

Amtliche Methodensammlung

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Als Erreger wurde ein Herpesvirus isoliert und später als Koi-herpesvirus (KHV) bezeichnet. Die Erkrankung wird international „KHV Disease (KHVD)“, in Deutschland aber KHV-I genannt. Wissenschaftlich wird das Virus, in Abgrenzung vom „Karpfenpockenvirus“ (carp pox virus, CyHV-1) und dem „herpesviral haematopoietic necrosis virus (HVHNV)“ oder „Goldfish Herpesvirus“ (GHV, CyHV-2), als Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) bezeichnet.

Die erste Isolierung des KHV erfolgte mit der Zelllinie von der Flosse eines Koi (koi fin cell line) KF-1. Eine weitere Zelllinie vom Gehirn des Karpfens, die common carp brain cell line (CCB), ist ebenfalls zur Anzucht des KHV geeignet. Beide Zelllinien befinden sich unter den Registriernummern 843 und 816 in der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin (CCVM) des FLI und stehen den Untersuchungsämtern zur Verfügung.

Die elektronenmikroskopischen Ultradünnschnittuntersuchungen infizierter Zellen zeigten zahlreiche Stadien einer Virusproduktion, wie sie für bisher untersuchte Herpesviren beschrieben wurden (Abb. 1). Dazu gehörten vor allem Nukleokapsidbildung im Zellkern, primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran und die sekundäre Umhüllung im Bereich des Golgi-Apparats. Morphogenetisch besonders auffällig war allerdings die vergleichsweise große Zahl akkumulierter Nukleokapside im Zellkern bzw. Zytoplasma. Dies führte zu zahlreichen pseudokristallinen Einschlüssen im Zellkern, die häufig aus inkompletten Nukleokapsiden bestanden.

Die große Anzahl produzierter Nukleokapside stand in deutlichem Widerspruch zur geringen Ausbeute an reifen Virusnachkommen. Dieses Missverhältnis dürfte auch die Beobachtung erklären, dass bei elektronenmikroskopischer Untersuchung der Virusanzüchtungen bzw. Organanreibungen infizierter Tiere im Negativkontrastverfahren nur sehr selten komplette Virionen nachzuweisen sind. Eine relativ hohe Empfindlichkeit kompletter Virionen gegenüber äußeren Einflüssen zeigt sich besonders im Nachweis zahlreicher, deformierter Nukleokapside, wie sie für andere Vertreter der *Herpesviridae* bisher nicht bekannt sind.

Das doppelsträngige DNA-Genom des KHV ist mit etwa 295 kbp größer als die Genome aller anderen bisher bekannten Herpesviren.

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

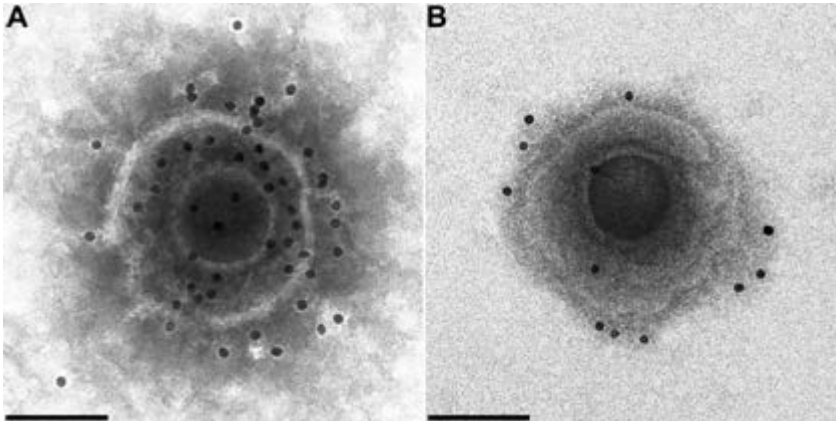


Abb. 1: A: *KHV markiert mit polyklonalem Hyperimmunserum vom Kaninchen und kolloidalem Gold (10 nm, GAR 10)*
B: *KHV markiert mit monoklonalem Antikörper mab 11A4 und kolloidalem Gold (10 nm, GAM 10). Die Markerlänge entspricht 100 nm (Fotos: Granzow, FLI Insel Riems)*

1.2 Klinische Symptomatik

Die Krankheit zeigt sich klinisch bei Wassertemperaturen zwischen 16 und 29 °C, in einigen Fällen auch bei Temperaturen zwischen 4 und 12 °C.

