

13. Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I) - koi herpesvirus disease (KHVD)

Bergmann, S. M., Schütze H.

Summary

Koi herpesvirus disease (KHVD) has spread worldwide by trade with infected koi and with other infected but not clinically diseased carrier fish. All over the world, KHVD represents an emerging disease, which poses a risk to the carp and koi industry. In 2014, a total of 3 KHVD outbreaks in carp farms and 46 outbreaks or virus detections in koi facilities were confirmed by the regional veterinary authorities in the German federal states. During the past years, Germany has produced approximately 5,300 t of carp annually in more than 6,136 carp farms, the majority of which is located in Bavaria and Saxony. In terms of KHV diagnostic procedures, the major focus is a safe, generally accepted and stable method. Considering these requirements, the method of choice for routine diagnostics as well as for confirmation and clarification of ambiguous cases by the national reference laboratory is real-time PCR (Gilad et al., 2004). Unfortunately, recent data suggest that some KHV varieties with clear clinical manifestations which induce KHVD with up to 100 % mortality were not detectable by routinely used PCRs according to Gilad et al., 2002 and 2004, and Bercovier et al., 2005. Alternatively a PCR recognizing the viral DNA polymerase gene is recommended to discriminate different cyprinid herpesviruses (Engelsma et al. 2013) with an additional sequence analysis. Furthermore, KHV diagnostics is complicated by KHV latency and/or persistence in infected fish which is usually characterized by very low virus loads. Viral latency has also been described for all other herpesviruses. The major goal of KHV diagnostics is the eradication of the virus from aquaculture and the maintenance of a disease free status. In 2014, 6.136 carp farms with carp and/or koi

were categorized according to 2006/88/EG. Worldwide, only the federal state Saxony implemented an eradication program for KHVD which was completed in 2014. With directive 2006/88/EG, which has been ratified by the EU in August 2008, measures for protection against KHVD were appointed.

Zusammenfassung

In den 90er Jahren verursachte ein Virus massenhafte Verluste bei Nutzkarpfen und Kois (*Cyprinus carpio*) in Israel und Westeuropa. Der isolierte Erreger wurde als Koi-Herpesvirus (KHV) taxonomisch in die Familie der *Alloherpesviridae* eingeordnet. Die KHV-Infektion (KHV-I) wurde durch den unkontrollierten Handel, vor allem mit infizierten Kois, aber auch offenbar mit infizierten, nicht erkrankenden Virusträgern weltweit verbreitet. Die KHV-I ist ein Risikofaktor für die Produktion von Nutzkarpfen und Kois, aber auch für Wildfische. Im Dezember 2005 wurde die „KHV-I der Karpfen“ in Deutschland als Fischseuche in die Verordnung über anzeigepflichtige Krankheiten aufgenommen. Die Anwendung der Verordnung wurde 2006 auf den Koi erweitert.

Labordiagnostische Untersuchungen

Im Jahr 2014 wurden in Deutschland 3 Ausbrüche der KHV-I bei Nutzkarpfen (und anderen Zypriniden) und 46 Ausbrüche/Nachweise beim Koi im TSN registriert (Tab. 1, Abb. 1). Bei der Erfassung der Neuausbrüche muss beachtet werden, dass Neufeststellungen der KHV-I beim Koi als Zierfisch in der Regel durch Handel mit infizierten Tieren verursacht werden und keine Aussagen über die epidemiologische Situation im jeweiligen Territorium zulassen.

Tabelle 1: KHV-I-Neuaustrüche/Nachweise im Jahr 2014 in Deutschland (TSN)

Bundesland	Nutzkarpfen	Koi
Baden-Württemberg	1	5
Bayern	1	2
Berlin	0	0
Brandenburg	0	1
Bremen	0	0
Hamburg	0	2
Hessen	0	2
Mecklenburg-Vorpommern	0	2
Niedersachsen	0	9
Nordrhein-Westfalen	0	7
Rheinland-Pfalz	0	5
Saarland	0	3
Sachsen	1	3
Sachsen-Anhalt	0	1
Schleswig-Holstein	0	3
Thüringen	0	1
Gesamt	3	46

Diagnose der KHV-Infektion

Voraussetzungen für das Aussprechen des Verdachts auf die KHV-I sind:

- gehäufte Todesfälle mit pathologisch-anatomischen Hinweisen,
- typische klinische Symptome,
- Todesfälle in Verbindung mit epidemiologischen Zusammenhängen zu einem labordiagnostisch bestätigten KHV-I-Fall.

