

Koi-Herpesvirus Übertragung vom Laichkarpfen zur Brut?

Schriftenreihe, Heft 15/2022



Untersuchungen zur Risikobewertung
der Übertragung des Koi-Herpesvirus
durch Laichkarpfenbestände zur Sicherung
nachhaltiger Sanierungserfolge
der KHV-I in Sachsen
und im Hinblick auf die Erhaltung
der genetischen Vielfalt der Laichfischbe-
stände in Sachsen

Prof. Dr. Dieter Steinhagen, Dr. Verena Jung-Schroers, Dr. Mikolaj Adamek, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Parasitologie, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung,
Dr. Grit Bräuer, Dr. Kerstin Böttcher, Sächsische Tierseuchenkasse, Fischgesundheitsdienst,
Dr. Gert Füllner, Sebastian Grosser, Dr. Alexandra Segelken-Voigt



Europäische Union

Europäischer Meeres- und
Fischereifonds **EMFF** 2014-2020

Gefördert durch:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	9
2.1	Forschungsfragen.....	11
3	Forschungsdesign	11
3.1	Beprobung der Laichfische und der Brut (K_0).....	11
3.2	Vorstrecken der Versuchsfische	12
3.3	Abfischung der K_V und Vorbereitung der Fische für weitergehende Untersuchungen	14
4	Untersuchungen zu einer möglichen vertikalen Übertragung von KHV Karpfen ...	15
4.1	Methoden	15
4.1.1	Beprobung der Karpfen	15
4.1.1.1	Laichfischbestand.....	15
4.1.1.2	Laicher in der Laichkammer, Geschlechtsprodukte und befruchtete Eier.....	15
4.1.1.3	Geschlüpfte Larven und fressfähige Brut.....	15
4.1.1.4	Karpfenbrut.....	16
4.1.2	Molekularbiologische Untersuchung der Proben.....	16
4.1.3	Statistische Analysen	18
4.2	Ergebnisse	18
4.2.1	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Kiemenproben von Laich-karpfen beim Abfischen und Geschlechtertrennung - Versuchsjahr 2020 und 2021.....	18
4.2.2	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Kiemenproben von Laichkarpfen aus der Laichkammer nach dem Ablachen.....	20
4.2.3	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Geschlechtsprodukten von Laichkarpfen aus der Laichkammer nach dem Ablachen.....	22
4.2.4	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in befruchteten Eiern	24
4.2.5	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in geschlüpften Larven	25
4.2.6	Nachweis von KHV-Genomsequenzen in angefütterter Karpfenbrut 2020 und 2021	26
4.2.7	Sequenzierung des KHV Isolats aus positiv befundenen Karpfen.....	26
4.2.8	Neutralisierende Antikörper in Serumproben (SNT-Titer).....	27
5	Untersuchungen einer möglichen Resistenz der Brut gegenüber KHV-I	28
5.1	Methoden	28
5.1.1	Aufzucht und Haltung der Karpfen.....	28
5.1.2	Infektion von Karpfen mit KHV.....	29
5.1.3	Extraktion von DNA aus Gewebeproben und Bestimmen der Viruslast	30
5.2	Ergebnisse	31
5.2.1	Empfänglichkeit der Karpfenbrut für eine KHV-I, die von Laichkarpfen aus dem KHV-Risikogebiet abstammen	31
5.2.1.1	Empfänglichkeit der Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung	31
5.2.1.2	Verlauf der Infektion und Viruslasten nach drei Monaten Beckenhaltung.....	31
5.2.1.3	Empfänglichkeit der Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung	33
5.2.1.4	Verlauf der Infektion und Viruslasten nach neun Monaten Beckenhaltung.....	34
5.2.1.5	Empfänglichkeit von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung.....	36
5.2.1.6	Verlauf der Infektion und Viruslasten nach einem Monat Beckenhaltung.....	37

6	Beantwortung der Forschungsfragen und Schlussfolgerungen für die teichwirtschaftliche Praxis.....	40
6.1	Sind die Laichfischbestände in Unternehmen, die mehrere Jahre einem hohen Feldvirusdruck ausgesetzt waren, nachweislich latent mit dem KHV infiziert?	40
6.2	Ist die Infektion von Laichkarpfen serologisch nachweisbar?	41
6.3	Entspricht das nachgewiesene Virusgenom der in Deutschland zirkulierenden KHV-Variante?	41
6.4	Ist bei infizierten Laichkarpfen das Virus auch in den Geschlechtsprodukten (Eiern und Spermien) nachweisbar?	41
6.5	Findet eine Infektion der Brut durch latent infizierte Laichkarpfen statt?	41
6.6	Können unter bestimmten Bedingungen die potenziell KHV-positiven Laichfischbestände während der Sanierungsmaßnahmen erhalten werden?.....	43
6.7	Welche Konsequenzen ergeben sich aus den Ergebnissen für die Seuchenbekämpfung?.....	43
	Literaturverzeichnis	45
	Anhang	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung der KHV-Situation in Sachsen bis 2020 (TSK 2021).....	9
Abbildung 2:	Einbringen des Transponders in den <i>Musculus adductor mandibulae</i>	11
Abbildung 3:	Eines der zum Vorstrecken eingesetzten Hälterbecken in der ÜHA Königswartha, mit Netz gegen Prädatoren überspannt.....	13
Abbildung 4:	Netzbeutel mit Gründüngung zur Nährstoffversorgung der Naturnahrung für die Karpfenbrut in den Becken der ÜHA Königswartha.....	13
Abbildung 5:	Desinfektionsmaßnahmen beim Vorstrecken der Karpfenbrut in der ÜHA Königswartha: Desinfektionsmatte und Desinfektionswannen (Hintergrund).....	14
Abbildung 6:	Vorbereitung der K _v für den Versand zur TiHo Hannover.....	14
Abbildung 7:	Vorgehen bei der Quantifizierung der Viruslast in untersuchten Proben: Amplifikationskurven von Standardlösungen und von Proben sowie Standardkurve mit Messpunkten für die Standardlösungen sowie für die untersuchten Proben.....	17
Abbildung 8:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen zum Zeitpunkt der Abfischung (vor der Reproduktion) in Betrieb A.....	19
Abbildung 9:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen zum Zeitpunkt der Abfischung (vor der Reproduktion) in Betrieb B.....	20
Abbildung 10:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen in der Laichkammer (nach der Reproduktion) in Betrieb A.....	21
Abbildung 11:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen in der Laichkammer (nach der Reproduktion) in Betrieb B.....	22
Abbildung 12:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in Ei- und Spermienproben von Laichkarpfen aus Betrieb A.....	23
Abbildung 13:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in Ei- und Spermienproben von Laichkarpfen aus Betrieb B.....	24
Abbildung 14:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in befruchteten Eiern in Betrieb A und B.....	25
Abbildung 15:	Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in geschlüpften Larven in Betrieb A und B.....	26
Abbildung 16:	Nachweis von Serum-neutralisierenden Antikörpern (SNT) in unterschiedlichen Verdünnungen von Laichern aus Betrieb A und B im Jahr 2020.....	27
Abbildung 17:	Nachweis von Serum-neutralisierenden Antikörpern (SNT) in unterschiedlichen Verdünnungen von Laichern aus Betrieb A und B im Jahr 2021.....	28
Abbildung 18:	Infektion von Karpfen der Versuchsgruppen A, B und K mit KHV in getrennt eingehängten Netzkäfigen.....	29
Abbildung 19:	Haltung der Karpfen nach der Infektion in einem gemeinsamen Wasserkörper.....	30
Abbildung 20:	Mortalität bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) nach drei Monaten Beckenhaltung im Vergleich zu Karpfen von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K).....	31
Abbildung 21:	Viruslasten in der Haut und Niere von Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung aus unterschiedlichen Betrieben nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat.....	32
Abbildung 22:	Viruslasten in Geweben von Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung aus einem KHV- Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV (Betrieb K). Historie am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat.....	33

Abbildung 23: Mortalität bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) nach neun Monaten Beckenhaltung im Vergleich zu Karpfen von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K). Dargestellt ist der Verlauf von Verlusten nach Infektion nach neun Monaten Beckenhaltung mit einem virulenten polnischen Isolat des KHV und die kumulative Überlebensrate als Mittelwert und Standardabweichung in 3 gleichen Versuchsgruppen..	34
Abbildung 24: Viruslasten in Haut und Niere von Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung aus unterschiedlichen Herkünften (Betrieb A, B und K) nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Angegeben sind die Viruslasten in Geweben von Karpfen, die in der Zeit von 5 bis 14 Tagen nach der Infektion verstarben oder aus Tierschutzgründen getötet wurden.	35
Abbildung 25: Viruslasten in Geweben von Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung aus einem KHV Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV Historie (Betrieb K) am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat.	36
Abbildung 26: Überlebensrate bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfenbrut von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K). Verlauf der Verluste nach Infektion von einem Monat alten vorge-streckten Karpfen mit einem virulenten polnischen Isolat des KHV in drei Versuchsbecken (Mittelwert und Standardabweichung).	37
Abbildung 27: KHV-Viruslasten in Haut und Niere von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung aus unterschiedlichen Herkünften (Betrieb A, B und K) nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Angegeben sind die Viruslasten in Geweben von Karpfen, die in der Zeit von 5 bis 14 Tagen nach der Infektion verstarben oder aus Tierschutzgründen getötet wurden.	38
Abbildung 28: KHV-Viruslasten in Geweben von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung aus einem KHV Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV Historie (Betrieb K) am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat.	39

Tabellenverzeichnis im Anhang

Tabelle A 1: Übersicht über den KHV-Genomnachweise in Laichkarpfen und Geschlechtsprodukten von individuellen Laichern aus Betrieb A im KHV-Endemiegebiet in den Jahren 2020 und 2021.	46
Tabelle A 2: Übersicht über den KHV-Genomnachweise in Laichkarpfen und Geschlechtsprodukten von individuellen Laichern aus Betrieb B im KHV-Endemiegebiet in den Jahren 2020 und 2021. ..	49

Abkürzungsverzeichnis

CEV	Carp Edema Virus (Erreger der Schlafkrankheit des Karpfens)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FGD	Fischgesundheitsdienst der Sächsischen Tierseuchenkasse
IE	Internationale Einheiten
K ₀	Karpfenbrut
K _v	vorgestreckte Karpfenbrut
KHV	Koi-Herpesvirus
KHV-I	Koi-Herpesvirusinfektion
LfULG	Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
qRT-PCR	quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RNA-Later	Konservierungslösung für Gewebeproben, die mittels PCR untersucht werden sollen
RIZ	Research Center for Emerging Infections and Zoonoses an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
SNT	Serumneutralisationstest
SPF	Specific pathogen free (Abwesenheit von bestimmten Krankheitserregern bei den Versuchstieren).
TiHo	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
TSK	Sächsische Tierseuchenkasse
ÜHA	Überwinterungs- und Halteranlage der VTA Königswartha
VTA	Versuchsteichanlage Königswartha

Zitiervorschlag: Steinhagen D, Jung-Schroers V, Ademek M, Bräuer G, Böttcher K, Füllner G, Segelken-Voigt A, Grosser, S (2022): Untersuchungen zur Risikobewertung der Übertragung des Koi-Herpesvirus durch Laichkarpfenbestände zur Sicherung nachhaltiger Sanierungserfolge der KHV-I in Sachsen und im Hinblick auf die Erhaltung der genetischen Vielfalt der Laichfischbestände in Sachsen. Schriftenreihe des LfULG XX: 49 pp.

1 Zusammenfassung

In latent infizierten Laichkarpfenbeständen lässt sich das Koi-Herpesvirus (KHV) während und nach dem Abfischstress nachweisen, dies jedoch bei wenigen Tieren und mit geringer Viruslast. In der Routinediagnostik wird es deshalb möglicherweise übersehen. Das Virusgenom kann in Geschlechtsprodukten und in Proben von befruchteten Eiern nachgewiesen werden. Eine Infektion der frisch geschlüpften Brütlinge (K₀) scheint allerdings nicht zu erfolgen. Damit ist auch eine Übertragung der Infektion auf nicht infizierte Bestände durch Karpfenbrut, die von KHV-positiven Laichern abstammt, unwahrscheinlich. Brütlinge von Laichfischen, die aus KHV-positiven Beständen stammen, haben eine höhere Resistenz gegenüber einer erneuten KHV-I. Der Besatz mit dieser Brut ist in Endemiegebieten möglich, aber insbesondere in KHV-freien Regionen nicht generell zu empfehlen.

