

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Wirksamkeitsüberprüfung dreier inaktivierter Koi-Herpes-Virus
Antigenpräparationen gegen eine Belastungsinfektion bei Karpfen**

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

eingereicht von

Theresa Maria Anna Schmid

aus Würzburg

Leipzig, 2022

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 der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

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

Tag der Verteidigung: 15.03.2022

Meiner Familie gewidmet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einer *short communication* bereits veröffentlicht.

“Efficacy assessment of three inactivated koi herpes virus antigen preparations against experimental challenge virus infection in common carp.”

Schmid T¹, Gaede L¹, Böttcher K², Bräuer G², Fichtner D³, Beckmann R⁴, Speck S¹, Becker F⁵, Truyen U¹.

¹Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

²Animal diseases fund of Saxony, Fish Health Service, Königswartha, Germany.

³Institute of Infectology, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald - Insel Riems, Germany.

⁴Division Veterinary Medicine, Paul-Ehrlich-Institut, Federal Institute for Vaccines and Biomedicines, Viral Vaccines II, Langen, Germany.

⁵Saxon State Ministry of Social Affairs and Consumer Protection, Dresden, Germany.

J Fish Dis. 2016 Aug;39(8):1007-13. doi: 10.1111/jfd.12428 . Epub 2016 Jan 13.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Systematische Einordnung von Viren.....	3
2.2	Ordnung Herpesvirales.....	3
2.3	Cyprinides Herpesvirus 3.....	4
2.3.1	Epidemiologie.....	4
2.3.2	Klinik KHVD (KHV-Disease).....	6
2.3.3	Pathogenese.....	8
2.3.4	Latenz.....	9
2.3.5	Immunologie.....	10
2.3.6	Empfängliche Fische und Carrierfische.....	12
2.3.7	Diagnose.....	14
2.3.7.1	Direkter Erregernachweis.....	14
2.3.7.1.1	Zellkultur.....	15
2.3.7.1.2	Molekularbiologische Verfahren.....	15
2.3.7.1.3	Weitere direkte Nachweismethoden.....	17
2.3.7.2	Indirekte Nachweismethoden.....	18
2.3.7.2.1	Serumneutralisationstest.....	18
2.3.7.2.2	ELISA.....	19
2.3.8	Differentialdiagnosen.....	20
2.3.9	Präventionsmaßnahmen.....	21
2.3.9.1	Hälterung.....	22
2.3.9.2	Quarantäne.....	22
2.3.9.3	Raubvogelschutz.....	22
2.3.9.4	Desinfektion.....	22
2.3.9.5	Weitere Forschungen.....	23
2.3.10	Vorgehen nach einem bestätigten KHV-Ausbruch.....	23
2.3.11	Bekämpfungsstrategien am Beispiel Sachsen.....	23
2.3.12	Vakzinierung.....	25
2.3.12.1	„Natürlich immune“ Fische.....	25
2.3.12.2	Attenuierte Lebendvakzinen.....	25
2.3.12.3	Inaktivierte Antigenpräparationen, rekombinante Impfstoffe und DNA-Vakzinen..	27
3	Tiere, Material und Methoden.....	29

INHALTSVERZEICHNIS

3.1	Fische.....	29
3.1.1	Hälterung.....	29
3.1.2	Handling.....	30
3.1.3	Kennzeichnung	30
3.1.4	Blutentnahme und Probenaufbereitung.....	30
3.1.5	Narkose und Euthanasie.....	30
3.1.6	Sektion und Organentnahme	31
3.2	Material	31
3.2.1	Medium	31
3.2.2	Zellen	31
3.2.3	Viren	31
3.2.4	Inaktivierte KHV-Antigenpräparationen.....	32
3.2.5	Geräte, Laborbedarf, Reagenzien.....	33
3.3	Methoden.....	35
3.3.1	Zellkulturverfahren.....	35
3.3.1.1	Kultivierung CCB.....	35
3.3.1.2	Virusvermehrung.....	35
3.3.1.3	Inkubationszeitraum und Virusaufbereitung.....	36
3.3.1.4	Bestimmung des Infektiositätstiters	36
3.3.2	Berechnung des Infektiositätstiters	37
3.3.3	DNA-Extraktion.....	37
3.3.4	NanoDrop2000 Spektrophotometer	38
3.3.5	Quantitative realtime PCR.....	38
3.3.6	Gelelektrophorese.....	40
3.3.7	Serumneutralisationstest	40
3.3.8	Statistische Auswertung	41
3.4	Versuche.....	42
3.4.1	Versuchsablauf 2013 (Experiment 1)	42
3.4.1.1	Unschädlichkeitsprüfung.....	42
3.4.1.2	Gruppeneinteilung	42
3.4.1.3	Vakzinierung.....	42
3.4.1.4	Belastungsinfektion.....	42
3.4.1.5	Euthanasie und Organentnahme	43
3.4.1.6	Blutentnahme und Probenaufbereitung.....	43

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.2	Versuchsablauf 2014 (Experiment 2)	43
3.4.2.1	Unschädlichkeitsprüfung.....	43
3.4.2.2	Gruppeneinteilung	44
3.4.2.3	Vakzinierung.....	44
3.4.2.4	Belastungsinfektion.....	44
3.4.2.5	Blutentnahme und Probenaufbereitung.....	45
3.4.2.6	Euthanasie, Sektion und Organentnahme	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Virusanzucht und zytopathischer Effekt.....	46
4.2	Versuch 2013.....	46
4.2.1	Unschädlichkeitsprüfung.....	46
4.2.2	Klinische Symptome und Todesfälle.....	47
4.2.3	Sektionsbefunde.....	47
4.2.4	Ergebnisse qPCR	49
4.2.5	Ergebnisse des Serumneutralisationstests.....	50
4.3	Versuch 2014.....	51
4.3.1	Unschädlichkeitsprüfung.....	51
4.3.2	Klinische Symptome und Todesfälle.....	51
4.3.3	Sektionsbefunde.....	52
4.3.4	Ergebnisse qPCR	52
4.3.5	Ergebnisse Gelelektrophorese.....	54
4.3.6	Ergebnisse Serumneutralisationstest.....	54
5	Diskussion	56
5.1	Versuch 2013.....	59
5.2	Versuch 2014.....	63
5.3	Zusammenfassende Beurteilung.....	66
6	Zusammenfassung.....	68
7	Summary.....	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang.....	85
10	Tabellenverzeichnis	89
11	Abbildungsverzeichnis	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen

*	signifikant
%	Prozent
°C:	Grad Celsius
AB:	Antibiotikum
Abb.:	Abbildung
Ag (<i>eng.</i>):	Antigen
AG:	Aktiengesellschaft
AGP:	Antigenpräparation
AK:	Antikörper (<i>eng.</i> : Ab)
bp:	Basenpaar(e)
CCB (<i>eng.</i>):	Common Carp Brain- Zelllinie
CCG (<i>eng.</i>):	Common Carp Gill- Zelllinie
CHSE (<i>eng.</i>):	Chinook Salmon Embryo- Zelllinie
cm:	Zentimeter
cm ² :	Quadratzentimeter
CNGV (<i>eng.</i>):	carp interstitial nephritis and gill necrosis virus
CPE (<i>eng.</i>):	cytopathic effect (Zytopathogener Effekt)
CyHV-1:	Cyprines Herpesvirus 1 (CHV, Herpesvirus cyprini, Carp Pox Virus)
CyHV-2:	Cyprines Herpesvirus 2 (Virus der hämatopoetischen Nekrose der Goldfische)
CyHV-3:	Cyprines Herpesvirus 3 (KHV, Koi-Herpesvirus)
d:	Tag
d.h.:	das heißt
DNA (<i>eng.</i>):	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dpi (<i>eng.</i>):	day(s) post infection (Tag(e) nach der Infektion)
DVG:	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ECACC (<i>eng.</i>):	European Collection of Authenticated Cell Cultures (Europäische Sammlung authentifizierter Zellkulturen)
EDTA:	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EHV-1:	equines Herpesvirus 1
ELISA (<i>eng.</i>):	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>et al. (lat.):</i>	et alii (und andere)
EPC:	Epithelioma Papilloma Carposum- Zelllinie oder Epithelioma Papulosum Cyprini- Zelllinie (Karpfenepithelzelllinie)
FGD:	Fischgesundheitsdienst
FischSeuchV:	Fischseuchenverordnung
FKS:	Fetales Kälberserum
fg:	Femtogramm
FHM (<i>eng.</i>):	Fat Head Minnow-Zelllinie
FLI:	Friedrich Loeffler Institut-Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
g:	Gramm bzw. Erdschwerebeschleunigung
h:	Stunde
IBR:	infektiöse Rhinotracheitis
IcHV-1:	Ictalurid Herpesvirus-1 (CCV)
i.d.R.:	in der Regel
IF:	Immunfluoreszenz
Ig:	Immunglobulin
IMED:	Institut für Infektionsmedizin des Friedrich Loeffler-Instituts
IPN:	infektiöse Pankreasnekrose der Salmoniden
K2:	zweisömmrige Karpfen
kbp:	Kilobasenpaare
KF-1 (<i>eng.</i>):	Koi Fin- Zelllinie (Koiflossenzelllinie)
KHV:	Koi-Herpesvirus
KHVD (<i>eng.</i>):	Koi-Herpesvirus Disease
KID ₅₀ ml ⁻¹ :	Kultur infektiöse Dosis 50 % pro Milliliter
l:	Liter
max.:	maximal
MEM:	Minimum Essential Medium
μ:	Mikro
min:	Minute
mind.:	mindestens
ml:	Milliliter
mmol:	Millimol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mM:	Millimolar
MW:	Mittelwert
NEA (<i>eng.</i>):	Non Essential Aminoacid (nicht essentielle Aminosäure)
ng:	Nanogramm
nm:	Nanometer
O ₂ :	Sauerstoff
OIE (<i>franz.</i>):	Office International des Epizooties; (<i>eng.</i> : World Organistaion for Animal Health; Weltorganisation für Tiergesundheit)
ORF (<i>eng.</i>):	open reading frame
p:	probability of error (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PBS (<i>eng.</i>):	Phosphate- buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR (<i>eng.</i>):	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg:	Pikogramm
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<i>p.i. (lat.):</i>	<i>post infectionem</i> (nach Infektion)
<i>p.vacc. (lat.):</i>	<i>post vaccinationem</i> (nach der Impfung)
qPCR (<i>eng.</i>):	quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA (<i>eng.</i>):	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
rpm:	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s:	Sekunde
SD:	standard deviation (Standardabweichung)
SNT:	Serumneutralisationstest
<i>sp.(lat.) :</i>	species
SPF (<i>eng.</i>):	specific pathogen free (spezifisch pathogen frei)
Tab:	Tabelle
Taq:	Gen einer DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TierSeuchAnzV:	Tierseuchen Anzeige Verordnung
USA (<i>eng.</i>):	United States of America
UV-Licht:	ultraviolettes Licht
VO:	Verordnung
WAHIS:	World Animal Health Information System
ZK:	Zellkultur

1 Einleitung

Die Zucht von Speisefischen in Aquakulturen stellt weltweit einen wichtigen Beitrag zur Produktion von tierischem Eiweiß dar (ILOUZE et al. 2011). Für das Jahr 2014 wird der Karpfen mit einer Produktionsmenge von 4,1 Millionen Tonnen auf Platz drei geführt, hinter den Graskarpfen mit 5,5 Millionen Tonnen und den Silberkarpfen mit 4,9 Millionen Tonnen (ANON. 2014). Der größte Produzent ist China, gefolgt von anderen asiatischen Ländern wie Indonesien, Thailand oder Kambodscha (FÜLLNER et al. 2007). Auch in Europa spielt der Karpfen als Speisefisch eine große Rolle, besonders in Osteuropa gibt es hohe Produktionsmengen (FÜLLNER et al. 2007). In Deutschland wurden im Jahr 2015 19 Tonnen Fisch aus Aquakultur produziert, davon entfallen fünf Tonnen auf den Karpfen, der somit der zweitwichtigste Fisch nach der Regenbogenforelle (sieben Tonnen) ist (ANON. 2016a). Die Produktion ist hauptsächlich auf drei Bundesländer einzugrenzen. Diese sind Bayern (1,9 Tonnen), Sachsen (1,7 Tonnen), und Brandenburg (0,5 Tonnen). Karpfenkrankheiten können somit zu einer wirtschaftlichen, für einzelne Betriebe eventuell auch existenzgefährdenden, Bedrohung werden (HAENEN et al. 2004). Insbesondere gilt das für die Infektion mit dem Koi-Herpesvirus (KHV), die sowohl eine hohe Morbidität von bis zu 100 % eines erkrankten Teiches als auch eine hohe Mortalität (80 – 100 %) aufweist (BRETZINGER et al. 1999) und für die keine wirksamen Behandlungsmöglichkeiten existieren. Durch die für Herpesviren typische Eigenschaft, eine Latenz im Träger auszubilden, stellen symptomlose Carrierfische einen der wichtigsten Übertragungswege für KHV dar (ST.-HILARE et al. 2005, MEYER 2007). In dieser Phase ist eine Infektion wegen der erniedrigten Virusreplikation nur sehr schwer nachzuweisen. Begünstigt durch die zunehmende Globalisierung und den dadurch erleichterten Handel mit Fischen verbreitete sich KHV weltweit (RODGERS et al. 2011, STRAUBE et al. 2012). So wurde KHV bereits in Ländern wie Israel, Japan, Deutschland, Polen, China und in den USA nachgewiesen (PERELBERG et al. 2003, TAKASHIMA et al. 2005, LEE et al. 2005, BERGMANN et al. 2006, AOKI et al. 2007; DONG et al. 2013). Seit 2007 wird die Infektion mit KHV von der World Organisation for Animal Health (OIE) als anzeigepflichtige Krankheit geführt. Damit kann die globale Ausbreitung verfolgt werden. Seit Beginn der Aufzeichnungen gab es keine Meldungen über KHV-Infektionen aus Australien, Brasilien oder Argentinien (WAHIS interface des OIE). Allerdings wird in Australien eine absichtliche Einschleppung diskutiert um die dort herrschende Karpfenplage

einздämmen (WAHLQUIST 2016, DASGUPTA 2016). In vielen anderen Ländern werden Quarantänemaßnahmen empfohlen, um die Gefahr einer Einschleppung zu minimieren (LING et al. 2005). Da eine Behandlung der Krankheit nicht möglich ist, stehen präventive Maßnahmen im Vordergrund, insbesondere die Immunisierung der Karpfen gegen den Erreger. In Israel werden junge Karpfen „natürlich immunisiert“, indem sie erst infiziert und anschließend die Wassertemperatur auf 28° C bis 30° C angehoben wird. Diese Temperaturerhöhung schwächt den Krankheitsverlauf ab und ermöglicht höhere Überlebensraten (RONEN et al. 2003). In Sachsen gibt es seit 2006 durchgehend Programme zur Eindämmung der KHV-Infektion (ANON. 2006a, ANON 2021). Teilnehmende Betriebe verpflichten sich, Fische nur aus KHV-negativen (andere Bundesländer außer Sachsen) oder KHV-unverdächtigen Betrieben mit PCR-Test zuzukaufen, Verdachtsfälle umgehend zu melden und untersuchen zu lassen und die Vorgaben der Tierseuchenkasse bezüglich Reinigung, Desinfektion und Neubesatz zu befolgen (ANON. 2006a, BERGMANN & FISCHER 2017, ANON. 2021). Die Entwicklung eines wirksamen und risikoarmen Impfstoffes würde eine Ergänzung solcher Bekämpfungsprogramme darstellen. So wird schon seit 2003 in Israel an der Verwendung von attenuierten Lebendvakzinen geforscht (RONEN et al. 2003, PERELBERG et al. 2005). Beide Methoden bergen das Risiko, Carrierfische zu produzieren. So kann es bei den „natürlich immunen“ Fischen zur Ausbildung einer Latenz oder bei den geimpften Fischen zur Rückmutation des Impfvirus mit anschließender Ausscheidung kommen (LAURING et al. 2010). Aufgrund dieser Risiken liegt der Fokus weltweit auf der Entwicklung und Verwendung von inaktivierten Vakzinen.

Ziel dieser Dissertation war die Wirksamkeitsüberprüfung drei verschiedener inaktivierter KHV-Antigenpräparationen (AGPs). Diese fand als Belastungsinfektion unter Laborbedingungen mit Fischen aus konventionellen Teichwirtschaften statt. Es wurden zwei Versuche durchgeführt, einer im Jahr 2013 und der zweite im Jahr 2014. Im ersten Versuch wurden zwei AGPs gegen eine Viruskontrollgruppe getestet. Eine weitere Fragestellung in diesem Versuch war, ob ein längerer zeitlicher Abstand zwischen der Impfung und der Belastungsinfektion eine Rolle in der Antikörperproduktion und Immunitätsbildung spielt. Im zweiten Versuch wurde aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuches nur eine AGP getestet. Es gab hier eine Viruskontrollgruppe, eine Hälterungskontrolle und eine Gruppe, die nur mit dem entsprechenden Adjuvans behandelt wurde um einen eventuellen Effekt der unspezifischen Immunabwehr durch das Adjuvans zu überprüfen.

2 Literaturübersicht

2.1 Systematische Einordnung von Viren

Viren werden aufgrund verschiedener Merkmale eingeteilt. Hierbei spielen die Morphologie des Virus (Größe, Symmetrie des Kapsids und das Vorhandensein einer Hülle), die Art des Genoms (RNA oder DNA, einzel- oder doppelsträngig, segmentiert oder nicht, zirkulär angeordnet oder kontinuierlich) und die Biologie des Virus (Ort der Virusvermehrung und Besonderheiten bei der Pathogenese) eine Rolle (BALTIMORE 1971). Des Weiteren ist die phylogenetische Verwandtschaft der Viren von Bedeutung.

2.2 Ordnung Herpesvirales

KHV wird der Ordnung *Herpesvirales* zugerechnet, die 2009 im Zuge einer Revision durch das International Comitee on Taxonomy on Viruses etabliert wurde.

Der Name der Ordnung leitet sich vom griechischen „herpein“ (kriechen) ab, was auf den chronisch persistierenden Krankheitsverlauf aller durch Herpesviren verursachten Krankheiten hindeutet (BESWICK 1962).

Viren der Ordnung sind gekennzeichnet durch ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom von 125 bis 290 kbp Länge, das von einer Kapsidhülle umgeben ist. Dieses Kapsid ist ikosaedrisch aufgebaut und besteht aus 162 Kapsomeren. Um das Kapsid herum befindet sich eine proteinreiche Tegumentschicht und eine äußere Hülle, in der verschiedene Glykoproteine eingelagert sind. Gemeinsam ist allen Herpesviren die Fähigkeit, im Wirt eine lebenslange Latenz auszubilden (BROWN & NEWCOMB, 2011).

Die Ordnung *Herpesvirales* umfasst drei Familien, die *Herpesviridae*, die *Malacoherpesviridae* und die *Alloherpesviridae* (DAVISON 2002, WALTZEK et al. 2009, ANON. 2019).

In der Familie der *Herpesviridae* werden die Herpesviren der Säuger, Vögel und Reptilien in drei Unterfamilien, den *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae* zusammengefasst. Vertreter der *Alphaherpesvirinae* sind veterinärmedizinisch bedeutende Herpesviren der Nutztiere, wie das bovine Herpesvirus 1 als anzeigepflichtiger Erreger der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR) und das equine Herpesvirus 1 (EHV-1), das als Erreger des Stutenabortes und der equinen Herpesvirus Myeloenzephalopathie zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Viren beim Pferd zählt. Darüber hinaus das gallide Herpesvirus 2 als Erreger der Marekschen Krankheit und der Erreger der Aujeszky-Krankheit beim Schwein (Suides Herpesvirus 1). Auch die Herpes simplex Viren 1 und 2 der Menschen

gehören dazu. Zu der Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* zählen unter anderem die Herpesviren der Mäuse, der Meerkatzen und der Erreger des Dreitagefiebers beim Menschen. In der Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* finden sich weitere equine Herpesviren, der Erreger des bösartigen Kartarrhalfiebers (Ovines Herpesvirus 2) und verschiedene Herpesviren der Menschen (DAVISON 2002, ANON. 2019).

Die Herpesviren der Weichtiere werden in die Familie der *Malacoherpesviridae* eingeordnet. Diese enthält gegenwärtig zwei Genus i. *Ostreavirus* mit der Spezies *Ostreid herpesvirus 1* und ii. *Aurivirus* mit der Spezies *Haliotid herpesvirus 1*. (WALTZEK et al. 2009, ANON. 2019)

Die Familie der *Alloherpesviridae* umfasst die Herpesviren der Fische und Frösche. Sie enthält vier Genus i. *Ictalurivirus* mit der Spezies Ictalurid Herpesvirus 1, ii. *Batrachovirus*, iii. *Salominivirus* und iv. *Cyprinivirus*. Zu diesem Genus gehören unter anderem die drei bekannten Herpesviren der Karpfenartigen, Cyprinides Herpesvirus (CyHV) 1-3. Das CyHV 1 ist der Erreger der Karpfenpocken, CyHV 2 der Erreger der hämatopoetischen Nekrose der Goldfische und CyHV 3 der Erreger der Koi-Herpesviruserkrankung (WALTZEK et al. 2009, HANSON et al. 2011, ANON. 2019).

2.3 Cyprinides Herpesvirus 3

Das CyHV 3 hat neben dem Namen Koi-Herpesvirus (KHV) noch eine ältere Bezeichnung, *carp interstitial nephritis and gill necrosis virus* (CNGV), was übersetzt ungefähr „das interstitielle Nephritis und Kiemennekrosen Virus der Karpfen“ bedeutet. Diese Bezeichnung ergibt sich aus den Symptomen bei erkrankten Tieren und wurde von RONEN et al. (2003) geprägt. In der folgenden Arbeit wird die Bezeichnung Koi-Herpesvirus oder die Abkürzung KHV verwendet. Der Virusaufbau des KHV entspricht dem allgemeinen Aufbau der Herpesviren. Auffällig ist das mit etwa 295 kbp größte bekannte Genom bei einem Herpesvirus (WALTZEK et al. 2005, MIYAZAKI et al. 2008a, ANON. 2015).

2.3.1 Epidemiologie

KHV stellt inzwischen ein weltweites Problem in privaten und gewerblichen Karpfen- und Koihaltungen dar. So wurden Nachweise von KHV in 28 Ländern auf fast allen Kontinenten bestätigt. Jedoch muss von einer wesentlich höheren Anzahl Länder ausgegangen werden, bei denen das Virus zwar vorhanden, aber nicht nachgewiesen oder gemeldet wurde (ANON. 2017b). Diese annähernd weltweite Verbreitung von KHV mit Ausbrüchen in Europa, dem

Nahen Osten, den USA und Asien (PERELBERG et al. 2003, LEE et al. 2005, BERGMANN et al. 2006, AOKI et al. 2007) ist vor allem auf den internationalen Handel mit lebenden Fischen sowie Fischeiern und internationale Ausstellungen ohne ausreichende Gesundheitskontrollen oder Quarantänemaßnahmen zurückzuführen. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Fischen im symptomlosen Carrierstatus zu, da bei diesen das Virus nicht nachgewiesen werden kann, aber eine Ausscheidung und Übertragung möglich sind (RODGERS et al. 2011).

Der Zusammenhang zwischen dem Einsatz neugekaufter Fische in einen Bestand und einem KHV-Ausbruch wurde schon sehr früh nach dem Entdecken der Krankheit von mehreren Autoren nachgewiesen (BRETZINGER et al. 1999, NEUKIRCH et al. 1999, WALSTER 1999). Sie bemerkten, dass schon der Zukauf eines einzelnen Fisches ausreichend ist. Die Ausbrüche konnten in einigen Fällen auch Monate oder Jahre nach dem Einsetzen erfolgen, sodass Quarantänemaßnahmen nicht immer wirksam sind.

Mehrere Übertragungswege des KHV werden seit der Entdeckung diskutiert.

Nach dem damaligen Stand (1999) der israelischen Forschungen konnten Fische, die eine KHV-Infektion überstanden haben, die Viren nicht weiter übertragen. Deshalb stellten für WALSTER (1999) Aerosole, verunreinigte Gerätschaften und die Hände der betreuenden Personen die einzigen Übertragungsvektoren dar. In 17 Fällen stellte er darüber hinaus einen Befall mit Karpfenläusen (*Argulus spp.*) fest, die bedingt durch ihre wiederholten Blutmahlzeiten als belebte Vektoren zur Übertragung von Viren fungieren können (WALSTER 1999, OVERSTREET 2009). Nach neueren Forschungen entwickeln Fische, die eine Infektion mit KHV überstanden haben, einen sogenannten „Carrierstatus“, das heißt, sie tragen das Virus ruhend in sich, zeigen aber keine Symptome (ST-HILAIRE et al. 2005, FABIAN et al. 2013).

Das Hälterungswasser als weiterer Übertragungsweg wurde in Israel entdeckt. Hier gelang PERELBERG et al. (2003) die Infektion naiver Karpfen durch Immersion des Virus im Hälterungswasser. Die Infektiosität des KHV blieb dabei für mindestens vier Stunden erhalten, war aber nach 21 h nicht mehr nachzuweisen (PERELBERG et al. 2003). BAUMER et al. (2013) detektierten KHV im Teichabflusswasser, womit eine Verbreitung des Virus in flussabwärts gelegene Gebiete und damit auch ein Eintrag in die Wildpopulation möglich ist. MINAMOTO et al. (2009) untersuchten ein Massensterben von wildlebenden Karpfen in einem Fluss. Sie bestätigten, dass es sich um durch KHV verursachte Todesfälle handelt, die

wiederholt im Frühjahr und Herbst auftraten. Bei den Untersuchungen wiesen sie während und bis zu drei Monate nach einem KHV-Ausbruch das Virus in hohen Konzentrationen im Flusswasser nach und leiteten daraus die Vermutung ab, dass die Infektion über das Wasser verbreitet und durch überlebende Carrierfische weiter im Gang gehalten wird. Ein ähnliches Verbreitungsmuster konnten UCHII et al. (2009) bei einer wildlebenden Karpfenpopulation in einem See nachweisen.

Verschiedene Ausscheidungen von infizierten Fischen stellen ebenfalls ein Übertragungsmedium dar. DISHON et al. (2005) und MATSUI et al. (2008) gelang der Nachweis, wie das Virus von den erkrankten Fischen in das Wasser abgegeben wird. MATSUI et al. (2008) fand KHV-DNA im Hautschleim infizierter Fische, während DISHON et al. (2005) den Kot infizierter Fische untersuchten und dabei virale DNA und große Mengen infektiöses KHV finden konnten. Dieses Virus diffundiert anschließend in das umgebende Wasser. Weiterhin wurde von DISHON et al. (2005) die These aufgestellt, dass Fischkot das Virus in den Phasen schützt, wenn die Wassertemperatur außerhalb des permissiven Bereiches von 18 – 25 °C liegt. SHIMIZU et al. (2006) stellten fest, dass KHV in reinem Wasser spätestens nach 7 Tagen seine Infektiosität verliert.

MATSUI et al. (2008) fanden eine mögliche Ursache für die Verschleppung von KHV zwischen Teichen, die nicht durch Wasserläufe oder Personal miteinander verbunden waren. In Gegenden mit hohem Raubvogelanteil kann es zu Verschleppung von infizierten Fischen durch die Luft kommen. Bei einem Verlust der Beute über einem noch nicht infizierten Teich erfolgt auf diesem Weg der Viruseintrag und höchstwahrscheinlich eine Infektion des sich dort befindlichen Bestandes (MATSUI et al. 2008).

2.3.2 Klinik KHVD (KHV-Disease)

In den späten 1990er Jahren wurde ein neues Krankheitsbild bei Karpfen beschrieben. Dieses Krankheitsbild äußert sich typischerweise mit einer Morbidität von 80 – 100 % und einer Mortalität von 70 – 80 % (WALSTER 1999, BRETZINGER et al. 1999). Auch die Eradikation ganzer Bestände wurde berichtet (BRETZINGER et al. 1999).

WALSTER (1999) stellte fest, dass die meisten Ausbrüche bei einer Wassertemperatur zwischen 20° C und 23° C auftraten, es allerdings auch einzelne Fälle bei einer größeren Temperaturspanne von 15° C bis 28° C gab. So lassen sich die hohen Mortalitätsraten im Frühjahr und Herbst erklären, da in diesen Zeiträumen im mitteleuropäischen Raum die

Wassertemperaturen zwischen 18° C und 25° C liegen. Weiterhin erschien WALSTER (1999) der Krankheitsverlauf bei niedrigeren Temperaturen verlangsamt und bei Temperaturen außerhalb des Bereichs von 15 – 28 °C latent. Diese Beobachtungen wurden in späteren Studien von GILAD et al. (2003), PERELBERG et al. (2003) und RONEN et al. (2003) bestätigt, die ebenfalls einen abgeschwächten Verlauf bei niedrigen Temperaturen feststellten. Sobald die Fische in den permissiven Bereich von 20 – 25 °C verbracht wurden, verlief die Erkrankung mit hohen Mortalitäten. Bei Temperaturen ab 28 °C, treten kaum noch Symptome auf, ab 30 °C findet keine Erkrankung mehr statt (BRETZINGER et al. 1999, HEDRICK et al. 2000, RONEN et al. 2003, PERELBERG et al. 2003, GILAD et al. 2003). Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit ist auch vom CyHV-1, dem Virus der Karpfenpocken, bekannt (SANO et al. 1993).

Besonders betroffen sind junge und juvenile Karpfen, wohingegen die Larven resistent gegen KHV sind. Allerdings werden die dem KHV exponierten Larven nicht immun, sondern können als Fische auch an KHV erkranken und sterben (PERELBERG et al. 2003, ITO et al. 2007).

