

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

Bergmann, S. M., Fischer, U., Kotterba, G.

#### 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 a fatal disease, which poses risk to carp and koi industry. In 2015, a total of 4 KHVD outbreaks in carp farms and 63 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 5 000 t carp annually in 5 791 carp farms, of which the majority is located in Bavaria, Lower Saxony and Saxony. In terms of KHV diagnostic procedures, the major focus is on the development of 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 the real-time PCR (Gilad et al., 2004). Unfortunately, recent data suggest that some KHV varieties with clear clinical manifestations inducing KHVD with up to 100% mortality were not detectable by routinely used PCRs according to Gilad et al., 2004 or Bercovier et al., 2005. Alternatively, a PCR recognizing the viral DNA polymerase gene is recommended to discriminate different cyprinid herpesviruses (Engelsma et al. 2013) in combination with sequence analysis of the respective PCR or nested PCR product.

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 2015, 5 791 carp farms with carp and/or koi were categorized according 2006/88/EG. Worldwide, only the federal state Saxony implemented an eradication program against KHVD, which came to an end in 2014. KHV notification is based on the Directive 2006/88/EC on "European Union animal health requirements for aquaculture animals and products and recently, a new diagnostic handbook has been introduced based on the "COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2015/1554 of 11 September 2015 laying down rules for the application of Directive 2006/88/EC as regards requirements for surveillance and diagnostic methods".

#### Zusammenfassung

In den 90er Jahren verursachte ein Virus massenhafte Verluste bei Nutzkarpfen und Koi (*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. Die KHV-Diagnostik basiert in Europa auf der 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. Am 1. April 2016 trat ein neues Diagnostikhandbuch in Kraft, dessen Grundlage der „DURCHFÜHRUNGS-BESCHLUSS (EU) 2015/1554 DER KOMMISSION vom 11. September 2015 mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich der Anforderungen an die Überwachung und der Diagnosemethoden“ ist.

Tabelle 1: KHV-I-Neuaustrüche/Nachweise im Jahr 2015 in Deutschland (TSN)

Bundesland	Nutzkarpfen	Koi
Baden-Württemberg	1	7
Bayern	0	3
Berlin/Brandenburg	0	0
Bremen	0	0
Hamburg	0	1
Hessen	0	0
Mecklenburg-Vorpommern	0	1
Niedersachsen	0	14
Nordrhein-Westfalen	0	17
Rheinland-Pfalz	0	8
Saarland	0	1
Sachsen	3	3
Sachsen-Anhalt	0	6
Schleswig-Holstein	0	1
Thüringen	0	1
<b>Gesamt</b>	<b>4</b>	<b>63</b>

### Labordiagnostische Untersuchungen

Im Jahr 2015 wurden in Deutschland vier Ausbrüche der KHV-I bei Nutzkarpfen (und anderen Zypriniden) und 63 Ausbrüche/Nachweise beim Koi in TSN registriert (Tab. 1, Abb. 1). Bei der Erfassung der Neuaustrüche 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.

### 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 labor-diagnostisch bestätigten KHV-I-Fall.

Dem TSN ist das Auftreten eines Falles anzuzeigen, wenn folgende Voraussetzungen für die amtstierärztliche Feststellung vorliegen:

- Genomnachweis

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

- für den Genomnachweis
  - real-time (q)PCR (Gilad et al. 2004) oder PCR (Bercovier et al. 2005)
  - PCR und nested PCR mit Sequenzanalyse (Engelsma et al. 2013).

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 aus, wie auch schon bei Einsatz der PCR nach Bercovier et al. (2005), da bei Ausbrüchen mit KHV-I-Klinik Virusgenom mit diesen Methoden nicht immer nachgewiesen werden konnte. Es wird daher zusätzlich die Verwendung einer PAN-CyHV-PCR mit einer nested PCR empfohlen (Engelsma et al. 2013), deren Produkte nach einer Sequenzanalyse mit Datenbanksequenzen von CyHV-3 verglichen werden, wobei Homologien von mindestens 98 % vorliegen müssen.