2 Einleitung

Die durch eine Infektion mit dem Cypriniden Herpesvirus 3 (CyHV-3), oder Koi Herpesvirus (KHV) bei Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) ausgelöste Erkrankung (KHV-I) verursacht in Karpfenbeständen in Sachsen seit ca. 10 Jahren erhebliche Sterblichkeiten in betroffenen Beständen und in der Folge wirtschaftliche Verluste. Besonders betroffen sind Betriebe in der Karpfenregion Oberlausitz; in den letzten Jahren wurde eine Ausbreitung in Richtung Westen beobachtet. Während im Zusammenhang mit einer KHV-I verstorbene zweisömmrige und ältere Karpfen von betroffenen Teichen abgelesen, beziffert und anschließend entsorgt werden können, bleiben Verluste bei jüngeren Karpfen, insbesondere bei Brut und vorgestreckten Karpfen aufgrund ihrer geringen Körpermasse während der Produktionsphase weitgehend unentdeckt und werden erst bei der Abfischung registriert. Insgesamt wurde der wirtschaftliche Gesamtschaden in der Karpfenteichwirtschaft in Sachsen in der Zeit vom ersten Auftreten der Erkrankung bis zum Beginn des Forschungsvorhabens im Juli 2019 auf mehr als 5 Mio. Euro geschätzt.

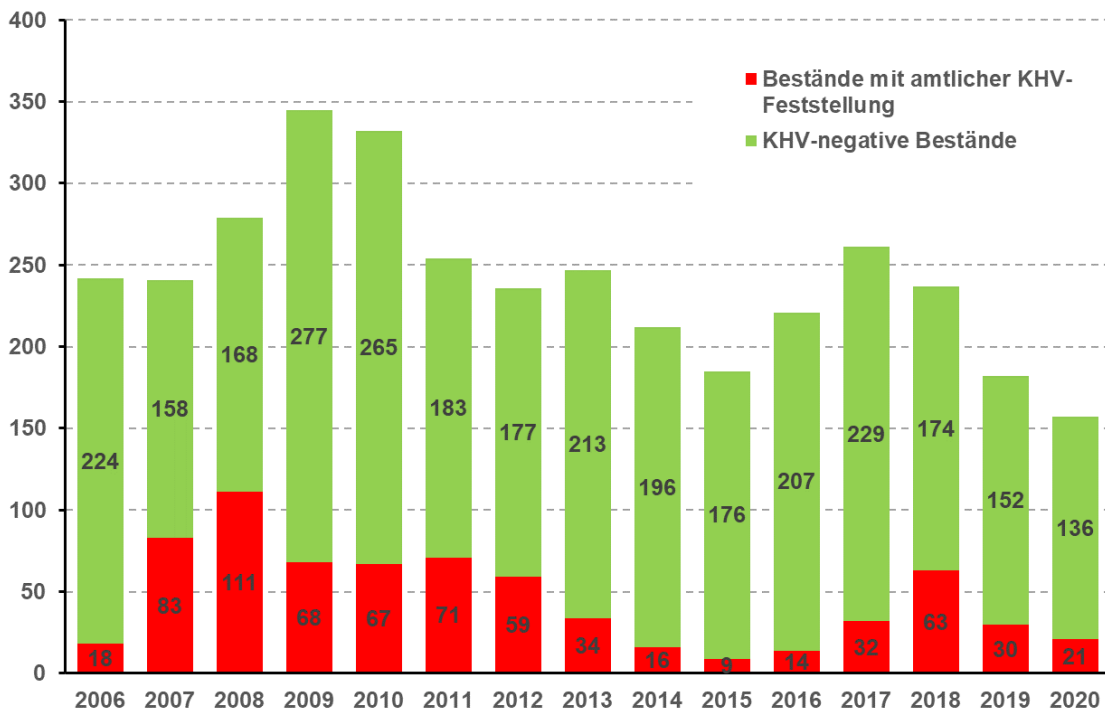


Abbildung 1: Entwicklung der KHV-Situation in Sachsen bis 2020 (TSK 2021)

Die Erkrankung war zu Beginn des Forschungsprojekts gemäß Fischseuchenverordnung als nicht exotische anzeigepflichtige Fischseuche eingestuft. Der Freistaat Sachsen hat durch umfangreiche Anstrengungen und insbesondere durch die Umsetzung des Programms zur Tilgung der Koi-Herpesvirusinfektion gemäß Artikel 32 der Verordnung (EG) Nr. 1198/2006 über den Zeitraum von 2009 bis 2016, in enger Zusammenarbeit mit der Sächsischen Tierseuchenkasse (TSK), den Veterinär- und Naturschutzbehörden und den betroffenen Fischhaltern die Seuche in einigen Regionen erfolgreich zurückdrängen können, was sich in einem deutlichen Rückgang der infizierten Fischbestände und der betroffenen Betriebe zeigt (Abbildung 1).

In einem regional abgegrenzten Gebiet der Oberlausitz mit einer großen Anzahl von Karpfenteichwirtschaften, die über eng benachbarte Teiche oder Teichgruppen verfügen und die eine hohe Prädatorendichte aufweisen, konnte die KHV-I trotz konsequenter Anwendung der üblichen Methoden zur Fischseuchenbekämpfung (Abfischen, Desinfektion, Neubesatz) jedoch bisher nicht zufriedenstellend eingedämmt werden. In dieser Region sind Karpfenteiche besonders wertvolle Hot Spots für den Biotop- und Artenschutz. Bei regelmäßig hohen Fischverlusten durch die KHV-I wäre ihr langfristiger Erhalt deswegen bedroht, weil eine dauerhaft ausbleibende Wirtschaftlichkeit Unternehmen der Karpfenteichwirtschaft zur Betriebsaufgabe zwingen könnte.

Mittlerweile gewinnen einige Unternehmen in der Region wieder Karpfenbrut aus dem eigenen Laichfischbestand. Aufgrund des dauerhaften Vorhandenseins von Feldvirus ist daher anzunehmen, dass die Elterntiere in diesen Betrieben latent mit KHV infiziert sind. In einigen Fällen ist der Nachweis bei den Elterntieren auch belegbar.

Bisher ist allerdings wenig darüber bekannt, ob Karpfen während des naturnahen Ablachens das KHV horizontal, das heißt über Wasser, Schleim oder Geschlechtsprodukte auf die Brut übertragen können. Ebenso wenig war bekannt, ob im weiteren Verlauf eine vertikale Übertragung des KHV von Elterntieren auf die Brut, also über das Eiinnere bzw. den Brütling, möglich ist oder erfolgt.

Nach klassischem Verständnis der Fischseuchenbekämpfung ist eine Brutgewinnung aus latent infizierten Laichkarpfen abzulehnen, da befürchtet werden muss, dass dadurch eine vollständige Bekämpfung der KHV-I verhindert und bei Weitergabe der Brut sogar die Ausbreitung der Infektion gefördert wird. Folglich wären latent infizierte Virusträger im Falle der konsequenten Seuchenbekämpfung zu merken.

Gegen eine Merzung von Laichkarpfenbeständen, die bereits mit dem KHV Kontakt hatten, sprechen hingegen folgende Punkte:

- Durch eine Merzung von Laichfischbeständen können wertvolle regional angepasste Karpfenherkünfte in der Oberlausitz endgültig verloren gehen. Diese müssten durch KHV-freie, aber örtlich weniger angepasste Bestände ersetzt werden. Das könnte wiederum die Leistung der Nachkommen, die Fischgesundheit und damit letztlich die wirtschaftliche Situation der Betriebe negativ beeinträchtigen.
- Es kann vermutet werden, dass nach einem KHV-Ausbruch in einem Bestand diejenigen Karpfen überleben, die eine geringere Empfänglichkeit für die Infektion oder die Entwicklung der Erkrankung haben. Werden diese Karpfen als Nachwuchslaicher ausgewählt, könnten ihre Nachkommen möglicherweise eine höhere Resistenz gegenüber einer KHV-I aufweisen.

Im Rahmen des Projekts sollte untersucht werden, ob potenziell KHV-positive Laichfische die Infektion während des natürlichen Ablachens in klassischen Laichteichen auf die Brut übertragen und Nachkommen solcher Laichfische höhere Überlebensraten im Falle einer KHV-I haben. Beide Fragen wurden wissenschaftlich bisher nicht untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen könnten aber weitreichende Konsequenzen für die Praxisbetriebe der Karpfenteichwirtschaft in Regionen haben, in denen nach wie vor KHV-Infektionen auftreten oder zu befürchten sind.

2.1 Forschungsfragen

Im Rahmen der Untersuchungen waren im Detail folgende Fragen zu beantworten:

Sind die Laichfischbestände in Unternehmen der ehemaligen Kategorie V ("Seuchenbetrieb"), die mehrere Jahre einem hohen Feldvirusdruck ausgesetzt waren, nachweislich latent mit dem KHV infiziert?

1. Ist die Infektion von Laichkarpfen serologisch nachweisbar?
2. Entspricht das nachgewiesene Virusgenom der in Deutschland zirkulierenden KHV-Variante?
3. Ist bei infizierten Laichkarpfen das Virus auch in den Geschlechtsprodukten (Eiern und Spermien) nachweisbar?
4. Findet eine Infektion der Brut durch latent infizierte Laichkarpfen statt?
5. Hat sich in der Nachkommenschaft gegenüber dem Virus bereits eine Resistenz aufgebaut?
6. Können unter bestimmten Bedingungen die potenziell KHV-positiven Laichfischbestände während der Sanierungsmaßnahmen erhalten werden?
7. Welche Konsequenzen ergeben sich aus den Ergebnissen für die Seuchenbekämpfung?

3 Forschungsdesign

Für die Untersuchungen wurden zwei Fischhaltungsbetriebe der ehemaligen Kategorie V („Seuchenbetrieb“) nach der bis 2021 geltenden Fischseuchenverordnung in Verbindung mit der Aquakulturrichtlinie 2006/88/EG aus dem KHV-Risikogebiet ausgewählt. Die Betriebe waren zur Mitarbeit am Projekt bereit und hatten eigene Laichfischbestände (Betrieb A und B). Zusätzlich wurde ein weiterer Betrieb ohne bekannte KHV-Infektion (ehemals Kategorie III - KHV-unverdächtiger Betrieb) als Kontrolle mit in die Versuche integriert (Betrieb K).

3.1 Beprobung der Laichfische und der Brut (K₀)



Abbildung 2: Einbringen des Transponders in den *Musculus adductor mandibulae*

In den Betrieben A und B wurden während der routinemäßigen Körung und Geschlechtertrennung der Laichfischbestände jeweils im Frühjahr 2020 und 2021 männliche und weibliche Laichkarpfen individuell mittels steriler RFID-Tierchips 1,4 x 8,5 mm im Bereich des *M. adductor mandibulae* markiert. Die Markierungsstelle wurde so ausgewählt, dass der Transponder nicht abwandern und relativ dicht unter der Schleimhaut platziert werden konnte (Abbildung 2). Beides ist für ein zügiges erneutes Identifizieren der Individuen unabdingbar. Die langfristige Kennzeichnung der Tiere hat für den Tierhalter auch in Zukunft Vorteile.

Gleichzeitig wurden von den nunmehr individuell markierten Laichfischen Kiemenbiopate und Serumproben zur Untersuchung auf Vorliegen einer KHV-Infektion entnommen.

Die markierten Laichfische wurden in Laichteichanlagen der Betriebe A und B nach dem jeweiligen betrieblichen Protokoll zum Ablachen ausgesetzt und nach dem Ablachen aus den Laichkammern entfernt. Dabei wurden den Laichfischen erneut Kiemenbiopate sowie nach Möglichkeit Geschlechtsproduktsproben (Eier oder Sperma) zur Untersuchung auf eine Infektion entnommen. Zusätzlich wurden aus den Laichkammern befruchtete Eier und später frisch geschlüpfte Karpfenbrut gesammelt und portionsweise zur Untersuchung auf KHV-Genomsequenzen beprobt. Die Proben wurden zur Konservierung der Nukleinsäuren in Gefäße mit RNA-later überführt und tiefgefroren, nur Serum- und Spermaproben wurden ohne Konservierungsmittel eingefroren.

Alle Gewebe-, Ei- und Spermaproben wurden mittels quantitativer reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) auf für das KHV spezifische Genomsequenzen untersucht und die Serumproben mit Hilfe eines Serum-Neutralisationstests (SNT) auf neutralisierende spezifische Antikörper gegen das KHV kontrolliert.

Die Kennzeichnung der Laichkarpfen durch die Transponder, alle weiteren klinischen Untersuchungen und Probenahmen für die Labordiagnostik wurden von Tierärztinnen des Projektpartners TSK durchgeführt.