Die Angaben zur Inkubationszeit schwanken zwischen den einzelnen Autoren. So nennt WALSTER (1999) einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen; bei Einsetzen eines virus-naiven Fisches in ein aktives Krankheitsgeschehen verkürzt sich die Inkubationszeit auf zwei bis drei Tage. PERELBERG et al. (2003) beobachteten fünf bis sieben Tage nach einer experimentellen Infektion die ersten Todesfälle.

Die durch KHV ausgelöste Erkrankung äußert sich in verschiedenen äußerlich erkennbaren Symptomen. Viele dieser Symptome sind unspezifisch, wie ein Enophthalmus, Hämorrhagien in der Haut und vermehrte Mukusproduktion auf der Haut und auf den Kiemen. Mit Fortschreiten der Infektion verringert sich die Mukusproduktion soweit, dass es zur Ausbildung einer für KHV-Infektionen typischen „sandpapierartigen“ Hautoberfläche kommt. Weitere Symptome sind eine durch Kiemenschwellung und teils fokale, teils großflächige Kiemennekrosen verursachte Dyspnoe und verschiedene Verhaltensauffälligkeiten. Diese beinhalten unter anderem Anorexie, unkoordinierte Schwimmbewegungen und Lethargie. Ein Verlust des Gleichgewichtsinnes äußert sich dadurch, dass erkrankte Fische in Seitenlage in strömungsschwachen Gebieten aufzufinden sind (BRETZINGER et al. 1999, HEDRICK et al. 2000, PITARSKY et al. 2004). Bei der Sektion stellten sich die inneren Organe geringgradig blass dar und häufig wurde eine vergrößerte Niere beschrieben (BRETZINGER et al. 1999, WALSTER 1999, HEDRICK et al. 2000, PITARSKY et al. 2004, HEDRICK et al. 2005).

MIYAZAKI et al. (2008a) untersuchten Karpfen nach experimenteller Infektion mit KHV sowohl histopathologisch als auch elektronenmikroskopisch. Histopathologisch waren vor allem geschwollene, vakuolierte Zellen der Kiemenfilamente auffällig, die darüber hinaus verschiedene Kernveränderungen zeigten. Diese waren insbesondere eine blässere Färbung, Karyorhexis (Zerfall des Zellkerns) und vor allem das Auftreten eines basophilen nukleären Einschlusskörperchens. Diese Einschlusskörperchen wurden ebenfalls in kleineren Nervenzellen, Herzmyozyten, den hämatopoetischen Zellen sowie einigen Tubuluszellen in der Niere und in Splenozyten beobachtet. Auch kam es zu verstärkten Zellnekrosen in allen untersuchten Organen. Im Gehirn fielen neben gestauten Kapillaren und kleineren Venen Entzündungen auf (MIYAZAKI et al. 2008a).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von infizierten Zellen zeigte in der Studie von MIYAZAKI et al. (2008a) verschiedene Reifungsstadien der KH-Viruspartikel in Kiemen-, Nieren- und Milzzellen.

2.3.3 Pathogenese

KHV wird horizontal übertragen. Eine vertikale Übertragung wurde bisher nicht nachgewiesen, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden (ANON. 2017b).

PERELBERG et al. (2003) halten Jungfische von zwei bis sechs Gramm am empfindlichsten, während WALSTER (1999) die höchste Mortalität bei adulten Karpfen mit einer Körperlänge von ca. 25 – 30 cm beobachtet hat.

Einige Autoren sehen die Kiemen als Eintrittspforte an. Zum einen zeigen sich hier erhebliche Läsionen die durch die Krankheit verursacht werden, zum anderen können dort schon sehr früh im Krankheitsverlauf hohe Viruslasten nachgewiesen werden. Weiterhin stellen die Kiemen eine beliebte Eintrittspforte für andere Fischpathogene dar, wie zum Beispiel für das Egtved-Virus (Virale hämorrhagische Septikämie der Salmoniden) und das IPN- Virus (Infektiöse Pankreasnekrose der Salmoniden) (GILAD et al. 2004, DISHON et al. 2005, ILUOZE et al. 2006).

Auch der Verdauungstrakt wird als mögliche Eintrittspforte gehandelt. So konnten FOURNIER et al. (2012) eine Infektion durch die peridontale pharyngeale Mukosa nachweisen, indem sie Karpfen mit Luciferase-markiertem, infektiösem Material fütterten und anschließend in festgelegten Zeitabständen untersuchten.

COSTES et al. (2009) verwendeten ebenfalls Luciferase markiertes KHV und infizierten Karpfen per Immersionsbad. Dabei wurde festgestellt, dass bei einer Infektion durch Immersion die Haut die Haupteintrittspforte darstellt.

Die Verteilung von den Eintrittspforten aus in die restlichen inneren Organe erfolgt über die Blutbahn (MIWA et al. 2014). MIWA et al. (2014) ermittelten eine zeitliche Abfolge der betroffenen Organe. So wiesen sie KHV zuerst in der Epidermis nach (zwei Tage *post infectionem* (dpi)), gefolgt von den Kiemen (3 dpi). Anschließend verteilte sich das Virus in Nieren, Milz und Herz, gefolgt von Leber, Darm und Gehirn (MIWA et al. 2014).

Der Nachweis von KHV im Gehirn, wo andere Herpesviren oft gefunden werden (FRASER et al. 1981, ROCK &FRASER 1983), gelang unregelmäßig und in unterschiedlichen Konzentrationen. Begleitet wurde dies oft von einer milden Entzündungsreaktion, die für die unkoordinierten Schwimmbewegungen verantwortlich gemacht werden kann. Der Weg des Virus in das Gehirn ist noch unklar. Einerseits ist die Infektion über die Blutbahn, andererseits eine neuronale Infektion ausgehend vom olfaktorischen System möglich. Die zweite Variante wird durch zwei Fakten gestützt: Erstens ist die Blut-Hirn-Schranke ein großes Hindernis für Viren der Größe des KHV und zweitens wurde KHV im Gehirn immer zuerst im *bulbus olfactorius* gefunden (MIWA et al. 2014).

2.3.4 Latenz

Die Fähigkeit des KHV eine Latenz auszubilden – ähnlich wie andere Herpesviren (GRINDE 2013) -, wird diskutiert. Schon St. HILARE et al. (2005) entdeckten, dass KHV in überlebenden Fischen auch nach sehr langen Zeitspannen (200 d) reaktiviert werden und es dann erneut zu Ausbrüchen und Todesfällen kommen kann. Die Krankheit befiel beim zweiten Ausbruch sowohl naive Fische als auch Überlebende aus dem ersten Versuch. Ein wichtiger Faktor für die Reaktivierung des Virus war die Wassertemperatur. Alle erneuten Ausbrüche erfolgten nach einer Erhöhung der Wassertemperatur von 12 °C auf 20 °C. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob es sich um sehr lange persistierende Infektionen oder um eine echte Latenz handelt (ST.-HILAIRE et al. 2005).

Weiterhin gelang FABIAN et al. (2013) der Nachweis von wildlebenden Karpfen, die eine Infektion überstanden haben und nach einer inapparenten Phase wieder Virus ausschieden. Sie untersuchten eine Wildpopulation von Karpfen in Japan, in der das KHV seit einigen

Jahren zirkuliert und zeigten, dass Tiere, die eine Infektion überlebt haben, wieder zu Ausscheidern und damit Überträgern werden können (FABIAN et al. 2013).

EIDE et al. (2011a) detektierten bei überlebenden Fischen eines KHV-Ausbruchs über Jahre danach KHV-DNA, aber kein infektiöses Virus. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich wirklich um Latenz handelt und nicht um eine persistierende Infektion. Eine Reaktivierung durch Temperaturstress war möglich, hierbei erfolgte die Ausscheidung von infektiösem Virus (EIDE et al. 2011a). In einer weiteren Studie wiesen EIDE et al. (2011b) nach, dass KHV die Fähigkeit zur Latenz in weißen Blutkörperchen, vermutlich B-Lymphozyten, hat. Dies wurde durch die Untersuchungen von REED et al. (2014) bestätigt und auf spezielle, IgM⁺ weiße Blutkörperchen verfeinert. Während der Latenzphase konnten REED et al. (2014) eine geringe Gentranskription nachweisen, wie es auch beim humanen Herpes simplex- Virus in Ganglienzellen bekannt ist (GALLOWAY et al. 1982).

MIWA et al. (2014) äußerten die Vermutung, dass KHV auch in neuronalem Gewebe eine Latenz ausbildet, da sie während der Infektion große Mengen an infizierten Zellen im ZNS der Fische nachweisen konnten. Auch nach dem vollständigen Abklingen aller Symptome wurde KHV-DNA in größeren Mengen im ZNS nachgewiesen.

Die Reaktivierung eines Herpesvirus aus der Latenzphase in die akute Phase erfolgt meistens durch Stress. Wie oben bereits erwähnt, stellt der Temperaturstress durch Erhöhung der Wassertemperatur einen solchen Faktor dar (EIDE et al. 2011b). Als weitere Stressoren wurden das Abfischen der Teiche (BAUMER et al. 2013) und die Paarungszeit identifiziert (UCHII et al. 2011).

2.3.5 Immunologie

Die evolutionär ältesten Tiere mit einem Immunsystem, das dem der Säugetiere verwandt ist, sind Knorpelfische, wie zum Beispiel Haie (BARTL 1994). Auch Knochenfische, wie die Karpfen, die evolutionär näher an den Säugetieren liegen, besitzen ein Immunsystem (BARTL 1994). Es stellt einen wichtigen evolutionären Zwischenschritt in der Entwicklung des Immunsystems, wie es bei Säugetieren gefunden wird, dar (TORT et al. 2003). Dieses gliedert sich in ein angeborenes, unspezifisches Immunsystem und ein erworbenes, spezifisches Immunsystem (CORBEL 1975, ELLIS 1977, TORT et al. 2003).

Im unspezifischen Immunsystem spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, wie physikalisch-chemische, humorale und zelluläre (CORBEL 1975, KIMBRELL & BEUTLER 2001, KUMARI et al.

2006). Einen wichtigen Teil unter den physikalisch-chemischen bildet der Mukus auf der Fischhaut mit zahlreichen Enzymen, wie dem Lysozym, und weiteren antimikrobiellen Proteinen (TORT et al. 2003, RAJ et al. 2011, RONSMANS et al. 2014). Bei den zellulären Faktoren sind insbesondere Makrophagen und Granulozyten als bewegliche Zellen des Immunsystems von Bedeutung. Sie wirken bei der Entzündungsreaktion mit und dienen der Eliminierung verschiedener Mikroorganismen aus dem Körper (KIMBRELL & BEUTLER 2001, TORT et al. 2003). Ebenso wie Säugetiere, besitzen Fische ein Komplementsystem (TORT et al. 2003, HUTTENHUIS et al. 2006). Zusammen mit verschiedenen Faktoren des angeborenen Immunsystems lassen sich Bestandteile des Komplementsystems schon vor dem Schlüpfen nachweisen (HUTTENHUIS et al. 2006).

Die spezifische Abwehr unterscheidet sich von der unspezifischen insbesondere durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (BORGHANS, NOEST & DE BOER 1999). So kann eine Reaktion auf ein Pathogen bei einer erneuten Exposition deutlich schneller erfolgen als beim Erstkontakt. Es wird hierbei zwischen der zellvermittelten und der humoralen Immunität unterschieden (BORGHANS, NOEST & DE BOER 1999). Für die zellvermittelte Immunität sind auch bei Fischen T- und B- Lymphozyten mit ihren Subpopulationen verantwortlich (TORT et al. 2003). Die Organe, die Immunzellen produzieren, sind bei Fischen sehr ähnlich zu denen der Säugetiere. Auch hier werden im Thymus Immunzellen ausgebildet, zusätzlich bei Fischen in der Kopfniere. Da Fische kein Knochenmark besitzen, bleibt die Kopfniere ein Leben lang fähig, Immunzellen zu bilden (TORT et al. 2003, ZAPATA et al. 2006). Zur humoralen Immunität gehören freie Antikörper (Immunglobuline), die durch Plasmazellen produziert werden und T-Zellrezeptoren. Beides dient der schnellen Erkennung und Eliminierung verschiedener Pathogene (BORGHANS, NOEST & DE BOER 1999, TORT et al. 2003).

Bei Knochenfischen ist bisher eine Klasse von Immunglobulinen bekannt: ein dem IgM ähnliches Immunglobulin (TORT et al. 2003). Dieses liegt hauptsächlich als Tetramer vor, kann allerdings in verschiedenen strukturellen Versionen agieren. So gibt es bei Salmoniden auch Nachweise von Mono-, Di- und Trimeren und Kombinationen aus diesen Versionen (TORT et al. 2003). Die Möglichkeit, dieses IgM so variabel zu kombinieren, bietet eine erhöhte Flexibilität bei der Interaktion mit verschiedenen Epitopen (LITMAN et al. 1997, TORT et al. 2003).

Da Fische zu den poikilothermen Tieren gehören, spielt die Außentemperatur, also die Wassertemperatur, bei der Ausbildung einer Immunität, bei der Produktion der Antikörper und bei der Geschwindigkeit der Immunantwort eine entscheidende Rolle (CORBEL 1975, ELLIS 1982, TORT et al. 2003). ELLIS (1982) stellte fest, wenn sich die Wassertemperatur im physiologischen Bereich für die jeweilige Fischart befindet, erfolgt die Immunantwort mit Ansteigen der Temperatur immer schneller, bis sie beim Überschreiten der oberen Temperaturgrenze wieder abflaut. Beim Absinken der Temperatur im physiologischen Bereich verlangsamt sich die Immunantwort bis sie unterhalb der unteren Temperaturgrenze zum Erliegen kommt (ELLIS 1982, TORT et al. 2003). Mehrere Autoren konnten mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) spezifische Antikörper gegen KHV nachweisen, sowohl nach Impfung (RONEN et al. 2003, PERELBERG et al. 2005) als auch nach natürlicher und überlebter Infektion (PERELBERG et al. 2008, ST.HILAIRE et al. 2009, MATRAS et al. 2012).

2.3.6 Empfängliche Fische und Carrierfische

Die meisten Herpesviren weisen ein sehr enges Wirtsspektrum auf. Sie haben sich evolutionär so gut auf einen Wirt spezialisiert, dass eine Übertagung und Vermehrung in anderen Wirten kaum vorkommt (ANON. 2011a).

Das gleiche wurde auch bei KHV angenommen, da dieses Virus nur bei *Cyprinus carpio* und seinen Farbvarianten massive Erkrankungen auslöst (BRETZINGER 1999, WALSTER 1999, HEDRICK et al. 2000).

So bezweifelten verschiedene Autoren die Empfänglichkeit von Goldfischen, Graskarpfen, Silberkarpfen für KHV. Diese Fische zeigen trotz gemeinsamer Hälterung mit infizierten und erkrankten Karpfen keinerlei Symptome einer Erkrankung mit KHV und infizierten auch in anschließenden Kohabitationsexperimenten naive Karpfen nicht (HEDRICK et al. 2000, PERELBERG et al. 2003, RONEN et al. 2003).

MEYER (2007) untersuchte die Rolle von Graskarpfen, Silberkarpfen, Schleien und Goldfischen als mögliche symptomlose Überträger von KHV. Es gelang der Nachweis von KHV-Bruchstücken bei allen getesteten Fischarten mittels PCR aus verschiedenen Geweben. Bei den folgenden Kohabitationsversuchen mit naiven Karpfen wurden KHV-Bruchstücke in den SPF-Karpfen (*specific pathogen free* Karpfen) detektiert. Keiner dieser Karpfen zeigte Krankheitssymptome.

BERGMANN et al. (2009) wiesen in Goldfischen, Stören, Goldorfen und Graskarpfen mittels nested-PCR und bei Goldfischen und Graskarpfen durch *in-situ*-Hybridisierung KHV Genom nach. Diese Fische wurden direkt über Händler bezogen und ohne Kontakt mit dem dortigen Hälterungssystem zum Labor gebracht und dort euthanasiert. Die Untersuchung mittels weniger sensitiven Methoden wie Zellkultur oder konventioneller PCR konnte kein KHV in den Proben detektieren. Die betroffenen Fischarten zeigten wie bei den Versuchen von MEYER (2007) keine Symptome einer Infektion mit KHV. Besonders Goldfische gelten nach BERGMANN et al. (2010a) als Carrier für KHV nach EU Commission Decision 2006 / 88 / EC (ANON. 2006).

Ein weiterer Nachweis von KHV bei Goldfischen und deren Potential das Virus zu übertragen wurde in der Studie von EL-MATBOULI et al. (2011) erbracht. Hier wurden natürlich infizierte Goldfische mit SPF-Karpfen gehalten und anschließend verschiedene Gewebeproben auf KHV untersucht. Der Nachweis gelang bei den SPF-Karpfen mittels *realtime* PCR ebenso wie mittels konventioneller PCR. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Goldfische das Virus nicht nur in sich tragen, sondern auch auf naive Karpfen übertragen können. Die Goldfische erkrankten dabei nicht.

RADOSAVLJEVIC et al. (2012) untersuchten ebenfalls die Möglichkeit, dass Graskarpfen, Silberkarpfen, Karauschen und Schleien als Vektoren für KHV fungieren. Latent infizierte Karpfen wurden mit den oben genannten Fischarten kohabitert und diese anschließend mit naiven Karpfen. Der Nachweis von KHV Fragmenten gelang bei allen Versuchsgruppen, womit die Übertragung des Virus in beide Richtungen belegt werden konnte. Wie in den Studien mit Goldfischen, blieben auch hier die nicht-Karpfen Gruppen gesund.

KEMPTER et al. (2009) begleiteten das Stör-Wiederansiedlungsprogramm in Polens Gewässern. Sie konnten KHV bei den Stören nachweisen, die aus Farmen mit einer KHV-Historie kamen und zur Auswilderung vorgesehen waren. Diese Tatsache zusammen mit der Möglichkeit, dass Störe als Überträger fungieren können, stellt laut KEMPTER et al. (2009) eine Gefährdung von Karpfenbeständen in bis jetzt noch KHV freien Gewässern dar.

KIELPINSKY et al. (2010) wiesen KHV in Frischwassermuscheln und Weichtieren, MINAMOTO et al. (2011) in Seeplankton nach. Allerdings ist hierbei noch unklar, ob es sich um eine passive Akkumulation oder eine aktive Virusvermehrung handelt. Ebenso wurde nicht untersucht, ob sich Karpfen durch solche Muscheln infizieren können (KIELPINSKY et al. 2010). MINAMOTO et al. (2011) stellten die These auf, dass das Plankton durch die

Aufnahme des Virus einer weiteren Verbreitung entgegenwirken könnte, da es vorübergehend aus dem Infektionskreislauf entfernt wird. Gleichzeitig sehen sie das Risiko einer Infektion mit KHV durch den Verzehr des infizierten Planktons.

Einen interessanten Forschungsansatz bezüglich Bekämpfungsmaßnahmen bietet die Studie von SHAPIRA et al. (2005). Die Autoren kreuzten zwei domestizierte Karpfenlinien mit einer bekanntermaßen gegenüber KHV resistenteren wildlebenden Linie, um eine mögliche Resistenzsteigerung durch dieses Einkreuzen zu evaluieren. Dabei erwies sich eine Kreuzung mit der Wildform als signifikant resistenter gegenüber den Auswirkungen einer KHV-Infektion als die Reinzuchten innerhalb der domestizierten Linien. Die Überlebensrate betrug 60 % bei den Kreuzungen gegenüber 8 % bei den Reinzuchten.

Auch TADMOR-LEVI (2017) kreuzten und selektierten mit Erfolg resistente Spiegelkarpfenlinien. Dabei war das Selektionsmerkmal der Resistenz gegenüber KHV stabil nachverfolgbar bis zur ersten Rückzucht-Generation. Die resistenten Fische erkrankten zwar an KHVD, allerdings mit signifikant geringeren Viruslasten und konnten deswegen die Infektion überleben.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten BERGMANN et al. (2010b) und HEDRICK et al. (2006). Beide führten Versuche mit Karpfen- Goldfisch-Hybriden durch, BERGMANN et al. (2010b) darüber hinaus noch mit Karpfen-Karasschen-Hybriden. Während HEDRICK et al. (2006) eine geringere Mortalität der Hybriden bei einer intraperitonealen Infektion mit KHV feststellten, konnten BERGMANN et al. (2010b) keine Resistenzsteigerung bemerken.

2.3.7 Diagnose

Bei den ersten KHV-Ausbrüchen war das auslösende Agens noch vollkommen unbekannt. So wurden nach dem Ausschlussprinzip bekannte Erreger bakteriologischen, mykologischen, virologischen und parasitologischen Ursprungs ebenso ausgeschlossen wie Hälterungsmängel. Aufgrund histopathologischer Untersuchungen ergab sich die Schlussfolgerung, dass es sich bei dem Erreger der Ausbrüche um ein noch unbekanntes Virus handeln könnte (WALSTER 1999).

2.3.7.1 Direkter Erregernachweis

Beim direkten Erregernachweis werden entweder der Erreger selbst oder Teile des Erregers, wie Erbgut oder Bruchstücke, nachgewiesen.

2.3.7.1.1 Zellkultur

Die Virusanzucht gelang NEUKIRCH et al. (1999) durch Tests mit fünf verschiedenen Zelllinien. Die Autoren etablierten hierfür zwei neue Zelllinien aus Karpfenzellen, zum einen aus dem Gehirn (common carp brain cells, CCB) und zum anderen aus Kiemen (common carp gill cells, CCG). Es wurde ein Isolat aus den nekrotischen Kiemen eines Kois verwendet und auf alle fünf Zellarten verimpft. Die Anzucht war erfolgreich in CCB, CCG und in einer Epithelzelllinie (epithelioma papulosum cyprini, EPC). Das Virus führte in diesen Zelllinien zu unterschiedlich großen Synzytien. Die beiden anderen getesteten Zelllinien, eine Chinook-Lachs-Embryozelllinie (CHSE) und eine Fettkopfritzenzelllinie (FHM), erwiesen sich als ungeeignet. In einem anschließenden Infektionsexperiment wurde infektiöser Zellkulturüberstand an mehrere Karpfen verimpft, diese an festgelegten Tagen getötet und versucht das Virus zu re-isolieren. Dies gelang bei einem von fünf Karpfen.

HEDRICK et al. (2000) gelang die Anzucht des Virus auf einer weiteren Zelllinie gezüchtet aus Flossenzellen von Kois (koi fin cells KF-1). Als besonders geeignetes Material zur Virusisolation stellten sich Kieme, Niere und Milz erkrankter Fische heraus. Die Anzucht gelang aber auch aus Darm oder Leber (HEDRICK et al. 2000). Die Bestätigung erfolgte über ein Infektionsexperiment mit einer Mortalität von 80 – 100 % und einer erfolgreichen Re-Isolation des Virus.

Die Virusanzucht in sensiblen Zelllinien als diagnostische Methode eignet sich nur für bereits erkrankte oder schon verstorbene Fische mit hoher Viruslast. Allerdings verschlechtert sich die Sensitivität, wenn das Gewebe zuvor tiefgefroren wurde (POKOROVA et al. 2005).

2.3.7.1.2 Molekularbiologische Verfahren

Zu den Standardverfahren in der Diagnostik gehört der direkte Erregernachweis mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (ANON. 2017b). Diese molekularbiologische Nachweismethode detektiert und amplifiziert schon sehr geringe Mengen an Ziel-DNA aus verschiedenen Probenmaterialien (GILAD et al. 2002, GILAD et al. 2004, BERCOVIER et al. 2005, BERGMANN et al. 2010c). Ein positives Ergebnis erfordert immer sachkundige Interpretation, da die PCR nur den Erreger nachweist, aber keine Aussage über eine tatsächlich vorliegende Erkrankung trifft.

Die Forschungen an einem Protokoll für KHV begannen zeitnah nach dem ersten Auftreten der KHVD. Zum Beispiel veröffentlichten GILAD et al. (2002) oder GRAY et al. (2002) PCR-Protokolle zum Nachweis von KHV aus Organmaterial.

GILAD et al. (2002) nutzten Organpoolproben infizierter Fische um ihre Methode zu etablieren. Als Vergleichsprobe diente in Zellkultur angezüchtetes KHV. Die entwickelten Primer KHV9/5F und KHV9/5R amplifizierten ein Fragment von 484 kbp Größe und waren in der Lage, ein Pikogramm KHV DNA in 100 ng Karpfen DNA zuverlässig nachzuweisen. Diese Methode eignete sich gut zum Nachweis von akuten Ausbrüchen, nicht aber aus tiefgekühlten Proben oder in der Latenzphase, da in diesen Fällen die Viruslast zu gering war. BERCOVIER et al. (2005) entwickelten eine PCR, die ein Thymidinkinase-Gen als target hat. Die Thymidinkinase ist essentiell für die Virulenz von Herpesviren und deswegen besonders geeignet als Zielsequenz (BOIVIN et al. 2002). Die amplifizierte Gensequenz ist 409 kbp lang. Diese PCR mit dem Primerpaar KHV-TKf und KHV-TKr hat eine untere Nachweisgrenze von zehn Femtogramm KHV-DNA oder 30 Virionen. Bei Vergleich mit den bereits etablierten PCR-Protokollen von GILAD et al. (2002) und GRAY et al. (2002) stellte sie sich als 10 – 1000fach sensitiver heraus (BERCOVIER et al. 2005). Des Weiteren ist eine PCR, die keine zufällig gewählte Gensequenz, sondern ein identifizierbares Gen als Zielsequenz nachweist, wesentlich unanfälliger für Veränderungen, die zum Beispiel durch Mutationen hervorgerufen werden (BERCOVIER et al. 2005).

Eine Weiterentwicklung der konventionellen PCRs stellt die sogenannte nested-PCR dar. Hierbei werden zwei Primerpaare verwendet, die nacheinander zum Einsatz kommen. Bei der zuerst durchgeführten PCR besteht die Gefahr, dass es weitere, ungewollte Primerbindungsstellen gibt. Dadurch könnten DNA-Fragmente amplifiziert werden, die nicht die Zielsequenz darstellen und damit falsch positive Ergebnisse erbringen. Deswegen wird das PCR-Produkt aus dem ersten Lauf in einen zweiten Lauf mit dem zweiten Primerpaar eingesetzt. Dieses hat seine Bindungsstellen auf der schon amplifizierten Zielsequenz („nested“). Somit ist die Wahrscheinlichkeit von Verunreinigungen erheblich verringert. BERGMANN et al. (2006) entwickelten eine KHV-nested PCR, bei der sich an das Protokoll nach GILAD et al. (2002) ein Durchlauf mit dem Primerpaar KHV-1Fn und KHV-1Rn anschloss. Die Verwendung der nested PCR resultierte in einer stark erhöhten Auffindungsrate von KHV in infizierten Proben, sodass von den Autoren geschlussfolgert wird, diese Methode sei auch zur Entdeckung von KHV im Latenzstadium geeignet.

Mit der Entwicklung der TaqMan real-time PCR stand eine noch schnellere und sensitivere Methode zur Verfügung (GILAD et al. 2004). Diese quantitative real-time PCR ist in der Lage, die gefundene Ziel-DNA ab einem Bereich von 100 bis 10⁷ Viruspartikeln pro Ansatz zu quantifizieren. Das verwendete Primerpaar ist KHV-86f und KHV 163r zusammen mit der KHV probe 109 (Sonde). Das Amplifikat hat eine Länge von 78 bp und ist damit wesentlich kürzer als die Zielsequenzen der konventionellen PCRs (GILAD et al. (2002): 484kbp; BERCOVIER et al. (2005): 409kbp) (GILAD et al. 2004).

Mehrere Autoren (GUNIMALADEVI et al. 2004, SOLIMAN & EL-MATBOULI 2005, YOSHINO et al. 2009) entwickelten Protokolle für den Nachweis von KHV über loop-mediated isothermal amplification, kurz LAMP. Diese Methode ist in der Lage, kleinste Mengen an Ziel-DNA in weniger als einer Stunde auf 10⁹ Kopien zu vervielfältigen. Die LAMP arbeitet bei konstanter Temperatur von 60 - 65° C („isothermal“), da keine Hitzedenaturierung der DNA-Stränge erfolgen muss um die Replikation fortzuführen. Zum Einsatz kommen vier bis sechs Primer, die je eine Zielsequenz detektieren und die durch Schleifenbildung („loop“) am Ende der Amplifikate sich wieder selbst replizieren können (NOTOMI et al. 2000). Durch den Einsatz mehrerer Primer wird die Gefahr von Kreuzreaktionen vermindert, ähnlich wie bei der nested PCR. Der Nachweis der replizierten DNA erfolgt durch Präzipitate von Magnesium-Pyrophosphat in den Reaktionsgefäßen und ermöglicht dadurch eine „real time“ Auswertung und Quantifizierung der Proben. Durch die einfache Handhabung, den geringen Zeitaufwand, die hohe Sensitivität und Spezifität und den Verzicht auf einen Thermocycler sehen die Autoren die Möglichkeit, diese Methode als Felddiagnosemöglichkeit zu verwenden (GUNIMALADEVI et al. 2004, SOLIMAN & EL-MATBOULI 2005, YOSHINO et al. 2009).

2.3.7.1.3 Weitere direkte Nachweismethoden

Zur visuellen Darstellung von Viruspartikeln ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung von infiziertem Gewebe notwendig. So gelang der Nachweis Virus-ähnlicher Partikel sowohl intranukleär als auch im Zytoplasma von Zellen aus Kiemengewebe, Leukozyten und Leberzellen erkrankter Fische (BRETZINGER et al. 1999, HEDRICK et al. 2000, BODY et al. 2000, PITARSKY et al. 2004, HUTORAN et al. 2005). HEDRICK et al. (2000) erkannten eine Ähnlichkeit dieser Viruspartikel zu schon bekannten Herpesviren.