Im Falle eines KHV-I-Ausbruchs sind von zehn frisch verendeten oder moribund getöteten Fischen Teile der Kiemen und der Niere zu entnehmen und in Pools à maximal fünf Tiere (bei Brütlingen zwei Pools à zehn Tiere) gekühlt zu versenden. Beim Monitoring zum Ausschluss des KHV sollen die Organe von maximal zwei Fischen im Pool (Kiemen- und Nierenteile) geprüft werden. Für die Probennahme von lebenden Fischen können vom

Einzel tier 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 der Probennahme 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 oft nur mit verfeinerten Methoden nachweisen, die zum Teil auf der Detektion weiterer Gene des KHV beruhen (z. B. virales Polymerase-, Kapsid- oder Glykoprotein-Gene). Bei Einwirkung von Stressoren wird das KHV reaktiviert. Das Virus wird dann massiv vermehrt und auch erneut ausgeschieden. Als Folge kann es wieder 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 Probennahme 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 Probennahme für 24 bis 48 Stunden, jedoch nicht länger als drei Tage, separat gehältert werden. Innerhalb der

## Tiergesundheitsjahresbericht 2015

beprobten Population werden aber auch dann nicht alle Fische als KHV-positiv erkannt, sondern i. d. R. nur 30 bis 40 %.

Im Jahr 2015 wurden in den regionalen Untersuchungsämtern 2 797 und im NRL 27 Proben auf das KHV untersucht. Insgesamt waren davon 384 Proben in einer oder mehreren der PCRn positiv.

### Statistische Angaben

#### *Herkunft der Daten*

Es wird auf Datenmaterial des jährlich vom Nationalen Referenz Labor 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 und auf Angaben des TSN zurückgegriffen. Die Daten für den Bericht wurden entsprechend §§ 23 und 27 TierGG von den für das Veterinärwesen zuständigen obersten Landesbehörden der Bundesländer (Daten aus den Untersuchungs-laboren und von den Fischgesundheitsdiensten) zugearbeitet. Die Daten über die Produktionszahlen wurden den Angaben des Statistischen Bundesamtes entnommen.

#### Allgemeine Angaben

2015 wurden in Deutschland in 5 791 Betrieben, und damit in 345 Betrieben weniger als im Jahr 2014, Karpfen produziert. Der Produktionsumfang war in den letzten Jahren insgesamt gleichbleibend bei etwa 5 000 t Karpfen pro Jahr. Deutschlands größte Karpfenproduzenten sind die Bundesländer Bayern, Niedersachsen 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	30
Bayern	4 720
Berlin/Brandenburg	38
Bremen	0
Hamburg	0
Hessen	0
Mecklenburg-Vorpommern	59
Niedersachsen	387
Nordrhein-Westfalen	76
Rheinland-Pfalz	11
Saarland	164
Sachsen	227
Sachsen-Anhalt	23
Schleswig-Holstein	42
Thüringen	14
<b>Gesamt</b>	<b>5 791</b>

Nach der Erteilung einer Genehmigung sind Aquakulturbetriebe laut Fischseuchenverordnung den Kategorien I bis V zuzuordnen. In Deutschland wurden nach der vorläufigen, noch nicht gänzlich abgeschlossenen Kategorisierung bisher keine nachweislich KHV-freien Fischhaltungsbetriebe (nach EU-Richtlinie 2006/88/EG) in die Kategorie I (amtlich seuchenfrei) bzw. in die Kategorie II (Überwachungsprogramm) eingeordnet. 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 waren offenbar die meisten Karpfenbetriebe dieser Kategorie zugeordnet. In

Betrieben der Kategorie IV sind Infektionen mit Fischseuchenerregern bekannt, es wird aber ein genehmigtes Tilgungsprogramm realisiert. In Deutschland wurde 2015 kein Betrieb in diese Kategorie eingeordnet. In Betrieben der Kategorie V sind Infektionen bekannt, es werden aber nur die festgelegten Mindestmaßnahmen zur Bekämpfung durchgeführt. Dies trifft auf mindestens vier Karpfenteichbetriebe zu.

Bis 2015 wurden in Deutschland nahezu alle Karpfenbetriebe 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 Kategoriestatus (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.

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

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, da in infizierten Karpfen das KHV lebenslang (latent) erhalten bleibt und bei Belastungs-

situationen, z. B. Transport, schlechte Wasserqualität, Temperaturschwankungen, hormonelle Veränderungen, Futterumstellung oder anderen Krankheiten [SVC, zunehmend auch das „Carp Edema Virus“ (CEV, piszines Pockenvirus)], reaktiviert werden kann.