3.2 Vorstrecken der Versuchsfische

Die Karpfenbrut der Betriebe A und B wurde anschließend in der Überwinterungs- und Hälteranlage (ÜHA) der Lehr- und Versuchsteichanlage Königswartha (VTA) über jeweils etwa 4 Wochen in je zwei Hälterbecken vorgestreckt (Abbildung 3). Die Hälter wurden hierbei etwa 50 cm hoch angestaut und mit in Netzen eingebundener Gründüngung für das Vorstreckverfahren vorbereitet (Abbildung 4). In einem weiteren Hälter erfolgte die Aufzucht der Kontrollgruppe von Karpfenbrut aus einem Vermehrungsbetrieb ohne bekannte KHV-Infektion (Betrieb K).



Abbildung 3: Eines der zum Vorstrecken eingesetzten Hälterbecken in der ÜHA Königwartha, mit Netz gegen Prädatoren überspannt

Das Vorstrecken der Brut erfolgte in Betonbecken der ÜHA-Königwartha, da hier die Abschirmung gegen Prädatoren durch Überspannung sicherer zu gewährleisten war, als in "klassischen" Vorstreckteichen inmitten eines großen Teichgebiets. Außerdem war eine sichere seuchenhygienische Abgrenzung zur Vermeidung des Eintrags von Feldvirus über Prädatoren aus umliegenden Teichen möglich. Dieser hätte die Klärung fast aller Versuchsfragen unmöglich gemacht. Um eine Virusübertragung auch zwischen den Versuchsgruppen auszuschließen, waren außerdem umfangreiche Hygienemaßnahmen erforderlich. Zum einen stand für jede Versuchsgruppe ein separates Equipment (Kescher etc.) zur Verfügung und zum anderen wurden jeweils Desinfektionswannen und -matten bereit gestellt, um alle Kontaktflächen (Stiefel, Hände etc.) vor dem Betreten zu säubern (Abbildung 5).



Abbildung 4: Netzbeutel mit Gründung zur Nährstoffversorgung der Naturnahrung für die Karpfenbrut in den Becken der ÜHA Königwartha



Abbildung 5: Desinfektionsmaßnahmen beim Vorstrecken der Karpfenbrut in der ÜHA Königswartha: Desinfektionsmatte und Desinfektionswannen (Hintergrund)

Die Haltung von Fischen zu wissenschaftlichen Zwecken ist in der Lehr- und Versuchsteichanlage (VTA) und der Überwinterungs- und Hälteranlage (ÜHA) gemäß Bescheid der Landesdirektion Sachsen vom 22. Juni 2015 unter dem Aktenzeichen DD24-5131/346/1 unbefristet erteilt worden.

3.3 Abfischung der K_v und Vorbereitung der Fische für weitergehende Untersuchungen

Nach Vorstrecken der fressfähigen Brut in der ÜHA Königswartha wurden pro Gruppe jeweils etwa 1.000 Stück der nun etwa 1 g schweren Karpfen getrennt verpackt und unter Sauerstoffatmosphäre per PKW an die TiHo Hannover überführt (Abbildung 6). Dort wurden sie in die Fischhaltung der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung aufgenommen und weiter nach Herkunft getrennt in mit Leitungswasser befüllten zuvor desinfizierten Becken gehalten.



Abbildung 6: Vorbereitung der K_v für den Versand zur TiHo Hannover

Die vorgestreckten Karpfen aller drei Betriebe (A, B und K) wurden jeweils ein, drei und neun Monate nach Einstellung mit KHV infiziert und anschließend wurde die Überlebensrate sowie die Entwicklung der Viruslast in verstorbenen und überlebenden Karpfen mittels quantitativer PCR bestimmt.

Die dafür angewandte Methodik und die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden detailliert beschrieben.

4 Untersuchungen zu einer möglichen vertikalen Übertragung von KHV Karpfen

4.1 Methoden

4.1.1 Beprobung der Karpfen

4.1.1.1 Laichfischbestand

Im Betrieb A erfolgte im Jahr 2020 die Markierung und Probennahme von 42 männlichen und 20 weiblichen Karpfen am 21.04.2020 und im Betrieb B von 41 männlichen und 20 weiblichen Karpfen am 15.04.2020. Neben Kiemenproben, die einzeln in Isopropanol überführt wurden, wurden Serumproben gewonnen. Alle Proben wurden zunächst bei -20 °C eingefroren und anschließend in der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der TiHo bis zur Untersuchung auf KHV-spezifische Genomsequenzen bzw. Antikörper bei -80 °C gelagert.

Im April 2021 wurde versucht, die identischen Laichkarpfen wie im Vorjahr zu beproben. Im Betrieb A konnten 56, im Betrieb B 50 der bereits im Vorjahr untersuchten Fische wiedergefangen und beprobt werden. Die Stichprobe wurde mit 26 (Betrieb A) bzw. 10 (Betrieb B) zusätzlichen, erstmalig untersuchten Laichkarpfen ergänzt.

4.1.1.2 Laicher in der Laichkammer, Geschlechtsprodukte und befruchtete Eier

Proben von Laichern aus den Laichkammern, von Geschlechtsprodukten und von befruchteten Eiern wurden sowohl im Jahr 2020 als auch im Jahr 2021 gewonnen.

Die markierten Laichfische wurden in den Betrieben A und B auf übliche Weise zum Ablachen gebracht und nach dem Ablachen aus der Laichkammer der Dubischanlage entfernt. Gleichzeitig wurden den Fischen erneut Kiemenproben und Geschlechtsprodukte zur Untersuchung auf eine Infektion mit KHV entnommen.

Aus den Laichkammern wurden befruchtete Eier gesammelt und portionsweise zur Untersuchung auf KHV-Genomsequenzen beprobt. Die Kiemen- und Eiproben wurden zur Konservierung in Gefäße mit RNA-Later überführt und anschließend bei -20 °C gelagert. Die Proben mit Karpfenmilch wurden direkt in Probengefäße gesammelt und bei -20 °C gelagert.

4.1.1.3 Geschlüpfte Larven und fressfähige Brut

Nach dem Schlupf der Larven in den Jahren 2020 und 2021 wurden durch den Projektpartner TSK aus den Laichkammern je Betrieb Brütlinge mit ca. 25 Larven entnommen, in RNA-Later konserviert und bis zur Untersuchung auf KHV-spezifische Genomsequenzen bei -20 °C gelagert. Die Proben aus den Fischhaltungsbetrieben A und B wurden mit Brütlingen aus dem Kontrollbetrieb K ergänzt und in die Untersuchung eingeschlossen.

4.1.1.4 Karpfenbrut

Die schwimm- und fressfähige Karpfenbrut aus den drei Betrieben A, B und K wurde im Frühjahr 2020 in der ÜHA Königswartha bis zu einem Stückgewicht ca. 1 g aufgezogen und anschließend an die TiHo Hannover transportiert. Hier wurden die Fische nach Herkunft getrennt in desinfizierte mit Leitungswasser befüllte Kunststoffwannen in die Laborhälterung übernommen und bei 20 - 23 °C weiter gehalten. Bei Ankunft in der TiHo Hannover wurden aus jedem Bestand (Betriebe A, B und K) jeweils 30 Karpfen durch Einsetzen in eine Lösung von 0,5 g Tricain pro Liter Wasser getötet, die Organe (Haut, Kiemen, Niere und Gehirn) entnommen und bis zur molekularbiologischen Untersuchung auf KHV-spezifische Genomsequenzen in RNA-later bei -20 °C eingefroren. Dieses Prozedere wurde mit den Proben des Jahres 2021 in gleicher Weise wiederholt.

4.1.2 Molekularbiologische Untersuchung der Proben

Aus den Kiemenproben, Organproben, Brütlingen, Eiern und Karpfenmilch wurde nach mechanischer Lyse von 25 mg Gewebe (Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers genomische DNA extrahiert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde in allen Proben photometrisch bestimmt (NanoDrop, Thermo Scientific, USA), mit Nuklease-freiem Wasser (ThermoFisher Scientific, USA) auf 50 ng/µl eingestellt und bei -80 °C bis zur Verwendung in der PCR gelagert. Als negative Kontrollen dienten Proben von nicht mit KHV infizierten Karpfen aus der eigenen SPF-Fischhaltung der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der TiHo Hannover, die dort unter virusfreien Bedingungen aus befruchteten Eiern aufgezogen wurden.

Zum Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in den Proben und zur Quantifizierung der Viruslast wurde eine quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Zum Einsatz kamen die von GILAD et al. (2004) entworfenen Startsequenzen und das in der zitierten Publikation beschriebene Amplifikationsprogramm (ADAMEK et al. 2013). Verwendet wurden die Startsequenzen KHV-86F und KHV-163R sowie die Sonde KHV-109. Die Startsequenzen amplifizieren ein Fragment des CyHV-3-ORF 89 und ORF 90 (Genbank ID: AF411803, GILAD et al. 2004). Das PCR-Reaktionsgemisch bestand aus 1 x MasterMix (Maxima Probe qPCR-Kit, Thermo Fisher Scientific), 800 nM jeder Startsequenz und 100 nM der fluoreszierenden Sonde, 5 µl extrahierte DNA sowie nukleasefreies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 20µl. Die gesamte Amplifikation erfolgte wie bei ADAMEK et al. (2013) beschrieben über insgesamt 40 Amplifikationszyklen.

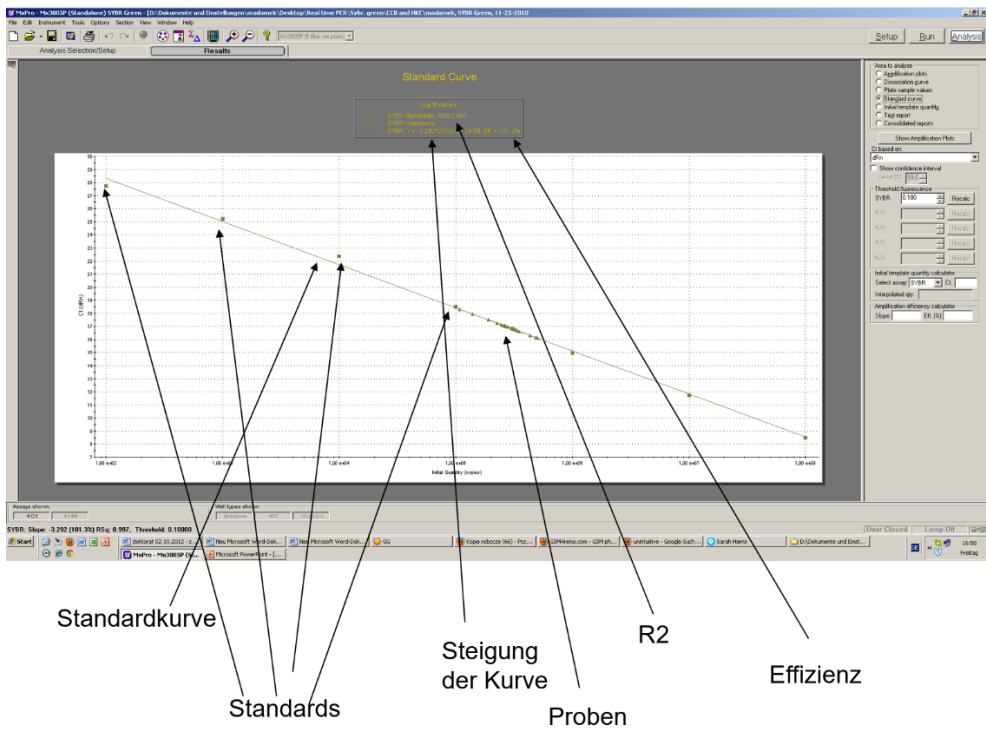
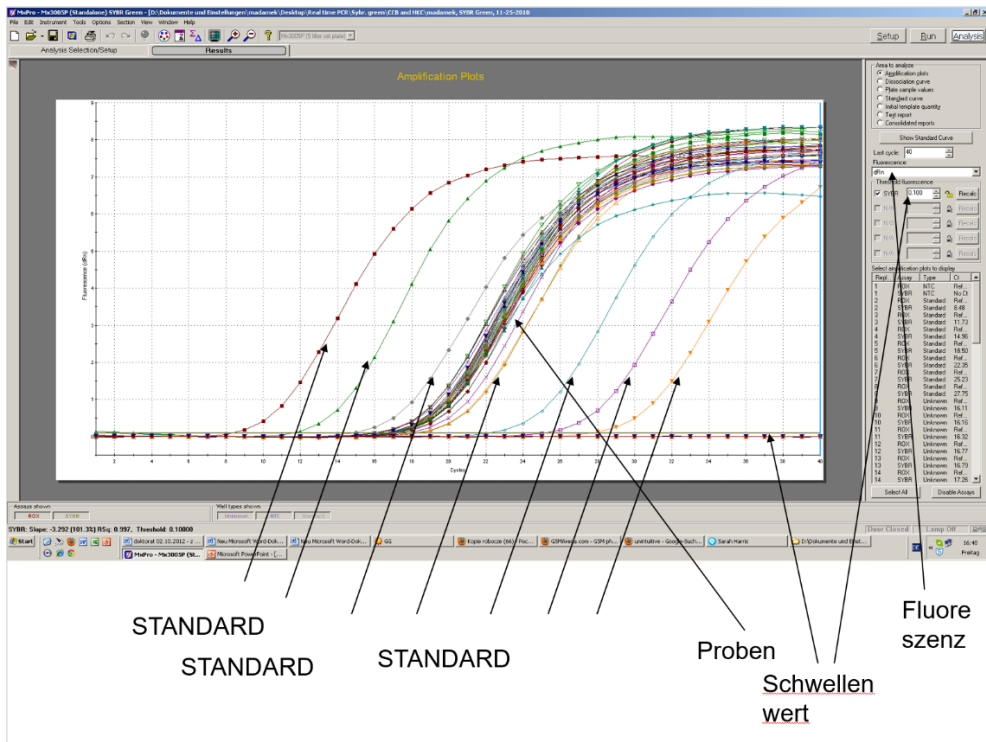


Abbildung 7: Vorgehen bei der Quantifizierung der Viruslast in untersuchten Proben. Obere Abbildung: Amplifikations-Kurven von Standardlösungen und von Proben. Untere Abbildung: Standardkurve mit Messpunkten für die Standardlösungen sowie für die untersuchten Proben.