Verschiedene Autoren (BERGMANN et al. 2006, BERGMANN et al. 2009, BERGMANN et al. 2010a, LEE et al. 2012, MONAGHAN et al. 2014) nutzten *in situ*-Hybridisierung um das KHV in

infiziertem Gewebe nachzuweisen. Bei dieser Methode werden bestimmte Gensequenzen durch Sonden detektiert. Diese Sonden wiederum sind an Farbstoffe gebunden, die anschließend nachgewiesen werden können. In Korea wurde durch die Studie von LEE et al. (2012) an in Paraffin eingebettetem Gewebe nachgewiesen, dass KHV schon 1998 eingeschleppt worden war. Auch BERGMANN et al. (2006, 2009, 2010a) nutzen in verschiedenen Studien die *in situ* –Hybridisierung als zusätzliche Nachweismethode für KHV oder um PCR-Ergebnisse zu validieren.

2.3.7.2 Indirekte Nachweismethoden

Wie für verschiedene andere Viren ist auch bei KHV eine Antikörperbildung bekannt. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, eine bestehende oder schon zurückliegende Infektion durch den Nachweis von gegen das KH-Virus gebildeten Antikörpern zu belegen.

2.3.7.2.1 Serumneutralisationstest

Eine Möglichkeit, Antikörper im Serum von infizierten Fischen nachzuweisen, stellt der Serumneutralisationstest (SNT) dar. Hierbei wird überprüft, ob die zu testenden Seren eine definierte Menge Virus neutralisieren können. CABON et al. (2015) beprobten sowohl gesunde als auch natürlich oder experimentell infizierte Karpfen für einen SNT. Die gewonnenen Proben, Serum oder Plasma, waren in der Lage, das Testvirus reproduzierbar zu neutralisieren und somit das Vorhandensein von Antikörpern zu bestätigen. Dabei wurde auch der hohe Verwandtschaftsgrad der einzelnen Virusstränge bestätigt, da die Fische mit europäischen, amerikanischen oder taiwanesischen Isolaten infiziert waren, das Testvirus jedoch immer das gleiche Isolat aus Frankreich war. In einigen Fällen konnten die Autoren Antikörper bis zu 25 Monate nach der Infektion nachweisen. Somit stellten CABON et al. (2015) eine mögliche baldige Verwendung dieses SNT als Screening Methode für Karpfenpopulationen in Aussicht. Möglicherweise kann man durch den Nachweis von Antikörpern Monate nach einem Infektionsgeschehen auf den Carrierstatus des Karpfen schließen, wie GANGL (2008), ST.-HILARE (2009) und CABON et al. (2015) postulieren. Dies erfordert neben einer wiederholten Testung der einzelnen Fische auch Kenntnisse über eine eventuelle KHV-Vorgeschichte des Teiches.

2.3.7.2.2 ELISA

Auch mittels enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) lassen sich Antikörper im Serum nachweisen. Ein ELISA zur Detektion von gegen KHV gerichteten Antikörpern im Serum von sowohl experimentell als auch von natürlich infizierten Karpfen wurde von ADKISON et al. (2005) entwickelt und wies Antikörper bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 62.500 nach. Bei Verdünnungen von 1 : 2.500 oder geringer wurde eine Kreuzreaktion der KHV-Antikörper mit CyHV-1 beobachtet, sodass die Autoren empfehlen, nur Verdünnungen größer als 1 : 2.500 einzusetzen. Die Antikörper konnten über 64 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden. In einem Telexperiment wurden überlebende Karpfen ein Jahr in virusfreiem Wasser gehalten und anschließend erneut mittels ELISA auf Antikörper untersucht. Dabei kam es zu positiven Nachweisen, wobei die Autoren hier die Vermutung einer latenten Infektion äußerten (ADKISON et al. 2005).

ST. HILARE et al. (2009) entwickelten ebenfalls einen Anti-KHV ELISA und untersuchten Serum von experimentell infizierten Karpfen. Dabei wurden bei Teilgruppen hohe Titer von bis zu 1:1.600 erreicht. Die Fische wurden während der gesamten Dauer der Experimente beprobt und so konnte eine Überlebensdauer der Antikörper von bis zu 65 Wochen nachgewiesen werden.

GANGL (2008) untersuchte die Eignung eines ELISAs zur Entdeckung von Carrierfischen und zur Kategorisierung von Teichen. Da der ELISA eine nicht letale Probennahme ermöglicht, ist er dazu besser geeignet als PCR oder Virusanzucht, die aus infizierten Geweben, deren Gewinnung i.d.R. eine Tötung des Fisches erforderlich macht, erfolgreich sind. Die Autorin konnte in ihren Versuchsreihen sowohl auf Teichebene als auch bei Einzeltieren eine Einteilung in „positiv“ „fraglich“ oder „negativ“ aufgrund der Ergebnisse des Antikörper-ELISAs vornehmen. Die „fragliche“ Kategorie ergibt sich aus der Tatsache, dass auch GANGL (2008) eine Kreuzreaktivität der KHV-Antikörper mit CyHV-1 nachweisen konnte.

Auch BERGMANN et al. (2017) gelang die Entwicklung eines ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen KHV. Dieser stellte sich als gut nutzbar bei großen Probenzahlen, wie in Fischfarmen üblich, dar.

2.3.8 Differentialdiagnosen

Bevor ein infektiöser Auslöser der Symptome in Betracht gezogen wird, sollten nicht infektiöse Ursachen, wie Wasserqualitätsmängel oder zu hohe Nitrit- und Ammoniumgehalte ausgeschlossen werden (BRETZINGER et al. 1999).

Viele Symptome einer KHV-Infektion, wie zum Beispiel Lethargie oder Anorexie, sind unspezifisch und können auch bei anderen Erkrankungen auftreten.

So können bakterielle, parasitologische und mykologische Primärerkrankungen ähnliche Symptome hervorrufen, aber den schnellen Krankheitsverlauf nicht erklären (BRETZINGER et al. 1999, Meyer 2007). Außerdem kommt es bei einer Infektion mit KHV häufig zu Sekundärinfektionen mit fakultativ pathogenen Erregern (BRETZINGER et al. 1999, MEYER 2007). BRETZINGER et al. (1999) konnten mehrere fakultativ pathogene Bakterienstämme in den inneren Organen, überwiegend *Aeromonas*-Spezies, nachweisen und eine Vielzahl von opportunistischen Protozoen auf Haut und Kiemen finden. Dies waren zum Beispiel *Ichthyobodo necator* und *Trichodina sp.* auf der Haut sowie *Dactylogyrus sp.* in den Kiemen (BRETZINGER et al. 1999).

Virale Erkrankungen, die ein KHV-ähnliches Krankheitsbild bei Karpfen hervorrufen, sind die Frühjahrsvirämie der Karpfen, die Karpfenpocken und die Schlafkrankheit der Karpfen. Die durch ein Rhabdovirus hervorgerufene Frühjahrsvirämie der Karpfen äußert sich ebenfalls durch Lethargie, unkoordinierte Bewegungen und Liegen auf dem Gewässerboden. Auch Hämorrhagien und Blutungen in der Haut sind häufige Symptome. Der akute Verlauf tritt meistens bei Wassertemperaturen unter 15 °C auf. Im Gegensatz zu einer Infektion mit KHV zeigen Karpfen mit Frühjahrsvirämie einen Exophthalmus und eine abdominale Umfangsvermehrung, die sich in der Sektion als Aszites herausstellt. Die inneren Organe sind ödematös und im Verdauungstrakt kann eine blutige Entzündung nachgewiesen werden. Jüngere Fische zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für diese Erkrankung und auch Goldfische können erkranken. Die Übertragung erfolgt horizontal über direkten Kontakt oder über Fäzes und erregerrhaltiges Hälterungswasser. Die Frühjahrsvirämie wird entweder mittels Virusnachweis in Zellkultur oder durch eine PCR bestätigt. Im Gegensatz zu KHV, einer anzeigepflichtigen Tierseuche, stellt die Frühjahrsvirämie der Karpfen nur eine meldepflichtige Erkrankung dar (AHNE et al. 2002, HARTMANN et al. 2013).

Die Karpfenpocken werden durch das Cyprinide Herpesvirus 1 (CyHV-1) hervorgerufen. Dieses Virus zeigt einen hohen Verwandtschaftsgrad zu KHV. Es kann zu Kreuzreaktionen der

Antikörper kommen (ADKINSON et al. 2005, GANGL 2008). Karpfenpocken äußern sich durch glatte, erhabene oder wachstartige Hautläsionen. Bei der Sektion können zudem Aszites, ödematöse innere Organe und blutige Entzündungen im Verdauungstrakt gefunden werden. Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt von Fisch zu Fisch. Je jünger der Fisch, desto höher ist die Anfälligkeit und desto schwerer der Verlauf. Bei älteren Fischen beeinträchtigt diese Erkrankung das Allgemeinbefinden nicht und die Hautläsionen können wieder komplett abheilen. Allerdings kann auch dieses Herpesvirus eine Latenz im Wirt ausbilden und unter Stresssituationen wieder ausbrechen (HARTMANN et al. 2013, VIADANNA et al. 2017).

Die Schlafkrankheit der Karpfen (*eng.*: Carp Sleepy Disease), wird von Carp Edema Virus (CEV), einem Pockenvirus, verursacht. Die erkrankten Fische zeigen Lethargie, geschwollene Kiemen bis hin zur Nekrose, Hautläsionen besonders im Maulbreich und Enophthalmus. Die Ausbrüche erfolgen meistens im Frühjahr oder Herbst, bei Wassertemperaturen zwischen 15 °C und 25 °C mit einer Mortalität bis zu 80 %. Hauptsächlich tritt die Schlafkrankheit der Karpfen in Japan auf, allerdings gibt es inzwischen auch Fälle außerhalb (Jung-Schroers et al. 2015, Adamek et al. 2017)

GRANZOW et al. (2014) untersuchten Proben von Karpfen aus Deutschland, die folgende Symptome aufwiesen: Kiemennekrosen und -schwellungen, vermehrte Mukusproduktion, sandpapierartige Hautstruktur, geschwollene Niere und Milz sowie kleine gelbe *foci* in Leber, Niere und Milz. Die erkrankten Fische zeigten hohe Morbidität und Mortalität. Den Autoren gelang die Isolation eines behüllten RNA-Virus mit 100 - 300 nm Durchmesser. Das noch namenlose Virus zeigt Ähnlichkeiten mit Vertretern der *Arena-*, *Ortho-* und *Paramyxoviridae*, eine Einordnung steht noch aus (GRANZOW et al. 2014).

2.3.9 Präventionsmaßnahmen

Aktuell gibt es keine Therapiemöglichkeit einer KHV-Infektion (GOTESMAN et al. 2013). Unabhängig davon stellt KHVD eine anzeigepflichtige Tierseuche dar und dürfte nicht therapiert werden. Infolgedessen liegt der Fokus auf der Prävention (ANON. 2011b, ANON. 2016b, Anon. 2018). Im europäischen Recht ist die Infektion mit KHV eine Seuche der Kategorie „E“ und gilt damit als eine rein zu überwachende Seuche (ANON. 2016b; ANON 2018).

2.3.9.1 Hälterung

Grundsätzlich sollten alle Hälterungsparameter dem Optimum entsprechen, um eine möglichst gute Funktion des Immunsystems des Karpfens zu gewährleisten. Dazu gehören Fütterung, Wassertemperatur, Besatzdichte und die Wasserqualität (WALSTER et al. 1999).

2.3.9.2 Quarantäne

Die Quarantäne wird von vielen Autoren empfohlen (BRETZINGER et al. 1999, LING et al. 2005), auch wenn ihre Wirksamkeit aufgrund der Möglichkeit einer Latenzausbildung nicht hundertprozentig sicher ist. Als Zeitspanne werden üblicherweise 21 Tage angegeben (LING et al. 2005). Diese Zeitspanne sollte ausreichen auch eine latente Infektion zu zeigen, da es durch verschiedene Stressfaktoren wie Abfischen, Transport und neue Umgebung zu einer Reaktivierung kommen sollte (ST-HILAIRE et al. 2005, MEYER 2007). Wichtig ist, die Hälterungstemperatur im permissiven Bereich für KHV zu halten, also zwischen 18 °C und 28 °C (BRETZINGER et al. 1999, GILAD et al. 2003). Das Quarantänebecken sollte einen separaten Wasserkreislauf und eigene Gerätschaften aufweisen. Allerdings ist von BRETZINGER et al. (1999) und HEDRICK et al. (2000) auch belegt, dass ein Ausbruch erst nach Jahren des Zukaufs erfolgen kann.

2.3.9.3 Raubvogelschutz

Ein Netz als Schutz gegen Raubvögel stellt neben dem Effekt, dass die Fische nicht erbeutet werden, einen Schutz gegen Viruseintrag durch fallengelassene Beute aus infizierten Beständen dar. Besonders in Intensivhälterungen in Gebieten mit hoher Fischreier- oder Kormorandichte ist diese Schutzmaßnahme sinnvoll (ANON. 2005, MATSUI et al. 2008).

2.3.9.4 Desinfektion

Zwischen zwei Belegungen mit Karpfen sollte das Becken einer routinemäßigen Desinfektion unterzogen werden. Dies kann durch Trockenlegung aller wasserführenden Teile und die anschließende UV-Lichtexposition erfolgen, da das KHV auf UV-Licht sensibel reagiert. Schon 5 min einer intensiven UV-Licht Bestrahlung töten das Virus ab, genau wie Temperaturen über 50 °C (KASAI et al. 2005). Die Gerätschaften wie Kescher sollten desinfiziert werden. Hier können zur zuverlässigen Abtötung behüllter Viren geeignete Desinfektionsmittel verwendet werden (KASAI et al. 2005, ANON. 2017a). Dazu gehören Mittel auf der Basis von

Peressigsäure, Ammoniumverbindungen oder Chlorid (HARTMANN et al. 2013, ANON. 2017a).

2.3.9.5 Weitere Forschungen

Eine weitere Möglichkeit zur Eliminierung des KH-Virus aus Teichen beschrieben YOSHIDA et al. (2013). Sie verwendeten verschiedene Bakterien aus Karpfendärmen um das KHV im Hälterungswasser zu inaktivieren. Dazu wurden von über 500 Bakterienarten 23 Arten positiv auf ihre „anti-KHV“-Wirkung getestet. Diese „Anti-KHV-Bakterien“ könnten ein Mittel darstellen, schnell und effektiv auf Ausbrüche zu reagieren oder sie durch eine schnelle Eliminierung des Virus zu verhindern (YOSHIDA et al. 2013).

2.3.10 Vorgehen nach einem bestätigten KHV-Ausbruch

Nach einem bestätigten KHV-Ausbruch gibt es für den Besitzer mehrere Möglichkeiten mit den infizierten Fischen zu verfahren: (i) Schlachten und Vermarkten (Innereien müssen unschädlich beseitigt werden), (ii) Abgabe an einen KHV-positiven Betrieb, (iii) weitere Hälterung der KHV-positiven Karpfen, wenn dadurch andere Betriebe nicht gefährdet werden oder (iv) Umsetzen in andere, KHV-positive Teiche des gleichen Betriebs (KOCH und WALTHER 2016 ANON. 2016b, ANON. 2018). Die verendeten Fische müssen unschädlich beseitigt werden (ANON. 2006, ANON. 2016b, ANON. 2018). Der Teich ist nach dem Abfischen trocken zu legen und einer Kalkung mit Branntkalk zu unterziehen. Sollte eine Trockenlegung nicht möglich sein, darf der betroffene Teich mindestens drei Monate am Stück nicht neu besetzt werden. Auch hier ist eine Kalkung verpflichtend, durch Aufstreuen von Branntkalk auf die Wasseroberfläche. Der pH-Wert muss an drei bis fünf Tagen den Wert 12 oder höher erreichen. Grundsätzlich gilt, dass eine Neubelegung erst drei Monate nach dem Abfischen oder der Sanierung des Teiches erfolgen darf. Der pH-Wert sollte dabei unter 8,5 gefallen sein. (ANON. 2007, IWANOWSKI 2013)

2.3.11 Bekämpfungsstrategien am Beispiel Sachsen

Seit den ersten seuchenhaften Ausbrüchen von KHV in Sachsen gibt es Anstrengungen, diese Erkrankung und deren Ausbreitung zu bekämpfen. Es wurde ein Programm aufgelegt, das aufgrund der zeitlichen Begrenzung zahlreichen Neufassungen unterzogen wurde. Begonnen hat es 2006 mit dem „Gemeinsamen Programm zur Prophylaxe und Bekämpfung der Koi-

Herpesvirus-Infektion in sächsischen Fischhaltungsbetrieben“, welches über mehrere Neuauflagen in den nachfolgenden Jahren schlussendlich in der aktuell gültigen Fassung „Programm des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt und der Sächsischen Tierseuchenkasse zur risikobasierten Überwachung und freiwilligen Bekämpfung der Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV-I) der Karpfen in sächsischen Aquakulturbetrieben (KHV-Programm)“ heißt und seit dem 1.1.2022 in Kraft ist (ANON. 2006a, ANON. 2021). Darüber hinaus wurde 2008 ein Tilgungsprogramm für die KHV-Infektion aufgelegt und von der EU-Kommission nach Artikel 32 der Verordnung (EG) Nr. 1198/2006 (KHV-Tilgungsprogramm) als Seuchenbekämpfungsprogramm nach der RL 2006/88/EG (Aquakulturrichtlinie) bestätigt (ANON. 2006b, ANON. 2006c). Jedes dieser Programme folgt dem gleichen Prinzip. Es erfolgt eine Einteilung der fischhaltenden Betriebe in fünf Kategorien (BERGMANN & FISCHER 2017). Kategorie I entspricht dem Status „KHV-unverdächtig“, Kategorie II umfasst Betriebe, die kein KHV im Betrieb haben und sich einer Überwachung unterziehen, Kategorie III entspricht Betrieben, die nicht von KHV betroffen sind, aber an keinen Programmen teilnehmen, Kategorie IV beinhaltet Betriebe mit nachgewiesener KHV-Infektion und einem laufenden, genehmigten Tilgungsprogramm und Kategorie V sind Betriebe mit KHV-Infektionen ohne ein genehmigtes Tilgungsprogramm (BERGMANN & FISCHER 2017). Das Ziel für den einzelnen Betrieb ist es, durch geeignete Maßnahmen, die durch das Programm begleitet werden, den Status „KHV-unverdächtig“ zu erhalten (ANON. 2021). Dazu werden verschiedene Maßnahmen angewendet, die von einer Beratung der Betriebe zu Biosicherheitsmaßnahmen über anlassbezogene Kontrolluntersuchungen bis hin zu Regelungen beim Zukauf von Fischen reichen (ANON. 2021). Die Biosicherheitsmaßnahmen umfassen betriebsbezogene Pläne zur seuchenhygienischen Trennung der einzelnen Teiche, Maßnahmen zur Desinfektion und Trockenlegung (ANON. 2021). Beim Zukauf verpflichten sich die teilnehmenden Betriebe, Fische nur noch aus zertifizierten KHV-unverdächtigen Betrieben zu erwerben (Sachsen) oder mit einer Bestätigung der KHV-Freiheit durch einen PCR-Test (andere Bundesländer) (ANON. 2021). Generell dürfen Fische nur in einen Betrieb der gleichen Kategorie oder schlechter verkauft werden (BERGMANN & FISCHER 2017). Eine Impfung ist in Betrieben der Kategorien I und II nicht erlaubt, in den anderen Kategorien kann eine Immunisierung der Fische zur KHV Prävention durchgeführt werden, wenn ein zugelassener Impfstoff zur Verfügung steht (BERGMANN & FISCHER 2017).

2.3.12 Vakzinierung

Eine der wirksamsten Präventionsmaßnahmen gegen Erkrankungen stellt die Immunisierung der empfänglichen Tiere dar (MA et al. 2019). Seit dem Auftreten von KHV-Infektionen wird an einer Möglichkeit der Immunisierung der Karpfen geforscht. Bei anderen Fischerkrankungen, wie dem Virus der infektiösen Pankreasnekrose der Salmoniden, dem Virus der infektiösen Anämie der Salmoniden oder auch gegen die Frühjahrsvirämie der Karpfen, zeigt die Impfung große Erfolge (CASHWELL-RENO et al. 1986, CIPRIANO et al. 2009, EMBREGTS et al. 2017).

2.3.12.1 „Natürlich immune“ Fische

Karpfen, die eine Infektion mit KHV überlebt haben, entwickeln bei einer erneuten Exposition keine Krankheitssymptome (RONEN et al. 2003). Dies lässt auf die Ausbildung von Antikörpern schließen, die für die weitere Impfstoffentwicklung interessant sind. Darüber hinaus stellten RONEN et al. (2003) durch ein spezielles Temperaturregime eine Steigerung der Überlebenschancen fest. Hierbei wurde drei bis fünf Tage *post infectionem* (*p.i.*) die Wassertemperatur über 30 Tage in den für das KH-Virus nicht permissiven Bereich (28 bis 30 °C) angehoben. Fische, die dieses Schema durchliefen, wiesen bei einer Infektion mit KHV eine höhere Überlebensrate (61 %) auf als Fische, bei denen dieses Temperaturregime nicht angewendet wurde (18 %). Solche Fische werden als „natürlich immun“ bezeichnet und verkauft (RONEN et al. 2003).

2.3.12.2 Attenuierte Lebendvakzinen

Die Attenuierung, oder auch Virulenzminderung, beschreibt eine Methode um Lebendvakzinen herzustellen, die eine ausreichende Immunantwort hervorrufen ohne eine Erkrankung zu verursachen. Viren können durch verschiedene Verfahren, wie häufiges Passagieren in der Zellkultur, Kultivierung unter abnormalen Bedingungen, Prägung auf einen anderen Wirt, Bestrahlung mit UV-Licht oder mittels Gentechnik attenuiert und anschließend als Lebendvakzinen eingesetzt werden (PLOTKIN 2009, VANSCOK et al. 2017, MA et al. 2019).

Gegen die Infektion mit dem Koi-Herpes-Virus entwickelten RONEN et al. (2003) einen KHV-Stamm, den sie durch mehrmaliges Passagieren attenuierten und anschließend als Vakzine verwendeten. Bei einer folgenden Belastungsinfektion wurde eine Überlebensrate von

100 % bei der vakzinierten Gruppe gegenüber 5 % bei der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht und somit die Wirksamkeit dieser Vakzine bestätigt. Eine weiterführende Untersuchung mittels Antikörper-ELISA ergab, dass ein hoher Antikörpertiter gegen KHV mit einer geringen Mortalität korreliert.

PERELBERG et al. (2005) entwickelten diese Vakzine weiter und veränderten das attenuierte KH-Virus durch Bestrahlung mit UV-Licht um weitere zufällige Mutationen im Virusgenom zu erzeugen und dadurch die Gefahr einer Rückmutation zum pathogenen Virus zu senken. Der so erzeugte KHV-Klon wurde anschließend als Vakzine bei naiven Karpfen eingesetzt. Die Autoren testeten die Wirksamkeit verschiedener Impfstoffdosierungen mittels anschließender Belastungsinfektion. Dabei korrelierten die Überlebensraten positiv mit der Höhe der Impfdosis. So überlebten bei der Gruppe mit der höchsten Dosis 85 % der Karpfen, während es bei der Gruppe mit der niedrigsten Dosis 20 % waren (PERELBERG et al. 2005).

Die obengenannten attenuierten Stämme sind durch zufällige Mutationen entstanden.

BOUTIER et al. (2015) entwickelten ebenfalls eine attenuierte Vakzine, indem sie eine Deletionsmutante des KHV konstruierten, bei der zwei open-reading-frames (offene Leserahmen, ORF), nämlich ORF56 und ORF57, fehlen. Diese sind mitverantwortlich für die Pathogenität des Virus. In nachfolgenden Versuchen wurde sowohl Sicherheit als auch die Wirksamkeit der Vakzine getestet. Die Mortalität nach einer Belastungsinfektion betrug in den Kontrollgruppen 100 %, in den Versuchsgruppen war die Mortalität abhängig von der verwendeten Impfdosis (0 % bei der höchsten Dosis, 20 – 80 % bei der geringsten Dosis).

Um die Wirtschaftlichkeit und Praktikabilität zu gewährleisten wird über ein Immersionsbad geimpft. So ist auch eine gleichmäßigere Dosierung über alle Fische im Gegensatz zu einer „Fütterungsvakzine“ zu erreichen (BOUTIER et al. 2015).

Auch SCHRÖDER et al. (2017) nutzten eine Doppeldeletionsmutante um eine attenuierte Lebendvakzine zu erhalten. Dieser Mutante fehlen zwei für die Virulenz wichtige Enzyme, die Thymidinkinase und die Deoxyuridin-Triphosphatase. Im Gegensatz zu den Einzelmutanten, denen jeweils nur eins der Enzyme fehlt, zeigt die Doppeldeletionsmutante eine sehr gute Attenuierung in Kombination mit sehr gutem Schutz und Antikörperbildung. Diese ist genauso stark ausgeprägt wie die von natürlich infizierten Fischen, die die Infektion überlebt haben (COSTES et al. 2008, FUCHS et al. 2011, SCHRÖDER et al. 2017). Darüber hinaus wurde in dieser Studie eine PCR entwickelt, die geimpfte Fische von natürlich infizierten Fischen unterscheiden kann (SCHRÖDER et al. 2017).

WEBER et al. (2014) untersuchten sowohl die Sicherheit als auch die Übertragbarkeit ihres Impfvirus auf naive Fische. Die modifizierte Lebendvakzine wurde in bis zu zehnfacher Überdosis appliziert und die Fische anschließend beobachtet. Nur bei Karpfen, die leichter als 87 g waren, konnten die Autoren eine vakzineabhängige Sterblichkeit feststellen. Bei einer sich der Impfung anschließenden Kohabitation mit naiven, ungeimpften Fischen wurde keine Übertragung des Impfvirus festgestellt (WEBER et al. 2014).

Die Dauer der Immunität und des Vorkommens von Antikörpern gegen KHV wurde von O'CONNOR et al. (2014) untersucht. Sie exponierten eine geimpften und eine ungeimpfte Gruppe Karpfen 13 Monate nach der Impfung dem KH-Virus und stellten sowohl eine geringere Mortalität (36 % gegen 100 % in der ungeimpften Gruppe) als auch eine verlängerte mittlere Überlebenszeit bei den geimpften Karpfen fest.

Bei attenuierten Lebendvakzinen bestehen gewisse Risiken, etwa eine mögliche geringe Virulenz bei immunsupprimierten Tieren oder die Rückmutation zur pathogenen Wildform, Integration des Impfvirusgenoms in das Wirtsgenom und daraus resultierend die Möglichkeit, Carrierfische zu induzieren oder naive Karpfen zu infizieren (NEUKIRCH 2003, SCHRÖDER et al. 2017, MA et al. 2019).

2.3.12.3 Inaktivierte Antigenpräparationen, rekombinante Impfstoffe und DNA-Vakzinen

Im Gegensatz zu den attenuierten Viren sind inaktivierte Viren nicht mehr vermehrungsfähig, dadurch sicherer in der Verwendung, besitzen allerdings eine geringere Immunogenität. Deshalb werden sie meistens mit einem Adjuvans verabreicht, welches die Wirksamkeit erhöhen soll (PLOTKIN 2005, MA et al. 2019). Die Inaktivierung der Viren kann auf mehreren Wegen erreicht werden, zum Beispiel durch eine Behandlung mit Formalin oder Hitze (LAURING et al. 2010, MA et al. 2019). Rekombinante Impfstoffe werden mit molekularbiologischen Methoden hergestellt indem man nur einen immunogenen Teil des Erregers in einen Vektor einbaut und diesen anschließend vermehrt und als Impfstoff verwendet (SCHILLING 2008).

In der Impfstoffforschung gegen KHVD gibt es mehrere Versuche eine rekombinante Vakzine zu entwickeln um die Gefahr der Rückmutation oder die Übertragung auf naive Fische zu eliminieren, die bei attenuierten Lebendvakzinen besteht (LAURING et al. 2010).

Der Ansatz, formalin-inaktiviertes KHV in Liposomen als Vektor zu integrieren, wurde von mehreren Autoren verfolgt. So entwickelten YASUMOTO et al. (2006) zwei oral zu

verabreichende Liposomenvakzinen, die den Versuchsgruppen über drei Tage mit dem Futter verabreicht wurden. Bei einer nachfolgenden Belastungsinfektion traten geringere Mortalitätsraten in den vakzinierten Gruppen (23 % bei beiden Vakzinen) gegenüber den unbehandelten Kontrollgruppen auf (80 % / 67 %) (YASUMOTO et al. 2006).

Auch MIYAZAKI et al. (2008b) entwickelten eine oral zu verabreichende Liposomenvakzine, die Formalin-inaktiviertes KHV enthält. In dieser Studie konnten Überlebensraten von 77 % in der geimpften Gruppe gegenüber 10 % in der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht werden.

ZHOU et al. (2014a und 2014b) konstruierten DNA-Vakzinen, die auf Plasmiden beruhen, die entweder den open-reading frame 81 (ORF81) oder den ORF25 des KH-Virus enthalten. Im Gegensatz zu den Liposomenvakzinen von YASUMOTO et al. (2006) und MIYAZAKI et al. (2008b) werden die Plasmidvakzinen per Injektion verabreicht. ZHOU et al. (2014a) entwickelten ein Protokoll, dass eine dreimalige Wiederholung der Impfung im Abstand von je zwei Wochen vorsieht. Die Mortalität in den geimpften Gruppen war mit 17 % bzw. 15 % (ORF81, ZHOU et al. 2014a) und 20 %, 17,5 % und 12,5 % (ORF25, ZHOU et al. 2014b) vergleichbar zu den Ergebnissen von MIYAZAKI et al. (2014a) und YASUMOTO et al. (2006). Im Falle der ORF25-Vakzine wurde die Produktion von neutralisierenden Antikörpern mittels ELISA nachgewiesen (ZHOU et al. 2014b).

