung der Amplifikation via Immunochromatographie. Die PCR wurde mit Hilfe des Sensoquest Labcycler 48 durchgeführt. Verwendete Primer und Sonden für den KHV-Nachweis sind in Tabelle 13 dargestellt. Die verwendete Sonde ist revers komplementär zur Referenzmethode GILAD et al (2004).

Tabelle 13 Verwendete Primer- und Sondensequenzen

Name des Primers	Sequenz 5‘ -> 3‘	Modifikation
KHV-86f (Detektion Analyt)	5‘ - GACGCCGGAGACCTTGTG – 3‘	keine
KHV-163r FITC (Detektion Analyt)	5‘ - CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT – 3‘	5´ FITC
KHV-109P BIO	5´ - CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG - 3´	5´ Biotin

Das Reaktionsvolumen für die Amplifikation betrug 20 µl. Für eine Reaktion erfolgte die Zugabe von 13 µl vorgefertigten Primermix sowie 8 µl Polymerasemix (Tabelle 14). Die Reaktionskomponenten wurden durch die Milenia Biotech GmbH zur Verfügung gestellt. Die Amplifikation erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Das Gemisch wurde mittels Vortexer gemischt und zu 20 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Pro Aliquot wurde 5 µl Probenmaterial hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurden 5 µl des KHV-Plasmids eingesetzt. 5 µl Nuklease-freies PCR-Wasser diente als Negativkontrolle.

Tabelle 14 Komponenten des LFA PCR Mastermix

Reagenz	Reaktionsvolumen/Reaktion
MGPOL – PolymeraseMix	13 µl/1 Reaktion
MGPKHV – PrimerMix	8 µl/1 Reaktion

Die Proben wurden in den Sensoquest Labcycler 48 eingesetzt und folgendes Zeit-Temperatur-Profil wurde gestartet (siehe Tabelle 15):

Tabelle 15 Temperaturprotokoll Dipstickassay Amplifikation

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zykluszahl
Denaturierung	04:00 min	95 Grad	1
Denaturierung	00:15 min	95 Grad	40
Annealing	00:15 min	60 Grad	40
Elongation	00:01 min	72 Grad	40
Inkubation	04:00 min	72 Grad	1
Inkubation	∞	8 Grad	∞

Anschließend wurden 55 µl Laufpuffer jedem PCR-Gefäß zugegeben. Das Funktionsprogramm wurde anschließend weiter fortgeführt:

Tabelle 16 Temperaturprotokoll Hybridiserung

Arbeitsschritte	Zeit	Temperatur
Inkubation	01:00 min	95 Grad
Inkubation	05:00 min	60 Grad
Inkubation	∞	50 Grad

Nach der Hybridisierung wurde pro Reaktionsgefäß 1 Teststreifen HybriDetect 2T in die Probenlösung hinzugegeben. Die optische Ablesung und Dokumentation der Testergebnisse erfolgte nach 10 min.

3.6 Validierung des KHV-PCR-LFA

Das folgende Kapitel beschreibt die durchgeführten Schritte der Validierung des KHV-PCR-LFA. Grundlage der Validierung bildeten die Minimal Information for Publication of Quantitative real-time PCR (MIQUE) (BUSTIN et al. 2009).

3.6.1 Analytische Sensitivität

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurde das KHV-Plasmid cTL-21 in verschiedenen Konzentrationen getestet (Tabelle 17). Jede Konzentration wurde im 5-fach-Ansatz eingesetzt. Eine Regressionsanalyse (Probit-Analyse) erfolgte mit Hilfe der statistischen Software R, Version 3.0.2. (R CORE TEAM, 2013). Die Bestimmung der absoluten Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) mit einer ≥ 95% Wahrscheinlichkeit wurde mittels dose-p-Funktion des MASS Package durchgeführt (VENABLES und RIPLEY 2002).

Tabelle 17 Plasmidkonzentrationen in den Verdünnungsstufen

Plasmid Kopien / µl	Plasmid Kopien / pro 5 µl im PCR Ansatz
606	3030
60,6	303
30,3	151
6,06	30,3
4,55	22.8
3,03	15,1
1,52	7,6
0,606	3,03
0,06	0,303

3.6.2 Analytische Spezifität

Für die Überprüfung der Analytischen Spezifität wurden die beiden KHV-Isolate Israel und Taiwan sowie andere Viren, die entweder differentialdiagnostisch eine Rolle spielen oder als Fischpathogene eine Bedeutung haben, getestet. Zusätzlich wurden verschiedene Bakterienarten, die Erkrankungen bei Fischen verursachen können, sowie eine einzellige Grünalge, die weltweit in nährstoffreichen Kleingewässern vorkommt, getestet (siehe Tabelle 3 und 4). Darüber hinaus wurde überprüft ob, neben Karpfen-DNA auch DNA von Lachs, Regenbogenforelle und Rotbarsch zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte. Die aufgereinigten Proben wurden ebenfalls mit einem Volumen von 5 µl im Test eingesetzt. Die Testdurchführung geschah im einfachen Probenansatz.

3.6.3 Intra-Assay Präzision

Im Intra-Assay wird das Testergebnis einer Probe im 3-fach Ansatz auf Übereinstimmung getestet. Zwei positive Proben (IA-8 Kieme, IA-8 Niere), zwei schwach positive Proben (UI-44 Kieme, IB-44 Niere) und zwei negative Proben (D-22 Kieme, D-22 Niere) wurden für diese Untersuchung ausgewählt. Wie vorangehend erwähnt, wurden die Proben vorab mit der Referenzmethode nach GILAD et al. (2004) modifiziert nach GAEDE et al. (2017) untersucht (Tabelle 18).

Tabelle 18 Ergebnisse der qPCR für die Proben zum Test der Intra-Assay Präzision

Probenbezeichnung	ct-Wert	Viruskopien/ µl	Kategorisierung
IA-8-Kieme	18,33	$7{,}22 \times 10^{6}$	stark positiv
IA-8-Niere	23,86	$1{,}92 \times 10^{5}$	stark positiv
UI-44-Kieme	36,56	$4{,}56 \times 10^{1}$	schwach positiv
IB-44-Niere	36,45	$5{,}02 \times 10^{1}$	schwach positiv
D-22- Kieme	-	-	negativ
D-22- Niere	-	-	negativ

3.6.4 Inter-Assay Präzision

Die Inter-Assay Präzision bestimmt die Vergleichbarkeit von Testergebnissen derselben Probe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Hierfür wurden die vorangehend genannten Proben (Tabelle 21) verwendet. Jede Probe wurde im 1-fach Ansatz an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im PCR-LFA getestet.

3.6.5 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Ein definiertes Probenpanel (n = 120) wurde für die Validierung der Diagnostischen Sensitivität und Spezifität eingesetzt. Die Herkunft der Proben ist dem Kapitel Material und Methoden zu entnehmen. Das Probenpanel setzte sich zusammen aus 100 Gewebeproben, davon stammten 43 Stück von KHV-negativen und 57 Stück von mit KHV infizierten Fischen. Weiterhin wurden 20 Kiementupferproben von verendeten Speisekarpfen, die aus einem amtlich bestätigten KHV-Ausbruchsgeschehen stammten, untersucht. Die Proben wurden mit einem Volumen von 5 µl im 1-fach-Ansatz im PCR-LFA eingesetzt.

Die Diagnostische Sensitivität und Spezifität wurde entsprechend der Validierungsrichtlinien nach BUSTIN et al. (2009) und COHEN et al. (2016) bestimmt. Dafür wurden die Ergebnisse in einer Vierfelder-Tafel dargestellt. Die Diagnostische Sensitivität beschreibt den Prozentsatz erkrankter Tiere bei der die jeweilige Krankheit durch das Testsystem nachgewiesen wird. Es errechnet sich aus dem Verhältnis richtig positiv getesteter kranker Tiere durch die Gesamtzahl richtig positiver und falsch negativ getesteter kranker Tiere (OIE Terrestrial Manual 2018). Die Diagnostische Spezifität beschreibt den Prozentsatz gesunder, nicht infizierter Tiere, welche durch das jeweilige Testsystem als korrekt nicht infiziert identifiziert werden. Es errechnet sich aus dem Verhältnis richtig negativ getesteter Tiere durch die Gesamtzahl richtig negativer und falsch positiver getesteter Tiere (OIE Terrestrial Manual 2018; THRUSFIELD et al. 2018). Die Konfidenzintervalle der Diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden nach WILSON et al. (1927) entsprechend THRUSFIELD et al. (2018) berechnet. Die Berechnung der Ergebnisse ist dem folgenden Kapitel zu entnehmen.

	Testergebnisse nach qPCR		
Testergebnisse PCR-LFA	KHV-positiv	KHV-negativ	Total
KHV-positiv	(a)	(b)	(a+b)
KHV-negativ	(c)	(d)	(c+d)
Total	(a+c)	(b+d)	

Abbildung 3. Schema der Darstellung der Ergebnisse in einer 4-Felder-Tafel

$$\text{Sensitivität} = \frac{a}{(a + c)}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{d}{(b + d)}$$

Für die Berechnung der Konfidenzintervalle der Sensitivität und Spezifität wurden die Formeln nach WILSON et al. (1927) verwendet. Für die Berechnung eines Konfidenzintervalls mit einem Konfidenzniveau von 95 % müssen zunächst die drei Werte A, B und C anhand folgender Formeln berechnet werden:

$$\mathrm{A} = 2 * r + 1{,}96^2$$

$$\mathrm{B} = 1{,}96 * \sqrt{1{,}96^2 + 4 * r * (1 - P)}$$

$$\mathrm{C} = 2 * (\mathrm{n} + 1{,}96^2\ )$$

r = Anzahl der Individuen mit der gesuchten Eigenschaft
n = Anzahl der untersuchten Tiere
P = Sensitivität oder Spezifität

Das Konfidenzintervall für die diagnostische Sensitivität reicht von

$$\frac{(\mathrm{A}-\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \mathrm{x} \text{ bis hin zu } \frac{(\mathrm{A}+\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \mathrm{x}\,.$$

Das Konfidenzintervall für die diagnostische Spezifität reicht von

$$\frac{(\mathrm{A}-\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \mathrm{x} \text{ bis hin zu } \frac{(\mathrm{A}+\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \mathrm{x}\,.$$

Der Positive Prädiktive Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tier, welches mit dem KHV-PCR-LFA positiv getestet wurde, auch in Wirklichkeit positiv ist. Der Negative Prädiktive Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tier, welches mit dem KHV-PCR-LFA als negativ getestet wurde, auch KHV-negativ ist (THRUSFIELD et al. 2018). Folgende Formeln nach THRUSFIELD et al. (2018) wurden verwendet:

$$\text{Prädiktiver Wert (Positives Test Resultat)} = \frac{\mathrm{a}}{(\mathrm{a}+\mathrm{b})}$$

$$\text{Prädiktiver Wert (Negatives Test Resultat)} = \frac{\mathrm{d}}{(\mathrm{c}+\mathrm{d})}$$

Gewebeproben und Kiementupfereluate, die im 1-fach Ansatz im KHV-PCR-LFA ein von der qPCR abweichendes Ergebnis zeigten, wurden erneut in den KHV-PCR-LFA eingesetzt.

Folgendes Vorgehen wurde gewählt: Waren alle Kontrollen des KHV-PCR-LFA regelgerecht ausgefallen, wurde die Probe zuerst im 3-fach-Ansatz eingesetzt. Blieb das Ergebnis negativ, erfolgte eine Wiederholung im 5-fach-Ansatz. War die Testlinie der IAC nicht vorhanden, was auf eine Hemmung der PCR hinweist, wurden die Proben, 1:10 und 1:100 in Nuklease-freiem PCR-Wasser verdünnt, eingesetzt. Die Kiementupfereluate wurden dann zusätzlich nach DNA-Aufreinigung im KHV-PCR-LFA getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Analytischen Sensitivität mittels Probit-Analyse

Die Bestimmung der LOD wurde mittels Verdünnungsreihe eines ausgewählten KHV-DNA-Plasmid-Standards ermittelt. In Abbildung 4 ist die Anzahl der positiven Testergebnisse auf der x-Achse in Abhängigkeit zu den Verdünnungsstufen des cTL 21-Plasmids auf der y-Achse ins Verhältnis gesetzt. Das KHV-Plasmid wurde im 5-fach Ansatz getestet. Bei den ersten drei Konzentrationsstufen ergaben 5/5 Ansätzen ein positives Ergebnis. Bei einer Plasmid-Konzentration von 3,03 x 10^1 Kopien pro 5 µl waren 4/5 Ansätzen positiv im Ergebnis. 2,28 x 10^1 Kopien/5 µl wurden durch den Assay in 1/5 Ansätzen detektiert. Die Konzentration von 1,51 x 10^0 Kopien /5 µl konnte in 4/5 Ansätzen nachgewiesen werden. Die eingesetzte Plasmid-Konzentration von 7,6 x 10^0 Kopien/5 µl wurde in 2/5 Ansätzen detektiert. Geringere Konzentrationen konnten im KHV-PCR-LFA nicht nachgewiesen werden. Alle Teststreifen zeigten eine positive Hybridisierungs- und interne Amplifikationskontrolle. Eine korrekte PCR-Amplifikation und Hybridisierung konnte somit bestätigt werden.

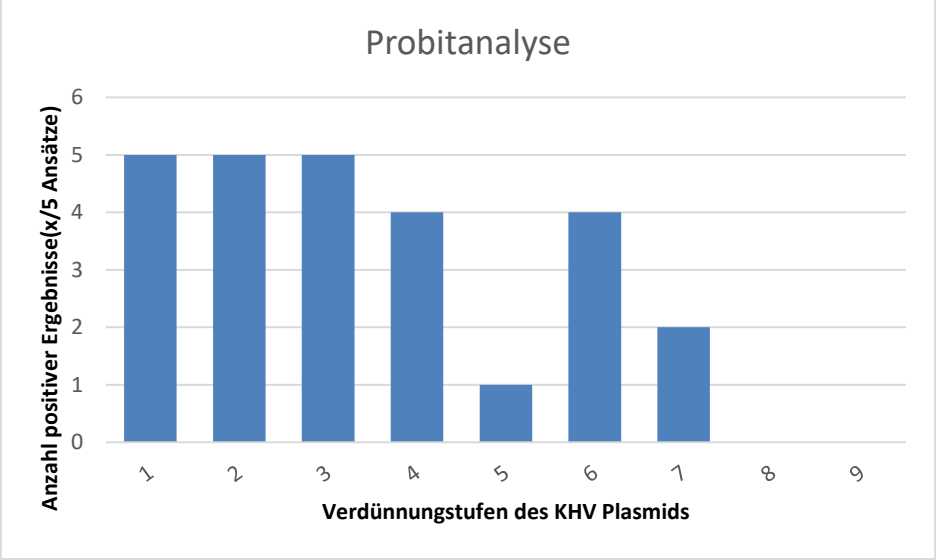

Abbildung 4. Ergebnisse des KHV-PCR-LFA: Test eines Plasmidstandards in verschiedenen Konzentrationen im 5-fach-Ansatz

Die Balkenhöhe zeigt die Anzahl positiver Reaktionen aus fünf Ansätzen an. 1 = 3,03 x 10^3 Plasmidkopien/5 µl: 5/5 Reaktionen positiv; 2 = 3,03 x 10^2 Plasmidkopien/5 µl): 5/5 Reaktionen positiv; 3 = 1,52 x 10^2 Plasmidkopien/5 µl): 5/5 Reaktionen positiv; 4 = 3,03 x 10^1 Plasmidkopien/5 µl): 4/5 Reaktionen positiv; 5 = 2,28 x 10^1 Plasmidkopien/5 µl: 1/5 Reaktionen positiv; 6 = 1,51 x 10^1 Plasmidkopien/5 µl: 4/5 Reaktionen positiv; 7 = 7,6 x 10^0 Plasmidkopien/5µl: 2/5 Reaktionen positiv; 8 = 3,03 x 10^0 Plasmidkopien/5 µl: 0/5 Reaktionen positiv; 9 = 3,03 x 10^{-1} Plasmidkopien/5 µl: 0/5 Reaktionen positiv

Die durchgeführte Probitanalyse der im 5-fach Ansatz eingesetzten Plasmidverdünnungen ergab eine Nachweisgrenze von 8,92 Genkopien/µl beziehungsweise 44,6 Genkopien/5 µl (siehe Abbildung 5).

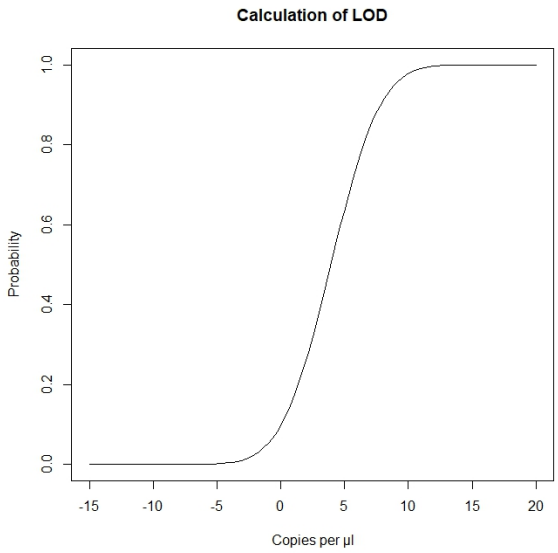

Abbildung 5. Grafische Darstellung der Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA
Probability=0,95; LOD = 8,92 Viruskopien/µl bzw. 44,6 Viruskopien/5 µl;

4.2 Analytische Spezifität

Die Überprüfung der Analytischen Spezifität des Testsystems umfasste eine Auswahl an fischpathogenen Bakterienspezies und viralen Krankheitserregern, DNA einer Grünalge sowie DNA verschiedener Fischspezies. Keine dieser Proben ergab ein positives Ergebnis im KHV-PCR-LFA (Tabelle 19).