Dem TSN ist aus Sicht des NRL für die KHV-I am FLI das Auftreten eines Falles anzuzeigen, wenn folgende Voraussetzungen für die amtstierärztliche Feststellung vorliegen:

- Genomnachweis oder
- Erregernachweis.

Beim labordiagnostischen Nachweis ist ein positiver Befund mit mindestens einer der folgenden Methoden erforderlich:

- für den Genomnachweis
 - real-time PCR,
 - PCR oder
 - in-situ Hybridisierung (ISH).
- Erregernachweis
 - Antigennachweis (Immunfluoreszenztest, ELISA),
 - Virusisolierung in Zellkulturen mit anschließender Identifizierung.

Ein epidemiologischer Zusammenhang ergibt sich bei Feststellung von:

- Lebendfischbewegungen,
- Kontakten (Personen, Geräte, Wasser) zu anderen Betrieben,
- Aussetzen KHV-infizierter Karpfen/Koi in Gewässer,
- Kontakte zu weiteren Fischarten (u. a. Goldfischen, Schleien, Graskarpfen), die als Überträger des Koi-Herpesvirus fungieren können, ohne selbst zu erkranken.

Beim Nachweis des KHV im Labor wird auf eine einheitliche, in allen Untersuchungseinrichtungen durchführbare, ausreichend sensitive und sichere Diagnostik orientiert. Für den routinemäßigen Genomnachweis wurde die real-time PCR nach Gilad et al. (2004) empfohlen, da diese Methode eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis der Infektion bietet. Gegenwärtig reicht aber diese Methode allein offenbar nicht mehr aus, wie auch schon bei Einsatz der PCR nach Bercovier et al. (2005), da bei Ausbrüchen mit KHV-I-Klinik und teilweise posi-

tiven serologischen Befunden das Virus nicht nachgewiesen werden konnte. Vom OIE wird zusätzlich die Verwendung einer PAN-CyHV PCR empfohlen (Engelsma et al. 2013) deren Produkte nach einer Sequenzanalyse beurteilt werden. Als diagnostische Bestätigungsverfahren kann die Sequenzanalyse der PCR-Produkte aber auch, im Falle einer Isolierung des KHV in der Zellkultur, der Immunfluoreszenztest (IFT) mit monoklonalen Antikörpern oder Antisera gegen das KHV eingesetzt werden. Zusätzlich kann am paraffin-fixierten Gewebeschnitt die Immunfluoreszenz-Technik (IFT) oder die in-situ Hybridisierung (ISH) angewandt werden.

Im Falle eines KHV-I-Ausbruchs sind von 10 frisch verendeten oder moribund getöteten Fischen Teile der Kieme und der Niere zu entnehmen und in Pools á maximal 5 Tiere (bei Brütlingen 2 Pools á 10 Tiere) gekühlt zu versenden. Beim Monitoring zum Ausschluss des KHV sollen die Organe von maximal 2 Fischen im Pool (Kiemen- und Nierenteile) geprüft werden. Für die Probenahme von lebenden Fischen können vom Einzeltier Kiemenabstriche mit einem Ohrtupfer direkt in PCR-Lysis-Puffer (z. B. in ATL buffer mit Proteinase K, Qiagen) sowie Blut für Serum oder, unter Zusatz von Gerinnungshemmern, für die Leukozytenseparation gewonnen und sofort gekühlt eingesandt werden.

Die Ergebnisse beim Nachweis des KHV sind von zahlreichen Faktoren abhängig, wie z. B. dem Alter und dem Immunstatus der Fische, der Wassertemperatur, dem Zeitpunkt nach erfolgter Infektion, der Infektionsdosis sowie von der Virulenz des KHV, mit dem die Infektion erfolgte.

Das KHV kann, wie von anderen Herpesviren bekannt, latent im Tier vorkommen ohne die Erkrankung zu verursachen. Dieses Phänomen stellt ein diagnostisches Problem dar, da im Verlauf einer KHV-I in der Latenzphase häufig mit den beschriebenen Routinemethoden keine virale DNA im Fisch

festgestellt werden kann. Das Virus lässt sich dann nur mit verfeinerten Methoden nachweisen, die zum Teil auf der Detektion weiterer Gene des KHV beruhen (z. B. virale Polymerase-, Kapsid- oder Glykoprotein-Gene). Bei Einwirkung von Stressoren wird das KHV reaktiviert. Das Virus vermehrt sich dann wieder massiv und wird auch ausgeschieden. Als Folge kann es erneut zu Todesfällen im Bestand kommen.