In dieser Doktorarbeit werden zwei Studien beschrieben, welche hitzeinaktivierte KHV-Antigenpräparationen auf ihre Wirksamkeit in Karpfen unter Laborbedingungen prüfen.

3 Tiere, Material und Methoden

Die hier vorgestellte Studie setzt sich aus zwei Teilen zusammen, der erste Teil wurde 2013 mit 180 Tieren, der zweite 2014 mit insgesamt ebenfalls 180 Tieren durchgeführt.

3.1 Fische

Die für die Versuche verwendeten Karpfen kamen aus zwei verschiedenen Herkunftsbetrieben in Sachsen. Im Versuch von 2013 wurden 180 Karpfen aus der Teichwirtschaft Lohsa GmbH in Mortka verwendet. Sie wogen im Durchschnitt 100 g (Mind.: 37 g, Max: 172 g) und zählten zu den zweisömmrigen Karpfen (K2). Der Bestand wurde wiederholt negativ auf KHV getestet.

Im Versuch von 2014 stammten die 160 verwendeten Karpfen aus der Teichwirtschaft Lohsa GmbH in Mortka und waren ebenfalls zweisömmrige Karpfen mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g (Mind.: 67 g, Max: 598 g).

Für einen Vorversuch im Jahr 2014 wurden 20 Karpfen aus der Intensivhälterung „Schwarze Pumpe“ verwendet, ebenfalls zweisömmrig und mit einem Durchschnittsgewicht von 160 g (Mind.: 99 g, Max: 227 g).

3.1.1 Hälterung

Die Fische wurden zum Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen verbracht. Dort erfolgte die Hälterung getrennt nach Gruppen in 1000 l Tanks. Jeder Tank hatte zwei Filterpumpen (je eine FLUVAL 405, Hagen GmbH & Co., Holm; und eine Eheim Professional 3, Eheim GmbH & Co. KG, Deizisau) mit einem Teilwasserwechsel jeden Tag. Das Lichtregime war für jede Gruppe identisch mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit, gesteuert durch eine Zeitschaltuhr. Die Fische wurden täglich mit einem kommerziell erhältlichen Pelletfutter (Teichsticks Neptune natur, Bob Martin GmbH, Southport England) gefüttert. Die Kontrolle bestimmter Wasserwerte (Nitrat, Nitrit, pH-Wert) mittels Teststreifen (Combur®9 Urinteststreifen, Roche, Berlin), sowie der Sauerstoffgehaltes (DO-5509 - Dissolved Oxygen Meter, Lutron Electronics Co., Inc, USA) und der Wassertemperatur (Infrarotthermometer IRT-350, Base Tech, Kassel) erfolgte alle 10 - 14 h. Die Werte wurden in Protokollen festgehalten. Bei diesen Kontrollgängen erfolgte gleichzeitig eine visuelle Überprüfung des Gesundheitszustandes der Tiere. Auffälligkeiten wurden notiert (Score Sheet im Anhang).

3.1.2 Handling

Jeder Tank hatte sein eigenes Equipment, bestehend aus Kescher, Narkosewannen, Eimer und Bechergläser für Wasseruntersuchungen. Die Desinfektion des Abwassers und der Gerätschaften erfolgte mit 0,1 %iger Peressigsäure (Wofasteril® E 400, Kesla Pharma Wolfen GmbH, Bitterfeld-Wolfen) für zwei Stunden. Ab dem Zeitpunkt der Infektion wurde der Tank der nicht infizierten Hälterungskontrollgruppe separat aufgestellt und zusätzlich mit Folie abgedeckt. Diese Gruppe wurde immer zuerst kontrolliert, gefüttert und behandelt.

3.1.3 Kennzeichnung

Für die Blutprobenentnahme wurden Fische der einzelnen Gruppen gekennzeichnet um eine Zuordnung der Proben und somit eine Verlaufskontrolle zu ermöglichen. Dazu wurden die Fische narkotisiert wie unter Punkt „3.1.5 Narkose und Euthanasie“ beschrieben und mit einem feuchten Handtuch fixiert. Die Kennzeichnung bestand aus einer individuellen Kombination aus Flossenschnitten in die Brustflossen und tätowierten Punkten entweder am Schwanz- oder Rückenflossenansatz oder an beiden Stellen. Die Tätowierung erfolgte mit handelsüblicher Tätowier Tinte und sterilen Kanülen.

3.1.4 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Den Fischen wurde zu festgelegten Zeitpunkten unter Narkose Blut entnommen. Die Fische wurden mit nassen Handtüchern fixiert. Anschließend erfolgte die Blutentnahme mit sterilen Kanülen, aufgesetzt sterile Serum-Monovetten (S-Monovette® 5,5 ml, Serum mit Gerinnungsaktivator), aus der *Vena cava caudalis*. Das Volumen pro Fisch betrug 1 ml. Die Blutproben wurden zum Agglutinieren 2 h bei 8 °C im Kühlschrank gelagert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm (Hettich Universal 30F mit Rotor 1424) für 3 min. Der Überstand (Serum) wurde dekantiert, in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.1.5 Narkose und Euthanasie

Die für die manche Untersuchungen notwendige Narkose der Fische erfolgte in einem separaten Narkosebad. Als Narkotikum wurde Nelkenöl (Bombastus-Werke AG, Freital) in einer Konzentration von 25 mg/l Hälterungswasser verwendet. Als ausreichende Narkosetiefe galt der Ausfall des Equilibriums.

Euthanasien erfolgten zu festgelegten Zeitpunkten oder um Agonie zu vermeiden. Dazu wurde eine Überdosis Nelkenöl verwendet (50 mg/l). Nach einer Stunde im Tötungsbad wurden die Fische entnommen und bis zur Sektion bei -20 °C gelagert.

3.1.6 Sektion und Organentnahme

Alle Fische, die während des Versuches euthanasiert wurden oder verstorben sind, wurden sezziert. Es wurden Gewicht und Länge ebenso wie patho-morphologische Auffälligkeiten notiert (Vorlage Sektionsprotokoll im Anhang). Anschließend erfolgte bei jedem Fisch eine Organentnahme: im Versuch von 2013 Teile der Kiemen, eine Niere, Teile der Leber, die Milz, ein Stück entleerter Darm und das Gehirn; im Versuch 2014 Teile der Kiemen und eine Niere. Die Lagerung der entnommenen Organe erfolgte bei -80 °C.

3.2 Material

3.2.1 Medium

Die Zellen wurden in Minimum Essential Medium Eagle (M7278, Sigma Aldrich, MEM) kultiviert. Diesem Medium wurden noch 1 % Non-essential-amino-acids (NEA) (Biochrom AG), 1 % Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin) (Biochrom AG) und entweder 5 % oder 10 % fetales Kälberserum (Biochrom AG) zugesetzt.

3.2.2 Zellen

Die Zellen, die sowohl für Virusanzucht und –vermehrung als auch den Serumneutralisationstest verwendet wurden, stammen aus der common-carp-brain (CCB) Zelllinie. Diese Zellen wurden sowohl vom Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) als auch im Institut für Tierhygiene und öffentliche Veterinärwesen genutzt und vom FLI zur Verfügung gestellt. Im ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) tragen sie die Nummer 10072802.

3.2.3 Viren

Die Viren, die für die Impfstoffherstellung verwendet wurden, gehörten zu den KHV-Isolaten „Israel“ und „Taiwan“ und die Vermehrung erfolgte im FLI.

Für die Belastungsinfektion im Experiment 2013 wurde das KHV-Isolat „Israel“ verwendet. Es wurde im FLI vermehrt und dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen in

ausreichender Menge zur Verfügung gestellt (Dr. D. Fichtner, Institut für Infektionsmedizin, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems).

Die Lagerung bis zur Anwendung fand bei -80 °C statt.

Das Virus für die Belastungsinfektion im Jahr 2014 gehörte ebenfalls zum KHV-Isolat „Israel“ und wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Fichtner (s.o.). Die Vermehrung und anschließende Lagerung bei -80 °C erfolgte im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen.

3.2.4 Inaktivierte KHV-Antigenpräparationen

2013: In diesem Versuch wurden zwei verschiedene KHV-Antigenpräparationen verwendet:

i. KHV-Antigenpräparation 2012 (KHV-AGP 2012) und ii. KHV-Taiwan-Antigenpräparation 2013 (KHV-T-AGP 2013). Beide AGPs wurden vor der Verwendung mit einem Adjuvans gemischt. Dieses Adjuvans von der Firma Seppic GmbH mit Namen Montanide ISA 763 A VG basiert auf metabolisierbaren Ölen und ist zugelassen für die Anwendung bei Fischen und Geflügel. Die KHV-AGP 2012 basiert auf dem Isolat „Israel“ und war im Verhältnis 1:2 mit dem Adjuvans vorgemischt. Somit betrug die Endkonzentration an Antigen $1 \times 10^3 \text{ KID}_{50} \text{ ml}^{-1}$. Die KHV-T-AGP 2013 basiert auf dem Isolat „Taiwan“ und wurde im Verhältnis 1:3 vor der Applikation frisch mit Adjuvans gemischt. Die Endkonzentration an Antigen betrug $4.2 \times 10^6 \text{ KID}_{50} \text{ ml}^{-1}$. Da die KHV-AGP 2012 einen niedrigeren Gehalt an Antigen aufwies, wurde die applizierte Menge pro Fisch verdoppelt um die Antigenmenge pro Fisch etwas zu erhöhen. Somit erhielten die Fische entweder 0.2 ml der KHV-AGP 2012 oder 0.1 ml der KHV-T-AGP 2013. Die Antigenkonzentrationen pro Fisch betragen demzufolge $2 \times 10^2 \text{ KID}_{50}$ für KHV-AGP 2012 und $4.2 \times 10^5 \text{ KID}_{50}$ für die KHV-T-AGP 2013. Die AGPs wurden im Nationalen Referenzlabor für KHV, Institut für Infektionsmedizin (IMED), Insel Riems, entwickelt. Das Impfvirus wurde dort vermehrt und mittels Hitze inaktiviert (Inaktivierungstemperatur 70 °C, angewandt über einen Zeitraum von 16 Stunden). Die notwendige Mischung des Impfvirus mit dem Adjuvans und darauffolgende Abfüllung erfolgte durch die Riemser Arzneimittel AG. Anschließend wurden die AGPs dem Fischgesundheitsdienst Sachsen und der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt.

2014: Es wurde eine Antigenpräparation getestet, die KHV-Antigenpräparation 2014 (KHV-AGP 2014). Diese war eine Mischung aus der KHV-AGP 2012 und der KHV-T-AGP 2013 und basierte demzufolge sowohl auf dem Isolat „Israel“ als auch auf dem Isolat „Taiwan“. Die

Zusammensetzung betrug 16 Teile „Israel“ und fünf Teile „Taiwan“. Durch Rechnung wurde eine Antigenkonzentration von 1×10^6 KID₅₀ ml⁻¹ ermittelt bei einer Adjuvanskonzentration von 16 %. Jeder Fisch erhielt 0.1 ml der KHV-AGP 2014, gleichbedeutend mit einer Antigenkonzentration von 1×10^5 KID₅₀ pro Fisch. Die Mischung und Abfüllung der AGPs 2012 und 2013 zur KHV-AGP 2014 erfolgte im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig (Abfüllprotokoll im Anhang).

3.2.5 Geräte, Laborbedarf, Reagenzien

Tabelle 1. Geräte

Sterilbänke	Hera Safe HS 18/2, Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifugen	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hettich Universal 30F centrifuge, rotor 1424 A, Hettich AG, Büch, Schweiz 2. E-Centrifuge, Wealtec Corp., Sparks, USA 3. Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Wilmington, USA
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Microsystems (Switzerland) Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
Analysenwaage	Analysenwaage Sartorius Typ 1801, Sartorius AG, Göttingen
Präzisionswaage	Kern 440-47, Kern & Sohn GmbH, Balingen
PCR-Cycler	Mx3000P, Stratagene, La Jolla, California, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Thermoschüttler	ThermoStat Plus, eppendorf, Wesslingen-Berzdorf

TIERE, MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2. Laborbedarf

Zellkulturflaschen (175, 75, 10 cm ²)	Firma TPP AG, Trasadingen, Schweiz
96-Well Mikrotiterplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
6-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorfggefäße (1,5 und 2 ml)	Firma TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Chirurgisches Besteck	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Einmalpipetten (5 ml und 10 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipetten	Biohit, Rosbach Eppendorf, Hamburg
Einmalskalpelle	Braun Aesculap AG, Tuttlingen
Falcons (15 ml und 50 ml)	Firma TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
sterile Monovetten (S-Monovette® 5,5 ml, Serum mit Gerinnungsaktivator)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterile Kanülen	Braun Aesculap AG, Tuttlingen
Zellschaber	Firma TPP AG, Schweiz
Mikropistill	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 3. Reagenzien

PBS	eigene Herstellung, Rezept siehe Anhang
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10.000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
FKS	Biochrom AG, Berlin
MEM	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
NEA	Biochrom AG, Berlin
QIAamp DNA Mini Kit (AL-Puffer, AE- Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer, ATL- Puffer, Proteinase K)	Qiagen, Hilden
Ethanol (98 %)	Biochrom AG, Berlin
Agarosepulver	GeneOn, Ludwigshafen

Midori Green	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
TBE-Puffer	eigene Herstellung
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
6x Loading Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Tätowiertinte, schwarz	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkulturverfahren

3.3.1.1 Kultivierung CCB

Die Kultivierung der CCB-Zellen erfolgte in geschlossenen Zellkulturflaschen verschiedener Größen (75 cm², 150 cm², 175 cm²). Als Nährmedium wurde Minimum Essential Medium Eagle (MEM) verwendet, das mit 10 % FKS und je einem Prozent NEA (non-essential aminoacids) und Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Um die Zellen zu passagieren wurde zunächst das in der Flasche vorhandene Nährmedium dekantiert und anschließend zweimalig mit je 3 bis 4 ml PBS gespült um Reste des Nährmediums auszuwaschen. Um die Zellen aus dem Zellrasen zu lösen erfolgten zwei Spülungen mit je 3 bis 4 ml Trypsin, wobei nach dem zweiten Spülvorgang ein bodenbedeckender Rest (ca. 1 ml) Trypsin in der Flasche belassen wurde. Daraufhin wurde die Flasche verschlossen und 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Trypsinierung immer wieder durch Betrachtung gegen das Licht kontrolliert. Die zunehmende Ablösung der Zellen war durch eine Trübung des Zellrasens und Straßenbildung beim Schräghalten der Zellkulturflasche zu erkennen. Sobald die Straßenbildung sichtbar wurde, erfolgte die Ablösung der restlichen Zellen durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche. Nach erfolgter Ablösung aller Zellen wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Nährmedium mit 10 % FKS gestoppt und erneut unter dem Mikroskop kontrolliert. Eventuell vorhandene Zellklumpen konnten durch mehrmaliges vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt werden. Anschließend wurden die abgelösten Zellen im Verhältnis von 1:2 oder 1:4 gesplittet und in neue Zellkulturflaschen verbracht, diese mit 30 ml (bei 150 cm²) bzw. 35 ml (175 cm²) MEM aufgefüllt und für die weitere Kultivierung bei Raumtemperatur (23 °C) gestellt.

3.3.1.2 Virusvermehrung

Es wurden frisch passagierete CCB-Zellen mit einer Dichte von ca. 10⁷ Zellen/ml verwendet, der FKS-Gehalt im Medium für die Infektion lag bei 5 %. Das für die Infizierung aufgetaute

Virus wurde direkt in das Zellkulturmedium gegeben. Für die Infizierung von 35 ml Zellsuspension kamen 1000 μ l Virus zum Einsatz.

3.3.1.3 Inkubationszeitraum und Virusaufbereitung

Nach der Infizierung wurden die Zellkulturflaschen täglich kontrolliert, ob ein KHV-typischer cpE (cytopathischer Effekt) zu erkennen ist. Sobald dieser 80 % oder mehr des Zellrasens befallen hatte, wurde die Virusvermehrung durch einer der folgenden Methoden gestoppt: Einfrieren bei -20 °C der Kulturflasche oder Schaben der Zellen vom Zellkulturflaschenboden. Auch eine Kombination der beiden Methoden wurde verwendet. Durch diese Methoden kommt es zu einer Zerstörung der noch intakten Zellen und somit zu einer Freisetzung des sich in den Zellen befindlichen Virus. Die Virussuspension einer Charge wurde anschließend gepoolt und in 50 ml, 15 ml oder 2 ml Gefäßen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.1.4 Bestimmung des Infektiositätstiters

Die Infektiosität eines Virus wird durch die kulturinfektiöse Dosis 50% (KID₅₀) angegeben. Diese wird mittels Endpunkttitration des Virus bestimmt. Dazu wurden zwei 96-Well Mikrotiterplatten vorbereitet. Die erste wird mit 100 μ l Zellsuspension mit einer Dichte von 10⁴ Zellen pro Well beschickt. Dazu wurde die Dichte der Zellsuspension vorab mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt. In die zweite Platte wurden in jedes Loch 225 μ l PBS gefüllt. In diese PBS-Platte kamen in die erste Reihe pro Loch 25 μ l des zu testenden Virus. Anschließend wurde mit einer Mehrkanalpipette diese Reihe zehnmal gemischt und je 25 μ l in die nächste Reihe übertragen. Die Spitzen wurden verworfen um Verdünnungsfehler zu vermeiden. Dieser Vorgang wurde bis zur Verdünnung von 10⁻⁶ fortgeführt. Die siebte Reihe blieb als PBS Kontrolle und die achte Reihe diente als Zellkontrolle. Nach erfolgter Verdünnung wurden 100 μ l der jeweiligen Virusverdünnung auf die Zellkulturplatte übertragen. Dies erfolgte beginnend bei der PBS-Kontrolle und anschließend aufsteigend von 10⁻⁶ nach 10⁻¹. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte bei Raumtemperatur (23 °C) und in geschlossenen Behältnissen. Täglich wurden die Mikrotiterplatten auf das Auftreten von cpEs in den einzelnen Kavitäten kontrolliert. Die Ergebnisse wurden in ein Protokoll übertragen und ausgewertet.

3.3.2 Berechnung des Infektiositätstiter

Die Berechnung des Infektiositätstiter erfolgte mittels der Formel nach SPEARMANN (1908) und KÄRBER (1931).

$$KID_{50}/\text{Volumen} = x_0 - d/2 + d/n * \sum x_i$$

x_0 : der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv sind

d : \log_{10} des Verdünnungsfaktors

n : die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte

$\sum x_i$: die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei x_0

3.3.3 DNA-Extraktion

Die Aufreinigung des Organmaterials erfolgte mit dem QIAamp DNA-Mini Kit von Qiagen, Hilden. Von den bei -80°C gefrorenen Organen wurde mit Einmalskalpell und Pinzette je eine Probe abgeschnitten, die mittels Feinwaage auf 25 mg eingestellt wurde. Als Aufreinigungskontrolle wurde ein leeres Eppendorfgefäß verwendet, in dem abgesehen von der Organprobe die gleichen Reagenzien verwendet wurden. Jede Probe wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß verbracht, in welches anschließend 180 μl ATL-Puffer hinzu pipettiert wurden. Anschließend wurde die Probe mit Plastikmörsern zerkleinert, und mit 20 μl Proteinase K auf einem Thermoschüttler bei 56°C für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 μl AL-Puffer hinzugefügt und die Proben mit einem Vortexer für 15 s durch mehrmaliges kurzes vortexen („pulse-vortexing“) gemischt. Danach erfolgte eine erneute Inkubation auf dem Thermoschüttler, diesmal bei 70°C für zehn Minuten. Daraufhin wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 200 μl 99 %igem Ethanol gestoppt und wieder durch „pulse-vortexing“ gemischt. Jede Probe wurde auf eine Säule in einem Sammelgefäß übertragen und das ganze bei 6000 g für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde anschließend durch ein neues ersetzt und die Probe wurde mit 500 μl AW1-Puffer gewaschen und erneut bei 6000 g für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde wieder erneuert und die Probe mit 500 μl AW2 Puffer gewaschen und bei maximal g (18000 g) für drei Minuten zentrifugiert. Um Rückstände der Waschpuffer zu vermeiden, erfolgte nach Erneuerung des Sammelgefäßes eine weitere Zentrifugation bei maximal g (18000 g) für eine Minute. Anschließend wurde das Sammelgefäß ausgetauscht und die DNA mit 50 μl AE-Puffer aus der Säule eluiert. Dazu wurden die Proben für eine Minute bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 6000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde aus dem Sammelgefäß in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß überführt, beschriftet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.4 NanoDrop2000 Spektrophotometer

Zur Messung des DNA-Gehaltes in den einzelnen Proben wurde eine spektrophotometrische Messung bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge in einem NanoDrop2000 durchgeführt. Dabei wird ein Abstand von einem Millimeter zwischen zwei Fiberglaskabeln durch eine Flüssigkeitssäule überbrückt und mit einer Xenonlampe Licht hindurch geleitet. Die Absorption bei bestimmten Wellenlängen wird gemessen und durch das zugehörige Programm umgerechnet in DNA-Gehalt. Das Messvolumen für die Messung von Nukleinsäuren liegt bei 1 µl. Zuerst wurde der Nullwert durch einen Abgleich mit dem verwendeten Elutionspuffer AE ermittelt. Anschließend wurde jede Probe gemessen. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Messfühler mit einem Papiertuch gereinigt um DNA-Übertrag zu vermeiden. Die Pipettenspitzen wurden nach jeder Probe gewechselt.

3.3.5 Quantitative realtime PCR

Um bestimmte Sequenzen einer Ziel-DNA nachweisen zu können, wird eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Diese stellt eine *in vitro* Technik dar, die mit Hilfe von Enzymen eine Amplifikation der Zielsequenz ermöglicht. Eine PCR gliedert sich in mehrere Zyklen, die wiederum jeweils aus verschiedenen Abschnitten bestehen. Bei dem verwendeten Protokoll sind es drei Abschnitte, die sich in ihrer Dauer und in der Temperatur unterscheiden. Jeder Zyklus beginnt mit dem Abschnitt Denaturierung, gefolgt von Hybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung führen hohe Temperaturen zur Trennung der Doppelstränge der DNA-Helix voneinander. Anschließend wird die Temperatur auf 40 - 60 °C (je nach Primer) abgesenkt. Dies ermöglicht die Hybridisierung der Primer an ihre Bindungsstellen. Jeder Primer stellt ein Oligonukleotid dar, welches 20- 30 bp lang ist und als Startpunkt für die DNA-Polymerase fungiert. Es werden immer Primer Paare verwendet, sodass an beiden komplementären Strängen der DNA eine Anlagerung und später auch Amplifizierung erfolgt. Die Primer Paare umschließen die Sequenz, die amplifiziert werden soll. Nach der Primerhybridisierung wird die Temperatur auf ca. 72 °C angehoben. Die Temperatur ist abhängig von der DNA-Polymerase, die verwendet wird. Bei

diesem Schritt, der Elongation, lagern sich die Polymerasen an den gebundenen Primern an und amplifizieren die DNA-Sequenz, die in Laufrichtung liegt. Die Abschnitte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation werden je nach Protokoll 30 – 40-mal wiederholt und somit theoretisch die Anzahl der Amplifikate jedes Mal verdoppelt.

Die quantitative realtime PCR ist eine spezielle Variante der PCR, die neben einer Vermehrung einer Sequenz auch deren Quantifizierung erlaubt. Die Messung der DNA-Menge erfolgt in Echtzeit mittels Fluoreszenz-Messungen. In der hier angewandten qPCR nach GILAD et al. (2004) wurde eine TaqMan Sonde verwendet. Diese Sonden sind Oligonukleotide, die an die Zielsequenz binden und gleichzeitig mit einem Quencher und einem Reporterfarbstoff markiert sind. Der Quencher unterdrückt durch seine räumliche Nähe die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes. Während der Synthese des komplementären Stranges durch die Taq-DNA Polymerase wird der Quencher durch die Exonuklease-aktivität der Taq-DNA-Polymerase abgetrennt und verliert somit seinen hemmenden Einfluss auf den Reporterfarbstoff. Dessen Fluoreszenz kann dann von dem PCR-Cycler detektiert und die zunehmende Intensität als Kurve dargestellt werden. Zur Berechnung der einzelnen DNA-Kopien werden in jedem Lauf Standardverdünnungen von 10^0 bis 10^7 mitgeführt und diese in der Auswertung definiert. Ausgehend von diesen Kurven können die Kopienzahlen in den eingesetzten Proben berechnet werden. Ein weiterer Wert bei einer quantitativen realtime PCR ist der Ct- Wert (cycle threshold). Dieser Wert bezeichnet den Zyklus, in dem die Fluoreszenz der PCR-Produkte erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Je niedriger der Wert, desto mehr der Zielsequenz ist in der Probe vorhanden.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde die quantitative realtime PCR nach Gilad et al (2004) zum Nachweis eines 78 bp großen Stücks der KHV-DNA durchgeführt. Die verwendeten Primer waren KHV-86F und KHV-163R, die mit je 1,0 µl in das Reagenzgemisch eingingen (Sequenzen siehe Anhang). Dazu kamen 12,5 µl MasterMix der Firma Qiagen (Bestandteile siehe Anhang), 0,5 µl TaqMan probe KHV-109p und 5,0 µl PCR-Wasser. Zu dieser Mischung wurden 5 µl der extrahierten DNA als Template gegeben und anschließend im Stratgene3000 bearbeitet. Der Gesamtansatz betrug 25 µl.

Das PCR-Protokoll enthielt eine 15 min andauernde Denaturierungsphase bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen, die jeweils aus 20 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Hybridisierung bei 60 °C und 30 s Elongation bei 72 °C bestanden. Schwach positive Proben (Ct-Werte über 39) wurden zur Verifikation in eine Gelelektrophorese eingesetzt.

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der PCR wurde eine Probitanalyse durchgeführt. Dazu wurden folgende Verdünnungen von KHV im 5-fach Ansatz getestet: 1000, 100, 10, 5, 1, 0.1 Kopien/Reaktionsansatz. Daraus wurde mit Hilfe der statistics software R Version 3.0.2 eine Regressionsanalyse nach dem Probit Model durchgeführt.

3.3.6 Gelelektrophorese

Es wurde zunächst ein 1 %iges Agarosegel gegossen, das den Farbstoff Midori Green (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) enthält. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer verbracht, die mit TBE- Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) gefüllt war. Anschließend wurden in die Vertiefungen von links nach rechts folgende Proben eingebracht: der Marker, ein 100 bp DNA Ladder (5 µl), die Positivkontrolle (8 µl), PCR-Wasser als Negativkontrolle (8 µl) und die zu untersuchenden Proben (jeweils 8 µl). Bis auf den Marker wurden alle Proben zuvor mit einem sechsfach vorkonzentrierten Loading Puffer vermischt. Dieser besteht aus zwei Farbstoffen, die die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel sichtbar machen. Nach dem Beschicken der Vertiefungen wurde die Kammer an die Spannungsversorgung angeschlossen und für mindestens 60 min bei 100 V so belassen. Anschließend wurde das Gel entnommen und unter UV-Licht untersucht um die Banden sichtbar zu machen.

3.3.7 Serumneutralisationstest

Für den Serumneutralisationstest lag ein Protokoll von Dr. S.-M. Bergmann vor. Hierfür wurden zwei 96-Well-Mikrotiterplatten vorbereitet. Die erste enthielt pro Kavität 100 µl einer auf 10^5 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension. Die zweite wurde wie folgt beschickt: Die erste und die zwölfte Spalte blieben leer, in die erste, zweite und achte Reihe kamen jeweils 30 µl Medium mit 5 % FKS. Die dritte bis siebte Reihe wurde jeweils mit 20 µl Medium mit 5 % FKS beschickt. Anschließend wurde in jede mit Medium gefüllte Kavität der zweiten Reihe 10 µl Serum pipettiert, jede Probe im Doppelansatz. Zusätzlich wurden von jeder Serumprobe 10 µl in ein Loch der ersten Reihe pipettiert, als Serumkontrolle. Die leere Kavität und die achte Reihe fungierten als Medium- und Zellkontrolle. Mit einer Mehrkanalpipette wurde die zweite Reihe acht Mal gemischt und je 20 µl in die nächste Reihe übertragen. Die Spitzen wurden danach verworfen um Verdünnungsfehler zu vermeiden. Dieser Vorgang wurde fortgesetzt bis zur siebten Reihe (Serumverdünnung von 1:256). In jedes Loch mit Serum-Medium-Gemisch mit Ausnahme der ersten Reihe wurden

20 µl Virus mit einem Titer von ca. $10^{2,5}$ KID₅₀/ml gegeben und die Platte über Nacht bei 8 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden von jedem Serum-Virus-Gemisch 20 µl auf die vorbereitete Zellkulturplatte mit jetzt konfluentem Zellrasen übertragen, beginnend bei der achten Reihe, gefolgt Reihe eins bis sieben. Zusätzlich wurde bei der ersten und letzten Platte eines Ansatzes eine Viruskontrolle in den Spalten eins und zwölf mitgeführt (Tabelle 4). Diese Platte wurde dann bei Raumtemperatur inkubiert und jeden Tag auf das Vorhandensein von cpE überprüft.