Die Quantifizierung der Viruslast erfolgte durch einen Plasmid-basierten Standard, indem das PCR-Produkt, das nach Amplifikation mit den Primern KHV-86F und KHV-163R erzielt wurde, in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, USA) ligiert und in JM109 kompetenten *Escherichia coli* Bakterien (Promega, USA) vermehrt wurde. Nach der Vermehrung wurde das Plasmid mit dem GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo) isoliert und eine Verdünnungsreihe von 1 bis 10.000.000 Gen-Kopien erstellt. Aus dieser Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, die zur Quantifizierung der Anzahl Genkopien in jeder Probe verwendet wurde (Abbildung 7).

Die Ergebnisse wurden angegeben als Anzahl Genkopien pro 250 ng DNA.

Alle Proben wurden im Doppelansatz untersucht und als KHV-positiv gewertet, wenn in beiden Proben des Doppelansatzes KHV-spezifische DNA nachweisbar war. Wenn nur in einer Probe des Doppelansatzes ein Signal für KHV-spezifische DNA auftrat, wurde die Probe als „fraglich positiv“ bewertet.

Das Serum aus den Blutproben der Laichkarpfen wurde von den Mitarbeiterinnen des Projektpartners TSK auf den Partnerbetrieben gewonnen und in der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der TiHo bei - 80 °C gelagert. Zunächst wurden von jeder Probe 3 Aliquots von 10 µl für 30 min bei 45 °C inaktiviert (Eppendorf 5331 Master Cycler Gradient Thermocycler). Anschließend wurden 190 µl Zellkulturmedium für KFC-Zellen (Minimum Essential Medium mit Eagle's Salzen, 10 % fötalem Kälberserum, 1 x nicht essentielle Aminosäuren, 100 IE/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin) zugegeben und das Serum wurde in einer Serie von 1:1 Verdünnungen in eine Kulturplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc, Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Von jeder Probe wurden jeweils 2 Serum-Aliquots in einer Verdünnung von 1 : 20 bis 1 : 2.560 verwendet, um 100 µl einer CyHV-3-Lösung mit 1.000 Kultur-Infektiosen Dosen 50/ml eines virulenten polnischen Isolats des Virus zu inaktivieren. Dieses führte dazu, dass die Fähigkeit des Serums zur Neutralisation des KHV in einer endgültigen Verdünnung von 1 : 40 bis 1 : 5.120 getestet wurde. Um zytotoxische Eigenschaften des Serums zu erfassen, wurde das dritte Aliquot mit 100 µl Zellkulturmedium für KFC Zellen gemischt. Alle Serumverdünnungen oder Serum-Virus-Verdünnungen wurden für 24 h bei 4 °C inkubiert und dann in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit einem konfluenten Zellrasen mit für KHV empfänglichen KFC-Zellen überführt und bei 20 °C inkubiert. Die Zellkulturen mit den Serum- bzw. Serum-Virus-Verdünnungen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen auf die Entwicklung von zytopathischen Effekten untersucht.

4.1.3 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Computerprogramm SigmaPlot 12.5 (Systat Software) verwendet. Zunächst wurden die Daten mit einem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und anschließend wurden Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bei normalverteilten Daten mittels Varianzanalyse mit nachfolgendem Tuckey-Test auf Signifikanz geprüft, bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Prüfung mit dem ANOVA on ranks-Test von KRUSKAL-WALLIS und DUNNS Post-Hoc-Test. Unterschiede zwischen Behandlungen wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant eingestuft.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Kiemenproben von Laich-karpfen beim Abfischen und Geschlechtertrennung - Versuchsjahr 2020 und 2021

Betrieb A: Aus Betrieb A lagen im Jahr 2020 vom Zeitpunkt der Abfischung Kiemenproben von 42 männlichen und 20 weiblichen Karpfen vor. In diesen Proben konnten bei einem Milchner (A20, Transponder Nr. 7481) KHV-spezifische DNA-Sequenzen in einer rechnerischen Konzentration von 7,9 Kopien in 250 ng Gesamt-DNA nachgewiesen werden. Bei den in Betrieb A beprobten weiblichen Karpfen wurde KHV-spezifische DNA ebenfalls bei einem Karpfen (A54, Transponder Nr. 7572) in einer Konzentration von 5,3 Kopien in 250 ng DNA nachgewiesen und bei zwei Karpfen wurden jeweils in einer Probe aus dem Doppelansatz KHV-spezifische DNA nachgewiesen: Probe A49 (Transponder Nr. 7555) mit rechnerisch 0,03 Kopien pro 250 ng DNA und Probe A51 mit rechnerisch 2,4 Kopien pro 250 ng DNA. Diese beiden Karpfen wurden als „fraglich“ infiziert eingestuft.

Für das Jahr 2021 lagen aus dem Betrieb A Kiemenproben von 54 männlichen und 29 weiblichen Karpfen vor. In diesen Proben konnten KHV-spezifische DNA-Sequenzen bei einem Milchner (A24, Transponder Nr. 7473) nachgewiesen werden. In der Probe von einem weiteren Milchner (A68, Transponder Nr. 3692) wurde KHV-spezifische DNA in nur einer Probe aus dem Doppelansatz nachgewiesen. Bei einem Rogner (A11, Tranponder Nr. 7798) wurde KHV-spezifische DNA nachgewiesen, bei einem weiteren Rogner (A80, Transponder Nr. 3706) in einer Probe aus dem Doppelansatz. Die beiden Karpfen (A68, Milchner, A80, Rogner) wurden als fraglich infiziert eingestuft (Abbildung 8). Außerdem lagen im Jahr 2021 Spermienproben von 10 Milchnern zur Untersuchung auf KHV-spezifische DNA vor. Bei einem Milchner (A23) wurde in einer Probe aus dem Doppelansatz KHV-spezifische DNA detektiert und die Probe als fraglich infiziert eingestuft (Abbildung 8).

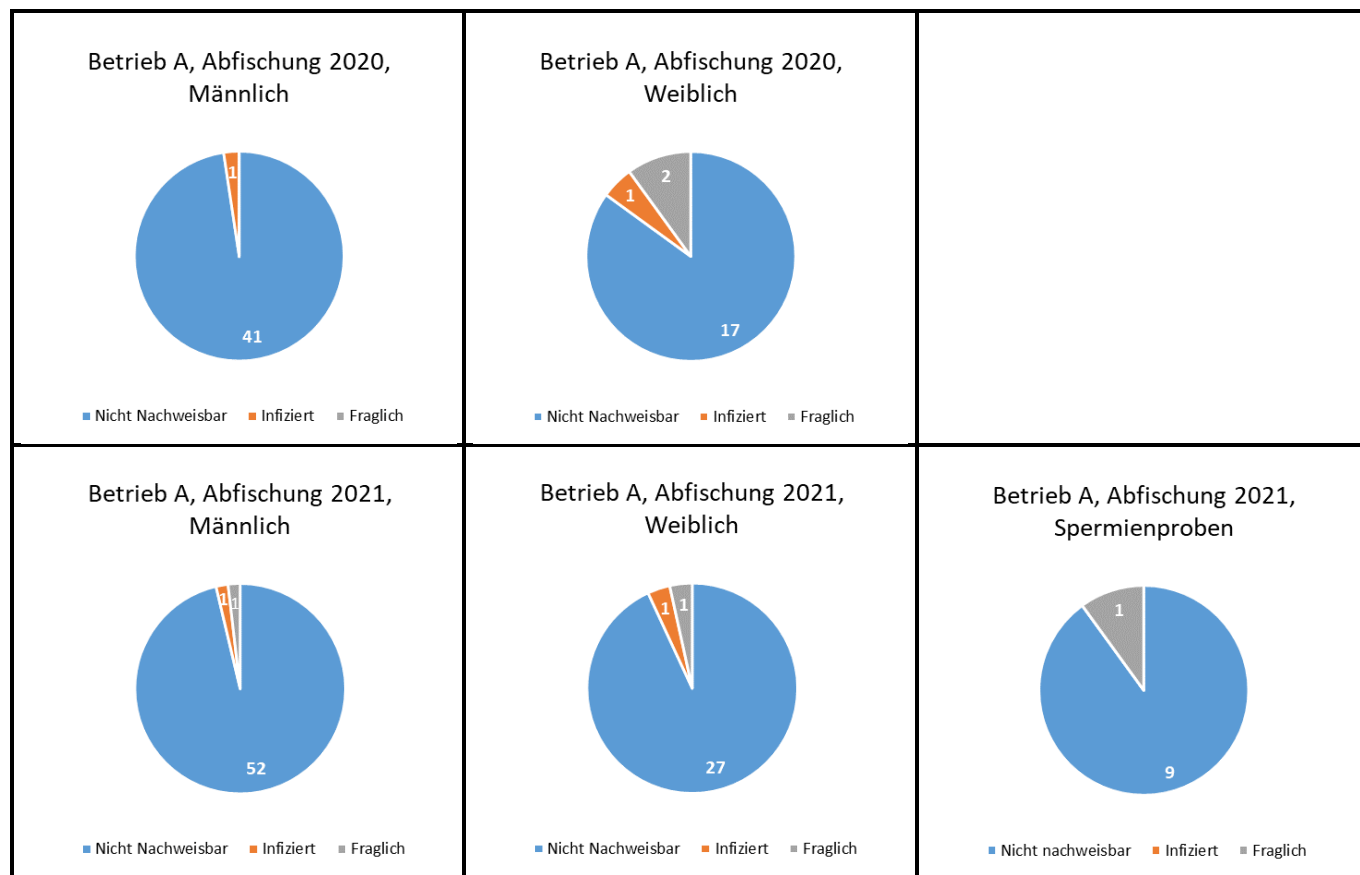


Abbildung 8: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen zum Zeitpunkt der Abfischung (vor der Reproduktion) in Betrieb A.

Betrieb B: Aus dem Betrieb B lagen Kiemenproben von 41 männlichen und 20 weiblichen Karpfen vor. In den Proben von männlichen Karpfen wurden bei einem Karpfen (B30, Transponder Nr. 7358) KHV-DNA-Sequenzen in beiden Proben des Doppelansatzes in einer Konzentration von 5,1 Kopien pro 250 ng DNA nachgewiesen. Bei Karpfen B13 (Transponder Nr. 3416) wurden KHV-Genomsequenzen nur in einer der beiden Proben des Doppelansatzes in einer Konzentration von 1,3 Kopien pro 250 ng DNA nachgewiesen, so dass dieser Karpfen als „fraglich“ infiziert eingestuft wurde. Unter den weiblichen Karpfen wurden bei Karpfen B57 (Transponder Nr. 3717) in beiden Proben des Doppelansatzes KHV-Genomsequenzen in einer Konzentration von 9,9 Kopien pro 25 ng DNA nachgewiesen. Somit wurden als positiv Karpfen B30 (männlich) und Karpfen B57 (weiblich) eingestuft, Karpfen B13 als fraglich infiziert (Abbildung 9).