In der praktischen Diagnostik kann es deshalb bei der Untersuchung von Fischen, die eine Infektion überlebt haben (Überträger, Carrier) und die zum Zeitpunkt der Probenahme keine klinischen Symptome zeigten, zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Um latent infizierte Fische auch in der Routineuntersuchung der Bestände zu erkennen, sollten die gefangenen Fische vor der Probenahme für 24-48 Stunden, jedoch nicht länger als 4 Tage, separat gehältert werden. Blut zur Serumgewinnung sollte am Tag bzw. spätestens am Folgetag des Fanges/Umsetzens entnommen werden. Innerhalb der beprobten Population werden aber auch dann nicht alle Fische als KHV-positiv erkannt, sondern i. d. R. nur 30-40 %.

Im Jahr 2014 wurden in den regionalen Untersuchungsämtern (90) und im NRL (94) für die KHV-I 184 Proben mittels PCR positiv auf das KHV geprüft.

Statistische Angaben

Herkunft der Daten

Es wird auf Datenmaterial des jährlich vom NRL zu erstellenden Berichtes über Umfang und Struktur der Aquakultur, über Angaben zur Epidemiologie, Diagnose und Bekämpfung sowie über das Ausmaß und die Ergebnisse der Laboruntersuchungen zu Fischseuchen und weiteren Fischkrankheiten sowie auf Angaben des TSN zurückgegriffen. Die Daten für den Bericht wurden entsprechend § 4 (2) TierSG von den für das Veterinärwesen zuständigen obern-

ten Landesbehörden der Bundesländer (Daten aus den Untersuchungslaboren und von den Fischgesundheitsdiensten) zugearbeitet. Die Daten über die Produktionszahlen wurden den Angaben des Statistischen Bundesamtes entnommen.

Allgemeine Angaben

2014 wurden in Deutschland in 6.136 Betrieben Karpfen produziert. Der Produktionsumfang war in den letzten Jahren insgesamt etwa 5.300 t Karpfen pro Jahr. Deutschlands größte Karpfenproduzenten sind die Bundesländer Bayern und Sachsen (Tabelle 2).

Virusbedingte Fischseuchen bzw. -krankheiten, wie die Frühjahrsvirämie der Karpfen (SVC) oder die KHV-I sowie zunehmend das „carp edema virus (CEV)“, können große wirtschaftliche Schäden in den Karpfenbeständen verursachen.

Tabelle 2: Anzahl der Teichwirtschaften mit Nutzkarpfen in den Bundesländern

Bundesland	Teichwirtschaften mit Nutzkarpfen
Baden-Württemberg	37
Bayern	4.723
Berlin/Brandenburg	31
Bremen	0
Hamburg	0
Hessen	0
Mecklenburg-Vorpommern	46
Niedersachsen	406
Nordrhein-Westfalen	keine Angaben
Rheinland-Pfalz	3
Saarland	164
Sachsen	526
Sachsen-Anhalt	25
Schleswig-Holstein	69
Thüringen	106
Gesamt	6.136

Nach der Erteilung einer Genehmigung sind Aquakulturbetriebe den Kategorien I bis V zuzuordnen. Bis 2014 wurden in Deutschland 5.682 von 6.136 Betrieben mit Karpfen in eine der Kategorien eingeordnet. Die Kategorisierung dient in erster Linie der Feststellung der Kontrollhäufigkeit und der möglichen Lebendfischbewegungen. Fische dürfen zum Zwecke des Besatzes grundsätzlich nur in Betrieben mit einem gleichen oder niedrigeren Kategorie-Status (höhere Kategorie-Nr.) verbracht werden. Kategorie-IV- und Kategorie-II-Betriebe dürfen Fische allerdings ausschließlich aus Kategorie-I-Betrieben, also nur Fische aus Betrieben mit dem höchsten Status zukaufen.