Tabelle 4. Plattenlayout einer 96-Well-Platte für den Serumneutralisationstest mit den resultierenden Verdünnungsstufen der Seren.

	SK Probe 1	ZK	SK Probe 2	ZK	SK Probe 3	ZK	SKProbe 4	ZK	SK Probe 5	ZK	
VK	1:4 Pr. 1	1:4 Pr. 1	1:4 Pr. 2	1:4 Pr.2	1:4 Pr.3	1:4 Pr.3	1:4 Pr.4	1:4 Pr.4	1:4 Pr.5	1:4 Pr.5	VK
VK	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	VK
VK	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	VK
VK	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	VK
VK	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	VK
VK	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	VK
	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	
	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	ZK	

Pr.1, Pr.2....: Probenbezeichnung, SK: Serumkontrolle, VK: Viruskontrolle, ZK: Zellkontrolle

3.3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 22 der Firma IBM. Zuerst wurden die Werte der Versuchsgruppen in den einzelnen Untersuchungs-Zeitabschnitten auf Normalverteilung getestet. Dies erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung. Anschließend wurde der Kruskal-Wallis Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um zu testen, ob signifikante Unterschiede in den einzelnen Zeitabschnitten vorliegen. Nach positivem Ergebnis schloss sich ein Vergleich der einzelnen Gruppen in jedem Probenahmezeitraum mit dem Mann-Whitney-U Test an, um diese auf signifikante Unterschiede zu untersuchen. Die Signifikanzschranke wurde dabei jeweils nach Bonferroni korrigiert, da sich die Signifikanzschranke p, sobald mehrere Gruppen untereinander verglichen werden sollen, verringert. Bei dieser Korrektur wird die Signifikanzschranke p von 0,05 durch die Anzahl der Tests geteilt. Bei vier Gruppen in einem Abschnitt, die alle untereinander verglichen werden sollen, sind es sechs Tests. Demzufolge verringert sich die Signifikanzschranke p von 0,05 auf 0,0083.

3.4 Versuche

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, einer 2013 und einer 2014. Im Folgenden wird der Versuch 2013 als Experiment 1 und der Versuch 2014 als Experiment 2 bezeichnet.

3.4.1 Versuchsablauf 2013 (Experiment 1)

3.4.1.1 Unschädlichkeitsprüfung

Die Unschädlichkeitsprüfung für die KHV-AGP 2012 und für die KHV-T-2013 wurde extern am FLI durchgeführt.

3.4.1.2 Gruppeneinteilung

Für das Experiment 1 waren 180 Fische vorgesehen. Diese wurden in drei Gruppen zu je 60 Karpfen eingeteilt, wobei 50 Karpfen für den Versuch und die zehn Übrigen als Reservefische für eventuelle Ausfälle vorgesehen waren.

3.4.1.3 Vakzinierung

Die erste Gruppe wurde mit der KHV-AGP 2012 vakziniert, die zweite Gruppe mit der KHV-T-AGP 2013. Das Injektionsvolumen betrug 0,2 ml für die AGP 2012 und 0,1 ml für die AGP 2013. Die dritte Gruppe blieb unbehandelt. Die Impfung erfolgte im Herkunftsbetrieb mittels intraperitonealer Injektion.

Tabelle 5. Gruppeneinteilung und Behandlung im Experiment 1

	Gruppe 1a und b	Gruppe 2a und b	Gruppe 3a und b
Vakzine	+ (KHV-AGP 2012)	+ (KHV-T-AGP 2013)	-
Infektion	+	+	+

3.4.1.4 Belastungsinfektion

Die Gruppen wurden jeweils in zwei gleichgroße Teilgruppen unterteilt. Die erste Teilgruppe wurde 60 Tage nach der Impfung (*days post vaccination, d p.vacc.*) der Belastungsinfektion unterzogen (Gruppen 1a, 2a und 3a), die zweite Teilgruppe 120 d *p.vacc.* (Gruppen 1b, 2b und 3b). Die Infektion erfolgte im Infektionsbad, bestehend aus 40 l Wasser

und 400 ml Virussuspension. Der Infektiositätstiter im Infektionsbad lag bei $1.8 \times 10^2 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ Wasser und wurde rechnerisch ermittelt. Die Infektion erfolgte getrennt nach Gruppen an drei aufeinanderfolgenden Tagen (je eine Gruppe pro Tag). Am Tag nach der Belastungsinfektion wurden die Fische mittels simulierten Abfischens für 10 min gestresst, um die Wirkung der Infektion zu verstärken. Die infizierten Fische wurden nach der Infektion in 300 l Aquarien umgesetzt und sieben Tage ohne Fütterung gehältert. Die Temperatur wurde mit 21 °C bis 23 °C im optimalen Bereich für KHV gehalten. Während dieses Zeitraums wurden Gesundheitszustand, Auftreten von KHV-verdächtigen Symptomen und Todesfälle protokolliert.

3.4.1.5 Euthanasie und Organentnahme

Am siebten Tag nach der Infektion (*day post infectionem*, dpi) wurden alle verbliebenen Fische euthanasiert und zur Sektion eingefroren (siehe 3.1.5). Anschließend wurden die Organe entnommen, die DNA extrahiert und für die qPCR vorbereitet (siehe 3.1.6, 3.3.3, 3.3.5).

3.4.1.6 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Es erfolgte eine Blutprobenentnahme bei der Teilgruppe, die 120 d *p.vacc.* infiziert wurden. Hierbei wurde fünf individuell markierten Fischen am 89 d *p.vacc.*, am 120 d *p.vacc.* und am siebten dpi Blutproben wie unter 3.1.4 beschrieben entnommen und weiter verarbeitet. Der Serumneutralisationstest für diese Blutproben wurde extern am FLI durchgeführt. Für den Versand waren die Seren bei -20 °C tiefgefroren.

3.4.2 Versuchsablauf 2014 (Experiment 2)

3.4.2.1 Unschädlichkeitsprüfung

Vor dem eigentlichen Versuch wurde die KHV-AGP 2014 an 20 Karpfen auf ihre Unschädlichkeit getestet. Dazu wurde den Karpfen jeweils eine Dosis der Vakzine verabreicht und die Fische dann anschließend über einen Zeitraum von 20 Tagen beobachtet. Während dieses Zeitraums wurden sowohl der Gesundheitszustand als auch die unter 3.1.1 genannten Wasserwerte protokolliert. Nach Ablauf der 20 Tage erfolgte die Euthanasie der Fische mit Nelkenöl (siehe 3.1.5) mit anschließender Sektion. Patho-morphologische Veränderungen wurden in Sektionsbefunden festgehalten.

3.4.2.2 Gruppeneinteilung

Die 160 Karpfen im Experiment 2 wurden in vier Gruppen zu je 40 Karpfen eingeteilt. Gruppe A wurde mit KHV-AGP 2014 vakziniert, Gruppe B erhielt ein Adjuvans-PBS-Gemisch, mit derselben Konzentration an Adjuvans wie in der Vakzine, Gruppe C war die Viruskontrolle und Gruppe D die Hälterungskontrolle, blieb also komplett unbehandelt.

Tabelle 6. Gruppeneinteilung und Behandlung im Experiment 2

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Vakzine	+ (KHV-AGP 2014)	-	-	-
Adjuvans	+ (Montanide)	+ (Montanide)	-	-
Infektion	+	+	+	-

3.4.2.3 Vakzinierung

Die Vakzinierung der Karpfen der Gruppe A erfolgte im Herkunftsbetrieb mittels intraperitonealer Injektion, die Fische der Gruppe B erhielten ihre Injektion mit dem Adjuvans-PBS-Gemisch im Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen, ebenfalls intraperitoneal.

3.4.2.4 Belastungsinfektion

Die Belastungsinfektion fand auch im Experiment 2 mittels Infektionsbad statt. Hierfür wurden die Fische einer Gruppe in einen kommerziell erhältlichen Fischtransportbeutel (35 cm x 80 cm) verbracht, zusammen mit 20 L Wasser, eingestellt auf 23 °C, und 600 ml Virussuspension. Dies resultierte in einem Virustiter von $2,91 \times 10^2 \text{KID}_{50} / \text{ml}$ Wasserbad (rechnerisch ermittelt). Zusätzlich wurden die Transporttüten mit reinem medizinischem Sauerstoff befüllt und anschließend verschlossen. Um die Temperatur konstant zu halten, verblieben die geschlossenen Tüten in einem auf 23 °C eingestellten Wasserbad. Die Fische wurden nach der Infektion in die jeweiligen 1000 L Tanks zurückgesetzt. Am Tag nach der Infektion erfolgte auch hier, wie in Experiment 1, bei allen Gruppen für 10 min ein simuliertes Abfischen, um Stress bei den Tieren zu induzieren.

3.4.2.5 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Es wurden vom Tag der Impfung bis zum Versuchsende im wöchentlichen Abstand Blutproben genommen. Die beprobten Tiere waren vom Zeitpunkt der Impfung bis eine Woche vor der Belastungsinfektion pro Gruppe zehn zufällig ausgewählte Tiere. Ab einer Woche vor der Infektion wurden in jeder Gruppe zehn Tiere gekennzeichnet und die Blutproben von den markierten Fischen entnommen. Die Blutentnahme und Probenaufbereitung erfolgten wie unter 3.1.4 beschrieben.

3.4.2.6 Euthanasie, Sektion und Organentnahme

Am Tag der Impfung wurden sechs Karpfen getötet um diese mittels qPCR auf KHV-Freiheit zu überprüfen. Aus dem gleichen Grund erfolgte vor der Belastungsinfektion die Euthanasie sechs weiterer Fische. Nach der Belastungsinfektion wurden am siebten, 14. und 21. Tag jeweils ein Drittel der in den Gruppen noch vorhandenen Karpfen euthanasiert und bei -20 °C bis zur Sektion gelagert. Es erfolgte eine Organentnahme wie unter 3.1.6 beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Virusanzucht und zytopathischer Effekt

Bei der Virusanzucht des Isolates „Israel“ aus der Kryokonservierung konnten nach einigen Passagen Virustiter von 10^5 KID₅₀ erreicht werden. Aus dieser Charge erfolgte die Vermehrung des Virus und die anschließende Lagerung bei -80 °C bis zur Verwendung. Der zytopathische Effekt (cpE) des KHV äußerte sich in einem Mottenfraß ähnlichem Aussehen des infizierten Zellrasens. Der cpE begann am vierten dpi und erreichte 90- 100 % am siebten dpi.

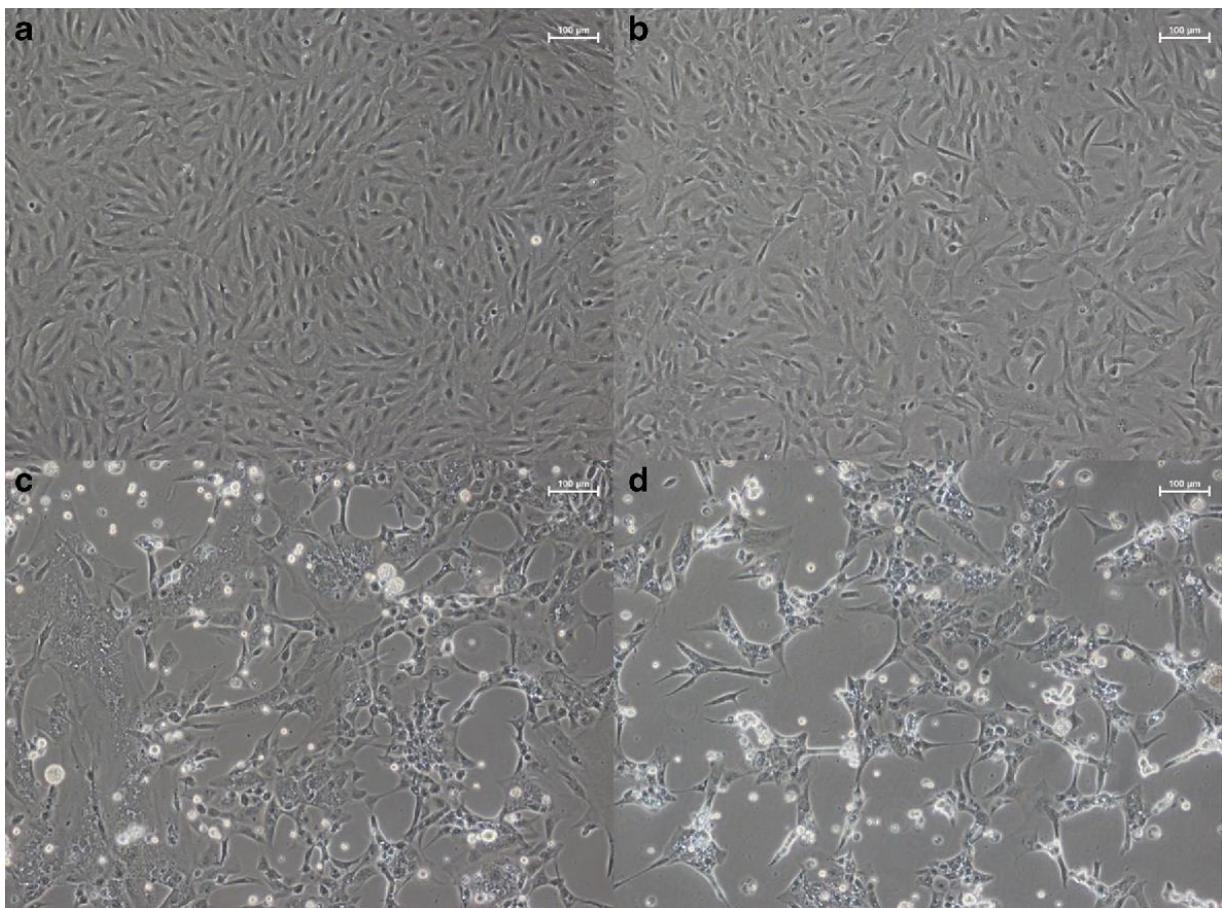


Abbildung 1: CCB-Zellkultur in MEM , infiziert mit KHV

a: 3,5h p.i. **b:** 2 dpi **c:** 4 dpi **d:** 6dpi

aus: MLETZKO et al. 2017

4.2 Versuch 2013

4.2.1 Unschädlichkeitsprüfung

Die extern durchgeführte Unschädlichkeitsprüfung ergab keine Auffälligkeiten.

ERGEBNISSE

4.2.2 Klinische Symptome und Todesfälle

30 Fische verendeten oder wurden vor der Belastungsinfektion euthanasiert. Die Todesfälle waren nicht auf KHV zurückzuführen.

Infektion 60 d *p.vacc.*: Die nicht vakzinierte Viruskontrollgruppe (Gruppe 3a) entwickelte keine Symptome und blieb unauffällig bis zum siebten dpi, also dem Tag der Euthanasie. Die beiden geimpften Gruppen hingegen zeigten Kiemennekrosen, Hautveränderungen und Enophthalmus ab dem 2. dpi und der erste Fisch verendete am 5. dpi.

Infektion 120 d *p.vacc.*: Keine der drei Gruppen entwickelte Symptome und alle Fische blieben unauffällig bis zum Tag der Euthanasie (7 dpi).

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Häufigkeiten der verschiedenen Symptome, Todesfälle und jeweils die Anzahl der betroffenen Fische.

Tabelle 7. Klinische Symptome und Todesfälle im Experiment 1

	Infektion 60 d <i>p.vacc.</i>			Infektion 120 d <i>p.vacc.</i>		
	Gruppe 1a	Gruppe 2a	Gruppe 3a	Gruppe 1b	Gruppe 2b	Gruppe 3b
Behandlung Symptom	KHV-AGP 2012	KHV-T-AGP 2013	nicht geimpft	KHV-AGP 2012	KHV-T-AGP 2013	nicht geimpft
Enophthalmus	5/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25
Kiemen- nekrosen	3/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25
Haut- veränderungen	3/25	11/25	0/25	0/25	0/25	0/25
Gestorben bis zum 7. Dpi	1/25	25/25	0/25	0/25	0/25	0/25

4.2.3 Sektionsbefunde

Die Fische wurden bei der Sektion gemessen und gewogen. Im arithmetischen Mittel waren sie 100 g schwer und 18 cm lang. Es wurden die unter Punkt 4.2.2 beschriebenen Symptome festgestellt. Des Weiteren fielen bei den geimpften Gruppen weiße Tropfen im Bauchraum auf. Die Tropfen kamen einzeln oder multipel vor und waren zwischen 0,5 und 5 mm im Durchmesser. Die Textur unterschied sich je nach dem Infektionszeitpunkt:

ERGEBNISSE

So waren die Tropfen bei den Fischen, die 60 Tage nach der Impfung infiziert wurden, ölig und flüssig, wohingegen sie in den Gruppen, die am 120 d *p.vacc.* infiziert wurden, von einer dünnen Membran umgeben waren. Wenn diese eröffnet wurde, war der Inhalt wiederum ölig-flüssig. Die Tropfen wurden in 33 % (n = 16) der Fische gefunden, die mit der KHV-AGP 2012 behandelt wurden und bei 93 % (n = 46) der Fische, die die KHV-T-AGP 2013 bekamen. Die folgenden Bilder zeigen als erstes einen eröffneten großen Tropfen (Abb. 2) und zweitens multiple Tröpfchen (Abb. 3), jeweils frei in der Leibeshöhle der betroffenen Fische.



Abbildung 2: Karpfen mit weißer Flüssigkeit in der Leibeshöhle, welche nach Zerstörung der dünnen Membran sichtbar wurde.

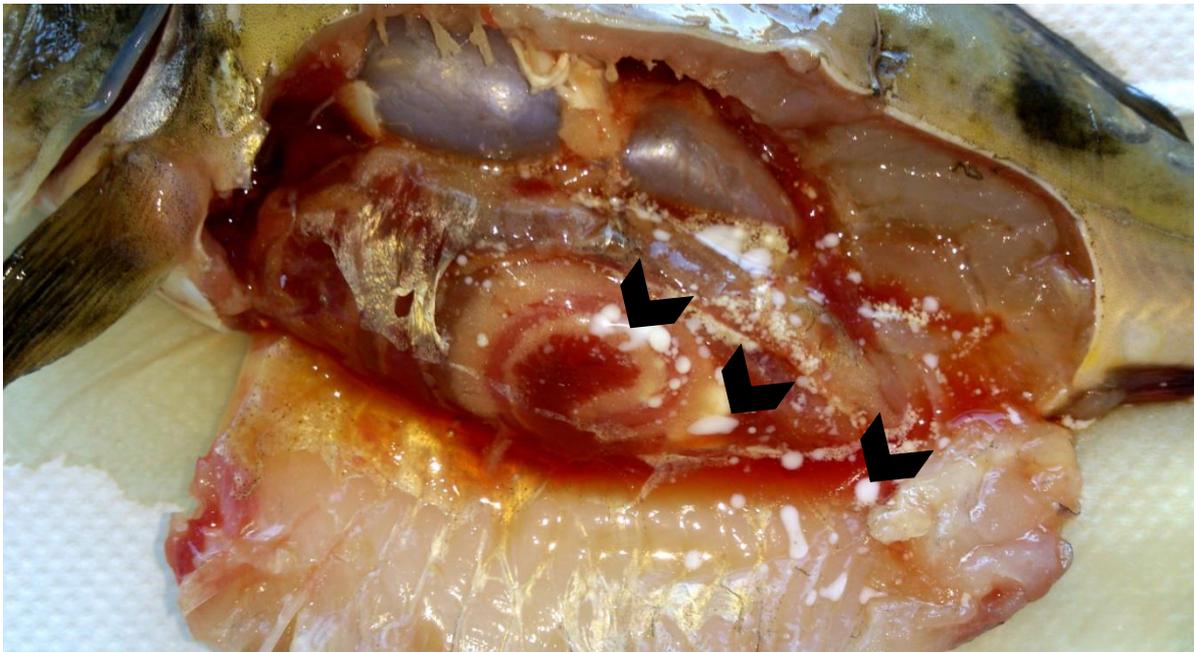


Abbildung 3: Karpfen mit multiplen weißen Tropfen in der Leibeshöhle (schwarze Pfeilspitzen)

4.2.4 Ergebnisse qPCR

Unter den 30 Fischen, die vor der Belastungsinfektion verstarben oder euthanasiert wurden, waren elf Fische in der qPCR positiv auf KHV-DNA in Kieme oder Niere oder in beiden Organen. Die Kopienzahlen waren sehr niedrig mit einer Spanne von 1.7×10^0 bis 3.3×10^2 Kopien / 5 μ L Template.

Insgesamt wurden 150 Karpfen der Belastungsinfektion unterzogen. Davon waren 143 (95,3 %) positiv für KHV-DNA. Das arithmetische Mittel der Kopienzahlen lag bei 2.3×10^5 Kopien/ 5 μ l Template, wobei die Spanne von ≤ 10 Kopien bis zu $\geq 10^7$ Kopien / 5 μ L Template reichte. Bei den Fischen, die 60 d *p.vacc.* infiziert wurden, zeigten die mit KHV-AGP 2012 geimpften Tiere signifikant höhere Kopienzahlen ($p \leq 0,001$) als die ungeimpften Fische oder die mit KHV-T-AGP 2013 behandelten Fische (s. Abb. 4).

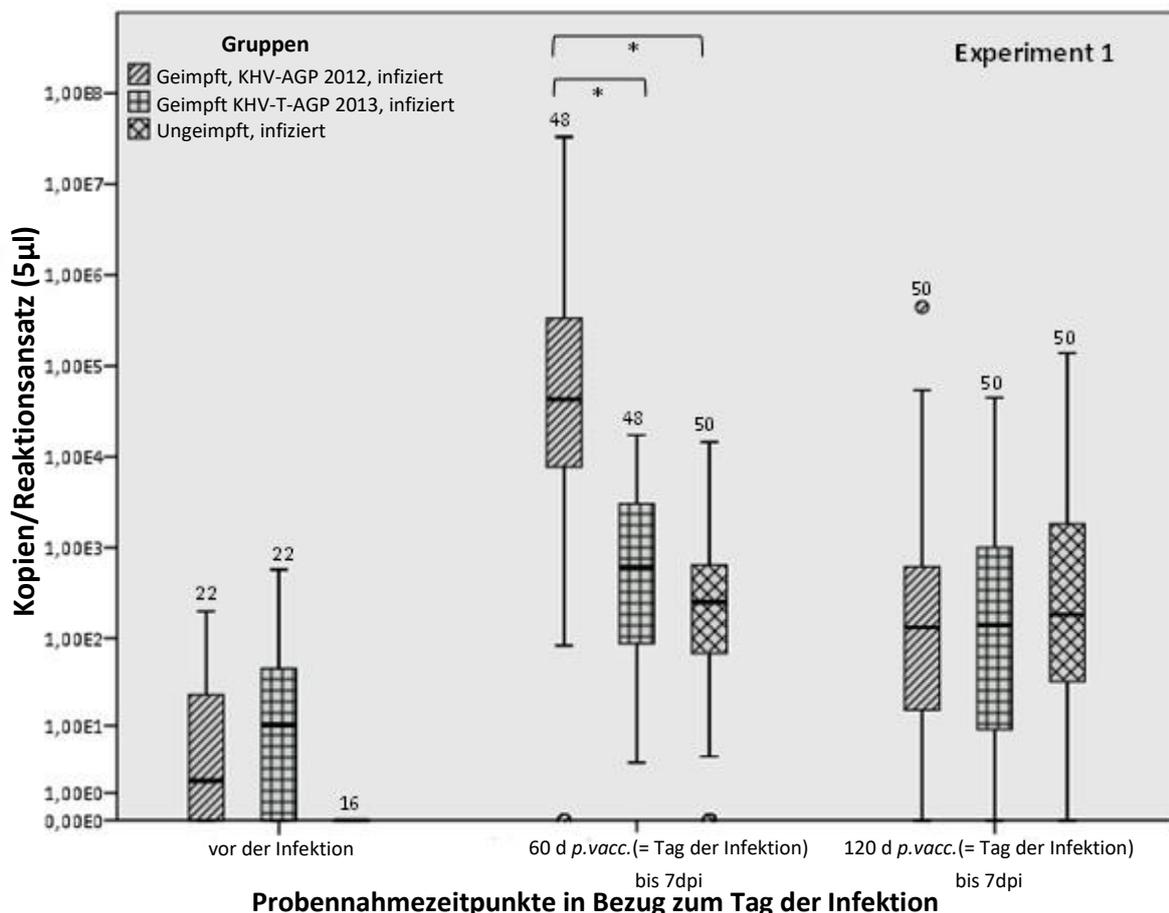


Abbildung 4: Kombinierte Präsentation der KHV-DNA Kopienzahlen, die per qPCR gefunden wurden. Bei jedem Fisch wurden Kieme und Niere getestet.

Einzelne Punkte symbolisieren die Ausreißer, Zahlen die Anzahl der getesteten Proben und die schwarzen Linien den Median jeder Säule

*signifikante Unterschiede, $p < 0,001$

(Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben)

ERGEBNISSE

4.2.5 Ergebnisse des Serumneutralisationstests

Die Ergebnisse des Serumneutralisationstests wurden für den Versuch 2013 extern im FLI ermittelt und sind in Tabelle 8 zu sehen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. So wiesen die Fische der Gruppe 1, die mit KHV-AGP 2012 geimpft wurden, hohe Titer auf (bis 1:128), die Karpfen der ungeimpften Gruppe 3 hingegen niedrige Titer. Die Gruppe 2, die mit der KHV-AGP-T 2013 geimpft wurden, stellte sich heterogen dar, mit sowohl hohen als auch niedrigen Titern. Ebenfalls sind in dieser Gruppe die Schwankungen zwischen den einzelnen Blutproben eines Fisches sehr hoch.

Tabelle 8. SNT-Ergebnisse im Versuch 2013 für fünf ausgewählte Karpfen jeder Gruppe, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten beprobt wurden

Gruppe	Bezeichnung der Fische	SNT-Titer 89d [#]		SNT-Titer 120d [#]		SNT-Titer 130d [#] = 7dpi	
		nicht geimpft	geimpft	nicht geimpft	geimpft	nicht geimpft	geimpft
1b geimpft KHV-AGP 2012 + infiziert	1b Fisch 1	-	≥1: 144	-	1: 16	-	neg.
	1b Fisch 2	-	1: 45	-	1: 32	-	1: 23
	1b Fisch 3	-	1: 23	-	1: 32	-	1: 64
	1b Fisch 4	-	1: 64	-	1: 128	-	1: 32
	1b Fisch 5	-	1: 64	-	1: 128	-	1: 6*
2b geimpft KHV-T- AGP 2013 + infiziert	2b Fisch 1	-	1: 11	-	1: 32	-	1: 11
	2b Fisch 2	-	neg.	-	neg.	-	1: 16
	2b Fisch 3	-	1: 128	-	1: 32	-	neg.*
	2b Fisch 4	-	1: 8	-	neg.*	-	neg.*
	2b Fisch 5	-	1: 45	-	neg.	-	≥1: 144
3b nicht geimpft + infiziert	3b Fisch 1	1: 6*	-	1:23	-	1: 16	-
	3b Fisch 2	neg.	-	neg.	-	1: 6*	-
	3b Fisch 3	1: 6*	-	1: 6*	-	1: 6*	-
	3b Fisch 4	1: 8*	-	neg.	-	1: 8	-
	3b Fisch 5	1: 16	-	neg.*	-	n. t.	-

neg.: negativ, d.h. ≤ 1:4; 1:4 bis 1:8: Serum verdächtig auf KHV-Antikörper; > 1:8: KHV-Antikörper bestätigt; n. t.: nicht untersucht; -: in dieser Gruppe nicht verfügbar; *Ergebnis kann durch toxisches Serum verfälscht sein; [#]entspricht dem Tag *p.vacc.* für die Gruppen 1b und 2b

4.3 Versuch 2014

4.3.1 Unschädlichkeitsprüfung

In den 21 Tagen der Unschädlichkeitsprüfung für die KHV AGP 2014 kam es zu keinen Auffälligkeiten bei den Versuchsfischen. Die Karpfen blieben klinisch unauffällig bis zur Euthanasie. Auch in der anschließenden Sektion wurden keinerlei Anzeichen einer KHV-Erkrankung, einer entzündlichen Reaktion auf die Impfung oder Adjuvansrückstände gefunden. Die Unschädlichkeitsprüfung wurde somit als bestanden und die AGP 2014 als ungefährlich bewertet.

4.3.2 Klinische Symptome und Todesfälle

Bereits vor der Belastungsinfektion wurden 50 Karpfen entweder euthanasiert oder sind verstorben. Keiner dieser Todesfälle war auf KHV zurückzuführen.

Die in der Belastungsinfektion infizierten Fische zeigten typische KHV-Symptome, wie sie unter Punkt 2.3.2 beschrieben wurden. Die ersten Symptome traten zuerst in der Gruppe C (nicht geimpft, infiziert) ab dem 5. dpi auf, gefolgt von der Gruppe A (geimpft und infiziert). Bereits am 2. dpi verstarb der erste Fisch der ungeimpften, infizierten Gruppe ohne das sichtbare Auftreten von Symptomen. Die Fische der mit Adjuvans behandelten Gruppe zeigten keine Symptome bis zum 14 dpi. Darüber hinaus überlebten in dieser Gruppe 17 % (n = 5) der infizierten Fische bis zum 21 dpi. Da viele der über Nacht verstorbenen Fische der Gruppe C Anzeichen von Autolyse aufwiesen als sie morgens abgesammelt wurden, war es schwierig die KHV-typischen Symptome daran zu erkennen. Deswegen sind fragliche Fälle hier nicht mit aufgelistet.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Häufigkeit der Symptome und Todesfälle in den einzelnen Gruppen.