Die Inkubationszeit beträgt, abhängig von der Wassertemperatur, der Virulenz des Erregers und der Empfänglichkeit der Fische, 4 bis 21 Tage, kann aber auch einige Monate dauern. In latent infizierten Fischen kann der Viruseintrag Jahre zurück liegen. Die Morbidität beträgt bei Wassertemperaturen zwischen 18 und 26 °C meist 100 %, die Mortalität ist in der Regel sehr hoch und kann ebenfalls bis zu 100 % erreichen. Bei den erkrankten Fischen sind die wichtigsten Symptome Atemnot, Kiemenverfärbungen und -nekrosen (Abb. 2), Inappetenz bis hin zur Anorexie, Enophthalmus (Abb. 3), Flossenerosionen, Hautläsionen (meist mit verstärkter milchig-grauer Schleimbildung zu Beginn der Erkrankung), später Blutungen, Schleimhautablösung (Sandpapierhaut) und großflächige Entzündungen (Abb. 4). Inapparente latente Infektionen können auftreten.

Das klinische Bild einer KHV-I ist definiert als eine mit Haut- und Kiemenveränderungen einhergehende Krankheit der Karpfen mit folgenden Anzeichen, die nicht in jedem Fall klinisch manifest sein müssen:

- Apathie
- Atemnot
- Inappetenz / Anorexie
- Kiemenblässe und -nekrosen
- Enophthalmus, selten aber auch Exophthalmus
- Blutungen am Flossenansatz und in der Haut
- kreisrunde bis konfluierende Schleimhautläsionen verbunden mit Schleimhautablösungen

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

Bei akutem Krankheitsgeschehen sind die Fische apathisch, inappetent, sitzen teilweise regungslos auf dem Bauch am Teichboden oder befinden sich in strömungsschwachen Zonen in der Nähe des Wassereinflusses bzw. an der Wasseroberfläche.



Abb. 2: Kieme eines erkrankten Koi mit umfangreicher Nekrose (Foto Kleingeld, LAVES Hannover)



Abb. 3: Enophthalmus beim Koi (Foto: Kleingeld, LAVES Hannover)

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)



Abb. 4: Moribunder Karpfen mit vermehrter Schleimbildung (Rücken) und Blutungen an Bauch und den Flossen. (Foto: Bergmann, FLI, Insel Riems)

1.3 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch müssen die Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVC), die "Carp Edema Virus" -Infektion (CEV oder "Koi Sleepy Disease" (KSD)), aber auch verschiedene Bakteriosen (u. a. mit *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.*) und schwere Parasitosen (u. a. Kiemenwürmer, Hautwürmer, Weißpünktchenkrankheit) in Betracht gezogen werden. Vor allem die Infektion mit dem CEV kann zu einer gleichen Symptomatik führen. Damit ist sie klinisch nicht von der KHV-I zu unterscheiden.

1.4 Diagnostische Indikation

Der erste Ausbruch der Krankheit bei Nutzkarpfen wurde im Mai 1998 in Israel beobachtet. Bis zum Ende des Jahres 2000 hat die Krankheit bis zu 90 % der Fischfarmen Israels erfasst und verursachte in der Aquakultur jährlich Kosten von 300 Mill. US\$. In den USA wurde die Krankheit erstmals Ende 1998 bei einem aus Israel importierten Koi beobachtet.

Erste Hinweise über „Massensterben“ bei Nutzkarpfen in Verbindung mit dem KHV wurden 1997 und 1998 in Deutschland beobachtet. In den Folgejahren wurde das KHV weltweit in zahlreichen Ländern nachgewiesen.