Bei Ausbruch der KHV-I ist die Sanierung des Betriebes auf der Grundlage eines „Programms zur Bekämpfung und Tilgung“ anzustreben. Die Sanierung eines infizierten Bestandes ist nur durch vollständige Entfernung aller Fische sowie anschließende Reinigung und Desinfektion der betroffenen epidemiologischen Einheiten möglich. In infizierten Karpfen bleibt das KHV lebenslang (latent) erhalten. Bei Belastungssituationen, z. B. Transport, schlechte Wasserqualität, Temperaturschwankungen, hormonelle Veränderungen oder Futterumstellung oder anderen Krankheiten [SVC, zunehmend auch das „Carp Edema Virus“ (CEV, pizisches Pockenvirus)], kann es zu einer Reaktivierung des Virus und damit zur Ausscheidung infektiöser Viren kommen, welche zur Infektion anderer empfindlicher Fische führen. Dies kann zu einer Durchbrechung der vorhandenen Immunität und damit zu einem erneuten Ausbruch der KHV-I mit Klinik und Verlusten führen.

Laut Fischseuchen-VO sind Impfungen gegen nicht exotische Krankheiten, z. B. gegen die KHV-I, in einem von der Fischseuche freien Schutzgebiet (Kategorie I) und in Betrieben, die einem Überwachungsprogramm unterliegen (Kategorie II), verbo-

ten. In Betrieben, die den Kategorien III, IV oder V zugeordnet sind, ist eine Immunprophylaxe gegen die KHV-I jederzeit möglich.

In Deutschland wurden nach der vorläufigen, noch nicht abgeschlossenen Kategorisierung bisher nur keine nachweislich KHV-freie Fischhaltungsbetriebe (nach EU-Richtlinie 2006/88/EG) in die Kategorie I (amtlich seuchenfrei) eingeordnet. Der Kategorie II werden Betriebe zugeordnet, die nicht für seuchenfrei erklärt wurden, die aber einem Überwachungsprogramm zur Erreichung des Seuchenfreiheits-Status unterliegen. 2014 wurden keine Betriebe gemeldet, die im Rahmen eines genehmigten Überwachungsprogramms zur Erreichung der KHV-Freiheit überwacht werden. In der Kategorie III werden Betriebe erfasst, in denen keine Infektionen mit KHV bekannt sind, die aber auch keinem Überwachungsprogramm zur Erreichung der Seuchenfreiheit unterliegen. In Deutschland sind 5.682 Betriebe dieser Kategorie zugeordnet. In Betrieben der Kategorie IV sind Infektionen mit Fischseuchen-Erregern bekannt, es wird aber ein genehmigtes Tilgungsprogramm realisiert. In Deutschland wurde 2014 kein Betrieb in diese Kategorie eingeordnet. In Betrieben der Kategorie V sind Infektionen bekannt, es werden aber nur die festgelegten Mindestmaßnahmen zur Bekämpfung durchgeführt. Nach unseren Erhebungen trifft dies auf 27 Karpfenteichbetriebe zu.

Staatliche Maßnahmen

Die Zielstellung bei der Bekämpfung der KHV-I besteht in der Freihaltung der Nutzkarpfenbestände. Durch die lückenlose Kontrolle des Zierfischhandels könnte die Einfuhr KHV-infizierter Koi verhindert werden.

Zur Verhütung und Bekämpfung der KHV-I werden folgende Vorbeugemaßnahmen empfohlen:

- Beim Zukauf von Zierfischen sollte zumindest auf der Ebene des Großhandels eine geeignete

Quarantänisierung und KHV-Untersuchung der empfänglichen Arten erfolgen. Im Einzelhandel mit Zierfischen kann auf diese Maßnahme verzichtet werden, sofern empfängliche Arten ausschließlich von Großhändlern zugekauft werden, die eine Quarantänisierung und Untersuchung der entsprechenden Zukaufschargen schriftlich bestätigen (Rückverfolgbarkeit).

- Die Probenahme für die virologische Untersuchung (auch für die Abstriche bzw. für die Leukozytenseparation) bei den quarantänisierten Fischen sollte 24 h bis maximal 4 Tage nach Ankunft im Bestand erfolgen. Die Wassertemperatur ist dabei unerheblich, höhere Wassertemperaturen ($>17^{\circ}\text{C}$) scheinen sich aber günstiger auf den Virusnachweis auszuwirken. Die Serumgewinnung sollte spätestens am Folgetag nach der Ankunft erfolgen, besser jedoch am Tag der Einstellung.
- Bei Nutzfischen ist die Quarantänisierung und Untersuchung vor dem Besatz ebenfalls anzustreben. Der Besatz sollte mit nachweislich und geprüft „KHV-freien“ Fischen erfolgen.
- Eine strikte seuchenhygienische Trennung der Zierfische (z. B. Koi, Orfen, Goldfische, Graskarpfen) von Nutzkarpfen ist einzuhalten.