ERGEBNISSE

Tabelle 9. Klinische Symptome und Todesfälle im Experiment 2

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Behandlung Symptome	geimpft+ infiziert	Adjuvans+ infiziert	nicht geimpft+ infiziert	nicht geimpft+ nicht infiziert
Enophthalmus	5/33 (15 %)	2/31 (7 %)	7/26 (27 %)	0/20 (0 %)
Kiemennekrosen	3/33 (9 %)	4/31 (13 %)	2/26 (8 %)	0/20 (0 %)
Hautveränderungen	5/33 (15 %)	5/31 (16 %)	1/26 (4 %)	0/20 (0 %)
Erste Symptome	8dpi	14dpi	5dpi	-
Erste Tote	10dpi	15dpi	2dpi	18 dpi (nicht durch KHV verursacht)
Mortalität	31/33 (94 %)	26/31 (83 %)	26/26 (100 %)	20/20 (100 %)

4.3.3 Sektionsbefunde

Die Karpfen wurden bei der Sektion gemessen und gewogen. Das Gewicht lag bei $200 \pm 75,4$ g, die Länge (gemessen von Maul zu Schwanzflossenspitze) bei $22 \pm 3,06$ cm (Mittelwert MW \pm Standardabweichung SD). Es wurden die in der Tabelle 9 genannten Symptome festgestellt. Darüber hinaus gab es keine weiteren Veränderungen.

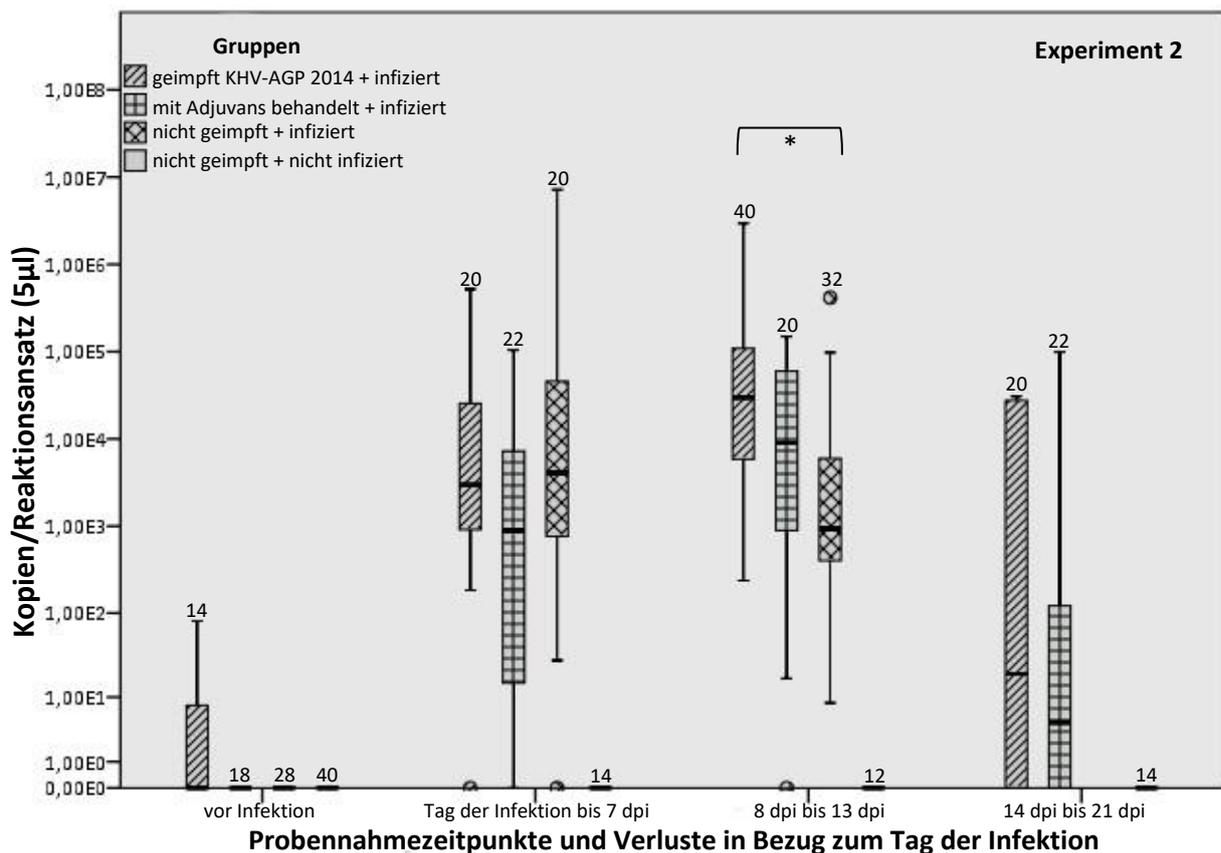
4.3.4 Ergebnisse qPCR

Von den 50 Fischen, die vor der Belastungsinfektion verstarben oder euthanasiert wurden, konnte bei drei Fischen KHV-DNA nachgewiesen werden. Die drei Fische gehörten zur Gruppe A (geimpft mit KHV-AGP 2014) und wurden am Tag der Impfung ($n = 2$) oder am Tag der Infektion ($n = 1$) euthanasiert. Alle drei wiesen sehr niedrige Kopienzahlen von $\leq 1 \times 10^2$ KHV-DNA Kopien/ 5 μ L Template auf.

Es gingen 90 Fische in die Belastungsinfektion, davon waren 87 positiv für KHV-DNA. Das arithmetische Mittel der Kopienzahlen lag bei 1.7×10^5 Kopien/ 5 μ L Template mit minimal ≤ 10 Kopien bis maximal $\geq 10^6$ Kopien/ 5 μ L Template. Dabei waren keine Unterschiede

ERGEBNISSE

zwischen den infizierten Gruppen im ersten Probenahme Zeitraum (Tag der Infektion bis 7 dpi) (Gruppe A gegen Gruppe B $p > 0,1$; Gruppe A gegen Gruppe C $p > 0,6$; Gruppe B gegen Gruppe C $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, Signifikanzschränke $p = 0,0083$, Korrektur nach Bonferroni) und im dritten Probenahme Zeitraum (15 dpi bis 21 dpi) (Gruppe A gegen Gruppe B $p > 0,4$; Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, Signifikanzschränke $p = 0,01667$, Korrektur nach BONFERRONI) zu ermitteln. Im zweiten Abschnitt wiesen die Fische der Gruppe A (geimpft, infiziert) signifikant höhere Kopienzahlen auf als die Fische der ungeimpften Viruskontrollgruppe ($p \leq 0,001$; Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben). Die Vergleiche der anderen infizierten Gruppen im zweiten Abschnitt ergab keine signifikanten Unterschiede (Gruppe A gegen Gruppe B $p > 0,08$; Gruppe B gegen Gruppe C $p > 0,04$; Signifikanzschränke $p = 0,0083$). Die Ergebnisse der qPCR sind in nachfolgender Graphik dargestellt.



Alle Fische der ungeimpften, infizierten Gruppe verstarben bis 11 dpi

Abbildung 5: KHV-DNA Kopienzahlen, die per qPCR gefunden wurden. Bei jedem Fisch wurden Kieme und Niere getestet. Die Ergebnisse aller Organe und Fische einer Gruppe wurden in den einzelnen Abschnitten zusammengefasst.

Einzelne Punkte symbolisieren die Ausreißer, Zahlen die Anzahl der getesteten Proben und die schwarzen Linien den Median jeder Säule

*signifikante Unterschiede, $p < 0,001$
(Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben)

4.3.5 Ergebnisse Gelelektrophorese

Sechs Proben waren fraglich, da sie Ct-Werte über 39 aufwiesen. Somit fand eine Validierung der Ergebnisse durch eine Gelelektrophorese statt, mit der alle Befunde als positiv bestätigt wurden. Die Ergebnisse dieser Proben wurden in oben gezeigter Graphik einberechnet.

4.3.6 Ergebnisse Serumneutralisationstest

Es konnte in keiner Gruppe ein Anstieg von neutralisierenden Antikörpern im Zeitraum vom Tag der Impfung bis zum Tag der Infektion (58 d *p.vacc.*) nachgewiesen werden. Sowohl die geimpfte Gruppe, als auch die mit Adjuvans behandelte Gruppe blieben auf dem Antikörperlevel der nicht behandelten Gruppen (0 bis 1:6). Nach der Belastungsinfektion blieb die Hälterungskontrollgruppe negativ für neutralisierende Antikörper bis zum Ende des Versuchs.

Ein Anstieg der Antikörpertiter war bei den verbliebenen Fischen der Gruppen A (geimpft und infiziert) und B (Adjuvans und infiziert) zwei bis drei Wochen nach der Infektion erkennbar. Die Fische der Gruppen C (Viruskontrollgruppe) und D (Hälterungskontrollgruppe) waren vor dem letzten Probenahmezeitpunkt bereits verstorben und konnten deswegen nicht beprobt werden.

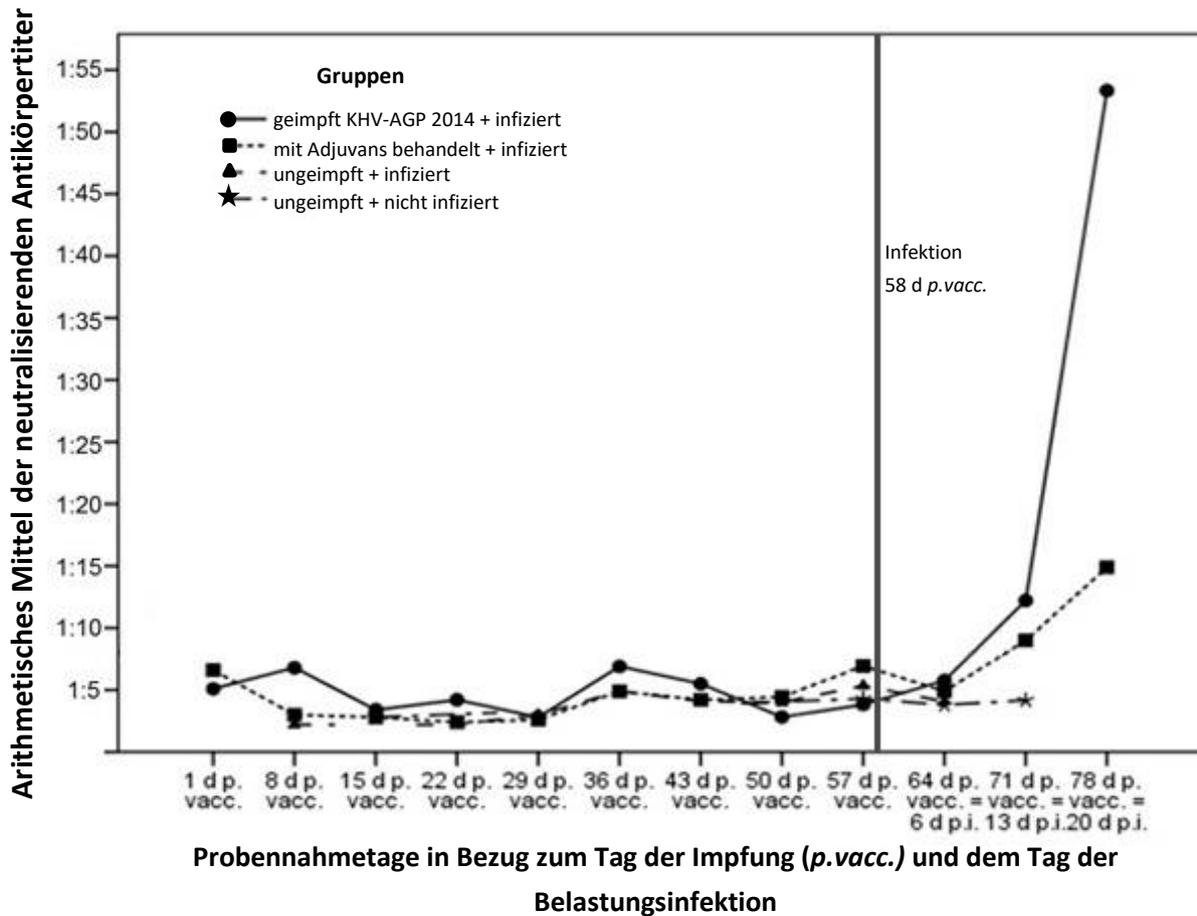


Abbildung 6: Mittelwerte der durch SNT ermittelten neutralisierenden Antikörpertiter vom Tag der Impfung bis zum Ende von Experiment 2.

Pro Gruppe und Tag wurden zehn Fische beprobt. Ab 57 d p.vacc. waren es in jeder Gruppe immer die gleichen zehn Fische

5 Diskussion

Die Infektion mit KHV stellt sowohl für die industrielle Karpfenproduktion als auch für Zucht und Hobbyhaltung von Kois eine große Bedrohung dar, die durch die zunehmende Globalisierung noch verschärft wird (ANON. 2017b). Dabei spielen insbesondere die hohen Tierverluste von bis zu 100 % des erkrankten Bestandes (WALSTER 1999; BRETZINGER et al. 1999), die schlechte Weiterverwertung der überlebenden Tiere (ANON. 2008), die fehlende Behandlungsmöglichkeit (ANON. 2011b) und die langwierige Nacharbeit bezüglich der Desinfektion und der Neubelegung eine Rolle (ANON. 2007, IWANOWSKI 2013).

In sächsischen Betrieben hat die Infektion mit dem KH-Virus mit dem ersten Auftreten zu einem Rückgang der Fischmenge um 40 % gesorgt, womit die Wirtschaftlichkeit der Aquakulturen gefährdet wurde (FÜLLNER et al. 2011).

Die Infektion mit KHV zählt in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen, in der EU ist sie als Seuche der Kategorie „E“ gelistet. Somit ist eine Behandlung in Deutschland per Gesetz verboten (ANON. 2011b).

Wie bei die meisten Erkrankungen spielen präventive Maßnahmen bei der Bekämpfung eine große Rolle. So machten MATSUI et al. (2005) auf die Rolle von Schutznetzen gegen den Eintrag durch Raubvögel wie den Reiher aufmerksam. Ebenso wichtig ist eine ausreichende Quarantäne neuzugekaufter Fische von mindestens 21 Tagen in einem abgeschlossenen Kreislauf (LING et al., 2008). Mehrere Autoren (MEYER 2007; BERGMANN et al. 2009; BERGMANN et al., 2010a; EL-MATBOULI et al. 2011) konnten nachweisen, dass KHV ein erheblich größeres Wirtsspektrum aufweist, als bisher angenommen und dass diese Arten (u.a. Stör, Schleien, Graskarpfen und Goldfische) die Fähigkeit besitzen, das Virus an Karpfen zu übertragen ohne dabei selbst zu erkranken. Damit stellt Mischbesatz in Teichen mit Karpfenhaltung einen weiteren Risikofaktor zur Weiterverbreitung des Virus dar. Als Konsequenz wurden in Sachsen verschiedene Programme, darunter das KHV-Tilgungsprogramm, zur Bekämpfung und Prophylaxe gegen das KHV entwickelt, die seitdem essentielle Bestandteile zum Erhalt der Karpfenteichwirtschaft darstellen (ANON. 2006a; ANON 2006b; ANON 2006c; ANON 2021). Seit dem Beginn dieser Maßnahmen im Jahr 2006 waren die Zahlen der von KHV betroffenen Betriebe im Jahr 2009 erstmals rückläufig (FÜLLNER et al. 2009). Auch Japan zeigt, dass ein Einhalten der Bekämpfungsmaßnahmen

zum Erfolg führt. Die Maßnahmen zielen insbesondere auf den Zukauf von negativen Fischen, und eine konsequente Desinfektion ab (YUASA & SANO 2009).

KHV ist, wie die meisten anderen Herpesviren auch, in der Lage latente Infektionen zu etablieren (FABIAN et al. 2013; EIDE et al. 2011 a; EIDE et al. 2011b), die unter Stressbedingungen auch nach mehreren Monaten wieder ausbrechen können (ST.-HILAIRE et al. 2005; EIDE et al. 2011b). Solche Fische werden als Carrierfische zu einer weiteren Eintragsquelle in den Bestand. Dies kann eventuell mit der Quarantäne und induziertem Stress während der Quarantäne abgemildert werden, eine hundertprozentige Sicherheit bietet das jedoch nicht (LING et al. 2005; MEYER 2007; BAUMER et al. 2013).

Um sich also vor einem Eintrag des KHV in den eigenen Teich zu schützen, sollten die Tiere vorher immunisiert werden. Die Impfung stellt bei viralen Infektionen oftmals die einzige Maßnahme dar, um sich effektiv gegen eine Erkrankung zu schützen. Die Impfung und auch eine protektive Antikörperbildung ist bei anderen Fischarten mit anderen Viren eine oft durchgeführte Präventionsmaßnahme. So konnten PAKINGKING et al. (2009) bei asiatischen Seebarschen mittels einer Injektionsvakzine eine starke Produktion von Antikörpern vom 10 d *p.vacc.* bis 116 d *p.vacc.* nachweisen, die eine protektive Wirkung gegen eine Belastungsinfektion 54 d *p.vacc.* hatten. Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch YAMASHITA et al. (2009) mit einer Injektionsvakzine bei Zackenbarschen und EMBREGTS et al. (2017) mit einer Vakzine gegen die Frühjahrsvirämie der Karpfen.

Bei KHV wurden schon früh mit Immunisierungstechniken experimentiert. RONEN et al. (2003) induzieren „natürlich immune“ Karpfen durch eine experimentelle Infektion mit anschließender Hälterung bei für KHV nicht permissiven Temperaturen. Diese Fische zeigten sich widerstandsfähig gegen eine erneute Infektion mit KHV (61 % Überlebende gegen 18 % Überlebende in der Kontrollgruppe). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass durch diese Behandlung latent infizierte Fische entstehen, die wiederum eine Gefahr für einen naiven Bestand darstellen können.

Mehrere Studien mit attenuierten Lebendvakzinen zeigten hohe Überlebensraten bei einer Belastungsinfektion: RONEN et al. (2003) 100 % gegen 5 % in der Kontrollgruppe, PERELBERG et al. (2005) 85 % Überlebende, BOUTIER et al. (2015) 100 % gegen 0 % in der Kontrollgruppe. SCHRÖDER et al. (2019) erreichten mit einem Impfstoff, der eine Doppeldeletionsmutante des KHV-I ist, bei intraperitonealer Applikation eine Sterblichkeit nach Belastungsinfektion von 0 %, bei Impfung durch ein Immersionsbad eine Sterblichkeit

von 15 % nach Belastungsinfektion. Die Schwierigkeit bei der Immersion liegt in der großen Impfvirusmenge, die benötigt wird um eine ausreichende Konzentration zu erreichen.

Die Gefahren bei Lebendvakzinen bestehen in der möglichen Übertragung auf naive Fische mit einer daraus folgenden Infektion oder einer Rückmutation des Impfvirus zum Wildtyp.

WEBER et al. (2014) konnten bei 10-facher Überdosierung ihres Lebendimpfstoffes eine Übertragung auf andere Karpfen verneinen, PERELBERG et al. (2005) ebenso bei normaler Dosis für eine Zeitspanne von 21 Tagen, bei den anderen Autoren gibt es dazu keine Aussage. PERELBERG et al. (2005) und auch SCHRÖDER et al. (2019) postulieren des Weiteren, dass eine Rückmutation immer ein Risiko darstellt, wenn Lebendvakzinen eingesetzt werden, selbst wenn sie attenuiert wurden.

Um diese Risiken zu vermeiden, wird an der Möglichkeit eines Totimpfstoffes mit vergleichbaren Resultaten geforscht. Sowohl inaktivierte als auch rekombinante Impfstoffe stellen Alternativen dar. Die rekombinanten Impfstoffe werden meistens oral oder per Injektion verabreicht und erzielen mit den attenuierten Vakzinen vergleichbare Überlebensraten von 77 % (MIYAZAKI et al., 2008b), 80 % und 67 % (YASUMOTO et al. 2006), 83 %/85 % (ZHOU et al. 2014a) und 80 %/82,5 %/87 % (ZHOU et al. 2014b). Die Schwierigkeit dieser Impfstoffe ist die Applikationsform. So kann bei einer Fütterungsvakzine die aufgenommene Menge pro Fisch erheblich schwanken, bei einer Injektionsvakzine ist der Arbeitsaufwand sehr hoch und damit unwirtschaftlich.

Im Rahmen der Bekämpfungsprogramme in Sachsen ist bei der Sanierung eines betroffenen Betriebes eine Impfung mit einem zugelassenen Wirkstoff erlaubt, allerdings nur in Betrieben der Kategorie III oder schlechter (KHV negativ, aber ohne Teilnahme am Programm (Kategorie III), KHV bestätigt und mit überwachtem Bekämpfungsprogramm (Kategorie IV) oder KHV bestätigt und ohne Bekämpfungsprogramm (Kategorie V)) (BERGMANN & FISCHER 2017). Im Moment steht kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung, sodass diese Möglichkeit nicht zur Verfügung steht. Die Impfung würde einen wichtigen Beitrag leisten, die Karpfen vor der Erkrankung zu schützen und somit die wirtschaftliche Lage der Betriebe zu stabilisieren. Darüber hinaus könnten so auch die Wildfische davon profitieren, weil das Virus nicht mehr über Abwasser und Raubvögel verteilt werden kann (FÜLLNER et al. 2011). Insbesondere inaktivierte Vakzinen stellen interessante Kandidaten dar, da bei diesen die Gefahr der Rückmutation zum virulenten Virus und die anschließende Ausscheidung nicht gegeben ist.

Die hier präsentierte Studie testete drei inaktivierte KHV-Vakzinen, die mit einem Adjuvans versetzt den Karpfen per Injektion verabreicht wurden. Der Erfolg und damit die Wirksamkeit der Vakzinen wurde an Antikörperproduktion und dem Überleben der anschließenden Belastungsinfektion gemessen.

5.1 Versuch 2013

Die Fische für diesen Versuch kamen aus kommerziellen Haltungen, waren also nicht SPF-frei, aber der Betrieb gilt als KHV unverdächtig. Diese Fische wurden gewählt, um die Wirksamkeit der Vakzinen an Feldfischen zu testen, die sich auch mit anderen Keimen und Umweltbelastungen auseinandersetzen mussten.

Die zwei zu testenden Antigenpräparationen (KHV-AGP 2012 und KHV-T-AGP 2013) wurden vom FLI entwickelt und bereitgestellt. Die KHV-T-AGP 2013 wurde genau nach Herstellerangaben appliziert, bei der KHV-AGP 2012 wurde die Dosis verdoppelt um eine höhere Antigenkonzentration im Fisch zu erhalten. Damit sollte erstens eine bessere Stimulation der Antikörperproduktion und zweitens eine bessere Vergleichbarkeit zur noch höher konzentrierten KHV-T-AGP 2013 erreicht werden. Geimpft wurde im Herkunftsbetrieb um den zusätzlichen Stress durch das ansonsten notwendige erneute Abfischen zu vermeiden.

Die Gruppengröße betrug 60 Fische pro Gruppe, zwei geimpfte Gruppen und eine ungeimpfte Kontrollgruppe. Die Gruppengrößen waren limitiert durch das Platzangebot, da für jede Gruppe ein 1000 L Tank zur Verfügung stand. Die Anzahl der Tiere wurde für eine statistische Abschätzung als ausreichend angesehen.

60 Tage nach der Impfung erfolgte die Belastungsinfektion der ersten Hälfte jeder Gruppe. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um eine ausreichende Antikörperproduktion zu gewährleisten. Laut BAUR, BRÄUR, RAPP; (Nutzfische und Krebse 2010) ist eine Spanne von 20 - 30 Tagen ausreichend, wenn die Temperaturen im Optimum für die jeweilige Spezies liegen. MATRAS et al. (2012) fanden Antikörper gegen KHV ab dem 21 dpi, was die Zeitspanne von BAUR, BRÄUR, RAPP untermauert. Die Hälterungstemperatur lag bei durchschnittlich 23 °C. Die Infektion der zweiten Hälfte der Gruppen erfolgte am 120. Tag nach der Impfung. Dieser Zeitpunkt diente der Überprüfung, ob die Zeitspanne von 60 Tagen eventuell zu kurz war um ausreichend Antikörper zu produzieren.

DISKUSSION

Eine Kontrolle der Antikörpertiter fand nur in der Gruppe statt, die 120 Tage nach der Impfung infiziert wurden. Die Notwendigkeit einer solchen Maßnahme ergab sich erst im Laufe der Studie, weswegen solche Daten zum Infektionszeitpunkt 1 (60 d *p. vacc.*) fehlen. Die Blutproben wurden von uns gezogen und zur Untersuchung mittels Serumneutralisationstest ans FLI geschickt. Da der Test extern durchgeführt wurde, ist eine genaue Fehleranalyse hier nicht möglich. Die Ergebnisse der ungeimpften Gruppe und der mit KHV-AGP 2012 geimpften Gruppe entsprachen den Erwartungen, da die mit KHV-AGP 2012 geimpfte Gruppe hohe Titer, die ungeimpfte nur sehr niedrige Titer zeigte. Das lässt sich mit einer Antikörperantwort auf die Impfung erklären, wohingegen die ungeimpfte Gruppe nur den kurzen Zeitraum seit der Infektion zur Antikörperproduktion zur Verfügung hatte. Allerdings zeigte die Gruppe, die mit KHV-T-AGP 2013 behandelt wurde, sehr heterogene Ergebnisse, einzelne Fische zeigten keine Immunantwort, andere schwankten zwischen hohen und nicht nachweisbaren Titern. GANGL (2008) entwickelte einen ELISA um Antikörper gegen KHV nachzuweisen. Sie konnte in Fischen aus Teichen, die laut Vorbericht KHV-Ausbrüche hatten, Antikörper nachweisen, wohingegen in definiert negativen Teichen das nicht gelang. Allerdings ging es in dieser Studie nur um den Nachweis positiver oder negativer Teiche, nicht um die Wirksamkeit einer Vakzine zu verifizieren. Auch RONEN et al. (2003) und SCHRÖDER et al. (2019) konnten nach einer Impfung Antikörper nachweisen, im Unterschied zu den hier getesteten Vakzinen verwendeten die Autoren eine attenuierte Lebendvakzine und einen von ihnen entwickelten ELISA zum Nachweis. Aber es konnte eine Korrelation zwischen hohen Titern und dem Überleben der Fische gezeigt werden. In unserem Experiment war das nicht möglich, da die Belastungsinfektion der zweiten Gruppenhälfte keine Erkrankung hervorrief, weder bei den geimpften noch bei den ungeimpften Tieren. Das Infektionsvirus wurde uns in ausreichender Menge vom FLI zur Verfügung gestellt und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert. Es war dieselbe Charge, die auch für die Infektion der ersten Gruppenhälfte verwendet wurde, ebenso lag der Infektiositätstiter beide Male bei 1.8×10^2 KID₅₀/ml Wasser. Ein Verlust der Infektiosität durch die längere Lagerung stellt eine mögliche Ursache dar, eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Infektiositätstiter des Infektionsbades zu gering war. Eine versehentliche Nicht-Infektion der Tiere kann durch die PCR-Ergebnisse ausgeschlossen werden. Hier wurde in allen Gruppen KHV-DNA nachgewiesen, also hat eine Virusaufnahme und Vermehrung stattgefunden. Die Schutzwirkung durch die Impfung, die vor einem Ausbruch der Infektion

bewahrt haben könnte, wird durch das Nicht-Erkranken der Kontrollgruppe unwahrscheinlich.

Auch bei der Infektion der ersten Gruppenhälfte erkrankte die ungeimpfte Kontrollgruppe nicht, wohingegen die geimpften Gruppen deutliche Symptome zeigten und auch verstarben. Eine Möglichkeit wäre auch hier, dass der Titer des Infektionsbades zu gering war um eine Infektion auszulösen. Allerdings könnten hier die vakzinierten Fische noch mit der Impfung und der nachfolgenden Immunantwort beschäftigt gewesen sein und somit empfindlicher auf die Belastungsinfektion reagieren. Ein weiterer Faktor bestärkt diese Interpretation, da viele der geimpften Tiere in der Sektion weiße, ölige Punkte in der Bauchhöhle aufwiesen. Diese erwiesen sich nach lichtmikroskopischer und molekularbiologischer Untersuchung als Adjuvans, in das noch Antigen eingebettet war. Das Vorliegen dieser Tropfen legt den Schluss nahe, dass eine unvollständige Antigenpräsentation die niedrigen bis nicht vorhandenen Antikörpertiter besonders in der mit KHV-T-AGP 2013 geimpften Gruppe erklärt. Ebenso bestätigt die Tatsache, dass die Tropfen in den zweiten Gruppenhälften mit einer dünnen Membran ummantelt waren, eine Entzündungsreaktion des Körpers, die eine erhöhte Empfindlichkeit der geimpften Fische zum ersten Infektionszeitpunkt wahrscheinlich macht. Gleichzeitig schließt das Vorhandensein dieser Tröpfchen eine unabsichtliche Nicht-Impfung der Tiere aus, da der Impfstoff in den Tieren nachgewiesen wurde. Die Prävalenz der Tröpfchen schwankt zwischen den beiden geimpften Gruppen von 33 % bei KHV-AGP 2012 und 93 % bei KHV-T-AGP 2013. Dies korreliert positiv mit dem Anteil des verwendeten Adjuvans von 50 % bei der KHV-AGP 2012 und 66 % bei der KHV-T-AGP 2013. Eine histologische Untersuchung des umliegenden Gewebes hinsichtlich einer Entzündungsreaktion erfolgte nicht. Unsere Interpretation dieser Befunde ist, dass der hohe Adjuvansanteil die Resorption der Impfstoffe verhindert hat und somit eine vollständige Antigenpräsentation unmöglich machte.