Tabelle 19 Ergebnisse der Analytischen Spezifität im KHV-PCR-LFA

Probenmatrix	Ergebnis
CyHV-1	negativ
CyHV-2	negativ
CEV	negativ
IHNV	negativ
PFRV	negativ
SVCV	negativ
VHSV	negativ
Aeromonas hydrophila	negativ

Bacillus cereus	negativ
Chlamydomonas reinhardtii	negativ
Francisella noatunensis subsp. orientalis	negativ
Pseudomonas koreensis	negativ
Staphylococcus aureus	negativ
Lachs DNA	negativ
Regenbogenforellen DNA	negativ
Rotbarsch DNA	negativ

4.3 Intra-Assay Präzision

Die Ergebnisse der Intra-Assay Präzision sind in Tabelle 20, Abbildung 6 und Abbildung 7 aufgeführt.

Tabelle 20 Ergebnisse der Intra-Assay Präzision

Probenbezeichnung	Testergebnis
IA-8-Kieme	3/3 Positiv
IA-8-Niere	3/3 Positiv
UI-44-Kieme	3/3 Positiv
IB-44-Niere	3/3 Positiv
D-22-Kieme	3/3 Negativ
D-22- Niere	3/3 Negativ

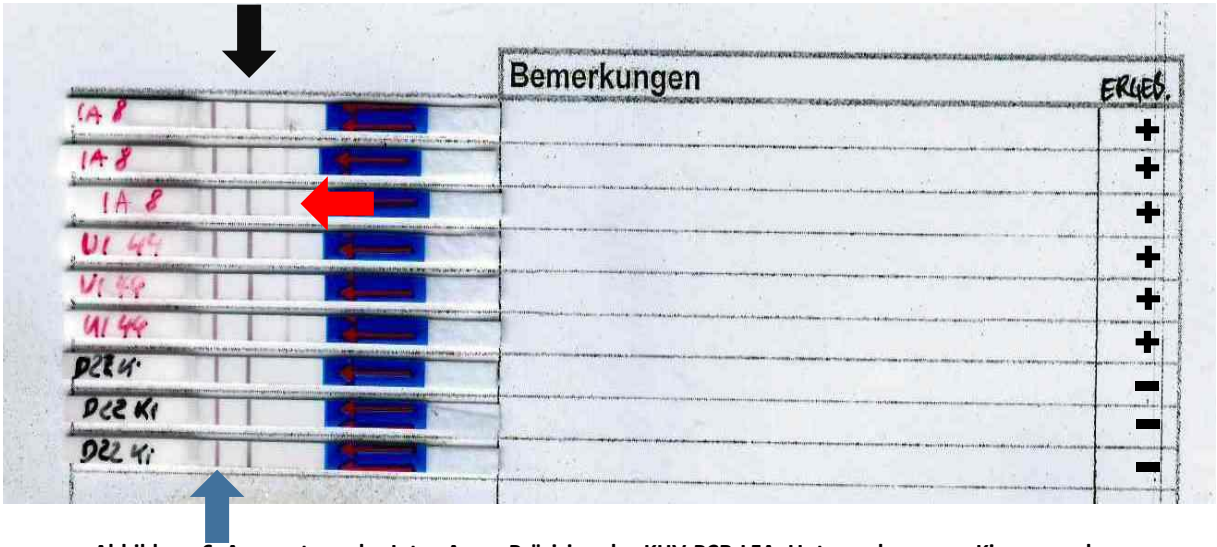

Abbildung 6. Auswertung der Intra-Assay Präzision des KHV-PCR-LFA: Untersuchung von Kiemenproben

IA 8 = Kieme (in der qPCR stark positiv gewertet) im 3-fach Ansatz; UI 44 = Kieme (in der qPCR schwach positiv gewertet) im 3-fach Ansatz; D22 Ki = negative Kiemenprobe im 3-fach Ansatz; + = positives Ergebnis; - = negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

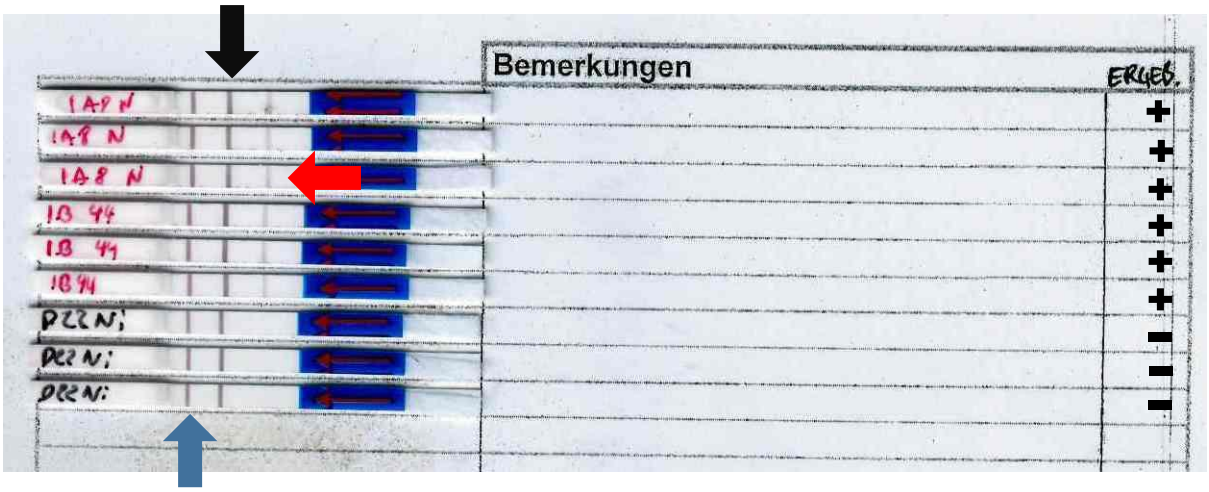

Abbildung 7. Auswertung der Intra-Assay Präzision des KHV-PCR-LFA: Untersuchung von Nierenproben

IA 8 N = Niere (in der qPCR stark positiv gewertet); IB 44 = Niere (in der qPCR schwach positiv gewertet); D22 Ni = negative Niere; + = positives Ergebnis; - = negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

4.4 Inter-Assay Präzision

Für die Überprüfung der Richtigkeit wurden die Proben aus dem vorherigen Kapitel verwendet. Die Hybridisierungskontrolle sowie die Anwesenheit der internen Amplifikationskontrolle bestätigte bei allen Teststreifen die korrekte Durchführung des Tests. Die Amplifikationskontrolle war bei zwei eingesetzten Teststreifen weniger stark ausgeprägt (Probe IA-8 Niere Tag 1 und Probe IA-8 Kieme Tag 2; siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). An zwei aufeinander folgenden Tagen zeigten die eingesetzten Proben identische Ergebnisse.

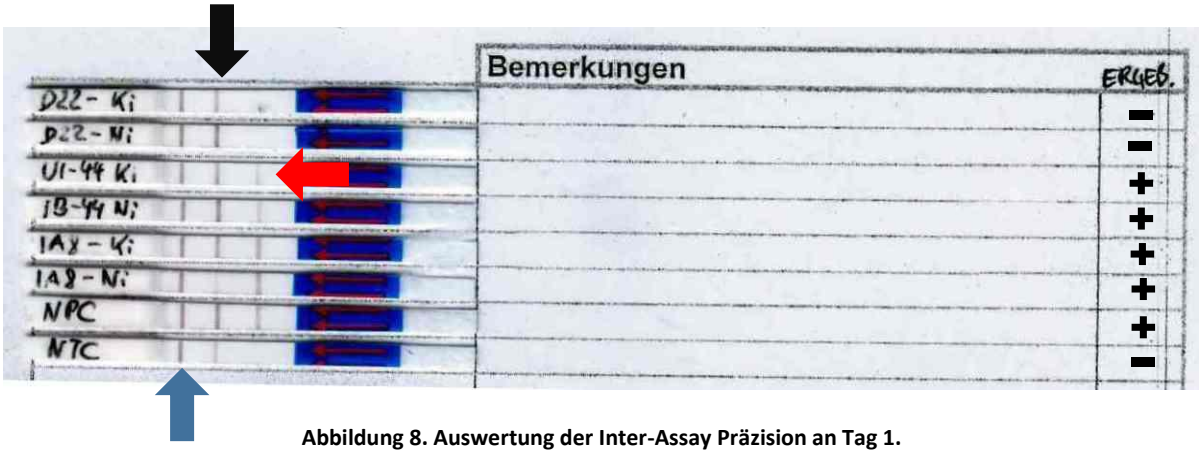

Abbildung 8. Auswertung der Inter-Assay Präzision an Tag 1.

D22 Ki = negative Kiemenprobe; D22 Ni = negative Nierenprobe; UI 44 Ki = schwach positive Kiemenprobe; IB 44= schwach positive Nierenprobe; IA 8 Ki = stark positive Kiemenprobe; A 8 Ni = stark positive Nierenprobe; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + =positives Ergebnis; - =negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

Abbildung 9. Auswertung der Inter-Assay Präzision an Tag 2.

D22 Ki = negative Kiemenprobe; D22 Ni = negative Nierenprobe; UI 44 Ki = schwach positive Kiemenprobe; IB 44= schwach positive Nierenprobe; IA 8 Ki = stark positive Kiemenprobe; A 8 Ni = stark positive Nierenprobe; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + =positives Ergebnis; - =negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

4.5 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Validierung der Diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurde mit einem definierten Pool an Karpfenproben durchgeführt. In Tabelle 21 sind die mittels qPCR ermittelten Ergebnisse der 57 KHV-positiven Gewebeproben gelistet. Bei 43 Gewebeproben wurde kein KHV nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Neben dem Pool zur Validierung wurden 20 Kiementupfereluate getestet. Die Ergebnisse sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 21 qPCR-Ergebnisse KHV-positiver Karpfenproben

Probenbezeichnung	cT Wert	Viruskopien/ µl
9-Kieme/ IB-9	31,33	$3{,}35 \times 10^{2}$
51-Kieme/ UI-15	32,56	$3{,}60 \times 10^{2}$
61-Niere/ UI-25	26,53	$8{,}21 \times 10^{3}$
91-Kieme/ IB-32	33,69	$1{,}70 \times 10^{2}$
113b-Niere/ UI-48	31,67	$1{,}09 \times 10^{3}$
129b-Kieme/ IA-41	36,97	$2{,}23 \times 10^{1}$
129b-Niere/ IA-41	37,52	$1{,}54 \times 10^{1}$
131b-Kieme/ IA-43	34,22	$2{,}16 \times 10^{2}$
134b-Kieme/ IA-46	32,81	$3{,}71 \times 10^{2}$
161b-Niere/ IB-49	33,96	$1{,}71 \times 10^{2}$
165b-Niere/ IB-53	31,82	$7{,}23 \times 10^{2}$
22-Kieme/ IB-12	34,46	$4{,}15 \times 10^{1}$
24-Kieme/IB-14	36,42	$1{,}13 \times 10^{1}$
56-Kieme/ UI-20	27,36	$1{,}15 \times 10^{4}$
79b-Niere/ IA-18	32,02	$9{,}12 \times 10^{2}$
84b-Niere/ IA-23	30,48	$2{,}35 \times 10^{3}$
118b-Kieme/ UI-53	38,95	$9{,}73 \times 10^{0}$
153b-Kieme/ IB-41	31,5	$8{,}99 \times 10^{2}$
158b-Niere/ IB-46	30,32	$1{,}99 \times 10^{3}$
170b-Kieme/ IB-58	35,07	$8{,}07 \times 10^{1}$
33-Niere/ IB-23	37,35	$6{,}04 \times 10^{0}$
43-Kieme/ UI-7	32,81	$3{,}06 \times 10^{2}$
60-Kieme/ UI-24	27,43	$4{,}51 \times 10^{3}$
79b-Niere/ IA-18	32,02	$9{,}12 \times 10^{2}$
108b-Kieme/ UI-43	34,78	$9{,}81 \times 10^{1}$
124b-Kieme/ IA-35	35,99	$4{,}33 \times 10^{1}$
137b-Kieme/ IA-49	35,9	$7{,}19 \times 10^{1}$
143b-Kieme/ IA-55	35,12	$1{,}19 \times 10^{2}$
164b-Kieme/ IB-52	34,88	$9{,}15 \times 10^{1}$
164b-Niere/ IB-52	31,34	$1{,}00 \times 10^{3}$
30-Kieme/ IB-20	36,11	$1{,}38 \times 10^{1}$
30-Niere/ IB-20	38,24	$3{,}33 \times 10^{0}$
45-Niere/ UI-9	34,24	$1{,}19 \times 10^{2}$

53-Niere/ UI-17	32,34	$4{,}18 \times 10^{2}$
64-Kieme/ UI-28	32,09	$2{,}02 \times 10^{2}$
66-Niere/ UI-30	37,95	$4{,}05 \times 10^{0}$
99b-Kieme/ UI-34	37,15	$3{,}15 \times 10^{1}$
120b-Kieme/ UI-55	38,94	$5{,}88 \times 10^{0}$
120b-Niere/ UI-55	38,78	$6{,}55 \times 10^{0}$
126b-Kieme/ IA-38	37,81	$1{,}26 \times 10^{1}$
141b-Kieme/ IA-53	35,85	$4{,}74 \times 10^{1}$
168b-Kieme/ IB-56	32,84	$3{,}63 \times 10^{2}$
20-Kieme/ IB-10	33,78	$6{,}52 \times 10^{1}$
28-Kieme/ IB-18	31,62	$2{,}75 \times 10^{2}$
35-Kieme/ IB-25	31,85	$5{,}79 \times 10^{2}$
40-Niere/ IB-30	26,74	$1{,}73 \times 10^{4}$
57-Niere/ UI-21	28,7	$1{,}94 \times 10^{3}$
65-Niere/ UI-29	35,22	$2{,}51 \times 10^{1}$
74b-Kieme/ IA-13	25,51	$6{,}52 \times 10^{4}$
76b-Niere/ IA-15	27,85	$1{,}40 \times 10^{4}$
81b-Kieme/ IA-20	18,41	$5{,}62 \times 10^{6}$
112b-Kieme/ UI-47	24,16	$1{,}38 \times 10^{5}$
140b-Niere/ IA-52	25,82	$4{,}17 \times 10^{4}$
152b-Niere/ IB-40	28,64	$6{,}20 \times 10^{3}$
160b-Kieme/ IB-48	35,64	$5{,}49 \times 10^{1}$
166b-Kieme/ IB-54	33,2	$2{,}85 \times 10^{2}$
166b-Niere/ IB-54	32,12	$5{,}92 \times 10^{2}$

Tabelle 22 Ergebnisse der Kiementupfereluate in der qPCR

Probenbezeichnung	Ct-Wert	Viruskopien / µl
Kiementupfer 1	22,89	$4{,}75 \times 10^{4}$
Kiementupfer 2	23,61	$2{,}86 \times 10^{4}$
Kiementupfer 3	23,38	$3{,}35 \times 10^{4}$
Kiementupfer 4	17,99	$1{,}51 \times 10^{6}$
Kiementupfer 5	17,40	$1{,}45 \times 10^{7}$
Kiementupfer 6	19,55	$5{,}04 \times 10^{5}$
Kiementupfer 7	23,64	$2{,}80 \times 10^{4}$
Kiementupfer 8	20,76	$2{,}14 \times 10^{5}$
Kiementupfer 9	20,50	$1{,}87 \times 10^{6}$
Kiementupfer 10	25,32	$7{,}66 \times 10^{4}$
Kiementupfer 11	21,37	$1{,}05 \times 10^{6}$
Kiementupfer 12	26,30	$4{,}27 \times 10^{3}$
Kiementupfer 13	24,76	$1{,}27 \times 10^{4}$

Kiementupfer 14	18,91	7,88 x 10^{5}
Kiementupfer 15	28,87	6,99 x 10^{2}
Kiementupfer 16	30,01	3,12 x 10^{2}
Kiementupfer 17	22,02	8,81 x 10^{4}
Kiementupfer 18	26,09	4,95 x 10^{3}
Kiementupfer 19	29,00	6,36 x 10^{2}
Kiementupfer 20	20,62	2,36 x 10^{5}

Die Ergebnisse der in den Tabellen 21 und 22 aufgeführten Proben im KHV-PCR-LFA sind den Abbildungen 16-27 im Anhang zu entnehmen. Für einen besseren Überblick und die Auswertung wurden die Ergebnisse der qPCR den Ergebnissen des KHV-PCR-LFA in einer 4-Feldertafel gegenübergestellt (siehe Abbildung 10).