Im Jahr 2021 lagen aus dem Betrieb B Kiemenproben von 39 männlichen und 21 weiblichen Karpfen vor. In den Proben der Milchner konnten bei einem Karpfen (B60, Transponder Nr. 3720) und in den Proben der Rogner ebenfalls bei einem Karpfen (B38, Transponder Nr. 7417) KHV-spezifische DNA nachgewiesen werden. In lediglich einer Probe aus dem Doppelansatz wurden bei 5 Milchnern (B07, Transponder Nr. 6314, B35, Transponder Nr. 3479, B44, Transponder Nr. 3336, B55, Transponder Nr. 3715, B57, Transponder Nr. 3717) KHV-DNA nachgewiesen sowie bei einem Rogner (B49, Transponder Nr. 7422). Diese Karpfen wurden als fraglich infiziert eingestuft (Abbildung 9). Zudem lagen im Jahr 2021 von 37 Milchnern Spermienproben vor, die zum Zeitpunkt der Abfischung und Körung gewonnen wurden. In der Spermienprobe eines Milchners (B04, Transponder Nr. 7358) wurden in beiden Proben des Doppelansatzes und in Spermienproben drei weiterer Milchner (B07, Transponder Nr. 6314, B13, Transponder Nr. 3330, B14, Transponder Nr. 7365,) in jeweils einer Probe aus dem Doppelansatz KHV-DNA-Sequenzen nachgewiesen. Diese drei Proben wurden als fraglich infiziert eingestuft (Abbildung 9).

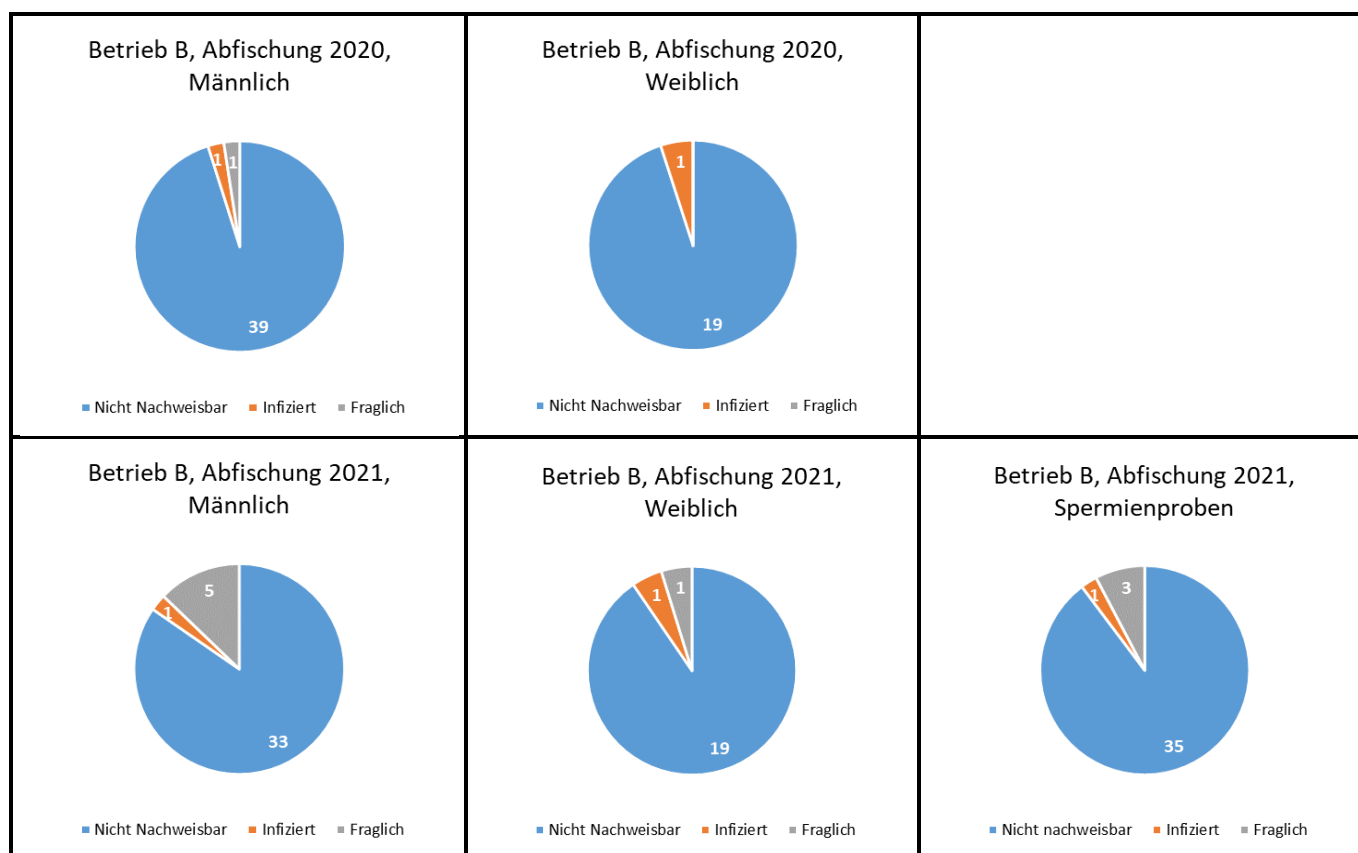


Abbildung 9: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen zum Zeitpunkt der Abfischung (vor der Reproduktion) in Betrieb B.

4.2.2 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Kiemenproben von Laichkarpfen aus der Laichkammer nach dem Ablaichen

Im **Betrieb A** konnten 2020 nach dem Ablaichen Kiemenbiopate von 41 männlichen und 20 weiblichen Karpfen gewonnen werden. In der molekularbiologischen Untersuchung auf KHV wurden bei zwei männlichen Karpfen (Transponder Nr. 7431, 7493) in nur jeweils einem Reaktionsansatz aus dem Doppelansatz KHV-spezifische DNA-Sequenzen in einer rechnerischen Konzentration von 1,4 Kopien pro 250 ng DNA und von 1,2 Kopien pro 250 ng DNA detektiert. Diese Karpfen wurden als „fraglich“ infiziert eingestuft. Bei keinem männlichen Karpfen wurde ein eindeutig positives Ergebnis mit einem Nachweis von KHV spezi-

fischen DNA-Sequenzen in beiden Reaktionsansätzen des Doppelansatzes erzielt. Von weiblichen Karpfen lagen 18 Kiemenproben vor. Die Untersuchung der weiblichen Karpfen ergab für zwei Karpfen (Transponder Nr. 7555, 7569) einen eindeutigen Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Kiemenbioptaten mit 4,2 bzw. 2,3 Kopien pro 250 ng DNA in beiden Reaktionsansätzen des Doppelansatzes. Hierbei handelte es sich um die Karpfen, deren Infektionsstatus in der Untersuchung vor der Reproduktion als „fraglich“ eingestuft worden war. Bei dem in der Untersuchung vor der Reproduktion als positiv befundenen Karpfen konnten in der Beprobung nach dem Ablachen keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen in Kiemenproben nachgewiesen werden.

Im Jahr 2021 wurden Kiemenbioptate von 51 männlichen und 26 weiblichen Karpfen gewonnen und auf Genomsequenzen von KHV untersucht. In der Kiemenprobe von einem Milchner (A56, Transponder Nr. 7430) wurde eine Infektion mit KHV festgestellt. In der Kiemenprobe von 6 Milchnern (A15, Transponder Nr. 3692, A22, Transponder nicht vorhanden, A52, Transponder Nr. 7423, A59, Transponder Nr. 7476, A62, Transponder Nr. 7431, A75, Transponder Nr. 7589) wurde in einer Probe aus dem Doppelansatz KHV-spezifische DNA nachgewiesen. Diese Karpfen wurden als fraglich infiziert eingestuft. In den Kiemenproben von Rognern wurden bei einem Fisch (A58, Transponder Nr. 7548) KHV-spezifischen DNA-Sequenzen in einer Probe des Doppelansatzes (fragliche Infektion) nachgewiesen (Abbildung 10).

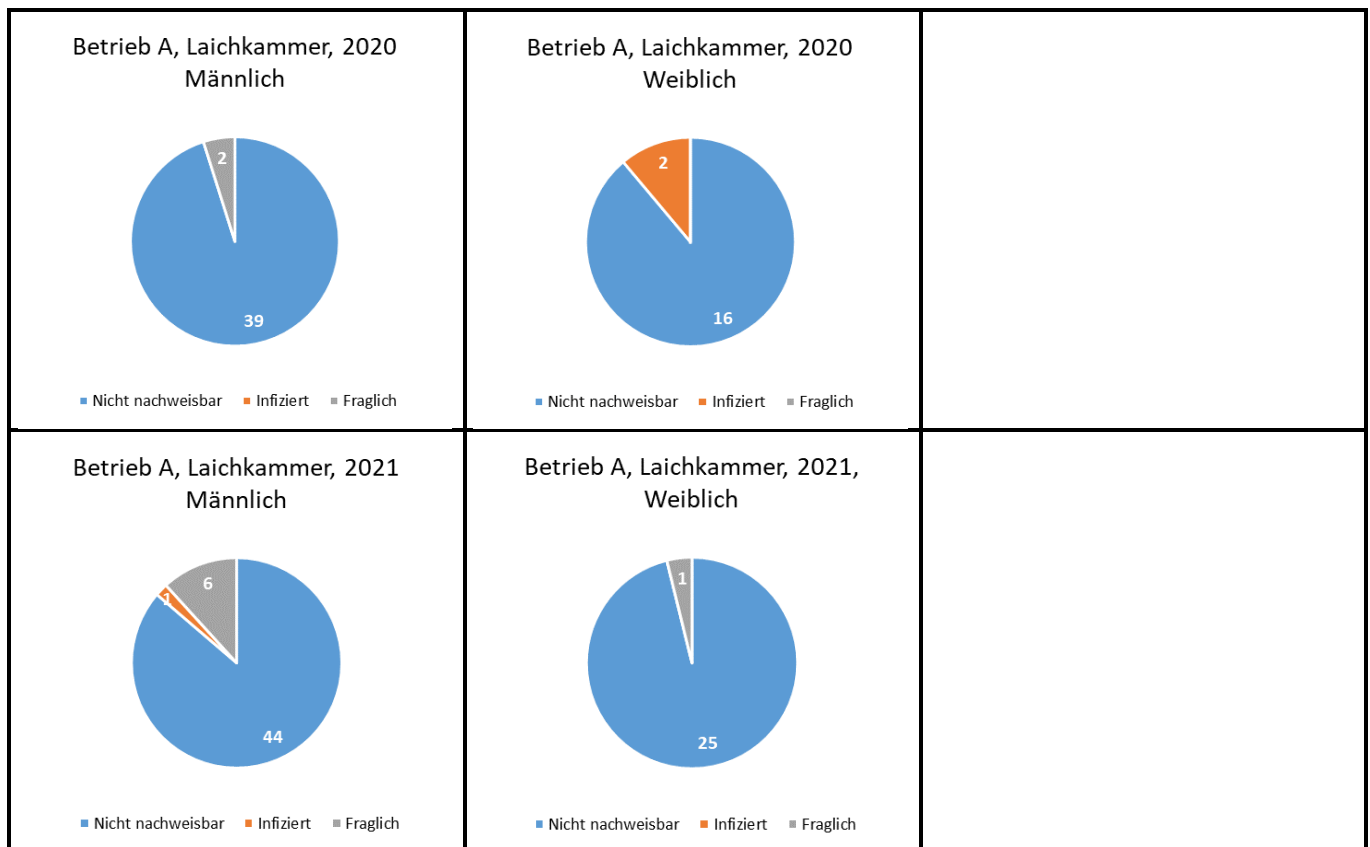


Abbildung 10: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen in der Laichkammer (nach der Reproduktion) in Betrieb A.

Betrieb B: Aus dem Betrieb B standen 2020 Kiemenbioptate von Karpfen aus der Laichkammer nach dem Ablachen von 41 männlichen und 20 weiblichen Karpfen zur Verfügung. In der molekularbiologischen Untersuchung wurden bei einem männlichen Karpfen KHV-DNA-Sequenzen in einem Reaktionsansatz des Doppelansatzes mit 1,3 Kopien pro 250 ng DNA nachgewiesen. Der Infektionsstatus dieses Karpfens

wurde als „fraglich“ eingestuft. Außerdem wurde bei einem weiblichen Karpfen in beiden Reaktionsansätzen des Doppelansatzes KHV-spezifische Genomsequenzen mit 4,7 Kopien pro 250 ng DNA gefunden. Dieser Karpfen wurde als infiziert eingestuft.

Im Jahr 2021 gelangten aus Betrieb B Kiemenproben von 39 männlichen und 19 weiblichen Karpfen nach dem Ablaichen zur Untersuchung. Dabei erwiesen sich die Kiemenproben von 3 Milchnern (B22, Transponder Nr. 3719, B36, Transponder Nr. 3380, B53, Transponder Nr. 3342) sowie von einem Rogner (B11, Transponder Nr. 7397) als fraglich infiziert (Nachweis von KHV-Genomsequenzen in einer der Proben des Doppelsatzes, siehe Abbildung 11).