Die Belastungsinfektion erfolgte mittels Immersionsbad um den natürlichen Infektionsweg zu simulieren. Es wurde das Isolat „Israel“ verwendet welches infektiöser als das Isolat „Taiwan“ ist (GAO et al. 2018). Da die beiden getesteten Impfstoffe auf unterschiedlichen Isolaten beruhen, wollten wir testen, ob ein Immunschutz auch gegen andere als die Impfisolate entstehen kann und wenn ja zu welchem Grad. Aufgrund der hohen Homologie (> 99 %) der beiden Stränge sollte es einen übergreifenden Impfschutz geben (GAO et al.

2018). Da allerdings die jeweiligen Belastungsinfektionen scheiterten, kann hierzu keine Aussage getroffen werden.

Die Karpfen wurden sieben Tage nach Infektion euthanasiert und mittels qPCR auf das Vorhandensein von KHV-DNA untersucht. So wurde auch mit Fischen verfahren, die schon früher verstorben waren. Die Zeitspanne von sieben Tagen zwischen Infektion und Euthanasie wurde gewählt, da KHV eine kurze Inkubationszeit (zwei bis drei Tage WALSTER 1999; zwei bis fünf Tage PERLEBERG et al. 2005) aufweist und man davon ausgehen konnte, dass sich Krankheitssymptome bis zu diesem Zeitpunkt sicher zeigen und eine eventuell vorhandene Virusvermehrung im Karpfen stattgefunden hat. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zeitspanne nicht ausreichend war, dass alle Fische das Krankheitsbild ausbilden konnten. So nennt WALSTER 1999 auch einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen als mögliche Inkubationszeit.

Die für die PCR-Untersuchung notwendige Organentnahme erfolgte am gleichen Arbeitsplatz durch die gleiche Person, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Allerdings wurden die Fische für die Sektionen gesammelt und bis zur Sektion bei -20 °C tiefgefroren. Da auch das Virus bis zur Belastungsinfektion bei dieser Temperatur gelagert wurde, ist eine Beeinträchtigung des Virus durch das Einfrieren und Auftauen unwahrscheinlich. Darüber hinaus wurden die entnommenen Organe bis zur Aufbereitung bei -80 °C gelagert. Die entnommenen Organe waren Teile der Kieme, eine Niere, das Gehirn, Teile der Milz, ein Teil des Darms und Teile der Leber, da aus diesen Organen in früheren Studien das Virus isoliert werden konnte (HEDRICK et al., 2000; GILAD et al. 2004). Für die anschließende PCR-Untersuchung wurden nur Kiemen und Nieren ausgewählt, da diese Organe die Hauptmanifestationen des KHV sind (HEDRICK et al. 2000; BRETZINGER 1999) und insbesondere in der Kieme die höchsten Viruslasten nachgewiesen werden konnten (GILAD et al. 2004).

Vor der Infektion starben 30 Fische, von denen 11 positiv auf KHV-DNA getestet wurden. Diese Fische gehörten zu den geimpften Gruppen, was den Schluss nahelegt, dass es sich um den Nachweis von Impf-DNA handelt, zumal es sehr geringe Kopienzahlen waren. Krankheitssymptome wurden nicht beobachtet. Die ungeimpfte Kontrollgruppe war durchweg negativ vor den Infektionen, was die Einstufung des Betriebes als KHV-unverdächtig untermauert.

Die typischen Krankheitssymptome wie Enophthalmus, Kiemennekrosen und Hautveränderungen konnten bei vielen Fischen nach der Infektion nachgewiesen werden, allerdings sind nur die eindeutigen aufgelistet. Es besteht die Möglichkeit, dass Fische mit Hautveränderungen oder Enophthalmus übersehen wurden, da dies auch Anzeichen einer fortgeschrittenen Autolyse sind. Die Aquarien wurden zweimal täglich (morgens und früher Abend) kontrolliert und tote Fische entfernt. Ein am Abend gestorbener Fisch kann also bis zu 14 Stunden im Wasser liegen bis er am Morgen entfernt und eingefroren wird, was autolytische Vorgänge begünstigt.

In 93 % der infizierten Fische wurde KHV-DNA nachgewiesen, womit bestätigt ist, dass eine Infektion stattgefunden hat. Ebenso waren die Kopienzahlen erheblich höher als der Titer im Infektionsbad. Daraus folgt, dass eine Vermehrung des Virus im Fisch stattgefunden hat. Hierbei brachte die Impfung keine Reduktion der Kopienzahlen, was eine Verminderung der Virusvermehrung und daraus resultierend der Viruslast bedeutet hätte. Im Gegenteil wiesen die Fische, die mit KHV-AGP 2012 vakziniert wurden, zum ersten Infektionszeitpunkt signifikant höhere Kopienzahlen auf als die ungeimpfte oder die mit KHV-T-AGP 2013 behandelte Gruppe. Diese Fakten kann man wieder zurückführen auf die durch die ungenügende Resorption des Impfstoffes resultierende Entzündungsreaktion und eine daraus entstandene Belastung für das Immunsystem der Karpfen.

5.2 Versuch 2014

Aufbauend auf den Ergebnissen des vorhergegangenen Versuchs 2013 wurden im Versuchsaufbau 2014 einige Änderungen vorgenommen.

Der Impfstoff wurde vorher einer Unbedenklichkeitsüberprüfung in unserem Institut unterzogen. Im Versuch 2013 wurden diese extern durchgeführt.

In der Studie wurden 4 Gruppen gebildet, darunter eine komplett unbehandelte und uninfizierte Hälterungskontrollgruppe. Diese sollte, wie der Name sagt, Mängel in der Hälterung aufzeigen. Eine weitere Neuerung war die Adjuvanskontrollgruppe. Basierend auf den Sektionsbefunden in 2013, wurde diese Gruppe etabliert um zu überprüfen, wie sich die Adjuvansapplikation im Karpfen verhält und eventuelle positive Aspekte, wie in Studien mit anderen Adjuvantien an asiatischen Welsen belegt, auf die Immunantwort der Karpfen aufzudecken (KUMARI & SAHOO 2006).

Zusätzlich wurden in jeder Gruppe zehn Fische für Titerverlaufskontrollen beprobt, ab Infektionszeitpunkt handelte es sich immer um die gleichen Tiere. Somit sollte ein möglicher Antikörperanstieg protokolliert und gleichzeitig der Effekt der Belastungsinfektion abgeschätzt werden. Auch könnte so die Belastbarkeit eines Titors überprüft werden. Da die KHV-AGP 2014 unseren Ergebnissen zufolge nicht in der Lage war, Antikörper zu induzieren, können wir keine Aussagen über Titer-Verläufe oder die Belastbarkeit eines Titors im Falle einer Infektion treffen.

Der Impfstoff wurde aus den Restbeständen der Impfstoffe des Versuchs 2013 zusammengestellt. Da die KHV-AGP 2012 bereits mit dem Adjuvans vermischt war, wurde von der KHV-T-AGP nur die Antigenpräparation verwendet, ohne das zusätzliche Adjuvans. Somit kam die KHV-AGP 2014 auf den im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch deutlich niedrigeren Adjuvansgehalt von 16 %. Der Wert wurde rechnerisch ermittelt und wurde durch die noch vorhandenen Bestände determiniert. Diese Vorgehensweise war aus den Ergebnissen von 2013 abgeleitet, bei denen wir vermuteten, dass die hohen Adjuvanskonzentrationen eine ausreichende Antigenpräsentation verhinderten und zu den öligen Tropfen in den Bauchräumen der Fische führten.

Unsere Hypothese bestätigte sich insofern, dass mit der niedrigeren Adjuvanskonzentration keine derartigen Sektionsbefunde, weder bei der geimpften, noch bei der Adjuvanskontrollgruppe, auftraten.

Der Zeitpunkt der Belastungsinfektion lag, wie im ersten Versuch, bei 60 d *p. vacc.*, da wir keinen Anhaltspunkt hatten, die Zeitspanne auf die von BAUR, BRÄUER und RAPP postulierten 20 bis 30 Tage zu verkürzen. Außerdem erhofften wir uns somit einen deutlich sichtbaren Antikörperanstieg etwa ab Tag 25 *p. vacc.*. Dieser blieb aus, stattdessen konnten ab dem Infektionszeitpunkt ansteigende Titer in den Gruppen A (geimpft, infiziert) und B (Adjuvans, infiziert) beobachtet werden. Ein solcher Anstieg ist als von der Infektion verursacht zu betrachten und hat höchstwahrscheinlich nichts mit der vorhergegangenen Behandlung zu tun. Ebenso waren es nur noch sehr wenige Tiere, die für die Probennahme zur Verfügung standen. Dadurch besteht keine statistische Aussagekraft der Werte.

Allerdings wurde 2014 die Zeitspanne zwischen Belastungsinfektion und Euthanasie auf 21 Tage ausgeweitet um eine ausreichend lange Inkubationszeit zu gewährleisten. Mit dieser Zeit lagen wir in den von WALSTER 1999 festgestellten zwei bis drei Wochen. Im Versuch 2014 zeigte das Infektionsvirus eine deutliche Wirksamkeit, die unbehandelte

DISKUSSION

Viruskontrollgruppe war am 8 dpi vollständig verstorben und die Tiere wiesen hohe Gehalte an KHV-Antigen in den Organproben auf. Die verendeten Karpfen zeigten deutliche Symptome einer KHV-Infektion, was auch die Wirksamkeit des Infektionsvirus untermauert. Auch die Fische der geimpften und der Adjuvanskontroll-Gruppe erkrankten schwer und entwickelten die oben beschriebenen Symptome. Die Ausprägung und die Häufigkeit unterschieden sich nicht von den Werten der Viruskontrollgruppe, was den Schluss nahelegt, dass die verwendete Antigenpräparation keine protektive Wirkung hat. Ebenso wenig wie die Behandlung mit Adjuvans. Allerdings gab es sowohl in der geimpften (zwei) als auch in der Adjuvanskontrollgruppe (sechs) Karpfen, die die Belastungsinfektion bis zum Ende des Versuches überlebt haben. Diese Werte sprechen für 6 % Überlebende mit der Impfung und 17 % Überlebende mit der Adjuvansbehandlung. Da, wie weiter oben bereits erwähnt, keine protektiven Antikörper vor der Infektion nachweisbar waren, sprechen diese Ergebnisse für einen Schutz, der durch die unspezifische Stimulation des Immunsystems durch das Adjuvans ausgelöst wurde, nicht für einen antikörperinduzierten Schutz.

Von den vor der Belastungsinfektion verstorbenen oder euthanasierten Fischen wiesen nur drei Karpfen sehr geringe KHV-Antigengehalte auf. Da alle drei Fische zur geimpften Gruppe gehörten, liegt auch hier, wie im Versuch 2013, der Schluss nahe, dass es sich um Nachweise des Impfantigens handelt.

Auffällig war in diesem Versuch, dass die sechs verbliebenen Fische der Hälterungskontrollgruppe zwei Tage vor Versuchsende plötzlich verstarben. Dafür konnte keine Ursache ermittelt werden, die Karpfen wiesen keine äußerlich sichtbaren Symptome auf, waren bei der Sektion unauffällig und die Organproben blieben, wie die gesamte Gruppe während des Versuchsverlaufes, negativ in der KHV-realtime-PCR. Die von uns kontrollierten Wasserwerte (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Nitritgehalt) waren unauffällig. Weiterführende Diagnostik wurde aufgrund der fehlenden Anhaltspunkte nicht durchgeführt.

Zur Antikörperdetektion wurde ein Serumneutralisationstest verwendet, der uns von Dr. Bergmann zur Verfügung gestellt wurde. Zum Start dieser Studien gab es keinen kommerziell erhältlichen oder für uns erreichbaren ELISA zum Nachweis von KHV-Antikörpern. Somit war der SNT trotz des hohen Arbeitsaufwandes mit Anzucht in Zellkultur und der Anfälligkeit für toxisches Serum das Mittel der Wahl und Dr. Bergmann stellte uns sein von ihm entwickeltes Protokoll zu Verfügung, dass aufgrund der besseren Vergleichbarkeit auch im Versuch 2014 verwendet wurde. Eine Absicherung der Ergebnisse mit in anderen Studien entwickelten

ELISAs (RONEN et al. 2003; ADKINSON et al. 2005; GANGL 2008, SCHRÖDER et al. 2019) erfolgte nicht. Der verwendete Cut-off Wert von 1:8 war in der Testvorschrift angegeben. Ein Vergleich mit den OD- (optische Dichte) Werten der ELISAs von RONEN et. al. 2003 konnte aufgrund der fehlenden Rohdaten nicht erfolgen.

5.3 Zusammenfassende Beurteilung

Keine der drei getesteten inaktivierten Antigenpräparationen konnte in unserem Versuch einen wirksamen Schutz gegen die Infektion mit KHV induzieren. Auch eine Abschwächung des Krankheitsverlaufes oder der Virusreplikation wurde nicht beobachtet. Lediglich eine schwache Unterstützung der Fische zeigte sich in der Gruppe, die nur das Adjuvans erhalten hatte, da hier die meisten Überlebenden zu verzeichnen waren. Deshalb stellen die drei getesteten AGPs keine wirksamen Werkzeuge für die Bekämpfungs- und Sanierungsprogramme in Sachsen dar. BOOTLAND et al. (1995) verwendeten eine inaktivierte Vakzine zur Immunisierung von erwachsenen Bachforellen gegen das infektiöse Pankreasnekrose-Virus. Dabei konnte die Erkrankung nur abgeschwächt werden und die Fische wurden trotz der Impfung zu Carriern und schieden das Virus aus. Diese Gefahr könnte auch bei einer inaktivierten AGP gegen KHV bestehen.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse sind weitere Forschungen auf diesem Gebiet notwendig bis eine sichere und wirksame Vakzine gegen KHV marktreif ist. Eine solche Vakzine könnte dann auch die Sanierungsprogramme effektiv unterstützen. Die Doppeldeletionsmutanten-Vakzine als nicht mehr infektiöse Lebendvakzine stellt im Moment einen der vielversprechendsten Kandidaten dar (SCHRÖDER et al. 2019). Auch stellte sich in unseren Versuchen die Applikationsmethode (intraperitoneale Injektion) als sehr arbeits- und zeitaufwändig dar. Eine Impfung, die über Futter (MIYAZAKI et al. 2008a, MIYAZAKI et al. 2008b, ZHOU et al. 2014a, ZHOU et al. 2014b) oder noch besser über das Wasser als Immersionsvakzine, wie bei der Doppeldeletionsmutante angewandt, verabreicht werden kann, wäre wirtschaftlich gesehen von noch höherem Nutzen als eine Injektionsvakzinierung (BRUDESETH et al. 2013, BØGWALD et al. 2019, SCHRÖDER et al. 2019). Auch der Weg, ganz ohne Impfung vorzugehen und sich auf die Zucht resistenter Linien zu verlagern, könnte ein Ansatz sein. Möglich wäre auch eine Kombination aus resistenterer Linie und wirksamer Impfung (SHAPIRA et al. 2005, TADMOR-LEVI et al. 2017).

DISKUSSION

Der Ansatz von REICHERT et al. (2017), die antivirale Wirkung von Exopolysacchariden gegen das KHV zu nutzen, ist nach den *in vitro* Ergebnissen vielversprechend, allerdings aufgrund der Beschränkung, der anzeigepflichtige Tierseuchen unterliegen, nur als unterstützende oder vorbeugende Maßnahme geeignet und nicht als Behandlung.

Eine Sanierung betroffener Betriebe ohne Impfung oder spezielle Zuchtlinien ist möglich und wird in Sachsen mit verschiedenen Sanierungsprogrammen erreicht. 2016 konnten die ersten zwei Betriebe in die Kategorie I aufgenommen werden (BRÄUER & BÖTTCHER 2016).

6 Zusammenfassung

Theresa Maria Anna Schmid

Wirksamkeitsüberprüfung dreier inaktivierter Koi-Herpes Virus-Antigenpräparationen gegen eine Belastungsinfektion bei Karpfen

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im September 2021

71 Seiten, 6 Abbildungen, 9 Tabellen, 166 Literaturstellen, Anhang

Schlüsselwörter: Koi-Herpes Virus, inaktivierte Antigenpräparation, Belastungsinfektion

Einleitung

Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität verursachen in der Speisefischproduktion weltweit erhebliche wirtschaftlichen Schäden, insbesondere die Infektion mit dem Koi-Herpes Virus (KHV). Da keine geeigneten Behandlungsmöglichkeiten bestehen, stellt ein wirksamer Impfstoff die einzige Möglichkeit dar, einen Bestand zu schützen.

Ziel der Studie

Drei inaktivierte Antigenpräparationen (AGPs) wurden in zwei aufeinanderfolgenden Experimenten mittels Belastungsinfektionen in kontrollierter Umgebung auf ihre Wirksamkeit als Impfstoff gegen KHV getestet.

Tiere, Material und Methoden:

Es wurden insgesamt 360 Karpfen aus kommerziellen Herkunftsbetrieben verwendet, aufgeteilt in verschiedene Testgruppen. Getestet wurden drei AGPs in zwei Experimenten, die KHV-AGP 2012 (Isolat „Israel“), die KHV-T-AGP 2013 (Isolat „Taiwan“) und die KHV-AGP 2014 (Isolate „Israel“ und „Taiwan“), jeweils mit Adjuvans.

Als Kriterien für die Wirksamkeit galten: das Auftreten von Symptomen, das Überleben des Untersuchungszeitraumes, der Virusgenomgehalt in Kieme und Niere und die Bildung von neutralisierenden Antikörpern.

Experiment 1: Drei Testgruppen i. vakziniert mit KHV-AGP 2012, ii. vakziniert mit KHV-T-AGP 2013 und iii. Viruskontrollgruppe (VKG). Belastungsinfektion war 60 Tage nach der Impfung (*d p.vacc.*) für die ersten Hälfte jeder Teilgruppe und 120 *d p.vacc.* für die zweite Hälfte. Die Euthanasie war immer 7 Tage nach der Infektion (*dpi*). Zur Bestimmung des

ZUSAMMENFASSUNG

neutralisierenden Antikörpertiters mittels Serumneutralisationstest (SNT) erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten Blutentnahmen in den zweiten Teilgruppen.

Experiment 2: Vier Testgruppen i. vakziniert mit KHV-AGP 2014 und infiziert, ii. mit Adjuvans behandelt und infiziert, iii. VKG und iv. unbehandelte Hälterungskontrollgruppe. Die Belastungsinfektion erfolgte 60 d *p.vacc.*, die Euthanasien 7 dpi, 14 dpi und 21 dpi. Die Blutproben für die SNT-Untersuchung wurden 10 Tieren jeder Gruppe im wöchentlichen Abstand entnommen. In beiden Experimenten fand eine Sektion verendeter oder getöteter Tiere mit Entnahme von Kieme und Niere zur Untersuchung auf Virusgenomgehalt mittels quantitativer realtime PCR (Polymerase Kettenreaktion) statt. Die statistische Auswertung erfolgte zuerst mit dem Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben, anschließend wurden mit dem Mann-Whitney-U Test die signifikanten Unterschiede untersucht.

Ergebnisse

Im ersten Experiment wiesen nur die geimpften Testgruppen, die 60 d *p.vacc.* infiziert wurden, Symptome einer KHVD auf, die VKG und alle andern drei Teilgruppen (Infektion 120 d *p.vacc.*), blieben klinisch unauffällig. Im zweiten Experiment entwickelten alle infizierten Versuchsgruppen klinische Symptome. In allen infizierten Gruppen wurden teils hohe Kopienzahlen ($>10^6$ Kopien/ 5 μ l Template) mittels PCR detektiert. Mit zwei Ausnahmen, bei denen die geimpften Gruppen signifikant höhere Kopienzahlen aufwiesen als die VKG (Experiment 1, Infektion 60 d *p.vacc.* und Experiment 2, Euthanasie 14 dpi), gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen geimpften Gruppen und den VKGs. Die SNT-Untersuchungen ergaben nur niedrige neutralisierende Antikörpertiter im ersten Experiment, im zweiten Experiment einen Anstieg erst nach der Belastungsinfektion.

Schlussfolgerung

Beide Experimente zeigten weder eine Verringerung des Gehaltes an viraler DNA im Fischgewebe noch einen Anstieg der neutralisierenden Antikörper bei den geimpften Gruppen im Vergleich zu den ungeimpften Gruppen. Beim Auftreten der Symptome ergab sich kein einheitliches Bild, da teilweise nur die geimpften Gruppen erkrankten, gar keine Gruppe erkrankte, oder keine Unterschiede im Verlauf erkennbar waren. Die Überlebensraten waren ebenso indifferent. Daher ist weitere Forschung notwendig, der Fokus sollte zum Beispiel auf neuen Lebendvakzinen, DNA-Vakzinen, der Zucht von resistenten Karpfenlinien oder in einer Kombination dieser Möglichkeiten liegen.

7 Summary

Theresa Maria Anna Schmid

Efficacy assessment of three inactivated koi herpes virus antigen preparations against experimental challenge virus infection in common carp

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Submitted September 2021

71 pages, 6 figures, 9 tables, 166 references, appendix

Key words: koi herpes virus, inactivated antigen preparation, challenge infection

Introduction

Infections with high morbidity and mortality cause considerable economic loss in the production of edible fish, especially the infection with koi-herpesvirus (KHV). As there is no suitable treatment, an effective vaccination is the only way to protect a stock from infection.

Aim of the study

Three inactivated antigen preparations (AGPs) were tested for their efficacy as a vaccine against an infection with KHV by experimental challenge infection. Two studies were performed in controlled surroundings.

Animals, material and methods:

360 carp were purchased from commercial farms and afterwards divided in different groups. For the studies, three AGPs were used, KHV-AGP 2012 (isolate "Israel"), KHV-T-AGP 2013 (isolate "Taiwan") and KHV-AGP 2014 (isolates "Israel" and "Taiwan), all are with adjuvant. The AGPs were judged in two different studies regarding their efficacy. The criteria were the appearance of symptoms, surviving the investigation period, the load of viral genome in kidney and gill and the production of neutralising antibodies.

Study 1: There were three groups, i. vaccinated with KHV-AGP 2012, ii. vaccinated with KHV-T-APG 2013 and iii. virus control group. Challenge infection took place 60 days after vaccination (*d p.vacc.*) for the first half of each group, for the remaining part 120 *d p.vacc.* Euthanasia was always seven days after infection (*dpi*). To determine the titre of neutralising antibodies by serum neutralisation test (SNT), blood samples were taken from groups infected 120 *d p.vacc.*, at different points of time.

SUMMARY

Study 2: There were four groups, i. vaccinated and infected group, ii. adjuvant treated and infected group, iii. virus control group and iv. a group which was completely untreated. The challenge infection was 60 d *p.vacc.*, the euthanasia took place 7 dpi, 14 dpi and 21 dpi. During the whole study, blood samples were taken in weekly intervals from ten marked fish in each group for SNT.

In both studies, there was a dissection of killed or perished carp with extraction of gills and kidney. These were tested for the amount of KHV-genome using quantitative realtime PCR (polymerase chain reaction).

Statistical evaluation was done first with Kruskal-Wallis-test for independent samples, then tested with Mann-Whitney-U Test for significant differences.

Results

In the first study, only the vaccinated groups infected 60 d *p.vacc.* developed clinical signs of KHV, the virus control group and all groups infected 120 d *p.vacc.* stayed clinically healthy.

In contrast, all infected groups in the second study developed clinical signs of KHVD.

PCR revealed high copy numbers (up to $> 10^6$ copies/ 5 μ l template) in all infected groups of both studies. With two exceptions, where the vaccinated groups showed significant higher copy number than the virus control groups (study 1, infection 60d *p.vacc.* and study 2, euthanasia 14 dpi), there were no significant differences between vaccinated and virus control groups.

Neutralising antibodies could be detected with only low titres in the first study. The vaccination in the second study failed to induce antibody production before challenge infection.

Conclusion

Both studies revealed neither a reduction of copy numbers nor an increase of neutralizing antibody titres in vaccinated compared to unvaccinated groups. The appearance of symptoms was variable, as partially only the vaccinated groups got sick, no group got sick, or no difference in the development could be detected. Survival rates were also indifferent. Further research in vaccination against KHV is needed, but inactivated AGPs do not seem to reach the desired results. The focus should be e.g. on live vaccines, DNA-vaccines, breeding resistant carp lines or in a combination of these methods.

8 Literaturverzeichnis

- Adamek M, Oschilewski A, Wohlsein P, Jung-Schroers V, Teitge F, Dawson A et al. 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(1):12.
- 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(2):53–62.
- Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton JR. Spring viremia of carp (SVC). *Dis. Aquat. Org.* 2002; 52:261–72.
- Anon. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011.; 2011 [Stand: 10.01.2017].
- Anon. Durchführungsverordnung (EU) 2018/ 1882 der Kommission - vom 3. Dezember 2018 - über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen; 2018
- Anon. DVG-Desinfektionsmittelliste für den Tierhaltungsbereich: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG); 21.08.2017a [Stand: 27.09.2017]. Verfügbar unter: http://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste_TH.pdf.
- Anon. Gemeinsames Programm des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und der Sächsischen Tierseuchenkasse zur Prophylaxe und Bekämpfung der Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV) in sächsischen Fischhaltungsbetrieben. *SächsABl.* 2006, Nr. 27, S. 632; 23.03.2006a
- Anon. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department. *FAO Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics Summary tables: Food and Agriculture Organization of the United Nations*; 2014 [Stand: 18.08.2016]. Verfügbar unter: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>.
- Anon. Hinweise und Empfehlungen zur Desinfektion in der Fischzucht: Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; 03/2007 [Stand: 05.10.2017].
- Anon. ICTV 9th Report: International Committee on Taxonomy of Viruses; 2011 [Stand: 11.01.2021]. Verfügbar unter: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/89/herpesvirales.

LITERATURVERZEICHNIS

- Anon. Karpfenbericht 2005. Deutschland: Referat –521- Fischwirtschaft; 2005 [Stand: 01.04.2016].
- Anon. Koi herpesvirus disease. In: World Organisation for Animal Health (OIE), Hrsg. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals; 2017b.
- Anon. Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I): Friedrich-Loeffler-Institut; 4/2015. Amtliche Methodensammlung [Stand: 18.08.2016]. Verfügbar unter: www.fli.bund.de.
- Anon. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals; 2017b.
- Anon. Report of the meeting of the OIE aquatic animal health standards commission. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE); 2007a [Stand: 18.12.2016].
- Anon. Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten.; 2006b [Stand: 08.04.2016].
- Anon. Verordnung (EG) Nr. 1198/2006 DES RATES vom 27. Juli 2006 über den europäischen Fischereifonds; 27.06.2006c [Stand: 05.08.2022].
- Anon. Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“); 2016b.
- Anon. Virus Taxonomy: 2019 Release: International Committee on Taxonomy of Viruses; 2019 [Stand: 08.01.2020]. Verfügbar unter: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
- Anon. Untersuchungen zur Koi-Herpesvirus-Infektion: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und Geologie; 2011 34.
- Anon. Programm des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Gesellschaftlichen Zusammenhalt und der Sächsischen Tierseuchenkasse zur risikobasierten Überwachung und freiwilligen Bekämpfung der Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV-I) der Karpfen in sächsischen Aquakulturbetrieben (KHV-Programm); 11.11.2021. Verfügbar unter: www.revosax.sachsen.de.
- Anon. Wirtschaftsbereiche - Fischerei - Fischerei - Statistisches Bundesamt (Destatis); 2016a [Stand: 18.08.2016]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/Fischerei/Tabellen/AquaBetriebeMenge.html>.
- Anon. Tiergesundheitsjahresbericht 2017: Friedrich-Loeffler-Institut; 2017.
- Aoki T, Hirano I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A et al. 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(10):5058–65.

- Baltimore D. Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* 1971; 35(3):235–41.
- Bartl S, Baltimore D, Weissman IL. Molecular evolution of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91(23):10769–70.
- 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(2):101–8.
- Baur WH, Bräuer G, Rapp J, Hrsg. *Nutzfische und Krebse: Lebensraum, Erkrankungen und Therapie.* 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010.
- Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M et al. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.* 2005; 5:13.
- Bergmann SM, Fischer U. Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I) - koi herpesvirus disease of common carp (KHVD). In: Friedrich-Loeffler-Institut, Hrsg. *Tiergesundheitsjahresbericht 2017;* 2017. S. 83–89.
- 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. of Eur. Associ. of Fish Pathol.* 2006; 26(6).
- Bergmann SM, Lutze P, Schütze H, Fischer U, Dauber M, Fichtner D et al. Goldfish is a susceptible species for KHV but not for KHV disease. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 2010a; 30(2).
- Bergmann SM, Riechardt M, Fichtner D, Lee P, Kempter J. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. *J. Virol. Methods* 2010c; 163(2):229–33.
- Bergmann SM, Sadowski J, Kiełpiński M, Bartłomiejczyk M, Fichtner D, Riebe R et al. 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.* 2010b; 33(3):267–72.
- Bergmann SM, Schütze H, Fischer U, Fichtner D, Riechardt M, Meyer K et al. Detection of koi herpes virus genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 2009; 25(5).
- Bergmann SM, Wang Q, Zeng W, Li Y, Wang Y, Matras M et al. Validation of a KHV antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Fish Dis.* 2017; 40(11):1511–27.
- Beswick TS. The origin and the use of the word herpes. *Med. Hist.* 1962; 6:214–32.
- Body A, Loeffrig F, Charlier G, Collard A. Isolation of Virus-Like Particles From Koi (*Cyprinus carpio*) Suffering Gill Necrosis. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 2000; 20(2):87–8.