	Ergebnis qPCR		
Testergebnisse KHV-PCR-LFA	KHV-positiv	KHV-negativ	Total
KHV-positiv	73 (a)	0 (b)	73 (a+b)
KHV-negativ	4 (c)	43 (d)	47 (c+d)
Total	77 (a+c)	43 (b+d)	120

Abbildung 10. Darstellung der Ergebnisse in einer 4-Felder-Tafel

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{a}}{(\text{a} + \text{c})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{d}}{(\text{b} + \text{d})}$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{73}{77} = 0{,}9481 \approx 94{,}81\ \%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{43}{43} = 1 \approx 100\ \%$$

Berechnung des Konfidenzintervalls für die Diagnostische Sensitivität:

$$\mathrm{A} = 2 * r + 1{,}96^2$$

$$\mathrm{B} = 1{,}96 * \sqrt{1{,}96^2 + 4 * r * (1 - P)}$$

$$\mathrm{C} = 2 * (n + 1{,}96^2)$$

r = Anzahl der Individuen mit der gesuchten Eigenschaft (KHV-positiver Teststreifen) (n=73)

n = Anzahl der untersuchten Tiere (n = 77)

P = $\text{Sensitivität} = \frac{73}{77} = 0{,}9481$

$$\mathrm{A} = 2 * 73 + \ 1{,}96^2 = 149{,}8416$$

$$\mathrm{B} = 1{,}96 * \sqrt{1{,}96^2 + 4 * 73 * (1 - 0{,}9481)} = 8{,}5426$$

$$C = 2 * (n + 1{,}96^2)$$

$$\mathrm{C} = 2 * (77 + 1{,}96^2) = 161{,}6832$$

Das Konfidenzintervall für die Diagnostische Sensitivität reichte von

$\frac{(\mathrm{A}-\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \frac{(149{,}8416-8{,}5426)}{161{,}6832} = 0{,}8739$ bis hin zu $\frac{(\mathrm{A}+\mathrm{B})}{\mathrm{C}} = \frac{149{,}8416+8{,}5426}{161{,}6832} = 0{,}9796.$

Zur Berechnung des Konfidenzintervalls der Diagnostischen Spezifität:

$$\mathrm{A} = 2 * r + 1{,}96^2$$

$$\mathrm{B} = 1{,}96 * \sqrt{1{,}96^2 + 4 * r * (1 - P)}$$

$$C = 2 * (n + 1{,}96^2)$$

r = Anzahl der Individuen mit der gesuchten Eigenschaft (KHV-negativer Teststreifen) (n=43)

n = Anzahl der untersuchten Tiere (n =43)

P = Spezifität $= \frac{43}{43} = 1$

$$A = 2 * 43 + 1{,}96^2 = 89{,}8416$$

$$B = 1{,}96 * \sqrt{1{,}96^2 + 4 * 43 * (1 - 1)} = 3{,}8416$$

$$C = 2 * (43 + 3{,}8416) = 93{,}6832$$

Das Konfidenzintervall für die Diagnostische Spezifität reichte von

$\frac{(A-B)}{C} = \frac{89{,}8416-3{,}8416}{93{,}6832} = 0{,}9180$ bis hin zu $\frac{(A+B)}{C} = \frac{89{,}8416+3{,}8416}{93{,}6832} = 1.$

Berechnung Prädiktiver Wert (Positives Testresultat)

$$\text{Prädiktiver Wert (Positives Testresultat)} = \frac{a}{(a+b)} = \frac{74}{74} = 1$$

Berechnung Prädiktiver Wert (Negatives Testresultat)

$$\text{Prädiktiver Wert (Negatives Testresultat)} = \frac{d}{(c+d)} = \frac{43}{46} = 0{,}9348$$

Zwei in der qPCR positiv getestete Proben (Kieme 120b und Niere 120b) wurden bei einfacher Untersuchung im KHV-PCR-LFA negativ bewertet, d.h. sie zeigten im Teststreifen keine KHV-Testlinie. In beiden Proben wurde mittels qPCR eine sehr geringe Virusbelastung mit 5,88 beziehungsweise 6,55 Viruskopien/µl nachgewiesen (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23 Virusbelastung Negativ getesteter Proben im Dipstickassay

Probenbezeichnung	cT-Wert	Viruskopien/µl	Testergebnis KHV-PCR-LFA
120b Kieme	38,94	$5{,}88x10^0$	negativ
120b Niere	38,78	$6{,}55x10^0$	negativ

In einem zweiten Test-Durchlauf wurden die Proben (120b Kieme und 120b Niere) jeweils im 3-fach-Ansatz mit dem KHV-PCR-LFA getestet. Die Kiemenprobe 120b wurde dabei in einem

von drei Ansätzen als positiv identifiziert. Die Nierenprobe 120b blieb in allen Ansätzen negativ (siehe Abbildung 11). Die Funktionalität und korrekte Durchführung wurde durch Banden der Hybridisierungs- und internen Amplifikationskontrolle bestätigt.

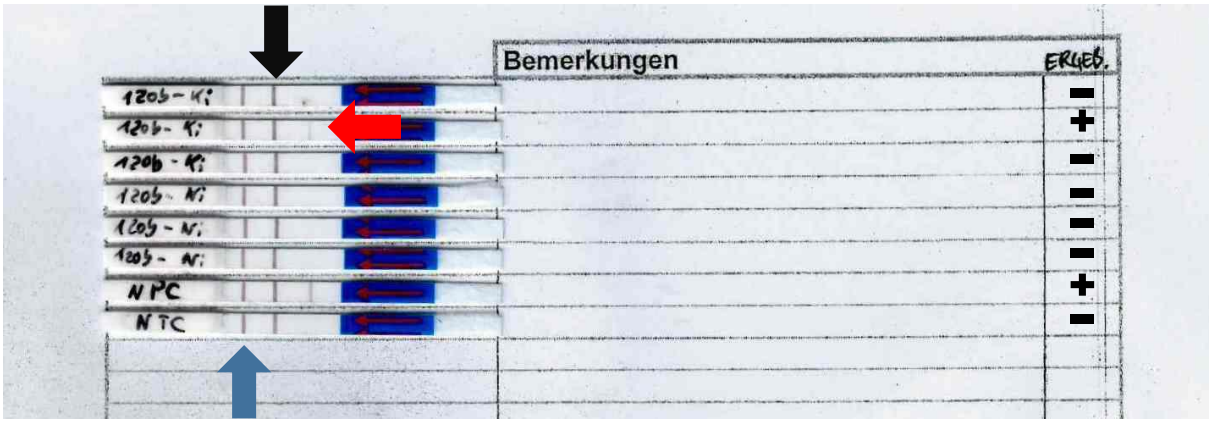

Abbildung 11. Untersuchung der Proben Kieme 120b und Niere 120b im 3-fach-Ansatz mittels KHV-PCR-LFA
120b-Ki = Kiemenprobe 120b; 120b-Ni = Nierenprobe 120b; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; += positives Ergebnis; -= negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

In nächsten Schritt wurde die Nierenprobe 120b im 5-fach-Ansatz getestet. In diesem Testansatz wurde in einem von fünf Ansätzen ein positives Ergebnis erzielt (siehe Abbildung 12).

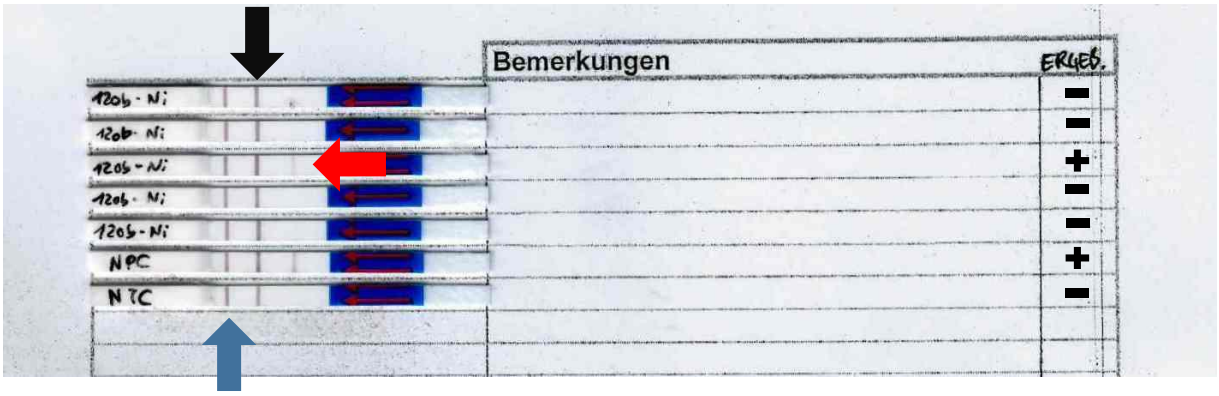

Abbildung 12. Untersuchung der Probe Niere 120b im 5-fach-Ansatz mittels KHV-PCR-LFA

120b-Ni = Nierenprobe 120b; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; += positives Ergebnis; -= negatives Ergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

Bei der Untersuchung der Kiementupfereluate im 1-fach-Ansatz waren zwei (Tupfer 10 und 11) von 20 Proben im KHV-PCR-LFA negativ. Bei einigen positiven Proben war die KHV-spezifische Testlinie im PCR-LFA nur schwach ausgeprägt. Bei fünf dieser Proben (KT 5, 7, 9, 12, 19) war die interne Amplifikationskontrolle gehemmt; bei weiteren 4 Proben (KT 1, 2, 3, 6) war die Testlinie der internen Amplifikationskontrolle nur undeutlich zu erkennen. Bei der negativ getesteten Probe Tupfer 11 war die interne Amplifikationskontrolle ebenfalls gehemmt (siehe Abbildung 14).

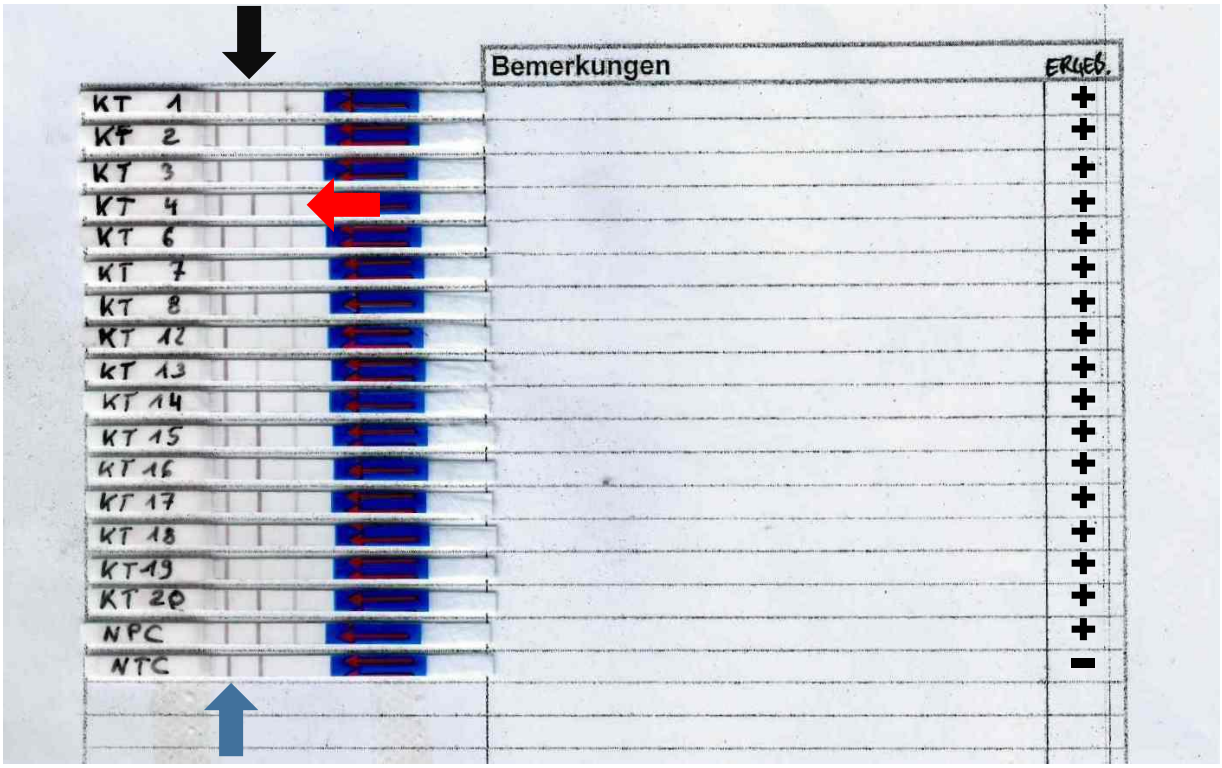

Abbildung 13. Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: Kiementupfereluate aus KHV-Ausbruch im KHV-PCR-LFA

KT-1= Kiementupfer; KT-2= Kiementupfer; KT-3 = Kiementupfer; KT-4 = Kiementupfer; KT-6 = Kiementupfer; KT-7 = Kiementupfer; KT8 = Kiementupfer; KT-12 = Kiementupfer; KT-13 = Kiementupfer; KT-14 = Kiementupfer; KT-15 = Kiementupfer; KT-16 = Kiementupfer; KT-17 = Kiementupfer; KT-18 = Kiementupfer, KT-19 = Kiementupfer; KT-20 = Kiementupfer; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

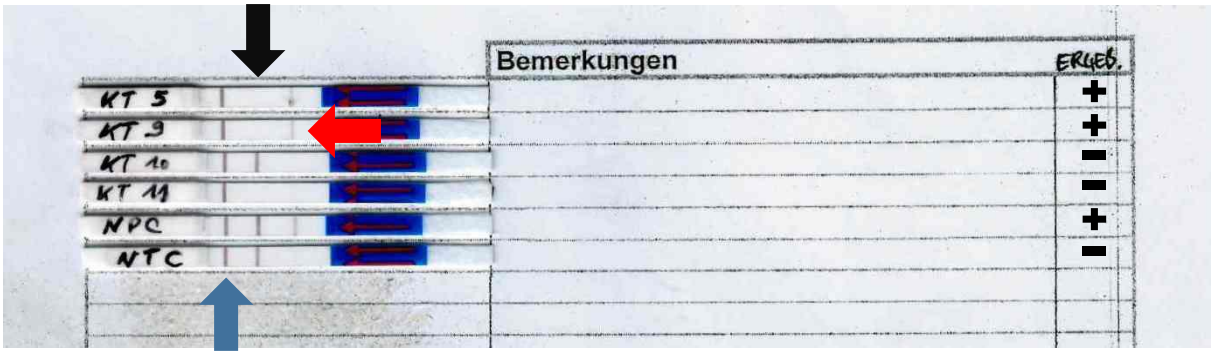

Abbildung 14. Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: Kiementupfereluate aus KHV-Ausbruch im KHV-PCR-LFA

KT-5 = Kiementupfer; KT-9 = Kiementupfer; KT-10 = Kiementupfer; KT-11 = Kiementupfer; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + 0 positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

Es erfolgte eine erneute Aufreinigung der Kiementupfer: KT-5, KT-9, KT-10 und KT-11. In einem weiteren Durchlauf des KHV-PCR-LFA zeigten diese eingesetzten Proben alle ein positives Testergebnis (siehe Abbildung 15).

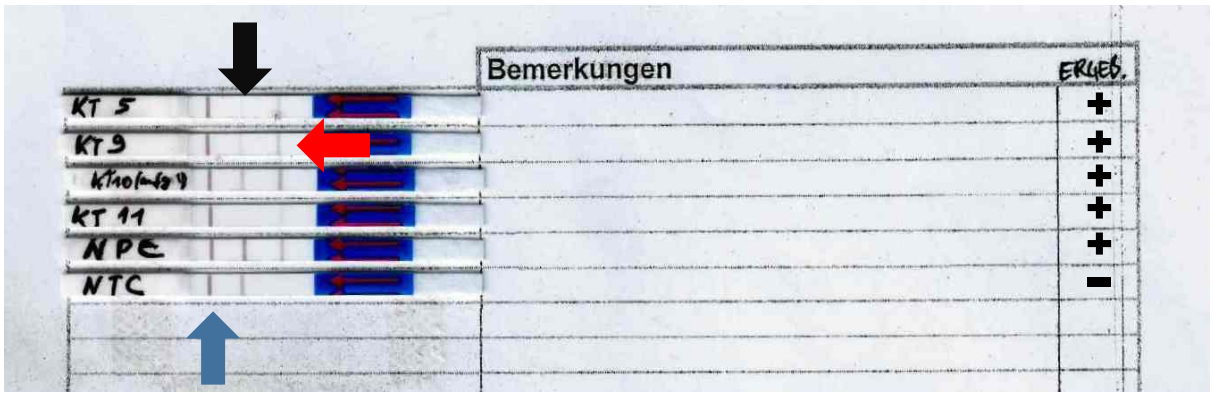

Abbildung 15. Ergebnisse: „Diagnostisches Probenpanel“: aufgereinigte Kiementupfereluate aus KHV-Ausbruch im KHV-PCR-LFA

KT-5 = aufgereinigte DNA aus Kiementupfer; KT-9 = aufgereinigte DNA aus Kiementupfer; KT-10 (aufgr.) = aufgereinigte DNA aus Kiementupfer; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; - = negatives testergebnis; + = positives Testergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

Von allen Proben, die eine Hemmung der internen Amplifikationskontrolle in der Auswertung ergaben (KT 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 19), wurde das Tupfereluat 1:10 und 1:100 in PCR-Wasser verdünnt und erneut im Dipstick getestet. Bereits ab der Verdünnung von 1:10 war die Amplifikationskontrolle in allen Teststreifen deutlich zu erkennen (Abbildung 16). Kiementupfer 11 war nach Verdünnung deutlich KHV-positiv, was darauf hinweist, dass die PCR durch Inhibitoren in der unverdünnten Probe gehemmt wurde.