Die wirtschaftliche Bedeutung des KHV als Erreger einer Fischseuche unterstreichen zwei Ausbrüche in Deutschland. Im Sommer 2003 kam es zu Ausbrüchen in 3 Teichwirtschaften in Sachsen. Die Mortalität betrug zwischen 20 und 100 %. Die Gesamtverluste betrugen 48 t Karpfen. Der direkte Schaden durch Fischverluste wurde mit etwa 130.000 € beziffert. Für Folgeschäden wurden nochmals 200.000 € errechnet. Ein weiterer KHV-I-Ausbruch wurde 2004 in einer Teichanlage in Thüringen festgestellt. Die Gesamtverluste

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

betragen 80 t Karpfen, mit einem direkten Schaden in Höhe von 310.000 € und Folgeschäden von insgesamt 106.000 €. Die KHV-I-Ausbrüche bei Nutzkarpfen setzten sich seither vor allem im Freistaat Sachsen fort.

Nach bisherigen Kenntnissen können nur Nutzkarpfen und Koi an der KHV-I klinisch erkranken. Offensichtlich wird das KHV in weiteren Spezies, wie z. B. in Goldfischen, Karauschen, Schleien und Graskarpfen, vermehrt und weitere Fischarten stehen in Verdacht, das Virus als Carrier zu beherbergen und an empfängliche Karpfen weiterzugeben.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, Nationales Referenzlabor für die KHV-I, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-1150 (1103)

1.6 Rechtsgrundlagen

KHV-I wurde in Deutschland im Dezember 2005 in die Verordnung über anzeigepflichtige Krankheiten aufgenommen. Die Anzeigepflicht für KHV-I wurde zunächst nur auf den Nachweis bei Nutzkarpfen beschränkt, 2006 jedoch auch auf Koi ausgedehnt.

In der EU-Richtlinie 2006/88/EG ist die KHV-I im Anhang IV in der Liste der nicht-exotischen Krankheiten aufgeführt, für die bei Feststellung Mindestbekämpfungsmaßnahmen festgelegt wurden. Die Überführung der EU-Richtlinie in nationales Recht erfolgte durch die „Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen vom 24. November 2008 (Fischseuchen-Verordnung)“.

KHV-I wurde in Deutschland im Dezember 2005 in die Verordnung über anzeigepflichtige Krankheiten aufgenommen. Die Anzeigepflicht für KHV-I wurde zunächst nur auf den Nachweis bei Nutzkarpfen beschränkt, 2006 jedoch auch auf Koi ausgedehnt.

Seit Januar 2006 besteht auch Meldepflicht beim OIE.

Die Diagnose und Bekämpfung der KHV-I wird in Deutschland durch die Fischseuchen-Verordnung in Verbindung mit der Verordnung über anzeigepflichtige Krankheiten auf der Grundlage der EU-Richtlinie 2006/88/EG geregelt.

Eine Anleitung zur Diagnose der KHV-I und weiterer, gegebenenfalls differentialdiagnostisch abzugrenzender Fischkrankheiten ist auch im "Manual for Diagnostic Tests for Aquatic Animals" des OIE erschienen. Eine Diagnose-Richtlinie für die Harmonisierung der KHV-Diagnostik in der EU in Form eines Handbuchs ist bisher nur als Entwurf erschienen.

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

Des Weiteren wurde in zwei Workshops (2008 und 2012) in Greifswald bzw. auf der Insel Riems der Werdegang der Diagnostik beraten und beschlossen.

2. Untersuchungsmaterial

Die Probenahme ist beim Nutzkarpfen und Koi und gegebenenfalls bei weiteren für die Erkrankung empfänglichen Arten (z. B. Hybride von Karauschen und Goldfischen mit Karpfen oder Koi) durchzuführen.

Alle Produktionseinheiten (Teiche, Rinnen, Behälter, Netzkäfige usw.) sind auf verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische zu kontrollieren. Proben sind je nach Fischart und -herkunft gesondert zu entnehmen. Bei der Probenauswahl sind bevorzugt geschwächte, verhaltensgestörte, moribunde oder frisch verendete Fische (ohne Anzeichen der Zersetzung) zu berücksichtigen.