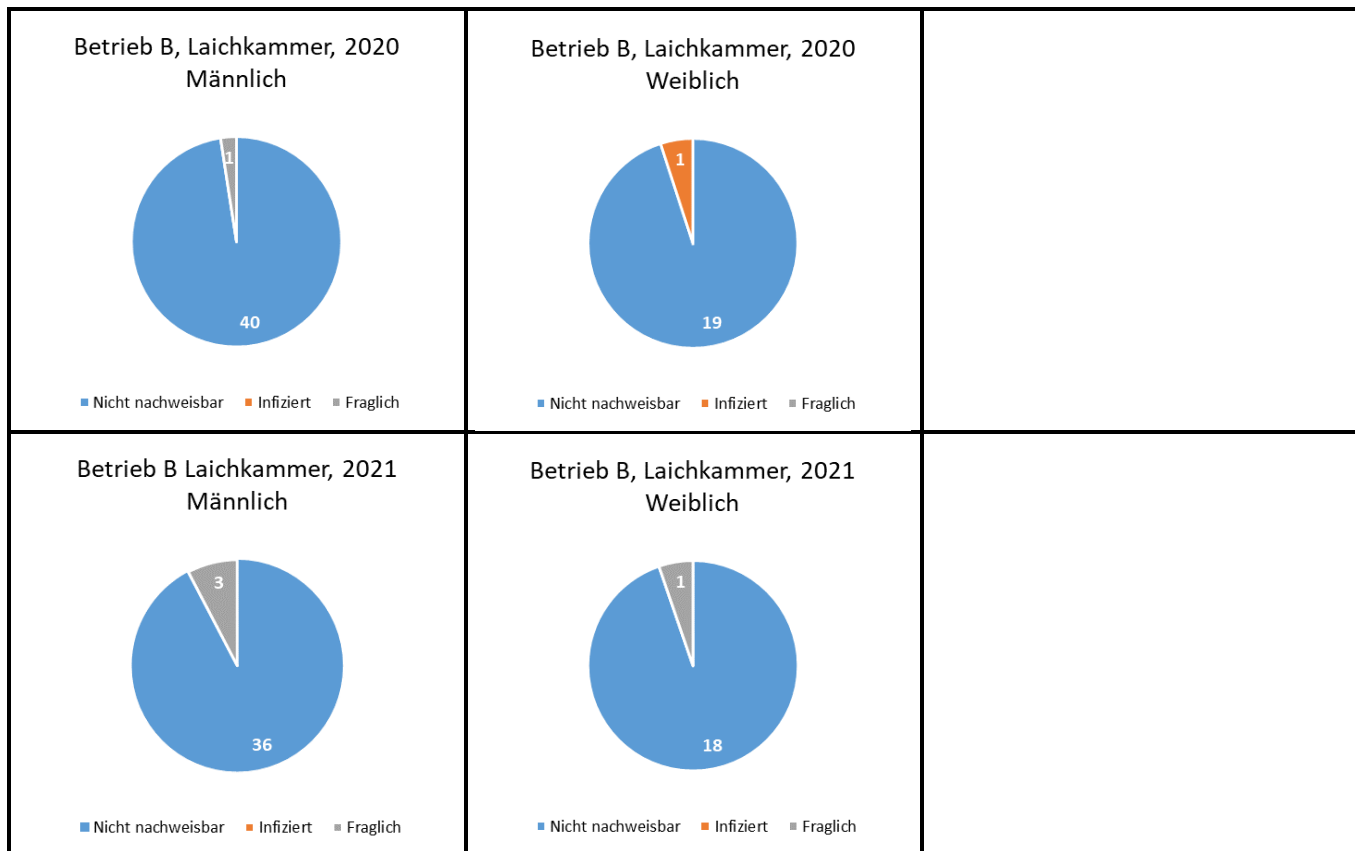


Abbildung 11: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen bei männlichen und weiblichen Laichfischen in der Laichkammer (nach der Reproduktion) in Betrieb B.

4.2.3 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in Geschlechtsprodukten von Laichkarpfen aus der Laichkammer nach dem Ablaichen

Betrieb A: Aus dem Betrieb A lagen im Jahr 2020 von insgesamt 16 männlichen Karpfen Spermienproben vor und von 6 weiblichen Karpfen Proben von Eiern. In den Spermienproben wurden bei einem Karpfen KHV-Genomsequenzen in einer Konzentration von 1,7 Kopien pro 250 ng DNA detektiert ("infiziert"), in den Proben mit weiblichen Geschlechtsprodukten wurden keine KHV-Genomsequenzen gefunden.

Im Jahr 2021 lagen von 47 Karpfen Spermienproben und von 16 Karpfen Eiprobe bzw. Ovarialflüssigkeit vor. In zwei Spermienproben von Karpfen A22 (Transpondernummer nicht vorhanden, Kiemenbioptat als fraglich eingestuft) und A49 (Transponder Nr. 7830) sowie in einer Eiprobe von Karpfen A60 (Transponder Nr. 3705) wurden in jeweils einer Probe des Doppelansatzes KHV-spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen. Diese Proben wurden als fraglich infiziert eingestuft (Abbildung 12).

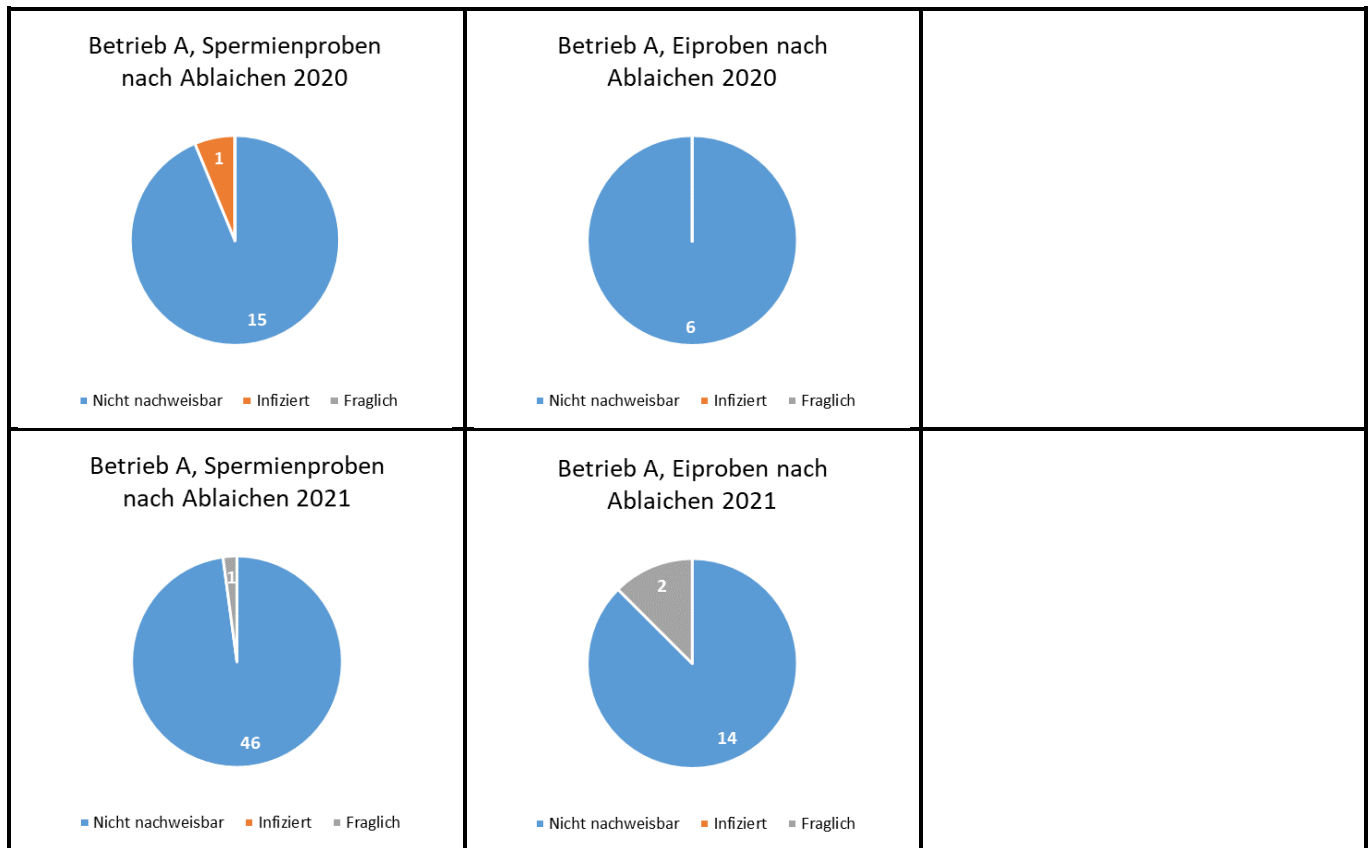


Abbildung 12: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in Ei- und Spermienproben von Laichkarpfen aus Betrieb A.

Betrieb B: Aus diesem Betrieb lagen im Jahr 2020 von 40 männlichen und von 17 weiblichen Karpfen Proben von Geschlechtsprodukten vor. Bei 6 männlichen Karpfen ließ sich KHV-spezifische DNA in den Geschlechtsprodukten in jeweils einem Reaktionsansatz pro Doppelansatz einer Probe in einer Konzentration von 2,0 bis 5,4 Kopien pro 250 ng DNA nachweisen, so dass diese Proben als „fraglich infiziert“ eingestuft wurden. Bei 2 weiblichen Karpfen ließ sich in den Geschlechtsprodukten KHV-spezifische DNA in beiden Ansätzen des Doppelansatzes in einer Konzentration von 3,8 bzw. 7,5 Kopien pro 250 ng DNA nachweisen und diese Proben wurden als „infiziert“ eingestuft. Bei 2 weiteren Karpfen wurde in jeweils nur einem Ansatz des Doppelansatzes KHV-spezifische DNA-Sequenzen in einer Konzentration von 2,3 und 6,1 Kopien pro 250 ng DNA nachgewiesen und diese Proben wurden als "fraglich" infiziert eingestuft (Abbildung 13).

Im Jahr 2021 lagen aus dem Betrieb B Spermienproben von 38 Milchnern und Eiprouben von 13 Rognern vor. In 2021 wurden in Spermienproben von vier Milchnern (B09, Transponder Nr. 7372, B23, Transponder Nr. 6318, B25, Transponder Nr. 3334, B47, Transponder Nr. 3477) sowie in der Eiproube von zwei Rognern (B33, Transponder Nr. 7422, B48, Transponder Nr. 7385) in jeweils einer Probe des Doppelansatzes KHV-spezifische DNA-Sequenzen detektiert. Diese Spermien- und Eiprouben wurden als fraglich infiziert eingestuft.

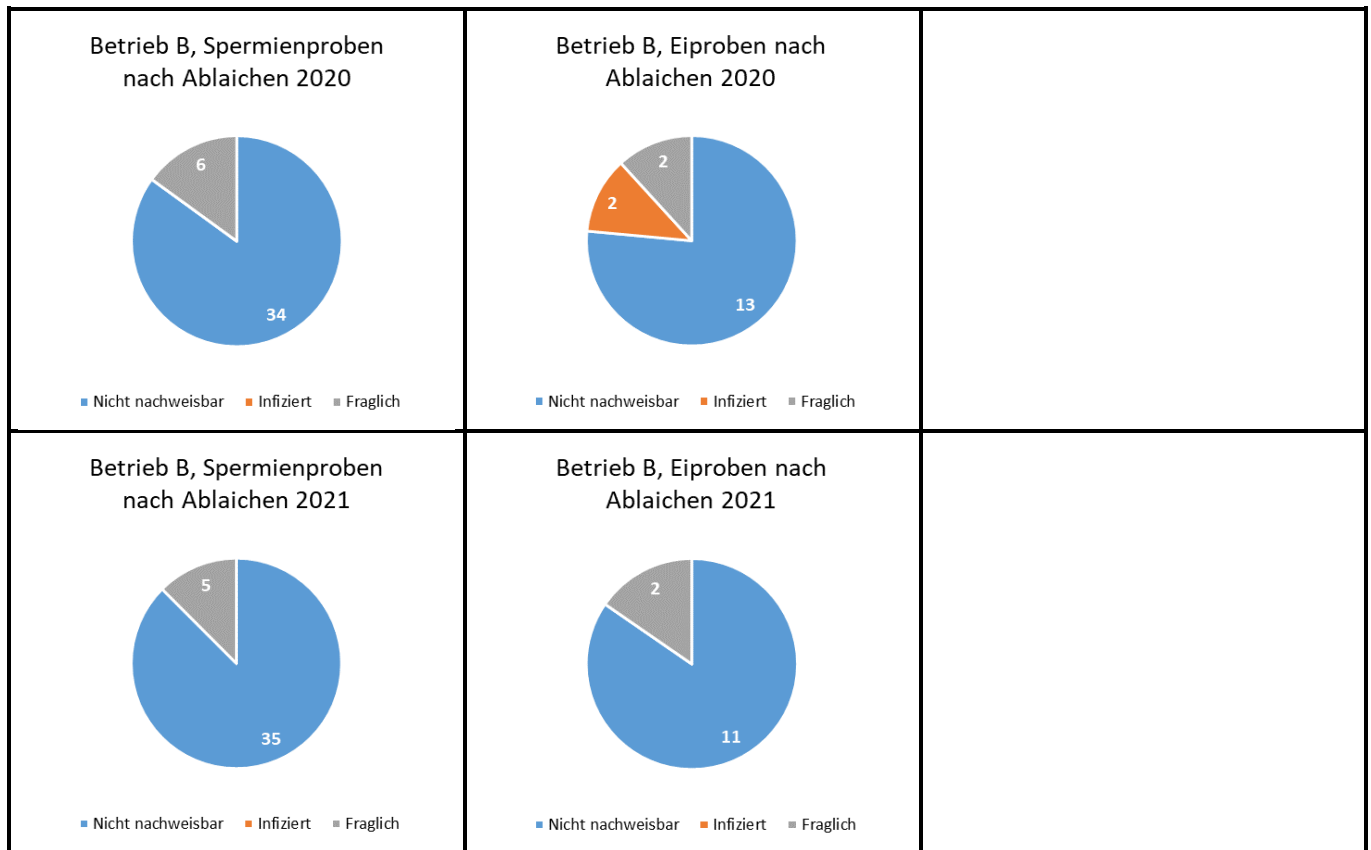


Abbildung 13: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in Ei- und Spermienproben von Laichkarpfen aus Betrieb B.