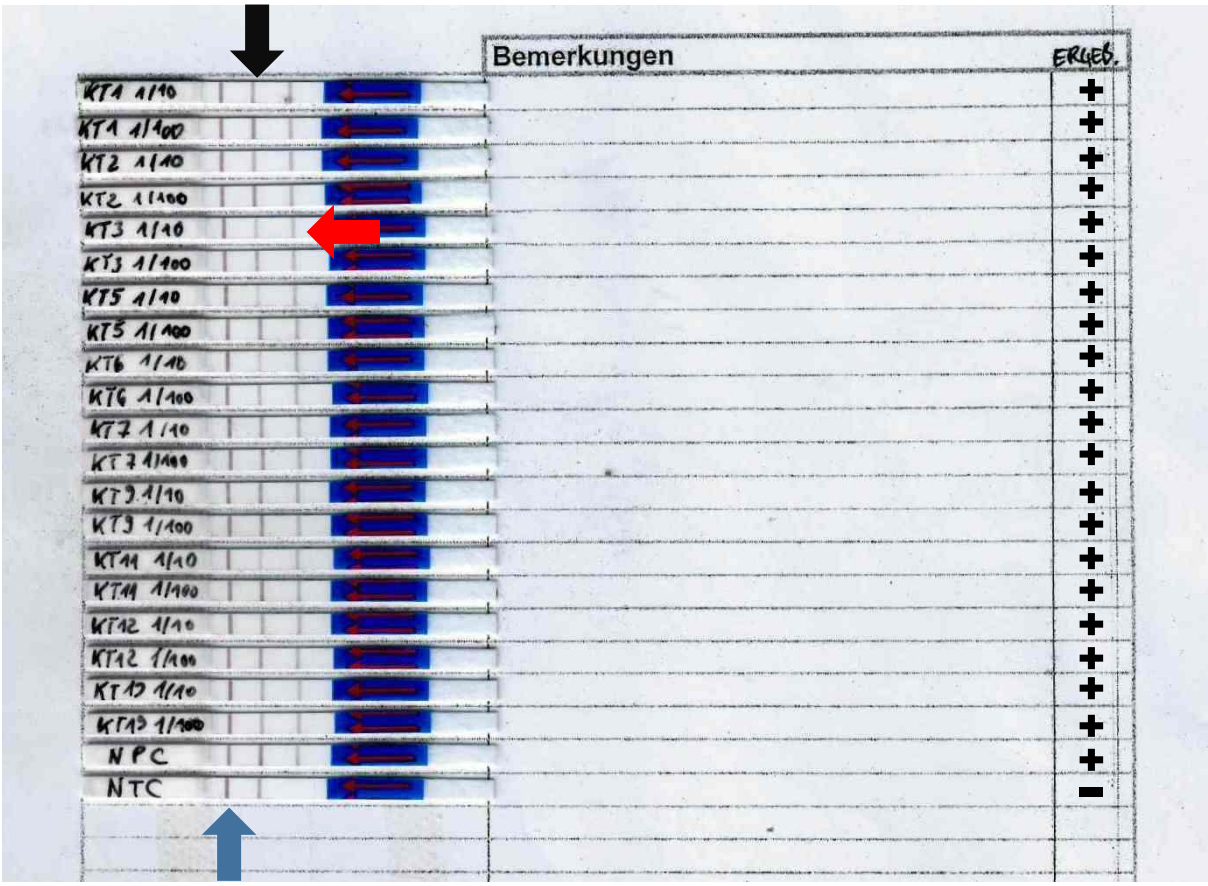

Abbildung 16. Ergebnisse: „Diagnostisches Probenpanel“: Verdünnungen von Kiementupfereluaten aus KHV-Ausbruch im KHV-PCR-LFA

KT-1-1/10 = Kiementupfer; KT-2= Kiementupfer; KT-3 = Kiementupfer; KT-5 = Kiementupfer; KT-6 = Kiementupfer; KT-7 = Kiementupfer; KT9 = Kiementupfer; KT-11 = Kiementupfer; KT-12 = Kiementupfer; KT-19 = Kiementupfer;1/10 = 1 zu 10 Verdünnung, 1/100 = 1 zu 100 Verdünnung; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis; Blauer Pfeil = Testlinie der Hybridisierungskontrolle; Schwarzer Pfeil = Testlinie der internen Amplifikationskontrolle; Roter Pfeil: Testlinie des gesuchten Targets

5 Diskussion

ADAMS und THOMPSON (2011) definieren die wichtigen Eigenschaften eines veterinärmedizinischen Testsystems. Nach den Autoren soll ein Diagnostikum exakte Testergebnisse bei optimaler Sensitivität und Spezifität kombinieren. Bei der Etablierung eines neuen Diagnostikums ist zudem der Vergleich zu einem Referenzsystem essentiell. HÜBNER et al. (2002) sowie BUSTIN et al. (2009) beschreiben die Validierung als wichtigen Prozess in der Etablierung von Laboruntersuchungen. Die im Rahmen einer Validierung durchgeführten Untersuchungen belegen die Eignung einer Testmethode für einen vorgesehenen Parameter. Für die Validierung eines Prototyps zum Nachweis von KHV wurde sich in dieser Arbeit an verschiedenen Referenzen aus der Literatur orientiert. Die Kollegen um BUSTIN et al. (2009) haben in ihrer Arbeit die MIQUE-Richtlinien definiert. Diese Arbeit stellt einen Leitfaden für die Entwicklung und Validierung von Testsystemen auf Basis quantitativer PCRs dar. Basierend auf den MIQUE-Richtlinien wurden in der vorliegenden Arbeit die Analytische Sensitivität und Bestimmung der LOD, die Analytische Spezifität, die Intra-Assay Präzision sowie die Inter-Assay Präzision des KHV-PCR-LFA Prototypen bestimmt. Die STARDS-Leitlinien nach COHEN et al. (2016) stehen für die „Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies“. Laut dieser Richtlinien definiert sich der Lateral Flow Assay als (Veterinär-)Medizinischer Test, da das Diagnostikum Informationen über den Gesundheitsstatus eines Patienten liefert. Entsprechend der STARD-Guidelines angefügter Checkliste wurde die Diagnostische Sensitivität und Spezifität anhand eines definierten Probenpanels bestimmt. Berechnet wurden zudem der positive und negative prädiktive Wert entsprechend der „Standards for Reporting Diagnostic Accurcay Studies“.

Der KHV-PCR-LFA kombiniert die Amplifikation einer Genomsequenz durch eine PCR mit der Auswertung über eine Lateral Flow Immunochromatographie. Lateral Flow Immunoassays (LFA) finden vielfältige Anwendungen in der klinischen Diagnostik, im Rahmen von Lebensmitteluntersuchungen oder etwa im Umweltmonitoring (BAHADIR und SEZGINTÜRK 2016). LFA in Form von Teststreifen sind kostengünstige und einfach anzuwendende Systeme. Der Einsatz in einem breiten Anwenderspektrum ist möglich. LFA sind einfach zu lagern und zu transportieren und erzielen schnelle reproduzierbare Ergebnisse. Die Literatur definiert den LFA als eine der sensitivsten Nachweismethoden. Je nach Anwendungsformat ist eine vorbereitende Bearbeitung der zu untersuchenden Proben häufig nicht notwendig (POSTHUMA-TRUMPIE et al. 2009; BAHADIR und SEZGINTÜRK 2016). Die Auswertung der Teststreifen durch die visuelle Beurteilung von Testsignalen ist einfach und ohne weitere

Hilfsmittel durchführbar. Die Technik des LFA basiert auf der Bewegung einer Flüssigkeit über einen Teststreifen durch Kapillarkräfte. Eingesetzte Proben müssen aus diesem Grund immer als flüssiges Medium vorliegen (BAHADIR und SEZGINTÜRK 2016). Optimale Testergebnisse sind in dem hier verwendeten KHV-PCR-LFA abhängig von einer funktionierenden PCR. Eine Hemmung der Amplifikation würde zu falsch negativen Ergebnissen führen. Der Einsatz einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ist deshalb essentiell für die Beurteilung der Funktionalität des Testverfahrens. Die Implementierung dieser internen Amplifikationskontrolle ist für den in dieser Arbeit eingesetzten Test ein Alleinstellungsmerkmal. Ähnliche LFA-Teststreifen wurden in anderen Arbeiten verwendet. In den Studien von VRANCKEN et al. (2013) und SOLIMAN und EL-MATBOULI (2018) wiesen die Teststreifen Bereiche für den Nachweis der Hybridisierungskontrolle und die Target-spezifische Testlinie auf. Eine Amplifikationskontrolle wurde in diesen Verfahren nicht eingesetzt. In der vorliegenden Studie trat eine Hemmung der IAC bei getesteten Kiementupferproben auf, jedoch nicht bei Verwendung mit aufgereinigter DNA. Ohne IAC wären diese Proben als (falsch) negativ bewertet worden. Für den Einsatz des Tests als Point of Care Diagnostikum am Teich, wo kein aufwändiges DNA-Extraktionsverfahren eingesetzt werden kann, ist diese Kontrollfunktion ein wichtiges Hilfsmittel.

Für die Validierung wurde aufgereinigte DNA von KHV-negativem und KHV-positivem Kiemen- und Nierengewebe verwendet. Die Kiemen und Niere sind Zielorgane einer KHV-Infektion (HEDRICK et al. 2000; GRAY et al. 2002; GILAD 2003; GILAD et al. 2004; RAKUS et al. 2013; MONAGHAN et al. 2015). Gemäß Amtlicher Methodensammlung des FLI sind diese Gewebe zu Diagnostikmaßnahmen einzusetzen. MONAGHAN et al. (2015) empfehlen die Kiementupfer-Entnahme als nicht-invasive Form der Probennahme am lebenden Tier. Der nicht-invasive Kiementupfer stellt die ideale Form der Probennahme am Teich für den hier eingesetzten KHV-PCR-LFA dar. Hinsichtlich der Praktikabilität am Teich sowie unter Betrachtung späterer Kosten wurden alle Proben im einfachen Ansatz getestet.

Nach THRUSFIELD et al. (2018) und BUSTIN et al. (2009) beschreibt die Analytische Sensitivität die kleinste Menge an Viruskopien in einer Probe, welche durch die Testmethode detektiert wird. Daraus ableitend resultiert die absolute Nachweisgrenze des Verfahrens. Der KHV-PCR-LFA in dieser Arbeit erreichte eine Nachweisgrenze von 8,9 Viruskopien/µl. Das Referenzsystem, die qPCR nach GILAD et al. (2004) modifiziert nach GAEDE et al. (2017), ergab eine Nachweisgrenze von 4,7 Viruskopien/µl.

Das KHV bedingt, wie alle Mitglieder der Familie *Herpesviridae*, eine latente Virusinfektion (RAKUS et al. 2013). Latent infizierte Fische zeigen kein ausgeprägtes klinisches Erscheinungsbild. Typisch sind ebenfalls niedrige Viruskonzentrationen in den Zielorganen der Virusinfektion (BERGMANN und KEMPTER 2011, MONAGHAN et al. 2015). Auch GAEDE et al.

(2017) belegten eine niedrige Viruslast in Kiemen und Nieren von infizierten Karpfen in den ersten Tagen nach einer Infektion. Konträr zu den erwähnt niedrigen KHV-Viruskonzentrationen konnten GILAD et al. (2004) hohe Viruskopienanzahlen mittels qPCR bei Wassertemperaturen zwischen 18 und 28 Grad Celsius nachweisen. Im Vergleich zu anderen Studien in der internationalen Literatur (VRANCKEN et al. 2013; SOLIMAN und EL-MATBOULI 2018) lag die ermittelte Analytische Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA deutlich niedriger. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der KHV-PCR-LFA, auch in Phasen einer KHV-Infektion mit geringer Viruslast, positive Tiere eindeutig identifizieren würde.

Die Analytische Spezifität ist die Fähigkeit eines Testsystems, ausschließlich das definierte Zieltarget nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden verschiedene virale und bakterielle (*Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas koreensis, Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*) Krankheitserreger von Karpfenartigen für das Spezifitätspanel ausgewählt. Das CEV gehört zur Familie der *Poxviridae* (ONO et al 1986; ADAMEK et al. 2017). Betroffene Karpfen zeigen zu Beginn einer Infektion ein Krankheitsbild, welches klinisch nicht von einer KHV-Infektion zu unterscheiden ist (OUYANG et al. 2018; JUNG-SCHROERS et al. 2015). Eine frühe Differenzierung zwischen den beiden Erkrankungen ist aufgrund der tierseuchenrechtlichen Regelungen notwendig. CyHV-1 (Erreger der Karpfenpocken) und CyHV-2 (Erreger der hämatopoetischen Nekrose des Goldfisches) sind dem KHV verwandte Vertreter der *Alloherpesviridae* (WALTZEK 2005; ADKISON et al. 2005). Zusätzlich wurden diverse RNA-Viren, die Erkrankungen bei Fischen hervorrufen, als mögliche Ursache für falsch-positive Ergebnisse in die Untersuchungen einbezogen. SVCV, ein Rhabdovirus, verursacht die Frühlingsvirämie der Karpfen und verursacht hohe Sterblichkeitsraten (AHNE et al. 2002; VRANCKEN et al. 2013). IHNV und VHSV verursachen weltweit hohe wirtschaftliche Schäden in der Aquakultur (SKALL et al. 2005). *Chlamydomonas reinhardtii*, eine Grünalge, kam als ubitquitär vorkommender Bestandteil der aquatischen Umgebung, als Testkandidat zum Einsatz. Es wurden keine falsch-positiven Ergebnisse im Validierungsprozess beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigten die Spezifität des KHV-PCR-LFA durch die verwendeten Reaktionspartner.

Einhundertzwanzig diagnostische Proben wurden mit dem neu entwickelten KHV-PCR-LFA untersucht. Die Herkunft der Proben ist dem Material- und Methoden-Teil zu entnehmen. Aus allen Gewebeproben wurde die DNA aufgereinigt und im 1-fach-Ansatz getestet. Kiementupferproben aus dem Ausbruchsgeschehen wurden zunächst in PBS ausgewaschen und ohne DNA-Aufreinigung im 1-fach-Ansatz getestet. Alle Proben wurden parallel mit dem Referenzverfahren (qPCR nach GILAD et al. 2004 modifiziert nach GAEDE et al. 2017) untersucht. Von 77 KHV-positiven Proben waren 73 bei einfacher Testung im KHV-PCR-LFA

positiv. Die 43 KHV-negativen Proben wurden eindeutig als negativ im KHV-PCR-LFA identifiziert. Daraus ergab sich eine diagnostische Sensitivität von 94,81 % (p=0,95; CI 87,39 % -97,96 %) sowie eine diagnostische Spezifität von 100 % (p=0,95; 91,9 % -100 %). Der positive prädiktive Wert ergab 100 % und der negative prädiktive Wert lag bei 93,48 %. Nach THRUSFIELD et al. (2018) beschreibt der prädiktive Wert für ein positives Testergebnis die Wahrscheinlichkeit, dass ein KHV-positiv getestetes Tier auch wirklich mit KHV infiziert ist. Umgekehrt beschreibt der prädiktive Wert für ein negatives Testergebnis die Wahrscheinlichkeit, dass ein KHV-negativ getestetes Tier auch wirklich nicht mit KHV infiziert ist. Mit einem positiven prädiktiven Wert von 100 % stellt der KHV-PCR-LFA ein sehr sicheres Instrument zum Nachweis von KHV- infizierten Tieren dar. Der negative prädiktive Wert von 93,48 % ermöglicht zu einem hohen Grad die Feststellung, dass Tiere gesichert frei sind von einer KHV-Infektion. Zu beachten ist, dass sich die prädiktiven Werte hier auf eine Stichprobe (ausgewählte Gewebeproben und Kiementupfer) mit einer KHV-Prävalenz von 77 % beziehen. SOLIMAN und EL-MATBOULI (2018) entwickelten einen Multiplex-LFI zum simultanen Nachweis von KHV- und CEV-DNA auf der Grundlage einer isothermalen Amplifikationsmethode. Insgesamt untersuchte diese Arbeitsgruppe 100 diagnostische Proben von Koi und Karpfen. Die Diagnostische Sensitivität und Diagnostische Spezifität wurden hier jeweils mit 100 % angegeben. Ebenso die positiv prädiktiven und negativ prädiktiven Werte. VRANCKEN et al. (2013) entwickelten einen LFA zum Nachweis von KHV-Antigen in Kiementupfern. Die bei VRANCKEN et al. (2013) angegebene Diagnostische Sensitivität des LFA variierte je nach eingesetztem KHV-Isolat erheblich. Bei dem moderat infektiösen Virusisolat FL lag die diagnostische Sensitivität bei 52,6 % im Vergleich zur Referenz-PCR. Bei dem hoch-virulenten KHV M3 Isolat wies der LFA eine diagnostische Sensitivität von 72,7 % auf. Weder ein positiv prädiktiver Wert noch ein negativ prädiktiver Wert wurde errechnet. Ähnliche Unterschiede lassen sich mit der vorliegenden Arbeit nicht beurteilen, da die verwendeten Gewebeproben nur von Tieren stammten, die mit KHV „Israel“ infiziert waren (SCHMID et al. 2016). Eine Charakterisierung des KHV aus dem Ausbruchsgeschehen wurde nicht durchgeführt. Aufgrund der Diagnostischen Spezifität von 100 % konnte an den hier verwendeten Proben gezeigt werden, dass der KHV-PCR-LFA in der Lage ist, KHV-negative Tiere als eindeutig negativ zu identifizieren.