2.1 Letale Beprobung

Die zu untersuchenden Proben sollten bei klinisch kranken Tieren unter 5 cm aus mindestens 20 Tieren (2 Pools á 10 Fische), bei klinisch kranken Fischen über 5 cm Länge aus mindestens 10 Fischen (2 Pools á 5 Fische) bestehen. Klinisch unauffällige Fische sollten mindestens 24 h, aber höchstens 4 Tage vor der Beprobung, separat gehältert werden. Zur Beprobung sollten bei Fischen unter 5 cm mindestens 20 Tiere (4 Pools á 5 Fische), bei Fischen über 5 cm mindestens 10 Tiere in 5 Pools mit 2 Tieren verwendet werden. Von den Fischen sind Organe bzw. Organteile (Kiementeile und Rumpfniere) zu entnehmen.

2.2 Nicht-letale Beprobung

In Abstimmung mit und unter vorheriger Anleitung durch die zuständige Behörde kann die Durchführung einer nicht-letalen Beprobung erfolgen.

Bei Laichfischen oder anderen Fischen, bei denen eine Tötung vermieden werden soll, kann sich die Probenahme am Einzeltier auf Blutentnahme zur Leukozytenseparation bzw. auf Kiemenabstriche / -biopate nach mindestens 24-stündiger aber höchstens 4 Tage separater Haltung beschränken, wenn die zuständige Behörde nichts anderes anordnet.

Kiemenabstriche

Zur zusätzlichen Absicherung können Kiemenabstriche mit sterilen Ohrtupfern von umgesetzten Tieren (24 Stunden bis 4 Tage nach der Umsetzung, Einzeltieruntersuchungen) bzw. beim Ausbruch (Abb. 5 a) in Isopropanol (1 ml Isopropanol), besser jedoch direkt in einen PCR-Lysis-Puffer (z. B. 180 µl ATL mit 20 µl Proteinase K, Qiagen) in einem sterilen 2 ml Eppendorfgefäß ungekühlt versandt werden. Auf den Tupfern muss Blut zu erkennen sein (Abb. 5 b). Bei der Verwendung von PCR-Lysis-Puffer muss die DNA-Extraktion spätestens 48 h nach Probenahme erfolgen. Werden die Kiemenabstriche in Isopropanol transportiert oder gelagert, müssen die Eppendorfröhrchen zentrifugiert (3000 U / Min., 10 Min., 4 °C), das Isopropanol un-

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

ter Erhalt des entstandenen Pellets abgossen und des Ohrtupfers kurz (5-10 Min.) getrocknet werden. Der getrocknete Ohrtupfer wird anschließend zum Pellet gegeben und mit z. B. 180 µl ATL-Lysispuffer mit Proteinase K für mindestens 1-3 h bei 56 °C inkubiert. Während der Vorbereitung für die DNA-Extraktion mit dem z. B. Qiagen-Kit wird der Ohrtupfer danach bis zur Überführung der Lösung auf die Silika-Säulchen immer im Eppendorfgesäß belassen.

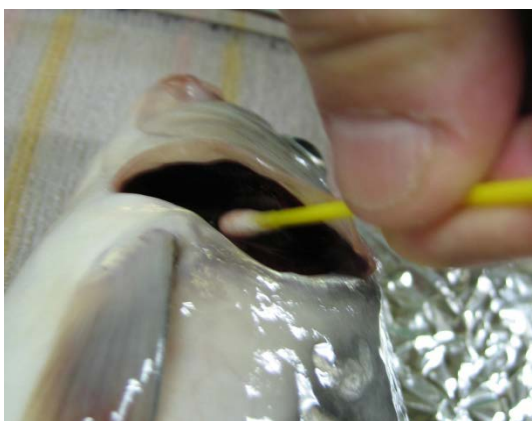


Abb. 5a: Kiemenabstrich beim Karpfen
(Fotos: Bergmann, FLI, Insel Riems)



Abb. 5b: Blutiger Tupfer

Zum Ausschluss einer latenten Infektion mit dem KHV sollten die Fische mittels eines simulierten (Abkutschern und für 30 Sek. bis 1 Min. an der Luft halten) oder eines tatsächlichen Transports dazu gebracht werden, das latente KHV zu reaktivieren. Die Probenahme soll frühestens nach 24 h, spätestens jedoch nach 4 Tagen nach dem Transport wie beschrieben erfolgen.