Zur Sicherung der KHV-freien Nutzkarpfen- und Zierfischbestände gehören neben der Realisierung allgemeiner seuchenhygienischer Maßnahmen zum Schutz der Fische in den Anlagen die regelmäßige tierärztliche Untersuchung und evtl. notwendige Beprobung der Fischbestände, Handelsuntersuchungen, Importkontrolle oder ggf. die Sperrung infizierter Bestände, auch bei Hobbyhaltungen in Gartenteichen.

Nach der Fischseuchen-Verordnung hat der Betreiber eines Fischhaltungsbetriebes seinen Fischbestand entsprechend der Einstufung in die verschiedenen Kategorien „passiv“ (Besichtigung/Adspek-

tion der Anlagen und Teiche), „aktiv“ (Probenahme bei Verdacht) oder „gezielt“ (verbindliche Entnahme von Proben und deren virologische Untersuchung) durch die zuständigen Behörden oder durch andere, von den zuständigen Behörden beauftragte, qualifizierte Dienste überwachen zu lassen. Die amtliche Untersuchung beinhaltet regelmäßige Inspektionen, Besichtigungen, Prüfungen der Buchführung und gegebenenfalls Stichprobenuntersuchungen in Abhängigkeit von dem vom Betrieb ausgehenden Sicherheitsrisiko.

Bei erhöhten Fischverlusten, die nicht eindeutig auf Haltungsbedingungen oder Transport zurückzuführen sind, besteht die Pflicht des Halters und der für die Fische verantwortlichen Personen, die zuständige Behörde davon zu unterrichten.

Betreiber eines Aquakulturbetriebes hat über Zu- und Abgänge, Herkunft und Empfänger umgesetzter Fische sowie über die Untersuchungsergebnisse oder erhöhte Sterblichkeit Buch zu führen.

In Deutschland hat nach den geltenden Gesetzklichkeiten eine Registrierung aller Fischhaltungsbetriebe zu erfolgen. Nach Prüfung der Unterlagen des Bestandes ist zu entscheiden, ob von dem Betrieb eine Seuchengefahr ausgehen kann und ob deshalb das Halten von Fischen genehmigungspflichtig ist. Diese Genehmigung kann auf Antrag des Betreibers erteilt werden, wenn:

- keine Seuchenerreger übertragen werden können,
- die Untersuchungspflicht erfüllt,
- die Meldung erhöhter Mortalität an die zuständige Behörde realisiert wird,
- eine Buchführung erfolgt und
- bei Verarbeitungsbetrieben eine Abwasserentkeimung vorhanden ist.

Alle Fischhaltungsbetriebe im Geltungsbereich der Fischseuchenverordnung sind, sofern keine Genehmigung erforderlich ist, gemäß § 6 der Fischseuchenverordnung registrierungspflichtig. Kriterien für die Registrierungspflicht ohne Genehmigung sind:

- Es werden keine Fische in Verkehr gebracht.
- Es handelt sich um Angelteiche.
- Die Aquakulturbetriebe geben die Fische direkt und in kleiner Menge ausschließlich für den menschlichen Verzehr an den Endverbraucher oder an örtliche Einzelhandelsunternehmen mit direkter Weitergabe an den Endverbraucher ab.

Das weltweit einmalige Programm zur Bekämpfung der KHV-I wurde in Sachsen 2014 erfolgreich beendet. Flächendeckend werden hierbei nahezu alle Teichwirtschaften des Landes regelmäßig untersucht. Ziel ist es, den Status „KHV-unverdächtiger Betrieb“ zu bescheinigen. Beim Nachweis des KHV werden von der Sächsischen Tierseuchenkasse bei Vorlage eines Konzeptes zur Bekämpfung der KHV-I Härtefallbeihilfen in Aussicht gestellt. Die Zielstellung des Programms besteht in der Sanierung infizierter Bestände und in der Tilgung der KHV-I vom sächsischen Territorium. Alternativ wurden, unterstützend zur Bekämpfung der KHV-I, Karpfen verschiedenen Alters mit einer inaktivierten KHV-Antigen-Präparation immunisiert.