Zwei von 57 nachweislich KHV-positiven DNA-Proben waren im KHV-PCR-LFA im 1-fach-Ansatz negativ getestet worden. In einem nächsten Schritt wurden beide Proben im Dreifachansatz getestet, um zu prüfen ob die Ausgangsmenge an KHV-DNA möglicherweise im Bereich der Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA lag. Eine Probe reagierte daraufhin in einem von drei Testansätzen positiv. Die zweite Probe blieb weiterhin negativ. Nachfolgend wurde diese im 5-fachen Ansatz im KHV-PCR-LFA eingesetzt. Einer von fünf Teststreifen zeigte nun ein positives Ergebnis. Die qPCR bestätigte eine geringe Viruslast, welche unter der ermittelten Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA lag. Daraus lässt sich ableiten, dass beim Einsatz dieses

Testverfahrens bei unklarem klinischem Befund bzw. Verdacht auf eine KHV-Infektion ohne typische Symptome jede Probe im 5-fachen Ansatz eingesetzt werden sollte, um ein falsch negatives Ergebnis zu vermeiden.
Negative Testergebnisse können ebenfalls durch die Hemmung der PCR-Reaktion entstehen. Eine Hemmung durch verwendete Tupferbestandteile bei der Probennahme kann ausgeschlossen werden. Die Tupfer wurden gründlich in PBS ausgewaschen. Eine systematische Hemmung aller entnommenen Tupfer-Proben kann ebenfalls ausgeschlossen werden.
Im Rahmen der Studie ergab sich die Möglichkeit, den KHV-PCR-LFA an Kiementupfer-Proben von an KHV verendeten Karpfen zu testen. Die Karpfen wiesen bei der Beprobung unterschiedliche Grade von Autolyse auf. Die entnommenen Tupfer wurden in PBS-Lösung ausgewaschen und anschließend sowohl mittels qPCR als auch im KHV-PCR-LFA im 1-fach-Ansatz getestet. Der KHV-PCR-LFA konnte in 18 von 20 Proben die KHV-Infektion durch eine positive Testlinie bestätigen. Eine Ursache hierfür könnte die zum Teil schon weit fortgeschrittene Autolyse der Kiemen sein. Hierbei werden Enzyme aus den Zellen freigesetzt, die die DNA angreifen können. Es zeigte sich jedoch, dass die Teststreifen eine fehlende IAC oder eine unterschiedlich stark ausgeprägte IAC-Kontrolllinie und KHV-Testbande aufwiesen. Dies wies auf eine Hemmung des Prozesses hin, entweder verursacht durch Hemmstoffe oder eine sehr hohe Viruskonzentration in den Kiementupfer-Eluaten. In der qPCR wurde eine hohe Viruslast bestätigt (siehe Tabelle 25). Nach Verdünnung der Eluate 1:10 und 1:100 bzw. nach DNA-Aufreinigung wurden alle Proben als KHV-positiv im KHV-PCR-LFA detektiert. Um falsch-negative Ergebnisse beziehungsweise Funktionsverluste des KHV-PCR-LFA auszuschließen, sollten entnommene Proben am Teich vorbereitend aufgearbeitet werden. Eine Bearbeitung des Probenmaterials im Sinne einer DNA-Extraktion steht jedoch im Widerspruch zum gewünschten einfach anwendbaren POC-Diagnostikum. Die Herstellung einer Verdünnungsreihe kann als vertretbar angesehen werden. Diese stellt einen angemessenen Kompromiss zwischen der Anwenderfreundlichkeit und der Aussagekraft des Testsystems dar. Auf Grundlage der hier erhobenen Resultate wären Verdünnungsstufen im Bereich von 1:10 und 1:100 in einem geeigneten Verdünnungsmittel, wie z.B. Nuklease-freiem Wasser, als sinnvoll anzusehen. Jede Probe sollte grundsätzlich aber auch unverdünnt getestet werden.

Der hier entwickelte KHV-PCR-LFA ist für die Anwendung direkt am Teich gedacht. Ein mobiles PCR-Gerät mit autarker Energiezufuhr (beispielsweise durch eine Autobatterie) könnte zur Durchführung des Tests genutzt werden. Mobile PCR-Geräte sind bereits auf dem Markt verfügbar, wie z.B. das MiniPCR-System (MARX 2015). Diese Geräte sind mit erheblichen Komfortfunktionen ausgestattet und könnten für den mobilen Einsatz am Teich eingesetzt

werden. Die Möglichkeit der Anwendung solcher Geräte sollte in weiteren Studien geklärt werden.

Sämtliche praktischen Arbeiten im Rahmen des Projektes wurden durch laborkundiges Personal nach entsprechenden Arbeitsanweisungen durchgeführt. Es kann somit keine objektive Aussage über die Anwenderfreundlichkeit bei der Nutzung durch Laien getroffen werden. Für die Durchführung der Diagnostik in ihrer hier beschriebenen Methodik sind Pipettier-Arbeiten notwendig. Kenntnisse der Bedienung von PCR-Geräten sind ebenfalls essentiell. Die Durchführung durch Laien (z.B. Hobbyhalter von Fischen, Züchter) bleibt kritisch zu sehen, da bei PCR-Verfahren die Gefahr von Kontaminationen gegeben ist. Mögliche carry-over-Kontaminationen und somit falsch-positive Ergebnisse sind eine große Schwäche besonders von konventionellen PCR-Verfahren (LONGO et al. 1990). Carry-over-Kontaminationen erschwerten auch in der vorliegenden Arbeit die Durchführung, trotz strikter räumlicher Trennung zwischen den einzelnen Arbeitsschritten (Ansetzen des Reaktionsmix, Vervielfältigung im PCR Gerät, Zugabe des Hybridisierungs-Puffers sowie die Auswertung der Teststreifen). Die Übertragung dieser Arbeitsweise auf den Einsatz am Teich ist nicht realistisch. Trotzdem sollten das Tragen von Handschuhen, ein sauberer Arbeitsplatz sowie eine räumliche Trennung der Arbeitsschritte empfohlen werden. Eine zusätzliche Möglichkeit wäre die Implementierung einer Uracil-D-Glycosylase (UDG) in den Amplifikationsschritt (LONGO et al. 1990). Die UDG ist ein Reparaturenzym und entfernt Uracil-Reste aus der DNA. UDG und dUTP verhindern den carry-over-Effekt. Hierzu wird dTTP und dUTP im Mastermix für die PCR eingesetzt. dUTP wird von der DNA-Polymerase auch in die DNA eingebaut, allerdings weniger effizient. Daher ist das Mischungsverhältnis zwischen dTTP und dUTP für den Erfolg der PCR entscheidend. Dem PCR-Ansatz wird zudem das UDG zugesetzt. Vor dem Beginn einer neuen PCR wird der PCR-Ansatz für zwei Minuten auf 50 °C erhitzt. Die UDG entfernt in diesem Schritt alle Uracil-Reste aus DNA-Molekülen, die in einer vorherigen PCR synthetisiert wurden und als Kontamination mit in den Reaktionsansatz gelangt sind.

Auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen können erste Empfehlungen für die spätere Probennahme am Teich vorgegeben werden. Kiemenabstriche können sowohl von lebenden als auch von toten Tieren genommen werden. Bei lebenden Tieren sollte die Zeit der Beprobung auf ein Minimum reduziert werden, da durch die Fixationsmaßnahmen großer Stress für die Tiere entsteht. Nach BERGMANN et al. (2017a) kann bei starkem Stress eine latente KHV-Infektion reaktiviert werden. Zu empfehlen wäre, dass jede Probe im 5-fach-Ansatz getestet wird. Grundsätzlich sollte man sich zur Beprobung verdächtiger Tiere an den

Vorgaben der Amtlichen Methodensammlung des FLI orientieren. Es sollten während der normalen Bewirtschaftungsvorgänge Proben von verdächtigen Tieren entnommen werden. Die amtliche Methodensammlung des FLI empfiehlt dazu die Entnahme von Gewebematerial mittels sterilem Tupfer. Die Tupfer sollten mit Blut benetzt sein.

In zukünftigen Versuchen könnte geklärt werden, ob auch weitere Probenmaterialien für die Untersuchung geeignet wären. So empfehlen MONAGHAN et al. (2015) beispielsweise die Probennahme von Hautsekreten. Dies könnte eine Alternative zur Beprobung der Kiemen darstellen.

Prinzipiell müssen im KHV-PCR-LFA positiv getestete Proben weiterhin durch die zuständigen Untersuchungseinrichtungen untersucht werden, da es sich bei der KHVE um eine anzeigepflichtige Tierseuche handelt. Der KHV-PCR-LFA kann jedoch als schnelles POC-Diagnostikum im Rahmen von Monitoring-Untersuchungen angesehen werden, welches es dem Anwender erlaubt, frühzeitig Informationen bei unklarem Krankheitsbild zu erlangen. Eine frühzeitige Diagnostik der KHVE ist für erste Quarantäne-Maßnahmen und die Eindämmung der Ausbreitung der Erkrankung besonders wichtig. Der Test kann auf Grundlage der Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, eine Untersuchung in einer amtlichen Untersuchungseinrichtung noch nicht ersetzen. Nach geltendem Recht müssen alle in Deutschland eingesetzten In-Vitro-Diagnostika für den Nachweis von Anzeigepflichtigen Tierseuchen nach § 11 Abs. 2 Tiergesundheitsgesetz (TierGesG) durch die Zulassungsstelle des FLI genehmigt werden. Für einen regulären Einsatz am Teich muss der KHV-PCR-LFA in zukünftigen Arbeiten für die Zulassung durch das FLI vorbereitet werden.

6 Zusammenfassung

Finn Niklas Loose

Validierung eines PCR-basierten Lateral Flow Assays zum qualitativen Nachweis von Koi-Herpesvirus DNA in verschiedenen Probenmatrizes

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2021

56 Seiten, 26 Abbildungen, 23 Tabellen, 85 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: KHVE, PCR, LFA, Validierung, Kiementupfer, Koi, Karpfen, Anzeigepflicht, Probenmatrizes, Analytische Sensitivität, Diagnostische Spezifität, POC, MIQUE

Einleitung: Die KHVE (Koi-Herpesvirus Erkrankung) ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, die weltweit zu wirtschaftlichen Verlusten in Karpfen- und Koi-Beständen führt. Der gesetzliche Rahmen verbietet eine Behandlung sowie Impfung infizierter Tiere. Die Bekämpfung dieser Tierseuche basiert auf frühzeitiger Diagnostik. Laut Amtlicher Methodensammlung ist die real-time PCR der diagnostische Goldstandard.

Ziel der Untersuchung: Ziel der vorliegenden Arbeit war die Validierung eines KHV-PCR-LFA (KHV-PCR-lateral flow assay) unter Einsatz variabler Probenmatrizes in Form einer Point of Care Diagnostik (POC) am Teich als Alternative zur laborgebundenen real-time PCR.

Material und Methoden: Die Kriterien der Validierung orientierten sich an den „Minimal Information for Publication of Quantatitative real-time PCR“. Durch die Anwendung einer Verdünnungsreihe eines KHV Plasmids wurde die Analytische Sensitivität festgelegt. Das Plasmid wurde im 5fach Ansatz je Verdünnungsstufe getestet. Die Analytische Spezifität wurde durch den Einsatz einer Auswahl von fischpathogenen Viren und Bakterien bestimmt. Um die Robustheit und die Präzision des Testsystems zu bestimmen, wurden definierte Proben sowohl vergleichend innerhalb eines Tages als auch an zwei aufeinander folgenden Tagen getestet. Ein definiertes Probenpanel lag für die Ermittlung von Diagnostischer Sensitivität und Diagnostischer Spezifität vor. Es handelte sich dabei um Kiemen- und

Nierengewebeproben von 43 gesunden und 57 experimentell infizierten Karpfen. Weiterhin konnte auf 20 Kiementupfer von unterschiedlich stark verwesten Karpfen zurückgegriffen werden. Diese Tiere stammten aus einem amtlich bestätigten KHV-Ausbruchgeschehen in Sachsen, Deutschland. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde eine Vier-Felder-Tafel gewählt. Die Diagnostische Sensitivität und Diagnostische Spezifität wurden basierend auf den Ergebnissen errechnet. Die Berechnung des Positiven Prädiktiven Wertes als auch des Negativen Prädiktiven Wertes vervollständigen die Validierung.

Ergebnisse: Die Analytische Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA liegt bei 8,9 Viruskopien/µl. Die Analytische Spezifität wurde durch negative Ergebnisse fischpathogener Viren und Bakterien bestätigt. Die Robustheit wie auch die Präzision des Testverfahrens konnte durch übereinstimmende Ergebnisse in der Intra-Assay Präzisionsuntersuchung als auch in der Inter-Assay Präzisionsuntersuchung bestätigt werden. Von insgesamt 77 nachweislich KHV-infizierten Gewebeproben konnte das Testsystem in einem ersten Testlauf 73 Gewebeproben als KHV-positiv identifizieren. Der validierte KHV-PCR-LFA weist eine Diagnostische Sensitivität von 94,81 % auf. Alle im Validierungsprozess nicht KHV infizierten Gewebe (n = 43) wurden negativ getestet. Die Diagnostische Spezifität beträgt 100 %.

Schlussfolgerung: Der validierte KHV-PCR-LFA kann als POC Diagnostikum im Rahmen von Monitoring-Untersuchungen mobil am Teich eingesetzt werden. Die Validierung wurde erfolgreich abgeschlossen. Eine zuverlässige Identifikation nicht-KHV-infizierter Tiere ist möglich. Im Vergleich zu dem Goldstandard aus der amtlichen Methodensammlung zeigt das Testsystem eine geringere Analytische Sensitivität. Durch die Verwendung einer internen Kontrolle weist das Diagnostikum ein Alleinstellungsmerkmal auf. Die Diagnostische Sensitivität ist in Relation zu anderen in der Literatur beschriebenen Testsystemen mit vergleichbarem Studiendesign höher. Der KHV-PCR-LFA kann die vorgeschriebene real-time PCR in seiner jetzigen Form noch nicht ersetzen. Fragestellungen hinsichtlich einer behördlichen Genehmigung müssen geklärt werden.

7 Summary

Finn Niklas Loose

Validation of a PCR-based lateral flow immunoassay for qualitative detection of KHV DNA in different sample matrices

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany
Submitted in January 2021

56 pages, 26 figures, 23 tables, 85 references, appendix

Keywords: KHVD, PCR, LFA, validation, gill swab, koi, carp, notifiable disease, sample matrices, analytical sensitivity, diagnostic specificity, POC, MIQUE

Introduction: The koi herpesvirus disease is a notifiable disease leading to mass mortality in worldwide common carp- and koi carp-aquacultures. The legal framework forbids treatment as well as vaccination of infected animals. An early diagnosis is elementary for successful prevention of KHVD. According to the official collection of methods of identifying the koi herpesvirus in infected animals, quantitative PCR is the gold standard.

Aim of study: The goal of the study was the validation of a KHV-PCR-LFA (KHV-PCR-lateral flow assay) using mutable matrices in the form of a point of care (POC) method as an alternative to laboratory-linked real time PCR.

Material and methods: The validation criteria were defined by minimal information for Publication of Quantitative real-time PCR. A KHV plasmid was tested in a dilution series to determine analytical sensitivity. The plasmid was tested in five replicates in a dilution step. The KHV PCR LFA's analytical specificity was detected by testing the various fish pathogenic viruses and bacteria with the LFA. Selected samples were tested between different runs within a day and on two following days to gain information about robustness and precision. A selection of 100 gill and kidney tissue samples was chosen to calculate diagnostic sensitivity and diagnostic specificity. 57 gill and kidney tissue samples originated from experimentally infected common carp, 43 gill and kidney tissue samples originated from non-infected common carp. Based on a KHV disease outbreak in Saxony, Germany, 20 gill tissue samples

had been collected from different dead animals. The fish showed different signs of decay. The samples were added to a diagnostic sample panel. For the presentation of the results a four field table was chosen. Based on these results diagnostic sensitivity as well as diagnostic specificity was calculated. The validation study was completed by determining positive and negative predictive values.