2.3 Aufbereitung und Einsendung der Proben

Lebende Fische sind in geeigneten Transportbehältnissen gekühlt (mind. 10 °C) und auf dem schnellsten Weg zur Untersuchungsstelle zu transportieren.

Frisch-tote Fische können unzerteilt zum Labor gesandt werden, sofern die Temperaturanforderungen (Kühlung, mind. 10 °C im Transportgefäß) während der Beförderung erfüllt werden können (**nicht einfrieren**).

Organe/Organteile (Kieme und Niere) und/oder Blutproben (Gerinnungshemmer, z. B. Heparin) sind unter sterilen Kautelen zu entnehmen und in ein steriles Kunststoffröhrchen mit Transportmedium (z. B. Zellzuchtmedium mit 10-fachem Antibiotika-Zusatz) zu geben. Die Proben sind sofort unter 10 °C zu kühlen. Während Blutproben und Abstriche von Einzeltieren einzusenden sind (keine Poolproben), können Organe als Sammelproben zur Untersuchung übergeben werden (Tabelle 1).

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

Tabelle 1: Anzahl der Tiere für die Probenahme beim Ausbruch und beim Monitoring

| Art der Untersuchung | Größe der Tiere | Anzahl der Pools | max. Anzahl der Tiere im Pool | Bemerkung |
|----------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| KHV-I-Ausbruch | < 5 cm | 2 | 10 | |
| | > 5 cm | 2 | 5 | |
| | | | | |
| Monitoring* | < 5 cm | 6 | 5 | |
| | > 5cm | 15 | 2 | |

* separate Hälterung für mind. 24 h bis höchstens 4 Tage vor der Probenahme

Im Gegensatz dazu empfiehlt das OIE-Referenzlabor umgekehrt beim klinischen KHV-I-Ausbruch nicht mehr als 2 Fische zu poolen, bei unauffälligen, gesunden Fischen bis zu 5 Tieren im Pool.

Die Probengefäße sind in Isolierbehältern gekühlt zum Labor zu transportieren.

Der Einsendetermin soll mit der Untersuchungsstelle abgesprochen sein.

Im Einvernehmen mit dem Diagnoselaboratorium kann weiteres Probenmaterial entnommen und für weitere Untersuchungen aufbereitet werden.

Für den Versand von Probenmaterial in Alkohol, wenn nicht innerhalb von 48 h untersucht werden kann, wird Isopropanol (100 %) bzw. ein PCR-Lysis-Puffer empfohlen. Ethanol in jeglicher Konzentration scheint ungeeignet zu sein und kann nach einer kurzen Lagerungszeit der Proben von über 7 Tagen zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

3. Untersuchungsgang

3.1 Aufbereitung der Proben für die Untersuchung

Die Methode der Wahl ist der Genomnachweis mittels PCR. Organteile sind zu entnehmen, anzureiben (mindestens 4 h bei 15 °C oder über Nacht bei 4 °C) oder mit einem Tissue-Lyser zu zerkleinern und für die Extraktion zu zentrifugieren. Der Überstand kann für die virologische Untersuchung und das Zentrifugat (Pellet) für den Genomnachweis verwendet werden. Die DNA ist sofort z. B. mit der DNAzol[®]-Methode (Invitrogen) oder mittels Silikasäulchen (Qiagen) zu extrahieren. Die extrahierte DNA kann bei -20 °C für mindestens drei Monate eingefroren bleiben.

Für den Genomnachweis können bei Fischen über 5 cm Länge die Organe von bis zu 2 Fischen (insbesondere Kieme und Niere) zusammen bearbeitet werden. Fische unter 5 cm können zu je 5 Exemplaren zusammen bearbeitet werden. Von den heparinisierten Blutproben ist für den Virusgenom-Nachweis die Leukozytenfraktion unter Verwendung von Histopaque 1077 (Sigma), Percoll (Sigma) oder Lympho-Prep (AXIS-SHIELD PoC AS, Dänemark) nach Angaben der Hersteller zu gewinnen.