Ist eine Sanierung auf Grund der vorhandenen Strukturen in den Teichwirtschaftsgebieten nicht oder nur mit unverhältnismäßig hohem finanziellem Aufwand möglich, muss eine Sperrung des betroffenen Bestandes (Verbringungsverbot) aufrechterhalten werden. In derartigen verseuchten Betrieben oder Gebieten darf eine Impfung der Karpfen mit sicheren und wirksamen Vakzinen zur Reduzierung der Verluste erfolgen.

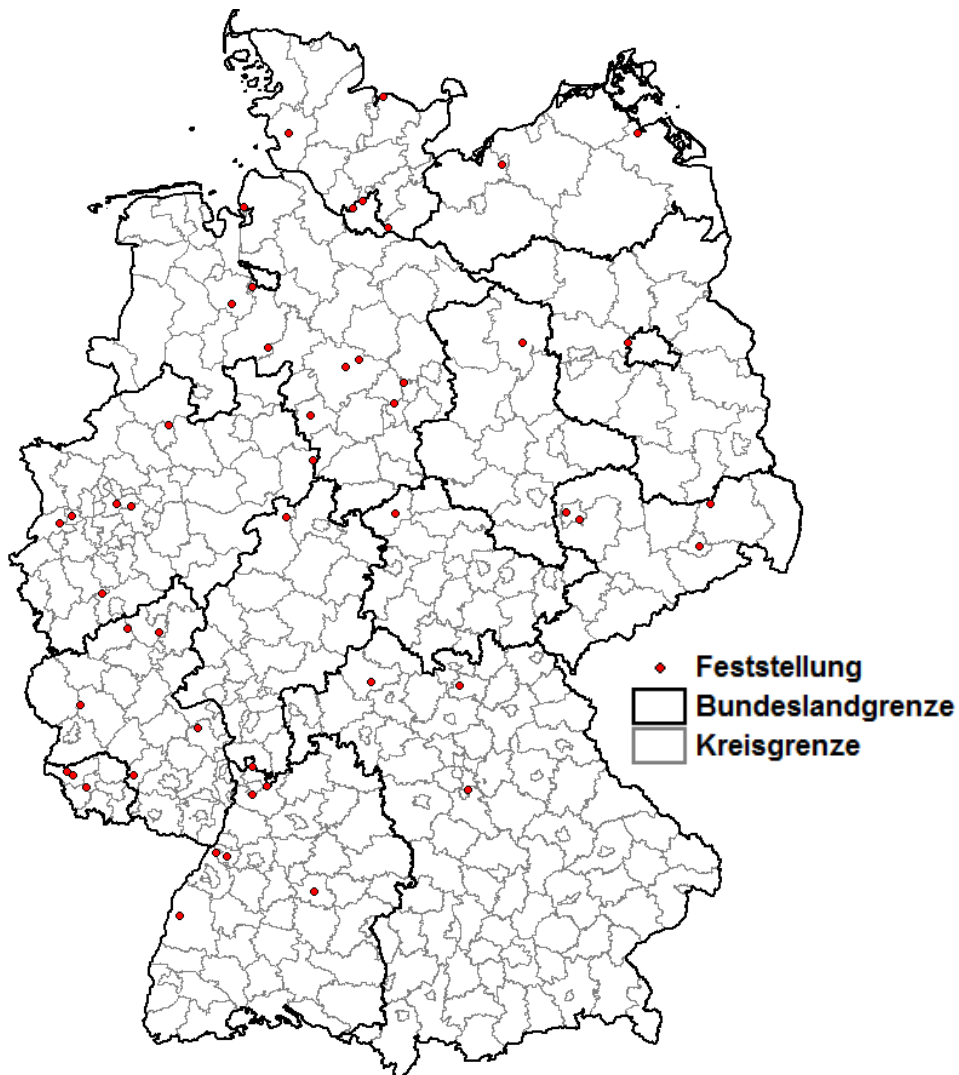


Abb. 1: Geografische Verteilung der im Jahr 2014 in Deutschland gemeldeten KHV-I-Ausbrüche (TSN; Stichtag: 31.12.2014)