4.2.4 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in befruchteten Eiern

Betrieb A: Aus dem Betrieb A standen im Jahr 2020 aus zwei Laichkammern jeweils fünf Portionen befruchteter Eier zur Verfügung. Mittels molekularbiologischer Untersuchung konnten in allen Portionen keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Im Jahr 2021 kamen aus Betrieb A insgesamt 5 Pools befruchtete Eier, jeweils zwei Pools aus zwei Laichkammern und ein Pool aus einer dritten Laichkammer. KHV-spezifische DNA-Sequenzen wurden in dem Pool aus Laichkammer 3 in einer Probe des Doppelansatzes nachgewiesen, so dass dieser Pool als fraglich infiziert eingestuft wurde (Abbildung 14).

Betrieb B: Aus dem Betrieb B standen 2020 aus Laichkammer 1 drei Portionen befruchteter Eier zur Untersuchung zur Verfügung und aus Laichkammer 2 zwei Portionen. Für die molekularbiologische Untersuchung wurden die Portionen aus Laichkammer 1 auf 5 Proben aufgeteilt, und die Proben aus Laichkammer 2 auf weitere 5 Proben. In zwei Proben aus der Laichkammer 1 waren KHV-spezifische Genomsequenzen in jeweils einem Ansatz des Doppelansatzes in einer Konzentration von 2,5 bis 2,7 Kopien pro 250 ng DNA nachweisbar. Diese Proben wurden als "fraglich" infiziert eingestuft. In Proben aus der Laichkammer 2 wurden KHV-spezifische DNA-Sequenzen nicht detektiert (Abbildung 14). Im Jahr 2021 standen aus dem Betrieb B fünf Pools befruchtete Eier aus Laichkammer 1 und 5 Pools aus Laichkammer 2 für die Untersuchung zur Verfügung. In allen Pools wurden keine KHV-spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen (Abbildung 14).



Abbildung 14: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in befruchteten Eiern in Betrieb A und B.

4.2.5 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in geschlüpften Larven

Betrieb A: Aus dem Betrieb A wurden 2020 insgesamt 10 Portionen mit geschlüpften Brütlingen untersucht, jeweils fünf Portionen aus zwei Laichkammern. In allen Portionen konnten keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Aus diesem Betrieb kamen auch drei Portionen mit verstorbenen Brütlingen zur Untersuchung. Auch bei diesen Brütlingen konnten keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Im Jahr 2021 wurden ebenfalls geschlüpft Brütlinge aus allen drei Laichkammern untersucht. Dabei konnte in den Proben aus Laichkammer 1 und 3 keine KHV-spezifischen DNA Sequenzen nachgewiesen werden und bei Brütlingen aus Laichkammer 2 in einer Probe aus dem Doppelansatz, so dass diese Brütlinge als fraglich infiziert eingestuft wurden (Abbildung 15).

Betrieb B: Aus dem Betrieb B wurden 2020 ebenfalls aus zwei Laichkammern insgesamt 10 Portionen frisch geschlüpfter Brütlinge untersucht. Bei einer Portion aus Laichkammer 2 wurden in einem Ansatz aus dem Doppelansatz KHV-spezifische DNA-Sequenzen in einer rechnerischen Konzentration von 0,6 Kopien pro 250 ng DNA nachgewiesen, was als „fragliche“ Infektion gewertet werden kann. In der Untersuchung der übrigen Portionen konnten keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen detektiert werden (Abbildung 15). Aus diesem Betrieb gelangten keine verstorbenen Brütlinge zur Untersuchung. Im Jahr 2021 wurden ebenfalls jeweils 5 Pools frisch geschlüpfter Brütlinge aus beiden Laichkammern untersucht. In diesen Proben wurden keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen.

Betrieb K: Aus dem Betrieb K gelangten 2020 und 2021 jeweils 10 Portionen von Brütlingen zur Untersuchung. In beiden Jahren konnten bei diesen Karpfen keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

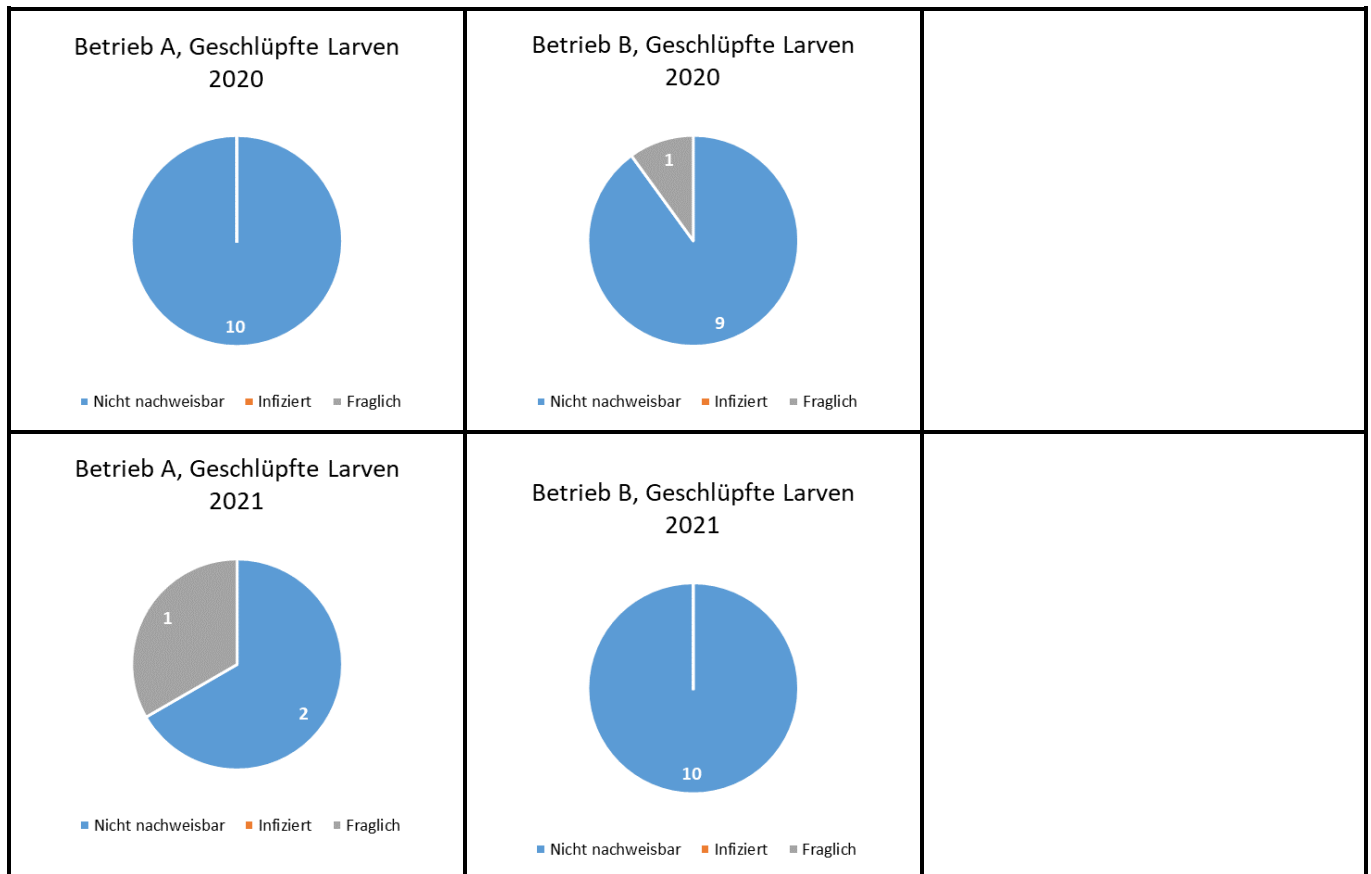


Abbildung 15: Nachweis von KHV-spezifischen Genomsequenzen in geschlüpften Larven in Betrieb A und B.

4.2.6 Nachweis von KHV-Genomsequenzen in angefütterter Karpfenbrut 2020 und 2021

Nach Aufzucht der Karpfenbrütlinge bis zu einem Stückgewicht von ca. 1 g in der ÜHA-Königswartha wurden sie an die TiHo Hannover transportiert und dort in die Laborhaltung übernommen. Nach Ankunft in der TiHo wurden aus jeder Herkunft (Betrieb A und B, sowie Betrieb K) jeweils 30 Karpfen beprobt und molekularbiologisch auf KHV-spezifische DNA-Sequenzen untersucht. Bei allen Proben konnten keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Analog wurden im Jahr 2021 Karpfenbrütlinge aus den Betrieben A und B aus dem KHV-Risikogebiet sowie aus der Kontrolle (Betrieb K ohne KHV-Historie) in der VTA Königswartha aufgezogen und an die TiHo Hannover transportiert, beprobt und molekularbiologisch auf KHV-spezifische DNA Sequenzen untersucht. Auch in diesen Proben (erneut je 30 Karpfen) konnten keine KHV-spezifischen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

4.2.7 Sequenzierung des KHV Isolats aus positiv befundenen Karpfen

Aufgrund der sehr niedrigen Viruslast in allen Proben konnte aus den in der PCR erhaltenen Amplifikaten keine Nukleotid-Sequenz für das amplifizierte KHV-Fragment isoliert werden.

Alle Versuche, eine Nukleotid-Sequenz des amplifizierten KHV-Fragments zu erhalten, blieben ohne ein Ergebnis.

4.2.8 Neutralisierende Antikörper in Serumproben (SNT-Titer)

Nach Inkubation von infektiösem Virus in unterschiedlichen Serumkonzentrationen von Laichkarpfen aus Betrieb A und B wurde beobachtet, dass die verwendete Viruslösung empfindliche Zellkulturen nach Inkubation in Serumverdünnungen von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320 zu infizieren vermochte. Serum von Karpfen, welches das Viruswachstum in einer Verdünnung von 1:20 oder 1:40 hemmte, wurde als „negativ, keine neutralisierenden Antikörper“ eingestuft. Serum von Karpfen, das die Replikation von Virus bis zu einer Konzentration von 1:80 hemmte, wurde als „fraglich positiv“ beurteilt und Serumproben, die die Replikation des KHV auch bei höheren Verdünnungen (1:160, 1:320) hemmte, wurden als positiv für neutralisierende Antikörper eingestuft. Diese Einstufung beruht auf Ergebnissen aus experimentellen Studien zur Impfstoffentwicklung zum Schutz von Karpfen vor KHV (ADAMEK et al. 2022). In der Mehrzahl der Serumproben von Karpfen aus den Betrieben aus dem KHV-Risikogebiet wurde der Titer von 1:20 oder 1:40 gefunden. Im Jahr 2020 wurde bei einem männlichen Laicher aus Betrieb A ein Serومتiter von 1:160 (positiv für neutralisierende Antikörper) bestimmt und bei 6 männlichen Laichern aus Betrieb B wurde ein Serومتiter von 1:80 (fraglicher Gehalt an neutralisierenden Antikörpern) bestimmt (Abbildung 16).