- Bøggwald J, Dalmo RA. Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorg.* 2019; 7(12).
- Boivin G, Coulombe Z, Rivest S. Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16(1):29–43.
- Bootland LM, Dobos P, Stevenson R. M. W. Immunization of adult brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state. *J. Fish Dis.* 1995; 18:449–58.
- Borghans JAM, Noest AJ, Boer RJ de. How specific should immunological memory be? *J. Immunolog.* 1999; 163(2):569–75.
- Boutier M, Ronsmans M, Ouyang P, Fournier G, Reschner A, Rakus K et al. Rational development of an attenuated recombinant cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and in vivo bioluminescent imaging. *PLoS Pathog* 2015; 11(2):e1004690.
- Bräuer G, Böttcher K. Deutschlands erste Teichwirtschaften in Sachsen als KHV-frei zugelassen: Sächsische Tierseuchenkasse; 2016 [Stand: 17.08.2022]. Verfügbar unter: <https://www.tsk-sachsen.de/index.php/de/tiergesundheitsdienste/fischgesundheit/veroeffentlichungenfisch/226-deutschlands-erste-teichwirtschaften-in-sachsen-als-khv-frei>.
- Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Oumouna M, Hoffmann R, Truyen U. Mass mortalities in koi carp associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 1999; 19(5).
- Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1(2):142–9.
- Brudeseth BE, Wiulsrød R, Fredriksen BN, Lindmo K, Løkling K-E, Bordevik M et al. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 35(6):1759–68.
- Cabon J, Louboutin L, Castric J, Bergmann SM, Bovo G, Matras M et al. Detection of antibodies specific to koi herpesvirus (KHV) by serum neutralization test. In: 17th International Conference on Diseases of Fish And Shellfish: Abstract book; 2015. S. 115.
- Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL. Monoclonal Antibodies to Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Analysis of Viral Epitopes and Comparison of Different Isolates. *J. Gen. Virol.* 1986; 67:2193–205.
- Cipriano RC. Antibody against infectious salmon anaemia virus among feral Atlantic salmon (*Salmo salar*). *ICES J. Mar. Sci.* 2009; 66:865–70.

- Corbel MJ. The immune response in fish: A review. *J. Fish Biol.* 1975; 7(4):539–63.
- Costes B, Fournier G, Michel B, Delforge C, Raj VS, Dewals B et al. Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in *Cyprinus carpio* koi. *J. Virol.* 2008:4955–64.
- Costes B, Raj VS, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L et al. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.* 2009; 83(7):2819–30.
- Dasgupta S. Release herpes virus to kill invasive carp in Australia, groups urge; 2016 [Stand: 27.09.2017]. Verfügbar unter: <https://news.mongabay.com/2016/01/release-herpes-virus-to-kill-invasive-carp-in-australia-groups-urge/>.
- Davison AJ. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 2002; 86(1-2):69–88.
- Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S et al. Detection of Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus in Fish Droppings. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(11):7285–91.
- Dong C, Li X, Weng S, Xie S, He J. Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China. *Vet. Microbiol.* 2013; 162(1):239–44.
- Eide K, Miller-Morgan T, Heidel J, Bildfell R, Jin L. Results of total DNA measurement in koi tissue by Koi Herpes Virus real-time PCR. *J. Virol. Methods* 2011a; 172(1-2):81–4.
- Eide KE, Miller-Morgan T, Heidel JR, Kent ML, Bildfell RJ, Lapatra S et al. Investigation of koi herpesvirus latency in koi. *J. Virol.* 2011b; 85(10):4954–62.
- Ellis AE. Differences Between the Immune Mechanisms of Fish and Higher Vertebrates. In: Roberts RJ, Hrsg. *Microbiological Diseases of Fish*. London: Academic Press; 1982. S. 1–29 (Special Publications of the Society for General Microbiology; Bd. 9).
- Ellis AE. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* 1977; 11(5):453–91.
- El-Matbouli M, Soliman H. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.* 2011; 90(3):536–9.
- Embregts CWE, Rigaudeau D, Veselý T, Pokorová D, Lorenzen N, Petit J et al. Intramuscular DNA Vaccination of Juvenile Carp against Spring Viremia of Carp Virus Induces Full Protection and Establishes a Virus-Specific B and T Cell Response. *Front. Immunol.* 2017; 8:1340.
- European Association of Fish Pathologists, Hrsg. 17th International Conference on Diseases of Fish And Shellfish: Abstract book; 2015.

- Fabian M, Baumer A, Steinhagen D. Do wild fish species contribute to the transmission of koi herpesvirus to carp in hatchery ponds? *J. Fish. Dis.* 2013; 36(5):505–14.
- Fournier G, Boutier M, Stalin Raj V, Mast J, Parmentier E, Vanderwalle P et al. Feeding *Cyprinus carpio* with infectious materials mediates cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa. *Vet. Res.* 2012; 43:6.
- Fraser NC, Lawrence* WC, Wroblewska Z, Gilden DH, Koprowski Hilary. Herpes simplex type 1 DNA in human brain tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1981; 78(10):6461–5.
- Fuchs W, Fichtner D, Bergmann SM, Mettenleiter TC. Generation and characterization of koi herpesvirus recombinants lacking viral enzymes of nucleotide metabolism. *Archives Virol.* 2011; 156(6):1059–63.
- Füllner G, Bräuer G, Mohr C. KHV-Sanierung im Freistaat Sachsen: Sächsische Tierseuchenkasse; 2009 [Stand: 17.08.2022]. Verfügbar unter: <https://www.tsk-sachsen.de/index.php/de/tiergesundheitsdienste/fischgesundheit/veroeffentlichungenfisch/216-khv-sanierung-im-freistaat-sachsen>.
- Füllner G, Steinhagen D, Baumer A, Fabian M, Runge M. Untersuchung zu Infektionswegen der Koi-Herpesvirus-Erkrankung von Karpfen und Untersuchungen zur Auswirkung von KHV-Bekämpfungsmaßnahmen auf Ökonomie und Ökologie. In: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und Geologie, Hrsg. Untersuchungen zur Koi-Herpesvirus-Infektion; 2011. S. 2–13.
- Füllner G, Pfeifer M, Langner N. Karpfenteichwirtschaft: Bewirtschaftung von Karpfenteichen Gute fachliche Praxis; 1/2007 [Stand: 01.04.2016]. Verfügbar unter: www.landwirtschaft.sachsen.de/lfl.
- Galloway DA, Fenoglio CM, Mcdougall JK. Limited Transcription of the Herpes Simplex Virus Genome When Latent in Human Sensory Ganglia. *J. Virol.* 1982; 41(2):686–91.
- Gangl C. Nachweis von Antikörpern gegen das Cyprine Herpesvirus-3(CyHV-3) bei Karpfen(*Cyprinus carpio*) mittels ELISA [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2008.
- Gao Y, Suárez NM, Wilkie GS, Dong C, Bergmann S, Lee P-YA et al. Genomic and biologic comparisons of cyprinid herpesvirus 3 strains. *Vet. Res.* 2018; 49(1):40.
- Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H et al. 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(Pt 10):2661–7.

- Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkinson MA, Zlotkin A, Bercovier H et al. 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; 48:101–8.
- 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; 60:170–87.
- Gotesman M, Kattlun J, Bergmann SM, El-Matbouli M. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Dis. Aquat. Org.* 2013; 105(2):163–74.
- Granzow H, Fichtner D, Schütze H, Lenk M, Dresenkamp B, Nieper H et al. Isolation and partial characterization of a novel virus from different carp species suffering gill necrosis - ultrastructure and morphogenesis. *J. Fish Dis.* 2014; 37(6):559–69.
- 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(3):171–8.
- Grinde B. Herpesviruses: Latency and reactivation – viral strategies and host response. *J. Or. Microbiol.* 2013; 5(1):22766.
- Gunimaladevi I, Venugopal MN, Sakai M, Kono T. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio L.*, by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.* 2004; 27(10):583–9.
- Haenen, O. L. M., Way K, Bergmann SM, Ariel E. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 2004; 24(6).
- Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish. *Viruses* 2011; 3(11):2160–91.
- Hartman KH, Yanong RPE, Pouder DB, Petty BD, Francis-Floyd R, Riggs AC et al. Koi Herpesvirus Disease (KHVD) 2013.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW et al. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J. Aquat. Anim. Health* 2000; 12(1):44–57.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun SC, McDowell TS, Waltzek TB, Kelley GO et al. Initial Isolation and Characterization of a Herpes-like Virus (KHV) from Koi and Common Carp. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl.* 2005; (2):1–7.
- Hedrick RP, Waltzek TB, McDowell TS. Susceptibility of Koi Carp, Common Carp, Goldfish, and Goldfish × Common Carp Hybrids to Cyprinid Herpesvirus-2 and Herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health* 2006; 18(1):26–34.

- Hutoran M, Ronen A, Perelberg A, Ilouze M, Dishon A, Bejerano I et al. Description of an as Yet Unclassified DNA Virus from Diseased *Cyprinus carpio* Species. *J. Virol.* 2005; 79(4):1983–91.
- Huttenhuis HBT, Grou CPO, Taverne-Thiele AJ, Taverne N, Rombout, Jan H W M. Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20(4):586–96.
- 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(5):885–92.
- Ito T, Sano M, Kurita J, Yuasa K, Iida T. Carp Larvae Are Not Susceptible to Koi Herpesvirus. *Fish Pathol.* 2007; 42(2):107–9.
- Iwanowski. Merkblatt Koi-Herpesvirus-Infektion: Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt; 08/2013 [Stand: 05.02.2016]. Verfügbar unter: http://www.mlu.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MLU/MLU/kontextmenue/13_08_09_KHV-Merkblatt_Version2_65-2.pdf.
- Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F, Hellmann J, Bergmann SM, Schütze H et al. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC Vet. Res.* 2015; 11:114.
- Kasai H, Muto Y, Yoshimizu M. Virucidal Effects of Ultraviolet, Heat Treatment and Disinfectants against Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.* 2005; 40(3):137–8.
- Kempton J, Sadowski J, Schütze H, Fischer U, Dauber M, Fichtner D et al. Koi Herpes Virus: Do Acipenserid Restitution Programs Pose a Threat to Carp Farms in the Disease-Free Zones? *Acta Ichth et Piscat* 2009; 39(2):119–26.
- Kielpinski M, Kempton J, Panicz R, Sadowski J, Schütze H, Ohlemeyer S et al. Detection of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 2010; 62(1):28–37.
- Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2(4):256–67.
- Koch S, Walther H. Neufassung des gemeinsamen Programms des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz und der Sächsischen Tierseuchenkasse zur Prophylaxe und Bekämpfung der Koi- Herpesvirus-Infektion (KHV-I) der Karpfen in sächsischen Fischhaltungsbetrieben (KHV-Bekämpfungsprogramm): Sächsisches Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz; Sächsische Tierseuchenkasse; 4/2016 [Stand: 18.08.2016].

LITERATURVERZEICHNIS

- Kumari J, Sahoo PK. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquac.* 2006; 255(1):133–41.
- Lauring AS, Jones JO, Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28(6):573–9.
- Lee N-S, Jung SH, Park JW, Do JW. In situ Hybridization Detection of Koi Herpesvirus in Paraffin-embedded Tissues of Common Carp *Cyprinus carpio* Collected in 1998 in Korea. *Fish Pathol.* 2012; 47(3):100–3.
- Ling KH, Kueh, Suasn Ling Fung, Poh YK. Quarantine, Surveillance and Monitoring of Koi Herpesvirus in Singapore. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl.* 2005; (2):35–40.
- Litman GW, Rast JP, Shambloott MJ, Haire RN, Hulst M, Roess W et al. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10(1):60–72.
- Ma J, Bruce TJ, Jones EM, Cain KD. A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorg.* 2019; 7(11).
- Matras M, Antychowicz J, Castric J, Bergmann SM. CYHV-3 Infection Dynamics in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) – Evaluation of Diagnostic Methods. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012; 56(2).
- Matsui K, Honjo M, Kohmatsu Y, Uchii K, Yonekura R, Kawabata Z'i. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshw. Biol.* 2008; 53(6):1262–72.
- Meyer K. Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirus-Infektionen durch symptomlose Carrierfische [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2007.
- Minamoto T, Honjo MN, Uchii K, Yamanaka H, Suzuki AA, Kohmatsu Y et al. Detection of cyprinid herpesvirus 3 DNA in river water during and after an outbreak. *Vet. Microbiol.* 2009; 135(3-4):261–6.
- Minamoto T, Honjo MN, Yamanaka H, Tanaka N, Itayama T, Kawabata Z'i. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res. Vet. Sci.* 2011; 90(3):530–2.
- Miwa S, Kiryu I, Yuasa K, Ito T, Kaneko T. Pathogenesis of acute and chronic diseases caused by cyprinid herpesvirus-3. *J. Fish Dis.* 2014; 38(8):695–712.
- 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.* 2008a; 80(1):1–11.

- Miyazki T, Yasumoto S, Kuzuya Y, Yoshimura T. A Primary Study on Oral Vaccination with Liposomes Entrapping Koi Herpesvirus (KHV) Antigens Against KHV Infection in Carp. *Dis. Asian Aquac.* 2008b; (6):99–184.
- Mletzko A, Amtmann A, Bergmann S, Lee P, Christian J, Buchholz R et al. Inoculation of cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) on common carp brain cells-influence of process parameters on virus yield. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2017; 53(7):579–85.
- Monaghan SJ, Thompson KD, Adams A, Kempter J, Bergmann SM. Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. using in situ hybridization. *J. Fish Dis.* 2014; 38(5):477–89.
- Neukirch M, Böttcher K, Bunnajirakul S. Isolation of a virus from koi with altered gills. *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 1999; 19(5).
- Neukirch M, Kunz U. Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis and mortality *Bull. Eur. Associ. Fish Pathol.* 2001; 21(4):125–35.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Animo N et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):63.
- O'Connor MR, Farver TB, Malm KV, Yun SC, Marty GD, Salonius K et al. Protective immunity of a modified-live cyprinid herpesvirus 3 vaccine in koi (*Cyprinus carpio* koi) 13 months after vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 2014; 75(10):905–11.
- Overstreet RM, Jovonovich J, Ma H. Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integr. Comp. Biol.* 2009; 49(2):127–41.
- Pakingking R, JR., Seron R, dela Peña L, Mori K, Yamashita H, Nakai T. Immune responses of Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine. *J. Fish Dis.* 2009; 32(5):457–63.
- 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):3750–6.
- Perelberg A, Ronen A, Hutoran M, Smith Y, Kotler M. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine* 2005; 23(26):3396–403.
- Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant A, Bejerano I, Kotler M. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *cyprinus carpio* in Israel. *Isr. J. Aquac. - Bamidgeh* 2003; 55(1):5–12.

- Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y et al. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.* 2004; 78(17):9544–51.
- Plotkin SA. Vaccines: Past, present and future. *Nat. Med.* 2005; 11(4):S5–S11.
- Plotkin SA. Vaccines: The fourth century. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(12):1709–19.
- Pokorova D, Vesely T, Piackova V, Reschova S, Hulova J. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med. - Czech* 2005; 50(4):139–47.
- Radosavljevic V, Jeremic S, Cirkovic M, Lako B, Milicevic V, Potkonjak A et al. Common fish species in polyculture with carp as cyprinid herpes virus 3 carriers. *Acta vet (Beogr)* 2012; 62(5-6):675–81.
- Raj VS, Fournier G, Rakus K, Ronsmans M, Ouyang P, Michel B et al. Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. *Vet. Res.* 2011; 44(92).
- Reed AN, Izume S, Dolan BP, Lapatra S, Kent M, Dong J et al. Identification of B cells as a major site for cyprinid herpesvirus 3 latency. *J. Virol.* 2014; 88(16):9297–309.
- Reichert M, Bergmann SM, Hwang J, Buchholz R, Lindenberger C. Antiviral activity of exopolysaccharides from *Arthrospira platensis* against koi herpesvirus. *J. Fish Dis.* 2017; 40(10):1441–50.
- Roberts RJ, Hrsg. *Microbiological Diseases of Fish*. London: Academic Press; 1982. (Special Publications of the Society for General Microbiology; Bd. 9).
- Rock DL, Fraser NW. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nat.* 1983; 302(5908):523–5.
- Rodgers CJ, Mohan CV, Peeler EJ. The spread of pathogens through trade in aquatic animals and their products. *Rev. – Off. Int. Epizoot.* 2011; 30(1):241–56.
- Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 2003; 21(32):4677–84.
- Ronsmans M, Boutier M, Rakus K, Farnir F, Desmecht D, Ectors F et al. Sensitivity and permissivity of *Cyprinus carpio* to cyprinid herpesvirus 3 during the early stages of its development: importance of the epidermal mucus as an innate immune barrier. *Vet. Res.* 2014; 45(10).
- Sano N, Moriwake M, San T. Herpesvirus cyprini: Thermal Effects on Pathogenicity and Oncogenicity. *Gyobyu Kenkyu* 1993; 28(4):171–5.
- Schilling J. *Impfstoffe und Fachbegriffe: Was bedeutet rekombinant, subunit, lebend und tot?* DoxMedical 2008; 4(2):6–7.

- Schröder L, Klafack S, Bergmann SM, Fichtner D, Jin Y, Lee P-Y et al. Generation of a potential koi herpesvirus live vaccine by simultaneous deletion of the viral thymidine kinase and dUTPase genes. *J. Gen. Virol.* 2019; 100(4):642–55.
- Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Levavi-Sivan B. Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquac.* 2005; 245(1-4):1–11.
- Shimizu T, Yoshida N, Kasai H. Survival of Koi Herpesvirus (KHV) in Environmental Water. *Fish Pathol.* 2006; 41(4):153–7.
- Soliman H, El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virol. J.* 2005; 2:83.
- St-Hilaire S, Beevers N, Joiner C, Hedrick RP, Way K. Antibody response of two populations of common carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to koi herpesvirus. *J. Fish Dis.* 2009; 32(4):311–20.
- St-Hilaire S, Beevers N, Way K, Le Deuff, R. M., Martin P, Joiner C. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.* 2005; 67:15–23.
- Straube J, Truyen U. Update on Koi-Herpesvirus- A globally challenging aquatic Disease 2012.
- Tadmor-Levi R, Asoulin E, Hulata G, David L. Studying the Genetics of Resistance to CyHV-3 Disease Using Introgression from Feral to Cultured Common Carp Strains. *Front. Genet.* 2017; 8:24.
- Takashima Y, Watanabe N, Yanai T, Nakamura T. The Status of Koi Herpesvirus Disease Outbreaks in Lake Kasumigaura and Kitaura. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl.* 2005; (2):65–71.
- Tort L, Balasch JC, Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunol.* 2003; 22(3):277–86.
- Uchii K, Matsui K, Iida T, Kawabata Z. Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 2009; 32(10):857–64.
- Uchii K, Telschow A, Minamoto T, Yamanaka H, Honjo MN, Matsui K et al. Transmission dynamics of an emerging infectious disease in wildlife through host reproductive cycles. *ISME J.* 2011; 5(2):244–51.
- Vancsok C, Peñaranda M, Raj S, Leroy B, Jazowiecka-Rakus J, Boutier M, Gao Y, Wilkie G, Suárez N, Wattiez R, Gillet L, Davison A, Vanderplasschen A. Proteomic and Functional Analyses of the Virion Transmembrane Proteome of Cyprinid Herpesvirus 3. *J. Virol.* 2017; 91(21).
- Viadanna PHO, Miller-Morgan T, Peterson T, Way K, Stone DM, Marty GD et al. Development of a PCR assay to detect cyprinid herpesvirus 1 in koi and common carp. *Dis. Aquat. Org.* 2017; 123(1):19–27.

- Wahlquist C. Fishers and conservationists urge release of herpes virus to kill Murray river carp; 2016 [Stand: 01.04.2016]. Verfügbar unter: <https://www.theguardian.com/australia-news/2016/jan/13/fishers-and-conservationists-urge-release-of-herpes-virus-to-kill-murray-river-carp>.
- Walster CI. Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. *Fish Vet. J.* 1999; 3(3):54–8.
- Waltzek TB, Kelley GO, Alfaro ME, Kurobe T, Davison AJ, Hedrick RP. Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis. Aquat. Org.* 2009; 84(3):179–94.
- Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H et al. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt 6):1659–67.
- Weber EPS, Malm KV, Yun SC, Campbell LA, Kass PH, Marty GD et al. Efficacy and safety of a modified-live cyprinid herpesvirus 3 vaccine in koi (*Cyprinus carpio koi*) for prevention of koi herpesvirus disease. *Am. J. Vet. Res.* 2014; 75(10):899–904.
- Yamashita H, Mori K, Kuroda A, Nakai T. Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *J. Fish Dis.* 2009; 32(9):767–75.
- 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(4):141–5.
- Yoshida N, Sasaki R-K, Kasai H, Yoshimizu M. Inactivation of koi-herpesvirus in water using bacteria isolated from carp intestines and carp habitats. *J. Fish Dis.* 2013; 36(12):997–1005.
- Yoshino M, Watari H, Kojima T, Ikedo M, Kurita J. Rapid, sensitive and simple detection method for koi herpesvirus using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 2009; 53(7):375–83.
- Yuasa K, Sano M. Koi Herpesvirus: Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research. *Isr. J. Aquac. - Bamidgah* 2009; 61(3):169–79.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frías C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20(2):126–36.
- Zhou J, Xue J, Wang Q, Zhu X, Li X, Lv W et al. Vaccination of plasmid DNA encoding ORF81 gene of CJ strains of KHV provides protection to immunized carp. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2014a; 50(6):489–95.
- Zhou J-X, Wang H, Li X-W, Zhu X, Lu W-L, Zhang D-M. Construction of KHV-CJ ORF25 DNA vaccine and immune challenge test. *J. Fish Dis.* 2014b; 37(4):319–25.

9 Anhang

Anhang 1: Score Sheet

Anlage 23

Score-Sheet

- Score 0: Der Fisch verhält sich unauffällig.
- Score 1: Der Fisch hat eingefallene oder hervorgetretene Augen, ist dunkler oder blasser.
- Score 2: Der Fisch sondert sich ab, schwimmt nicht mehr zum Futter.
- Score 3: Der Fisch liegt auf der Seite, die Kiemenbewegungen sind unregelmäßig und schwach.

Tiere mit einem Score von 3 werden euthanasiert (Nelkenölbad: 10-20mg/L Wasser).

Bei Tieren mit einem Score von 1 bzw. 2 ist eine intensivere Überwachung notwendig.

Alle an dieser Studie beteiligten Wissenschaftler, Tierpfleger und Technischen Assistenten sind in dem Scoring-System unterrichtet und wenden es entsprechend an, um den Tieren Leiden und Schäden zu ersparen.

Anhang 2: Vorlage Sektionsprotokoll

Sektionsprotokoll Karpfen

Karpfen-ID: _____

Datum: _____

Äußere Besichtigung

Gewicht/Länge: _____

Ernährungszustand: _____

Haut/Schuppen: _____

Flossen: _____

Kiemen: _____

Maulhöhle: _____

Augen: _____

Innere Besichtigung

Muskelfleisch: _____

Leibeshöhle: _____

Organe:

Darm: _____

Leber/Gallenblase: _____

Nieren: _____

Milz: _____

Herz: _____

Geschlechtsorgane: _____

Schwimmbase: _____

Abschließende Beurteilung:

Histologie: Ja Nein

Ausführender: _____

Unterschrift: _____

Anhang 3: Abfüllprotokoll AGP 2014

Seite 1 von 2

Abfüllprotokoll
KHV-Antigenpräparation 2014
(KHV-AGP 2014)

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
An den Tierkliniken 43
04103 Leipzig

Produktbezeichnung: KHV-Antigenpräparation 2014 (KHV-AGP 2014)

Ansatzgröße Soll: 2,1 Liter
Ansatzgröße Ist:

Darreichungsform: Flüssigvakzine zur i.p.-Applikation

Ausgangsmaterialien: 16 Flaschen à 100 ml KHV-AGP 2012, ohne Adjuvans; Charge
5 Flaschen à 100 ml KHV-T-AGP 2013, Adjuvansgehalt: 67,0 %; Charge
VM 01 03 13,

Formulierung der Charge:

Datum: 13.03.14
Mitarbeiter: Frau Dr. Speck
Frau Luise Gaede

Ingredienzien:

KHV-AGP 2012 1,6 Liter
KHV-T-AGP 2013 0,5 Liter (Adjuvansgehalt: 67 % → 333,33 Liter)
Gesamt: 2,1 Liter (Adjuvansgehalt: 15,9 %)

Vorbereitung der Abfüllung:

Sterilisieren (180°C, 120 Minuten) der Injektionsflaschen, Besteck, Erlenmeyerkolben
Autoklavieren (121°C, 2 bar, 30 Minuten) der Stopfen (Mittelabziehkappen),
Silikonschläuche, Magnetrührer

Abfüllung: *Sicherheitsvakuumkante Klasse II, Desinfektion vorab, Vorlaufzeit 15 min.*

Datum: 13.03.2014

Füllmenge: 19 x ca. 100 ml/Injektionsflasche + 1 x ca. 10 ml/Injektionsflasche, bestimmt
für die Anwendung im Feldversuch durch den FGD
1 x ca. 30 ml/Injektionsflasche, bestimmt für die Antigengehaltbestimmung,
FLI
1 x ca. 15 ml/Injektionsflasche, bestimmt für die Sterilitätsprüfung, PEI
1 x ca. 10 ml/Injektionsflasche, bestimmt für Unschädlichkeitstest, Uni Leipzig

Anzahl der abgefüllten Flaschen: 23 Stück

Seite 2 von 2

Uhrzeit: 9:00 Uhr - 13 Uhr

Etikettierung und Lagerung:

Datum: 13.03.2014

Anzahl der Flaschen: 23 Flaschen, Lagerung im Kühlschrank (+4°C), Versand gekühlt per TNT an FLI, PEI, FGD

Datum/Unterschrift:

13.03.14, *L. Gaede*

Luise Gaede

Anhang 4: Rezept PBS

Reagenz	Hinzuzufügende Menge (für 1-fach konzentrierte Lösung)	Endkonzentration (1x)
NaCl	8 g	137 mmol
KCl	0.2 g	2.7 mmol
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10 mmol
KH ₂ PO ₄	0.24 g	1.8 mmol

Die Reagenzien in 800 ml H₂O lösen. Anschließend pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen. Danach mit H₂O auf 1 Liter auffüllen. Sterilisation mittels Autoklavierens, anschließend Lagerung bei Raumtemperatur.

Anhang 5: Verwendete Primersequenzen

KHV-86F:	5'-GACGCCGAGACCTTGTG-3'
KHV-163R:	5'-CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT-3'
TaqMan probe KHV-109p:	5'-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-3'

Anhang 6: Bestandteile Master Mix:

Polymerase:	HotStar Taq DNA-Polymerase
Nukleotid-Mischung:	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP
QuantiTect Multiplex PCR-Puffer:	MgCl ₂ , KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , weitere verschiedene Salze für die Primerbindung

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Geräte	33
Tabelle 2. Laborbedarf	34
Tabelle 3. Reagenzien.....	34
Tabelle 4. Plattenlayout einer 96-Well-Platte für den Serumneutralisationstest mit den resultierenden Verdünnungsstufen der Seren.....	41
Tabelle 5. Gruppeneinteilung und Behandlung im Experiment 1	42
Tabelle 6. Gruppeneinteilung und Behandlung im Experiment 2	44
Tabelle 7. Klinische Symptome und Todesfälle im Experiment 1	47
Tabelle 8. SNT-Ergebnisse im Versuch 2013 für fünf ausgewählte Karpfen jeder Gruppe	50
Tabelle 9. Klinische Symptome und Todesfälle im Experiment 2	52

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CCB-Zellkultur in MEM , infiziert mit KHV.....	46
Abbildung 2: Karpfen mit weißer Flüssigkeit in der Leibeshöhle	48
Abbildung 3: Karpfen mit multiplen weißen Tropfen in der Leibeshöhle.....	48
Abbildung 4: KHV-DNA Kopienzahlen (Versuch 1)	49
Abbildung 5: KHV-DNA Kopienzahlen (Versuch 2).....	53
Abbildung 6: Mittelwerte der durch SNT ermittelten neutralisierenden Antikörpertiter (Versuch 2). 55	

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle geht mein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung und Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Stephanie Speck danke ich für die wissenschaftliche Beratung und fachliche Unterstützung.

Ein großer Dank gebührt Herrn Marc Ullrich für die große Hilfe in allen technischen Belangen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Nadja Leinecker für die praktische Hilfe, Ratschläge und die Einarbeitung in den virologischen Arbeitsbereich.

Vielen lieben Dank an alle weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen für ihre Unterstützung bei praktischen Aufgaben, Hilfe und Ratschläge, das kollegiale Miteinander und die Motivation.

Herrn Dr. Dr. habil. Sven M. Bergmann vom Friedrich-Loeffler-Institut danke ich für die Durchführung des SNTs im Versuch 1, die Überlassung des SNT-Protokolls für den Versuch 2 und die fachliche Unterstützung.

An Dr. Dieter Fichtner vom Friedrich-Loeffler-Institut geht mein Dank für die Bereitstellung der Zellen für die Virusvermehrung sowie der Virusisolate für die Belastungsinfektionen.

Frau Dr. Grit Bräuer und Frau Dr. Kerstin Böttcher vom Fischgesundheitsdienst Sachsen danke ich für die Bereitstellung der KHV-AGP 2012 und KHV-T AGP 2013 sowie für die fachliche Unterstützung.

Des Weiteren danke ich dem sächsischen Ministerium für Gesellschaftliches und Sozialen Zusammenhalt für die Ausschreibung des Projektes und die Finanzierung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: Bei meinen Eltern für viele gute Gespräche, bei meinem Lebensgefährten für die große Unterstützung und immerwährende Motivation und bei meinem Sohn für sein aufmunterndes Lächeln.