Results: The analytical detection limit of the KHV-PCR-LFA is 8,9 virus copies/µl. Analytical specificity was confirmed by negative results of fish pathogenic viruses and bacteria. The robustness as well as the precision of the test procedure could be confirmed by consistent results in the intra-assay precision test as well as in the inter-assay precision test. Out of a total of 77 proven KHV-infected tissue samples, the test system was able to identify 73 tissue samples as KHV-positive in a first test run. The validated KHV-PCR-LFA has a diagnostic sensitivity of 94.81 %. All tissues not infected with KHV in the validation process (n = 43) were tested negative. The diagnostic specificity is 100 %.

Conclusion: The validated KHV-PCR-LFA can be used as a mobile point of care diagnostic for monitoring studies directly at the pond. The validation was successfully completed. Reliable identification of non-KHV-infected animals is possible. Compared to the gold standard from the official method collection, the test system showed a lower analytical sensitivity. By using an internal control, the diagnostic has a unique selling proposition. The diagnostic sensitivity is higher in relation to other test systems described in the literature with a comparable study design. The KHV-PCR-LFA cannot yet replace the prescribed real-time PCR in its current form. Questions regarding official approval must be clarified.

.

8 Literaturverzeichnis

Adamek M, Oschilewski A, Wohlsein P, Jung-Schroers V, Teitge F, Dawson A , Gela D, Piackova V, Kocour M, Adamek J, Bergmann SM, Steinhagen D. Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. Vet Res. 2017;48:12. DOI: 10.1186/s13567-017-0416-7

Adams A, Thompson KD. Development of diagnostics for aquaculture: challenges and opportunities. Aquac Res. 2011;42:93–102. DOI: 10.1111/j.1365-2019.2010.0.2663.x

Adkison MA, Gilad O, Hedrick RP. An Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Antibodies to the Koi Herpesvirus (KHV) in the Serum of Koi Cyprinus carpio. Fish Pathol. 2005;40:53–62. DOI: 10.3147/jsfp.40.53

Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton JR. Spring viremia of carp (SVC). Dis Aquat Org. 2002;52:261–272. DOI. 10.3354/dao052261

Aoiki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP. Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. J Virol. 2007;81:5058-5065. DOI: 10.1128/JVI.00146-07

Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. Trends Analyt Chem. 2016;82:286–306. DOI: 10.1016/j.trac.2016.06.006

Baumer A, Fabian M, Wilkens MR, Steinhagen D, Runge M. Epidemiology of cyprinid herpesvirus-3 infection in latently infected carp from aquaculture. Dis Aquat Org. 2013;105:101-108. DOI: 10.3354/dao02604

Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A, Hedrick RP. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and ist use for a highly sensitive PCR based diagnosis. BMC Microbiol. 2005;5:1-9. DOI: 10.1186/1471-2180-5-13

Bergmann SM, Kempter J, Sadowski J, Fichtner D. First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio L.*) in Poland. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2006;26:97-104. ISSN: 0108-0288

Bergmann SM, Lutze P, Schütze H, Fischer U, Dauber M, Fichtner D, Kempter J. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (*KHV*) but not for KHV disease (*KHVD*). Bull Eur Ass Fish Pathol. 2010;30:74-84. ISSN: 0108-0288

Bergmann SM, Riechardt M, Fichtner D, Lee P, Kemptner J. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. J Virol Methods. 2010;163:229-233. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.09.025

Bergmann SM, Sadowski J, Kielpinski M, Bartlomiejczyk, Fichtner D, Riebe R, Lenk M, Kempter J. Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). J Fish Dis. 2010;33:267-272. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01127.x

Bergmann SM, Kempter J. Detection of koi herpesvirus (KHV) after re-activation in persistently infected common carp (Cyprinus carpio L.) using non-lethal sampling methods. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2011;31:92-99. ISSN: 0108-0288

Bergmann SM, Wang Q, Zeng W, Li Y, Wang Y, Matras M, Reichert M, Fichtner D, Lenk M, Morin T, Olesen NJ, Skall HF, Lee PY, Zheng S, Monaghan S, Reiche S, Fuch W, Kotler M. Validation of a KHV antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J Fish Dis 2017;40:1511–1527. DOI: 10.1111/jfd.12621

Bergmann SM, Monro ES, Kempter J. Can water disinfection prevent the transmission of infectious koi herpesvirus to naive carp?-a case report. J Fish Dis 2017;40:885-893. DOI: 10.1111/jfd.12568

Bigarré L, Baud M, Cabon J, Antychowicz J, Bergmann SM, Engelsma M, Pozet F, Reichert M, Castric J. Differentation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. J Virol Methods. 2009;158:51-57. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.01.023

Bretzinger A, Fischer-Scherls T, Oumuna M, Hoffmann R, Truyen U. MASS MORTALITIES IN KOI CARP, *CYPRINUS* CARPIO, ASSOCIATED WITH GILL AND SKIN DISEASE. Bull Eur Ass Fish Pathol. 1999;19:182-185. ISSN: 0108-0288

Bruno DW, Woo PTK. Fish Diseases and Disorders: Volume 3: Viral, bacterial and fungal disorders. 2. Aufl. Wallingford, Oxfordshire; Cambridge : Cabi; 2011. ISBN: 9781845935542

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQUE Guidelines: *M*inimum *I*nformation for Publication of *Q*uantitative Real-Time PCR *E*xperiments. Clin Chem. 2009;55:611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797

Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, Bruns DE, Gatsonis CA, Hooft L, IrwigL, Levine D, Reitsma JB, De Vet HCW, Bossuyt PMM. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. BMJ Open. 2016;6:1-17. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-012799

Costes B, Raj VS, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L, Mast J, Lieffrig F, Bremont M, Vanderplasschen A. The Major Portal of Entry of Koi Herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the Skin. J Virol. 2009;83:2819-2830. DOI: 10.1128/JVI.02305-08

Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S, Kotler M. Detection of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus in Fish Droppings. Appl Environ Microbiol. 2005;71:7285-7291. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7285-7291.2005

Dishon A, Davidovich M, Ilouze M, Kotler M. Persistence of Cyprinid Herpesvirus 3 in Infected Cultured Carp Cells. J Virol. 2007;81:4828-4836. DOI: 10.1128/JVI.02188-06

Eide KE, Miller-Morgan T, Heidel JR, Kent ML, Bildfell RJ, LaPatra S, Watson G, Jin L. Investigation of Koi Herpesvirus Latency in Koi. J Virol. 2011;85:4954-4962. DOI: 10.1128/JVI.01384-10

El-Din MMM. Histopathological Studies in Experimentally Infected Koi Carp (*Cyprinus carpio koi*) with Koi Herpesvirus in Japan. WJFMS. 2011;3:252-259. ISSN: 2078-4589

EL-Matbouli M, Saleh M, Soliman H. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfsih cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). Vet Rec. 2007;161:792-793. DOI: 10.1136/vr.161.23.792

El-Matbouli M, Rucker U, Soliman H. Detection of *Cyprinid herpesvirus-3* (CyHV-3) DNA in infected fish tissues by nested polymerase chain reaction. Dis Aquat Org. 2007;78:23-28. DOI: 10.3354/dao01858

Embregts CWE, Tadmor-Levi R, Veselý T, Pokorová D, David L, Wiegertjes GF, Forlenza M. Intra-muscular and oral vaccination using a Koi Herpesvirus ORF25 DNA vaccine does not confer protection in common carp (*Cyprinus carpio L.*) Fish Shellfish Immunol 2019;85:90-98. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.03.037

Engelsma MY, Way K, Dodge MJ, Voorbergen-Laarman M, Panzarin V, Abbadi M, El-Matbouli M, Skall HF, Kahns S, Stone DM. Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. Dis Aquat Org. 2013;107:113-120. DOI: 10.3354/dao02666

Fijan N, Sulimanović D, Bearzotti M, Muzinić D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF, De Kinkelin P. Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *cyprinus carpio*. Ann Inst Pasteur Virol. 1983;134:207–220. DOI: 10.1016/S0769-2617(83)80060-4

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) 2016. Amtliche Methodensammlung- Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I), Vollständige überarbeitete Version vom 01.04.2016.

Gaede L, Steinbrück J, Bergmann SM, Jäger K, Gräfe K, Schoon HA, Speck S, Truyen U. Koi herpesvirus infection in experimentally infected common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and three potential carrier fish species *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758); *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758); and *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) by quantitative real-time PCR and in-situ hybridization. J Appl Ichthyol. 2017;33:776-784. DOI: 10.1111/jai.13368

Gao Y, Suárez NM, Wilkie GS, Dong C, Bergmann S, Alison Lee P-Y, Davison AJ, Vanderplasschen AFC, Boutier M. Genomic and biologic comparisons of cyprind herpesvirus 3 strains. Vet Res. 2018;49:1-11. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0532-z

Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkison MA, Zlotkin A, Bercovier H, Eldar A, Hedrick RP. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. Dis Aquat Org. 2002;48:101-108. DOI: 10.3554/dao048101

Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. J Gen Virol. 2003;84:2661-2668. DOI: 10.1099/vir.0.19323-0

Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hedrick RP. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. Dis Aquat Org. 2004;60:179-187. DOI: 10.3354/dao060179

Gotesman M, Kattlun J, Bergmann SM, El-Matbouli M. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. Dis. Aquat Org. 2013;105:163-174. DOI: 10.3354/dao02614

Gravell M, Malsberger RG. A permanent cell line from fathead minnow (Pimephales promelas). Ann N Y Acad Sci 1965;126:555–565. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb14302.x

Gray WL, Mullis L, LaPatra SE, Groff JM, Goodwin A. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. J Fish Dis. 2002;25:171-178. ISSN: 0140-7775

Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that Infect Fish. Viruses. 2011;3:2160 – 2191. ISSN: 1999-4915

Hedrick RP, Groff JM, Okihiro MS, McDowell TS. Herpesviruses Detected in Papillomatous Skin Growths of Koi Carp (*Cyprinus carpio*). J Wildl Dis. 1990;26:578–581.

Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. J Aquat Anim Health. 2000;12:44-57. ISSN: 0899-7659

Hübner P, Gautsch S, Jemmi T. In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. Mitt Lebensmittelunters Hyg. 2002;93:118-139. ISSN: 0026-6841

Ilouze M, Davidovich M, Diamant A, Kotler M, Dishon A. The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. Ecol Res. 2011;26:885–892. DOI: 10.1007/s11284-010-0694-2

Jung SJ, Miyazaki T. Herpesviral haematopoetic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis. 1995;18:211 – 220.

Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F, Hellmann J, Bergmann SM, Schütze H, Kleingeld DW, Way K, Stone D, Runge M, Keller B, Hesami S, Waltzek T, Steinhagen D. Another potential carp killer? Carp Edema Virus disease in Germany. Vet Res. 2015;11:1-4. DOI: 10.1186/s12917-015-0424-7

King A, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1. Aufl. Elsevier; 2011. ISBN: 9780123846846

Kirsten Meyer. Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirus-Infektionen durch symptomlose Carrierfische (Dissertation med. vet.). Hannover: TiHo Hannover; 2007.

Kurita J, Yuasa K, Ito T, Sano M, Hedrick RP, Engelesma MY, Haenen OLM, Sunarto A, Kholidin EB, Chou H-Y, Tung M-C, Pena L, Lio-Po G, Tu C, Way K, Iida T. Molecular Epidemiology of Koi Herpesvirus. Fish Pathol. 2009;44:59-66. ISSN: 1881-7335

Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG) 2011. Untersuchungen zur Koi-Herpesvirus-Infektion. 1. Auflage, Schriftenreihe 34/2011, Dresden. https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/15093

Li W, Lee X, Weng S, He J, Dong C. Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia. Vet Microbiol. 2015;175:185–194. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.11.022

Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125–128. DOI: 10.1016/0378-1190(90)90145-h.

Marx V. PCR heads into the field. Nat Methods. 2015;12:393–397. DOI: 10.1038/nmeth.3369

McColl KA, Sunarto A, Slater J, Bell K, Asmus M, Fulton W, Hall K, Brown P, Gilligan D, Hoad J, Williams LM, Crane MSTJ. Cyprinid herpesvirus 3 as a potential biological control agenat for carp (*Cyprinus carpio*) in Australia: susceptibility of non-target species. J Fish Dis. 2017;40:1141-1153. DOI: 10.1111/jfd.12591

Michel B, Fournier G, Lieffrig F, Costes B, Vanderplasschen A. Cyprinid Herpesvirus 3. Emerg Infect Dis. 2010;16:1835 – 1843. DOI: 10.3201/eid1612.100593

Miyazaki T, Kuzuya Y, Yasumoto S, Yasuda M, Kobayashi T. Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. Dis Aquat Org. 2008;80:1-11. DOI: 10.3354/dao01929

Monaghan SJ, Thompson KD, Adams A, Bergmann SM. Sensitivity of seven PCRs for early detection of koi herpesvirus in experimentally infected carp, Cyprinus carpio L., by lethal and non-lethal sampling methods. J Fish Dis. 2015;38:303–319. DOI: 10.1111/jfd.12235

Neukirch M, Kunz U. Isolation and preeliminary characterization of several viruses from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis and mortality. Bull Eur Ass Fish Pathol. 2001;21:125–135. ISSN: 0108-0288

Ono S, Nagai A, Sugai N. A Histopathological Study on Juvenile Colorcarp, *Cyprinus carpio*, Showing Edema. Fish Pathol. 1986;21:167-175. ISSN: 1881-7335.

Ouyang P, Yang R, Chen J, Wang K, Geng Y, Lai W, Huang X, Chen D, Fang J, Chen Z, Tang L, Yin L. First detection of carp edema virus in association with cyprinid herpesvirus 3 in cultured ornamental koi, Cyprinus carpio L., in China. Aquac Int. 2018;490:162–168. DOI: 10.1016(J.AQUACULTURE.2018.02.037

Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant A, Bejerano Y, Kotler M. EPIDEMIOLOGICAL DESCRIPTION OF A NEW VIRAL DISEASE AFFLECTING CULTURED *CYPRINUS CARPIO* IN ISRAEL. Isr J Aquacult Bamid. 2003;55:5-12. ISSN: 0792-156X

Perelberg A, Ilouze M, Kotler M, Steinitz M. Antibody response and resistance of Cyprinus carpio immunized with cyprinid herpes virus 3 (CyHV-3). Vaccine. 2008;26:3750-3756. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.04.057

Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y, Steinitz M, Perelberg A, Soffer D, Kotler M. Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. J Virol. 2004;78:9544-9551. DOI: 011JVI.78.179544-9551.2004

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Anal Bioanal Chem. 2009;393:569–582. DOI: 10.1007/s00216-008-2287-2

Rakus K, Ouyang P, Boutier M, Ronsmans M, Reschner A, Vancsok C, Jazowiecka-Rakus J, Vanderplasschen A. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research. Vet Res. 2013;44:85.

Reed AN, Izume S, Dolan BP, LaPatra S, Kent M, Dong J, Jin L. Identification of B Cells as a Major Site for Cyprinid Herpesvirus 3 Latency. J Virol. 2014;88:9297-9309. DOI: 10.1128/JVI.00990-14

Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio.* Vaccine. 2003;21:4677-4684. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00523-1

Sadler J, Marecaux E, Goodwin AE. Detetcion of koi herpes virus (*CyHV-3*) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. J Fish Dis. 2008;31:71-72.

Schmid T, Gaede L, Böttcher K, Bräuer G, Fichtner D, Beckmann R, Speck S, Becker F, Truyen U. Efficacy assessment of three inactivated koi herpes antigen preparations against experimental challenge virus infection in common carp. J Fish Dis. 2016;39:1007-1013. DOI: 10.1111/jfd.12428

Skall HF, Olesen NJ, Mellergaard S. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming--a review. J Fish Dis. 2005;28:509–529. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x

Soliman H, El-Matbouli M. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp. J Fish Dis. 2018;41:761-772. DOI: 10.1111/jfd.12774

St-Hilaire S, Beevers N, Way K, Le Deuff RM, Martin P, Joiner C. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. Dis Aquat Org. 2005;67:15-23. DOI: 10.3354/dao067015

Steinbrück J. Untersuchung der Koi-Herpesvirus-Infektion bei Nutzkarpfen (*Cyprinus carpio carpio*), Plötzen (*Rutilus rutilus*), Schleien (*Tinca tinca*), Karauschen (*Carassius carassius*) mittels quantitativer real-time PCR (Dissertation med. vet.). Leipzig: VMF Leipzig der Universität Leipzig; 2017.

Tiergesundheitsgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. November 2018 (BGBI. I S. 1938), zuletzt geändert durch Artikel 100 des Gesetzes vom 20. November 2019 (BGBI. I S: 1626)

Thrusfield M, Christley R. Veterinary Epidemiology. 4.Aufl. Chichester. John Wiley & Sons, Ltd; 2018. ISBN: 978-1-118-28028-7

Venables WN, Ripley B d. Modern applied statistics with S. 4. Aufl. New York: Springer-Verlag; 2002. DOI: 10.1007/978-0-387-21706-2

Vrancken R, Boutier M, Ronsmans M, Reschner A, Leclipteux T, Lieffrig F, Collard A, Melard C, Wera S, Neyts J, Goris N, Vanderplasschen A. Laboratory validation of a lateral flow device

fort he detection of CyHV-3 antigens in gill swabs. J Virol Methods. 2013;193:679-682. ISSN: 0166-0934

Walster CI. Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. Fish Vet J. 1999;3:54-58. ISSN: 1462-2246

Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H, Hirono I, Aoki T, Davison AJ, Hedrick RP. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. J Gen Virol. 2005;86:1659-1667. DOI: 10.1099/vir.0.80982-0

Waltzek TB, Kelley GO, Alfaro ME, Kurobe T, Davison AJ, Hedrick RP. Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. Dis Aquat Org. 2009;84:179-194. DOI: 10.3354/dao02023

Wilson EB. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. J Am Stat Assoc. 1927;22:209-212. DOI: 10.1080/01621459.1927.10502953

World Organisation for Animal Health (OIE)-Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2017). Chapter 2.3.7. KOI HERPESVIRUS DISEASE vom 13.07.2017: 1-18. https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_koi_herpesvirus.htm

World Organisation for Animal Health (OIE)- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 8.Aufl. 2018. ISBN: 978-92-95108-18-9

Yasumoto S, Kuzuya Y, Yasuda M, Yoshimura T, Miyazaki T. Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. Fish Pathol. 2006;41:141-145. DOI: 10.3147/jsfp.41.141

Zhou J, Xue J, Wang Q, Zhu X, Li X, Lv W, Zhang D. Vaccination of plasmid DNA encoding ORF81 gene of CJ strains of KHV provides protection to immunized carp. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2014;50:489-495. DOI: 10.1007/s11626-014-9737-2

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Milenia®HybriDetect 2T Dipstick – Darstellung möglicher Ergebnisse	S. 13
Abbildung 2	Schema der stationären Antikörper auf dem Teststreifen	S. 14
Abbildung 3	Schema der Darstellung der Ergebnisse in einer 4-Felder-Tafel	S. 28
Abbildung 4	Ergebnisse des KHV-PCR-LFA: Test eines Plasmidstandards in verschiedenen Konzentrationen im 5fach Ansatz	S. 31
Abbildung 5	Grafische Darstellung der Nachweisgrenze des KHV-PCR-LFA	S. 32
Abbildung 6	Auswertung der Intra-Assay Präzision des KHV-PCR-LFA: Untersuchung von Kiemenproben	S. 33
Abbildung 7	Auswertung der Intra-Assay Präzision des KHV-PCR-LFA: Untersuchung von Nierenproben	S. 34
Abbildung 8	Auswertung der Inter-Assay Präzision an Tag 1	S. 35
Abbildung 9	Auswertung der Inter-Assay Präzision an Tag 2	S. 35
Abbildung 10	Darstellung der Ergebnisse in einer 4-Felder-Tafel	S. 38
Abbildung 11	Untersuchung der Proben Kieme 120b und Niere 120b im 3fach Ansatz mittels KHV-PCR-LFA	S. 41
Abbildung 12	Untersuchung der Probe Niere 120b im 5fach Ansatz mittels KHV-PCR-LFA	S. 42
Abbildung 13	Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: Kiementupfer Eluate aus KHV Ausbruch im KHV-PCR-LFA	S. 43
Abbildung 14	Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: Kiementupfer Eluate aus KHV Ausbruch im KHV-PCR-LFA	S. 44
Abbildung 15	Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: aufgereinigte Kiementupfer Eluate aus KHV Ausbruch im KHV-PCR-LFA	S. 44
Abbildung 16	Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: Verdünnungen von Kiementupfer Eluaten aus KHV Ausbruch im KHV-PCR-LFA	S. 45
Abbildung 17	Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA	S. 75

Abbildung 18 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 75

Abbildung 19 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 76

Abbildung 20 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 76

Abbildung 21 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 77

Abbildung 22 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 77

Abbildung 23 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 78

Abbildung 24 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 78

Abbildung 25 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 79

Abbildung 26 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA S. 79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Molekularbiologische Nachweistechniken für das Koi Herpesvirus	S. 11
Tabelle 2	Funktionsbereiche Teststreifen	S. 13
Tabelle 3	Material für die Virusanzucht und Aufreinigung von Nukleinsäuren	S. 15
Tabelle 4	Verwendete Bakterien und Einzeller	S. 16
Tabelle 5	Verwendete Zellkulturen	S. 16
Tabelle 6	Adspektorische Beurteilung der Fische bei der Entnahme der Kiementupferproben	S. 17
Tabelle 7	Auflistung Chemikalien und Reagenzien	S. 18
Tabelle 8	Auflistung Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien	S. 19
Tabelle 9	Auflistung Geräte	S. 19
Tabelle 10	Primer- und Sondensequenzen nach GILAD et al. (2004)	S. 23
Tabelle 11	Mastermix für PCR nach GILAD et al. (2004) modifiziert nach GAEDE et al. 2017	S. 23
Tabelle 12	Modifiziertes Temperaturprotokoll nach GAEDE et al. (2017)	S. 24
Tabelle 13	Verwendete Primer- und Sondensequenzen	S. 24
Tabelle 14	Komponenten des LFA PCR Mastermix	S. 25
Tabelle 15	Temperaturprotokoll Dipstickassay Amplifikation	S. 25
Tabelle 16	Temperaturprotokoll Hybridisierung	S. 25
Tabelle 17	Plasmidkonzentrationen in den Verdünnungsstufen	S. 26
Tabelle 18	Ergebnisse der qPCR für die Proben zum Test der Intra-Assay Präzision	S. 27
Tabelle 19	Ergebnisse der Analytischen Spezifität im KHV-PCR-LFA	S. 32
Tabelle 20	Ergebnisse der Intra-Assay Präzision	S. 33
Tabelle 21	qPCR Ergebnisse KHV-positiver Karpfenproben	S. 36
Tabelle 22	Ergebnisse der Kiementupfereluate in der qPCR	S. 37
Tabelle 23	Virusbelastung Negativ getesteter Proben im Dipstickassay	S. 40

9 Danksagung

Abschließend möchte ich die Gelegenheit nutzen, um der Vielzahl an Personen zu danken, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich niemals entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen möchte ich für die Bereitstellung dieses äußerst spannenden Projektes sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung danken. Durch seine souveräne und pragmatische Art hat er den Weg dieser Arbeit geebnet. Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhagen danke ich ebenfalls für die zügige und exzellente Begutachtung meiner Arbeit.

Frau Dr. Stephanie Speck danke ich für ihre außergewöhnliche Projektbegleitung sowie -koordination. Ich kann mich glücklich schätzen, eine so ambitionierte Ansprechpartnerin während meiner Doktorandenzeit am Institut gehabt zu haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Firma Milenia Biotech GmbH, insbesondere Herrn Andre Breitbach und Herrn Ivo Bertalan danke ich für die jederzeit zügige Bereitstellung von Materialien und die Hilfe bei offenen Fragestellungen.

Ich danke ebenfalls dem gesamten Team des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen. Die familiäre und tolle Atmosphäre dort werde ich nie vergessen. Besonders danken möchte ich hierbei Frau Dana Rüster. Durch ihre offene, sympathische und geduldige Art war mir die Zusammenarbeit im Labor immer eine Freude. Ich bin glücklich über die zahlreichen Freundschaften, die sich in dieser einmaligen Zeit gefunden haben.

Zuletzt danken möchte ich natürlich meiner Familie, welche mich stets in den härtesten Phasen des Studiums, aber auch während der Promotion, tatkräftig unterstützt hat. Danke für die Geduld und Zuversicht. Mein größter Dank gilt Nadine. Ihre Unterstützung und Anwesenheit haben mich in dieser turbulenten Zeit zum Abschluss dieser Arbeit gebracht.

10 Anhang

Aufreinigung von Proben für die PCR

Aufreinigungsprotokoll “Aufreinigung von DNA aus Geweben“

Die Aufreinigung von DNA aus diagnostischen Gewebeproben wurde mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen,Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung von DNA aus CEV Positiven Gewebeproben wurde ebenfalls mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die im Spezifitätspanel eingesetzte Alge wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Folgende Reagenzien fanden Anwendung:

- AE-Puffer: Elutionspuffer
- AL-Puffer: Lysis-Puffer
- ATL-Puffer: Lysis-Puffer
- AW1-Puffer: Waschpuffer1
- AW2-Puffer: Waschpuffer2

Bei jeder Aufreinigung wurde eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt. Es wurde PBS verwendet.

Die Zentrifugationsschritte fanden in einer Minispin Sprout (Biozym Scientific GmbH, Deutschland) und in einer Heraeus Fresco 17 Zentrifuge (Thermofisher Scientific Inc., USA) statt.

Arbeitsschritte:

- Unter einer Sicherheitswerkbank wurden 25 mg des aufzureinigenden Gewebematerials mittels Skalpell-Klinge zerkleinert, abgewogen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße SafeSeal überführt
- Es erfolgte die Zugabe von 80 µl PBS, 100 µl ATL Puffer sowie 25 µl Proteinase K. Das Gemisch wurde im Anschluss auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei 56 °C inkubiert
- 200 µl AL-Puffer wurden hinzupipettiert; das Reaktionsgemisch erneut auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das Reaktionsgemisch inkubierte für 10 min bei 70 °C
- 200 µl Ethanol für die Molekularbiologie wurde hinzupipettiert; das Reaktionsgemisch erneut auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das komplette Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW1 Puffer wurden auf die Säule pipettiert

- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW2 Puffer wurden auf die Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- Die Säule wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 50 µl AE-Puffer hinzupippetiert
- Es erfolgte die Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Das Eluat wurde auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße SafeSeal überführt
- Die Säule wurde verworfen
- Das Eluat wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß SafeSeal überführt

Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Aufreinigungsprotokoll “Aufreinigung von DNA aus Koloniematerial einer Agarplatte“

Die Aufreinigung von DNA aus Koloniematerial einer Agarplatte wurde mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen,Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Reagenzien fanden Anwendung:

- AE-Puffer: Elutionspuffer
- AL-Puffer: Lysis-Puffer
- ATL-Puffer: Lysis-Puffer
- AW1-Puffer: Waschpuffer1
- AW2-Puffer: Waschpuffer2

Bei jeder Aufreinigung wurde eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt. Es wurde PBS verwendet.

Die Zentrifugationsschritte fanden in einer Minispin Sprout (Biozym Scientific GmbH, Deutschland) und in einer Heraeus Fresco 17 Zentrifuge (Thermofisher Scientific Inc., USA) statt.

Arbeitsschritte:

- Unter einer Sicherheitswerkbank wurden pro aufzureinigende Probe 180 µl ATL Puffer vorgestreckt
- Mittels Öse wurde Koloniematerial in den ATL-Puffer eingebracht
- Es erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K. Das Gemisch wurde im Anschluss auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 56 °C inkubiert
- 200 µl AL-Puffer wurden hinzupipettiert; das Reaktionsgemisch erneut auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das Reaktionsgemisch inkubierte für 10 min bei 70 °C
- 200 µl Ethanol für die Molekularbiologie wurde hinzu pipettiert; das Reaktionsgemisch erneut auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das komplette Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW1 Puffer wurden auf die Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW2 Puffer wurden auf die Säule pipettiert

- Die Säule wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- Die Säule wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 200 µl AE-Puffer hinzupippetiert
- Es erfolgte die Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Das Eluat wurde auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße SafeSeal überführt
- Die Säule wurde verworfen
- Das Eluat wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß SafeSeal überführt

Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Aufreinigungsprotokoll “Aufreinigung von viraler RNA “

Die Aufreinigung von RNA (IHNV,SVCV,VHSV,PFRV) aus infizierten Zellkulturüberständen wurde mittels QIAamp® RNA Mini Kit (Qiagen,Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Reagenzien fanden Anwendung:

- AVE-Puffer: Elutionspuffer
- AVL-Puffer: Lysis-Puffer
- AW1-Puffer: Waschpuffer1
- AW2-Puffer: Waschpuffer2

Bei jeder Aufreinigung wurde eine Aufreinigungskontrolle mitgeführt. Es wurde PBS verwendet.

Die Zentrifugationsschritte fanden in einer Minispin Sprout (Biozym Scientific GmbH, Deutschland) und in einer Heraeus Fresco 17 Zentrifuge (Thermofisher Scientific Inc., USA) statt.

Arbeitsschritte:

- Unter einer Sicherheitswerkbank wurden pro aufzureinigende Probe 560 µl carrier-RNA versetzter AVL Puffer in 1,5 ml Reaktionsgefäße SafeSeal vorgelegt
- 140 µl Probe (infizierter Zellkulturüberstand) wurden hinzupipettiert
- Das Gemisch wurde im Anschluss auf dem Vortex-Mischer gemischt
- Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur unter der Sicherheitswerkbank inkubiert
- 560 µl Ethanol für die Molekularbiologie wurde hinzupipettiert; das Reaktionsgemisch erneut auf dem Vortex-Mischer gemischt
- 630 µl des Gemisches wurden auf eine Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Der Rest des Gemisches wurde auf dieselbe Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW1 Puffer wurden auf die Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen
- 500 µl AW2 Puffer wurden auf die Säule pipettiert
- Die Säule wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein sauberes 2 ml collection tube gegeben; das Filtrat wurde verworfen

- Die Säule wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert
- Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 60 µl AE-Puffer hinzupippetiert
- Es erfolgte die Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
- Die Säule wurde bei 6000 x *g* für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert
- Das Eluat wurde auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße SafeSeal überführt
- Die Säule wurde verworfen
- Das Eluat wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß SafeSeal überführt

Die aufgereinigte RNA wurde bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Rezeptur von PBS

Herstellung von 10x PBS

Je 1000 ml dd H_2O sind enthalten:

80,0 g – NaCl (Natriumchlorid)

2,0 g – KCl (Kaliumchlorid)

2,4 g – KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)

17,8 g – Na_2HPO_4 2 H_2O (Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat)

Alternativ: 14,4g – Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat)

Herstellung von 1x PBS

100 ml 10x PBS + 900 ml dd H_2O

pH-Wert: 7,2-7,4

Ergebnisse des KHV-PCR-LFA (Originalprotokolle)

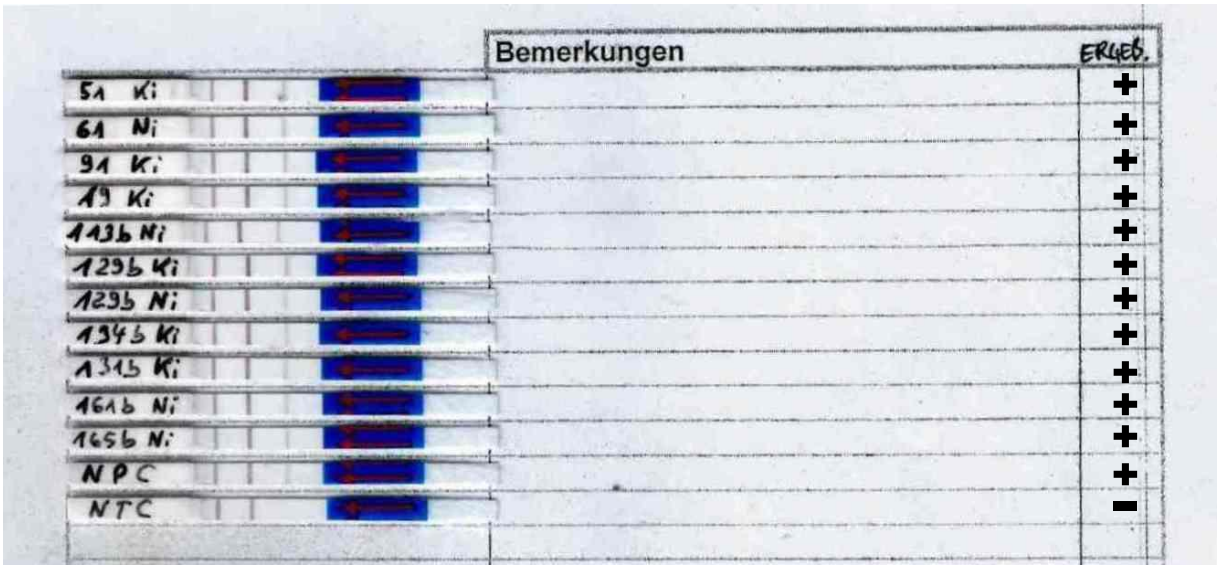

Abbildung 17 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
51-Ki = Kieme; 61-Ni = Niere; 91-Ki = Kieme; 19-Ki = Kieme; 113b-Ni = Niere; 129b-Ki = Kieme; 129b-Ni = Niere; 134b-Ki = Kieme; 131b-Ki = Kieme; 161b-Ni = Niere-; 165b-Ni = Niere; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