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

3.2 Gewinnung der Leukozyten aus heparinisiertem Blut

Fische werden betäubt und aus der Schwanzvene (Abb. 6) oder dem Herzen wird Blut mit einer passenden Spritze (je kleiner die Fische, desto kleiner die Spritze und die Kanüle) gewonnen. Mengen zwischen 0,5 und 1 ml sind optimal für die Fraktionierung. Es können aber auch wesentlich kleinere Mengen (50 bis 200 µl Blut) verwendet werden. Das heparinisierte Blut wird sofort nach der Entnahme in ein isotonisches Medium, z. B. gekühltes Zellkulturmedium, im Verhältnis 1:3 bis 1:4 gegeben. Die Suspension ist sofort unter 10 °C zu kühlen. Die weitere Bearbeitung sollte spätestens nach 30 Min. bis maximal 1 h erfolgen, da das Blut trotz Heparinzusatz gerinnen könnte. Die Suspension wird auf 3 ml z. B. Histopaque 1077 überschichtet und danach für 40 Min. bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Die Leukozytenfraktion befindet sich i. d. R. als weißer Ring deutlich sichtbar und getrennt im klaren Überstand oberhalb der Fraktion der Erythrozyten. Nach Abnahme der Leukozyten (ca. 1 bis 2 ml) mit einer Pipette sind diese mit 10 ml PBS⁻ zu waschen. Nach vorsichtiger Mischung wird erneut zentrifugiert (10 Min., 900 bis 1000 g, 4 °C). Gegebenenfalls ist dieser Waschvorgang zu wiederholen. Das entstehende Pellet wird in 1 ml PBS⁻ aufgenommen und es erfolgt eine Zählung der weißen Blutzellen. Zur weiteren Untersuchung bzw. zur Verwendung in der PCR bzw. der Zellkultivierung werden die Leukozyten auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Geringere Zellzahlen sind möglich, bei höheren Zellzahlen kann z. B. die PCR inhibiert werden. Für die PCR wird anschließend 1 ml mit eingestellter Zellzahl abgenommen, die Zellen wiederum pelletiert (1000 g, 10 Min., 4 °C), der Überstand entfernt und das Pellet in 200 µl PBS⁻ resuspendiert. Diese Leukozyten-Präparation kann für die IFT, die *in-situ* Hybridisierung (ISH) und für die PCR verwendet werden.



Abb. 6: Blutentnahme aus der Schwanzvene eines Koi
(Foto Kleingeld, LAVES Hannover)

Leukozytenproben müssen einzeln bearbeitet werden. Es wird empfohlen, die Leukozyten auf maximal 1×10^7 Zellen/ml einzustellen. Für die PCR sollten anschließend 200-300 µl für die Extraktion der DNA verwendet werden.

3.3. Genomnachweis im Organmaterial und in Leukozyten-Präparationen

Empfohlen wird die Aufarbeitung von 25 bis 30 mg Organmaterial oder 1×10^7 Leukozyten/ml von einem Fisch. Die DNA wird mittels Silikasäulen (Qiagen) gewonnen. Bei der Extraktion ist darauf zu achten, dass es, entsprechend der Herstellerangaben, zu keiner Überladung der Säulchen mit DNA bzw. mit Proteinen kommt, dies besonders bei Poolproben.

Folgende Nachweismethoden sollen verwendet werden:

- die real-time PCR nach Gilad et al., 2004 [1] ,
- alternativ kann die PCR nach Bercovier et al. 2005 durchgeführt werden [2]
- oder die PCR nach Engelsma et al. 2013 [3] mit anschließender Sequenzanalyse des Fragments

Werden mittels real-time PCR oder PCR nach Bercovier positive Befunde erhoben, gilt das KHV als nachgewiesen und die KHV-I labordiagnostisch als bestätigt. Gleiches gilt für die Engelsma-PCR nach Sequenzierung und Abgleich mit den Sequenzen aus der Datenbank. Das KHV ist nachgewiesen, wenn die Sequenzen des PCR-Produkts zu 98% mit denen aus der Datenbank (Aoki et al., 2007) [4] übereinstimmen. Bei Bedarf und auf Anfrage können am FLI im NRL für die KHV-I weitere PCRs zum Virusnachweis bzw. zur Differenzierung durchgeführt werden.