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.

### 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 Kois 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 Probennahme für die virologische Untersuchung (auch für die Abstriche bzw. für die Leukozytenseparation) sollte bei den quarantänisierten Fischen 24 Stunden bis maximal 3 Tage nach Ankunft im Bestand erfolgen. Die Wassertemperatur ist dabei

## Tiergesundheitsjahresbericht 2015

unerheblich, höhere Wassertemperaturen (> 15 °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 „KHV-freien“ Fischen erfolgen.
- Eine strikte seuchenhygienische Trennung der Zierfische (z. B. Kois, 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 Fischseuchenverordnung hat der Betreiber eines Fischhaltungsbetriebes seinen Fischbestand entsprechend der Einstufung in die verschiedenen Kategorien „passiv“ (Besichtigung / Adspektion der Anlagen und Teiche), „aktiv“ (Probennahme 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 hiervon zu unterrichten.

Der 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 Gesetzlichkeiten 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 ist,
- die Meldung erhöhter Mortalität an die zuständige Behörde realisierbar erscheint,
- 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 war es, den Status „KHV-unverdächtiger Betrieb“ zu bescheinigen. Beim Nachweis des KHV wurden von der sächsischen Tierseuchenkasse bei Vorlage eines Konzeptes zur Bekämpfung der KHV-I Härtefallbeihilfen in Aussicht gestellt. Die Zielstellung des Programms war auch die Sanierung infizierter Bestände und die Tilgung der KHV-I vom sächsischen Territorium.

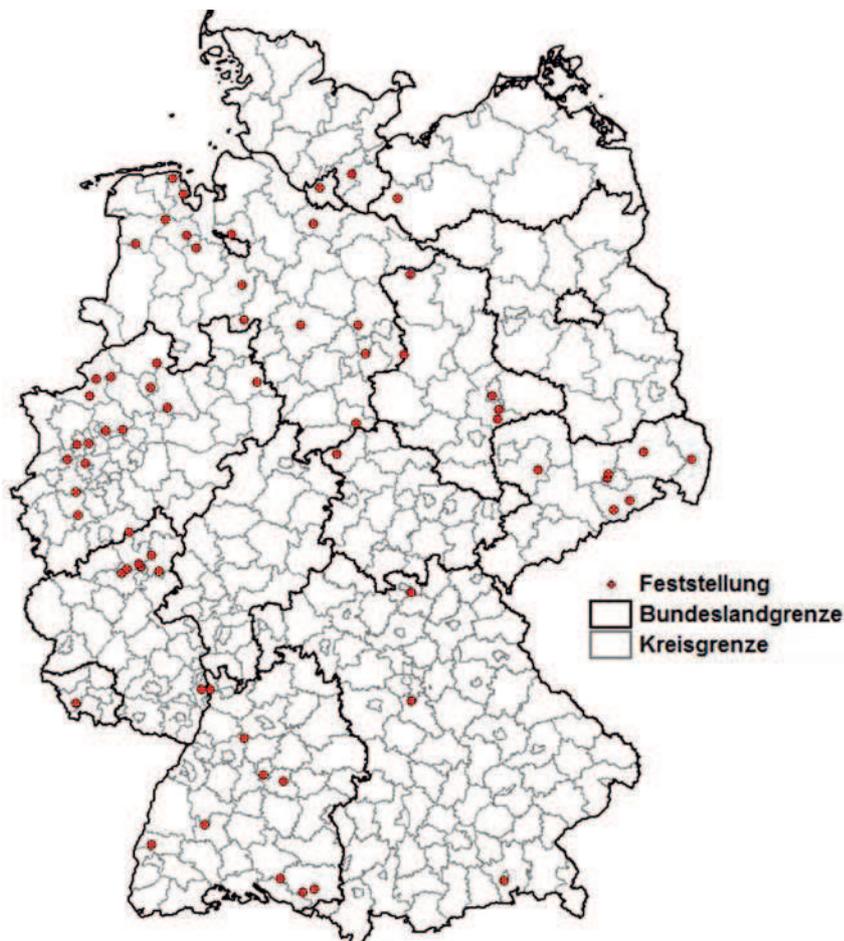


Abb. 1: Geografische Verteilung der im Jahr 2015 in Deutschland gemeldeten KHV-I-Ausbrüche  
(Quelle: TSN)