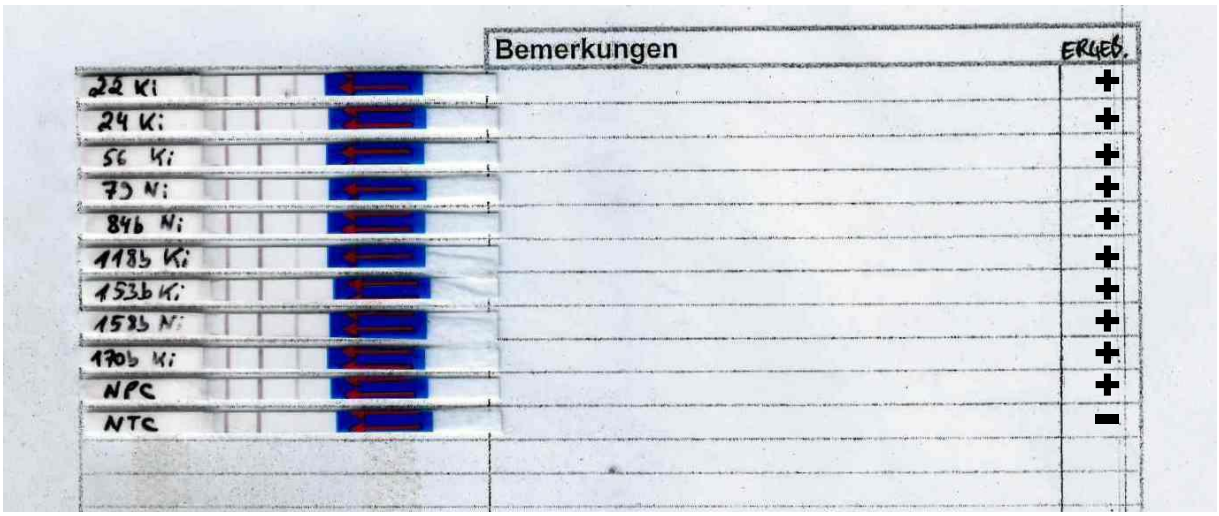

Abbildung 18 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
22-Ki = Kieme; 24-Ki = Kieme; 56-Ki = Kieme; 79-Ni = Niere; 84b-Ni = Niere; 118b-Ki = Kieme; 153b-Ki = Kieme; 170b-Ki = Kieme; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle, + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

Abbildung 19 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
79b-Ni = Niere; 108b-Ki = Kieme; 124b-Ki = Kieme; 137b-Ki = Kieme, 143b-Ki = Kieme; 169b-Ki = Kieme; 164b-Ni = Niere; 43-Ki = Kieme; 33-Ni = Kieme; 60-Ki = Kieme; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle, + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

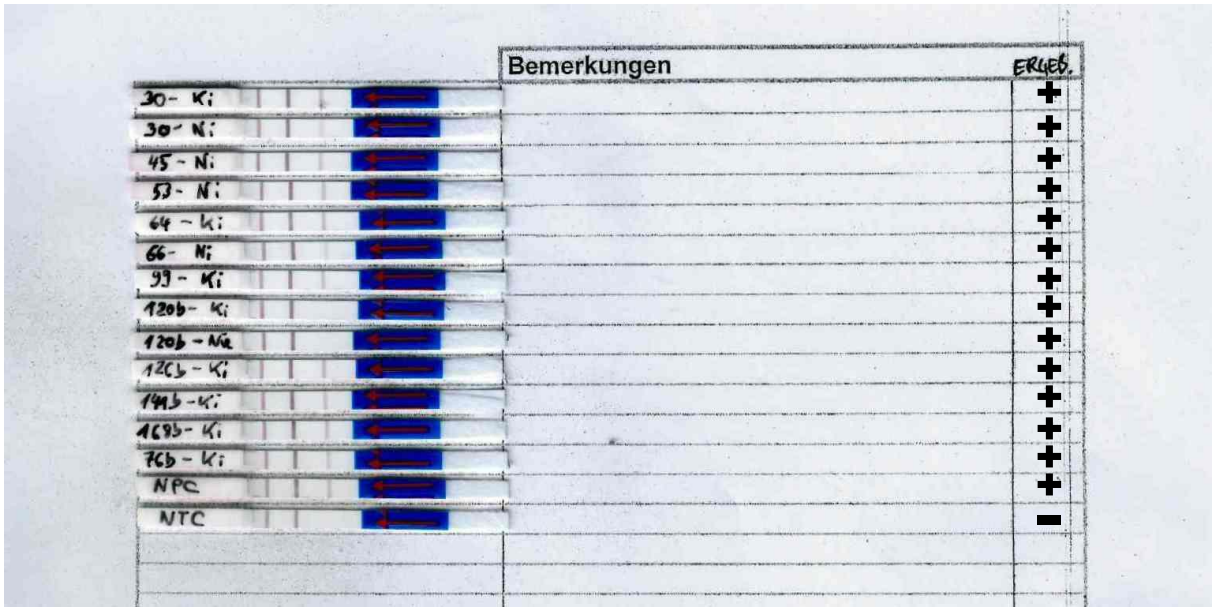

Abbildung 20 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
30-Ki = Kieme; 30-Ni = Niere, 45-Ni = Niere; 53-Ni = Niere; 64-Ki = Kieme; 66-Ni = Niere; 99-Ki = Kieme; 120b-Ki = Kieme; 120b-Ni = Niere; 126b-Ki = Kieme; 141b-Ki = Kieme; 168b-Ki = Kieme; 76b-Ki = Kieme, NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

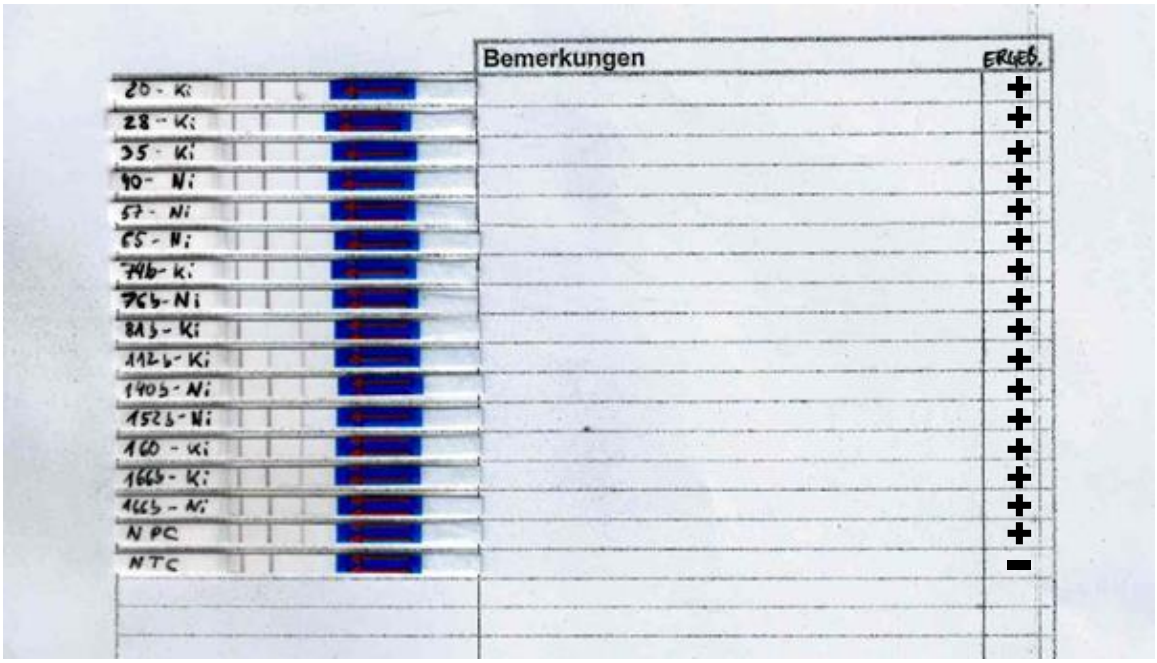

Abbildung 21 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-positiven Gewebeproben im KHV-PCR-LFA

20-Ki = Kieme; 28-Ki = Kieme; 35-Ki = Kieme, 40-Ni = Niere; 57-Ni = Niere; 65-Ni = Niere; 74b-Ki = Kieme; 76b-Ni = Niere; 81b-Ki = Kieme; 112b-Ki = Kieme; 140b-Ni = Niere; 152b-Ni = Niere; 160-Ki = Kieme, 166b-Ki = Kieme; 166b-Ni = Niere; NPC = Positivkontrolle; NTC = Negativkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

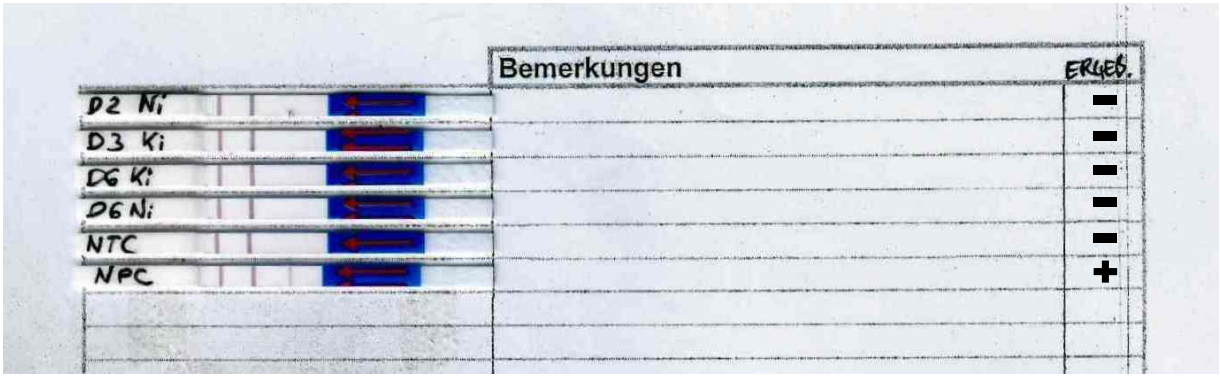

Abbildung 22 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA

D2-Ni = Niere, D3-Ki = Kieme; D6-Ki = Kieme; D6-Ni = Niere; NTC = Negativkontrolle; NPC = Positivkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

v

Abbildung 23 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
D13-Ki = Kieme; D13-Ni = Niere; D14-Ki = Kieme; D14-Ni = Niere; D16-Ki = Kieme; D16-Ni = Niere; D18-Ki = Kieme, D18-Ni = Niere; D20-Ki = Kieme; D20-Ni = Niere; NTC = Negativkontrolle; NPC = Positivkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

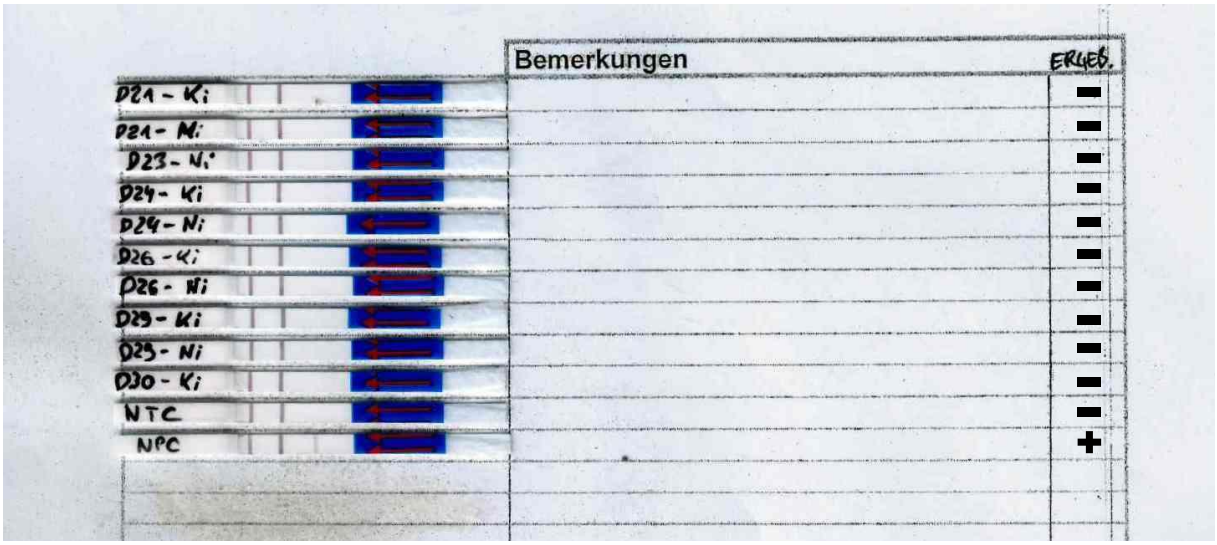

Abbildung 24 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA
D21-Ki = Kieme; D21-Ni = Niere; D23-Ni = Niere; D24-Ki = Kieme, D24-Ni = Niere; D26-Ki = Kieme; D26-Ni = Niere, D29-Ki = Kieme; D29-Ni = Niere, D30-Ki = Kieme; NTC = Negativkontrolle; NPC = Positivkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

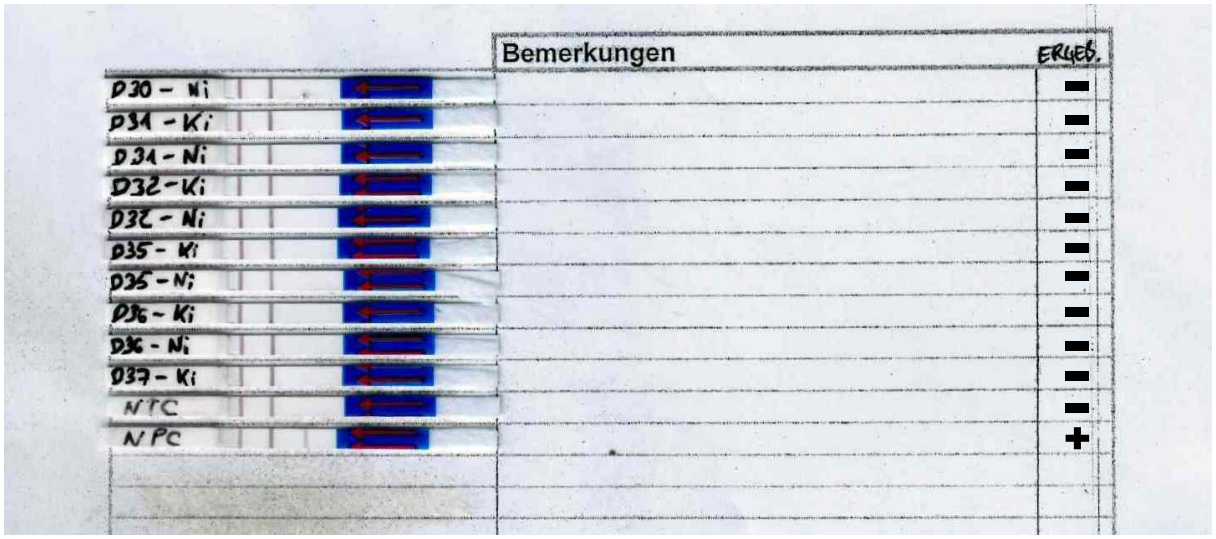

Abbildung 25 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA

D30-Ni = Niere, D31-Ki = Kieme; D31-Ni = Niere; D32-Ki = Kieme; D32-Ni = Niere; D35-Ki = Kieme, D35-Ni = Niere, D36-Ki = Kieme; D36-Ni = Niere; D37-Ki = Kieme; NTC = Negativkontrolle; NPC = Positivkontrolle; + = positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis

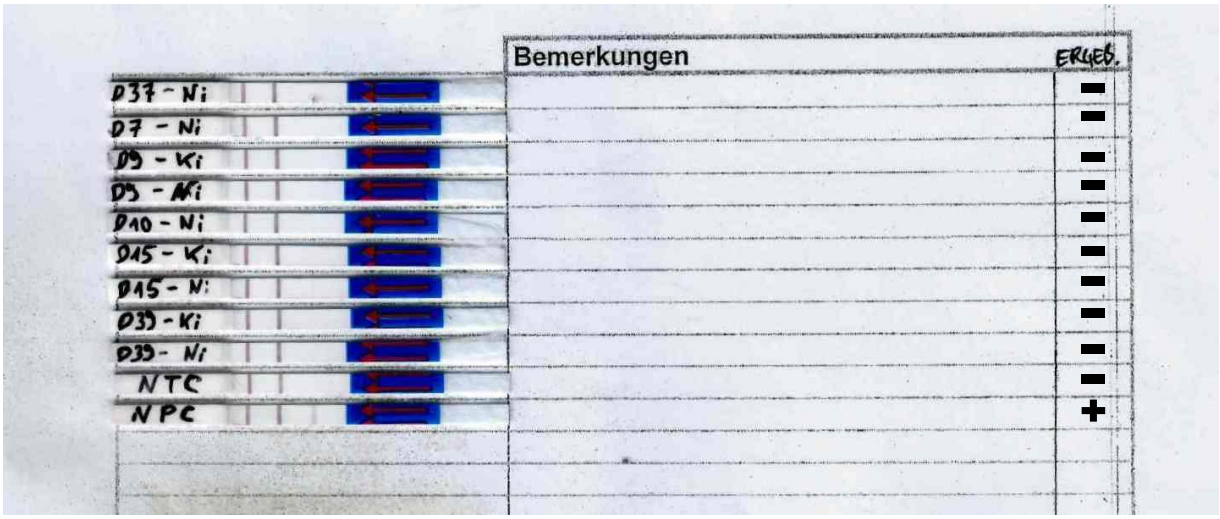

Abbildung 26 Ergebnisse „Diagnostisches Probenpanel“: DNA von KHV-negativen Gewebeproben im KHV-PCR-LFA

D37-Ni= Niere; D7-Ni= Niere; D9-Ki= Kieme; D9-Ni= Niere; D10-Ni= Niere; D15-Ki= Kieme; D39-Ki= Kieme; D39-Ni= Niere; NPC= Positivkontrolle; NTC= Negativkontrolle; += positives Testergebnis; - = negatives Testergebnis