Protokoll für die real-time PCR (Gilad et al. 2004):

| Primer/Sonde | Sequenz | Programm |
|--------------|--|--|
| KHV-86f | 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3' | Ein Zyklus: 50°C, 2 min 95°C, 10 min |
| KHV-163r | 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3' | |
| KHV-109p | 5'-FAM- CTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-TAMRA 3' | 40 Zyklen: 95°C, 15s 60°C, 1 min |

Alternativ kann diese Methode nach Bergmann et al. 2010 [5] unter Verwendung des IC-2-Plasmids als interne Kontrolle modifiziert werden.

Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I)

Protokoll für die alternative konventionelle PCR (Bercovier et al. 2005)

| Primer | Sequenz | Programm | Produktgröße |
|---------|--------------------------|---|--------------|
| KHV-Tkf | 5'-GGGTTACCTGTACGAG -3' | Ein Zyklus: 95°C, 5 Min 35 Zyklen: 95°C, 30 Sek 52 (55)°C, 30 Sek 72 °C, 1 min | |
| KHV-Tkr | 5'-CACCCAGTAGAT TATGC-3' | Ein Zyklus: 72 °C für 10 min | 409 bp |

Protokoll für die konventionelle PCR (Engelsma et al. 2013)

| Primer | Sequenz | Programm | Produktgröße |
|-----------------|----------------------------|---|--------------|
| CyHVpol-forward | 5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3' | Ein Zyklus: 95°C, 2 Min 40 Zyklen: 95°C, 30 Sek 55°C, 30 Sek 72 °C, 45 Sek | |
| CyHVpol-reverse | 5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3' | Ein Zyklus: 72 °C für 10 Min | 362 bp |

Das PCR-Produkt aus der konventionellen PCR nach Engelsma et al. (2013) muss sequenziert und mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen für die virale DNA-Polymerase (ORF 79des KHV) verglichen werden. Für den Befund „KHV“ müssen die Sequenzen zu mindestens 98% übereinstimmen.

3.4. Virologische Untersuchung und Isolierung der KHV in Zellen

Virologische Nachweise in Zellkulturen sind zum Nachweis und Charakterisierung von KHV ungeeignet, da sich das Virus selten in den zur Verfügung stehenden Zelllinien KF-1 und CCB isolieren lässt.

3.5. Antigen- und Erregernachweis

Der Antigennachweis und die Identifizierung des Virus können nach erfolgreicher Isolierung in der Zellkultur mittels Immunfluoreszenztest erfolgen. Es wird die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das KHV empfohlen.

Virus-Antigen kann bei akuten Ausbrüchen mit hoher Viruslast mit einem kommerziellen KHV-Antigen-ELISA (Kovax, Israel) bzw. mit einem Lateral-Flow-Assay (Fast®Test Koi HV, Megacor, Österreich) nachgewiesen werden. Beide Tests benötigen jedoch große Mengen an KHV (mindestens 10^4 bis 10^6 Partikeln / ml) im Organ bzw. den Fäces für den positiven Nachweis. Nur ein positiver Befund ist aussagekräftig.

An einem sensitiveren Antigen-ELISA wird derzeit im NRL für die KHV-I gearbeitet.

Die zum Nachweis verwendeten Diagnostika müssen zugelassen und vom NRL für die KHV-I geprüft sein.

Literatur

[1] Gilad, O., et al., Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004. 60(3): p. 179-187.

[2] Bercovier, H., et al., Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology*, 2005. 5.

[3] Engelsma, M. Y., et al., Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 2013. 107(2): p. 113-120.

[4] Aoki, T., et al., Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *Journal of Virology*, 2007, 81(10), p. 5058-5065.

[5] Bergmann, S. M., et al., Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. *Journal of Virological Methods*, 2010. 163(2): p. 229-233.