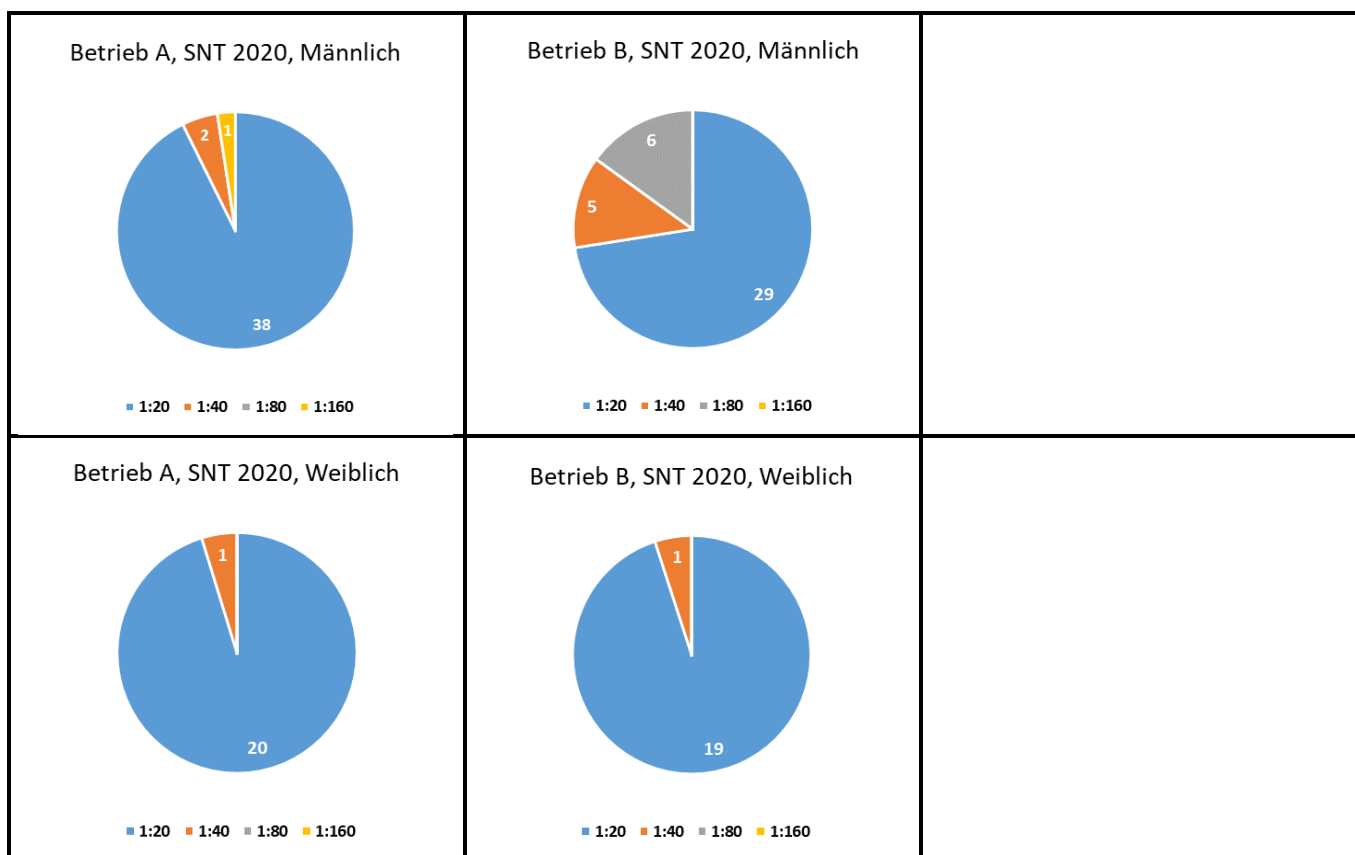


Abbildung 16: Nachweis von Serum-neutralisierenden Antikörpern (SNT) in unterschiedlichen Verdünnungen von Laichern aus Betrieb A und B im Jahr 2020.

Im Jahr 2021 wurde bei vier männlichen Laichern und einem weiblichen Laicher aus Betrieb A ein Serومتiter von 1:160 sowie bei einem männlichen Laicher ein Serومتiter von 1:320 bestimmt. Außerdem wurden bei sechs männlichen und einem weiblichen Laicher ein Serومتiter von 1:80 ermittelt. Somit waren in Betrieb A sechs Laicher positiv für neutralisierende Antikörper gegen KHV, bei sieben Laichern wurde ein fraglicher Gehalt an neutralisierenden Antikörpern bestimmt. Im Betrieb B wurden im Jahr 2021 im Serum von insgesamt vier Laichern neutralisierende Antikörper gefunden: bei einem männlichen Laicher ein Serومتiter von 1:160 sowie bei zwei männlichen und einem weiblichen Laicher ein Serومتiter von 1:320. Bei sechs männlichen und einem weiblichen Laicher wurde mit einem Serومتiter von 1:80 ein fraglicher Gehalt an neutralisierenden Antikörpern gemessen (Abbildung 17).

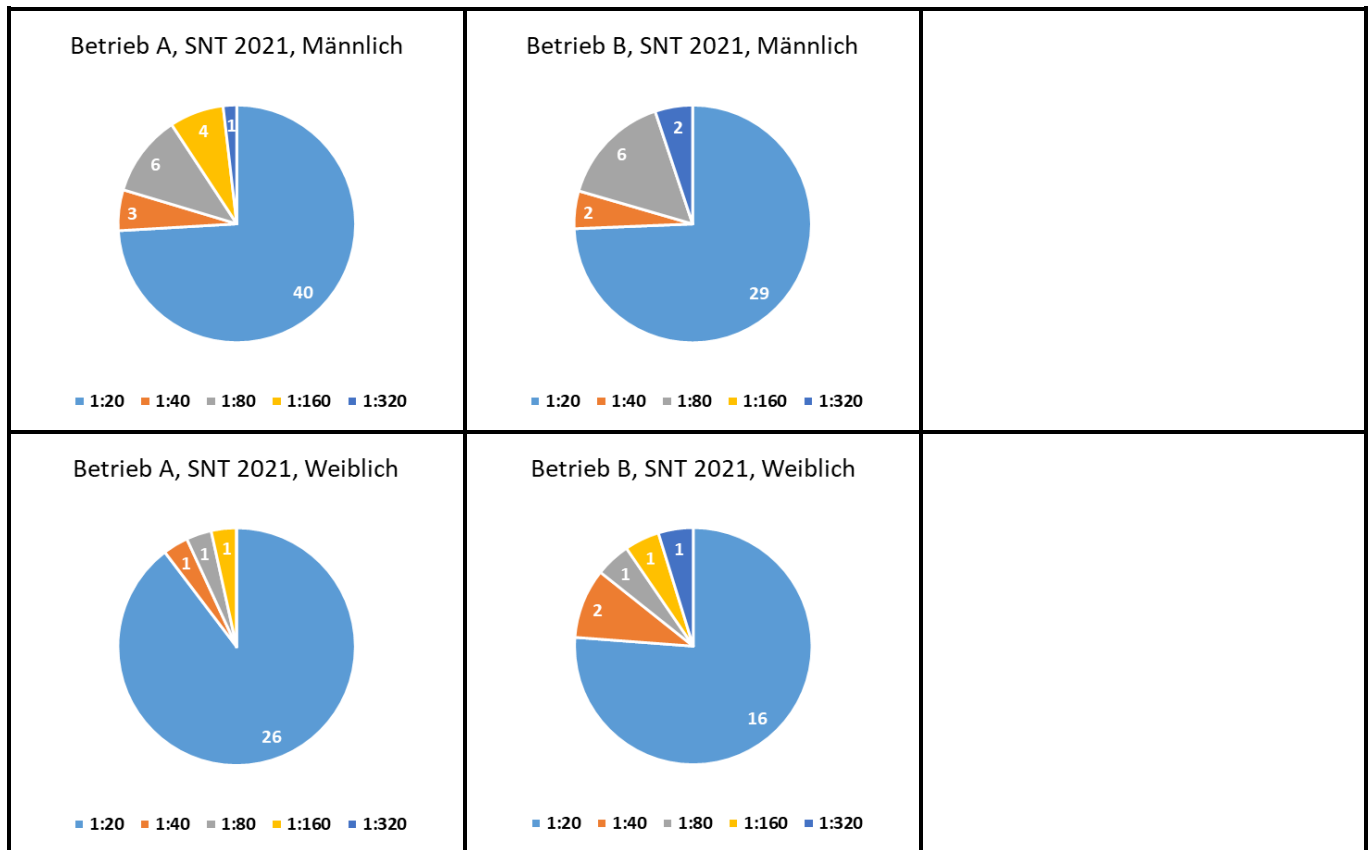


Abbildung 17: Nachweis von Serum-neutralisierenden Antikörpern (SNT) in unterschiedlichen Verdünnungen von Laichern aus Betrieb A und B im Jahr 2021.

Lediglich bei einem Karpfen aus Betrieb B wurden im Jahr 2021 neutralisierende Antikörper im Serum bestimmt, bei dem in der Kiemenprobe KHV-spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen wurden. Außerdem enthielt die Serumprobe eines Karpfens aus diesem Betrieb mit einem "fraglichen" KHV Nachweis in der Kiemenprobe neutralisierende Antikörper.

Aus dem Betrieb K ohne KHV-Historie lagen im Jahr 2020 30 Serumproben vor. In allen Proben wurde ein SNT-Titer von 1:20 bestimmt und somit keine KHV-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen.

5 Untersuchungen einer möglichen Resistenz der Brut gegenüber KHV-I

5.1 Methoden

5.1.1 Aufzucht und Haltung der Karpfen

Karpfenbrütlinge aus den Betrieben A und B sowie K wurden im Jahr 2020 und 2021 in die VTA Königswartha überführt und dort nach Herkunft getrennt bis zu einem Stückgewicht von ca. 1 g aufgezogen. Anschließend wurden die nun vorgestreckten Karpfen an die TiHo Hannover transportiert und in der Fischhaltung der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung nach Herkunft getrennt in desinfizierten Kunststoffbecken, die mit Leitungswasser befüllt wurden, bei ca. 20 °C gehalten. Zur Aufrechterhaltung der Wasserqualität wurden bei Bedarf Wasserwechsel von 30 – 40 % des Beckenvolumens vorgenommen. Die Fütterung erfolgte mit Karpfen-Brutfutter (Trouvit®). Bei der Aufnahme der Karpfen in die Fischhaltung wurden die Versuchstiere aus allen Herkunftsniveaus klinisch-parasitologisch, mikrobiologisch und auf Infektion mit dem Koi-Herpesvirus untersucht. Entsprechend der Untersuchungsergebnisse wurden Behandlungen gegen einen Befall mit Ektoparasiten durchgeführt. Die Untersuchungen zum Zeitpunkt der Aufnahme in die TiHo auf Infektion mit KHV verliefen in allen Fällen negativ (siehe oben unter Kapitel 4.2.6).

5.1.2 Infektion von Karpfen mit KHV

Die Infektionsversuche von Karpfen mit virulentem KHV fanden unter Sicherheitsbedingungen der Stufe BSL 2 in der Tierhaltung des Research Centers for Emerging Infections and Zoonoses (RIZ) der TiHo Hannover nach vorheriger Tierversuchsgenehmigung durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit statt (Aktenzeichen: 33.8-42502-04-20/3414).

Für die Infektionsversuche wurden die Versuchskarpfen der Fischhaltung der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung entnommen, in die Tierhaltung des RIZ überführt und dort in 400 Liter fassende desinfizierte Kunststoffbecken, befüllt mit Leitungswasser bei ca. 23 °C eingesetzt. Zur Akklimatisierung wurden die Karpfen zunächst nach Herkunft getrennt über 4 Tage gehalten. Während dieser Zeit wurden die Fische mit handelsüblichem Karpfenfutter gefüttert. Für die experimentelle Infektion mit KHV wurden die Karpfen nach Herkunft getrennt in 20 Liter Wasser über eine Stunde in einer Viruslösung (320 TCID₅₀ pro ml) eines virulenten polnischen KHV-Virusisolats, das in der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der TiHo Hannover in der Zellkultur vermehrt wurde, gehältert. Die Infektion erfolgte aufgrund der geringen Körpergröße der Versuchsfische, indem sie nach Herkunft getrennt in Netzkäfige eingesetzt wurden, die dann in ein zuvor desinfiziertes Kunststoffaquarium mit dem virushaltigen Wasser eingehängt wurden (Abbildung 18).

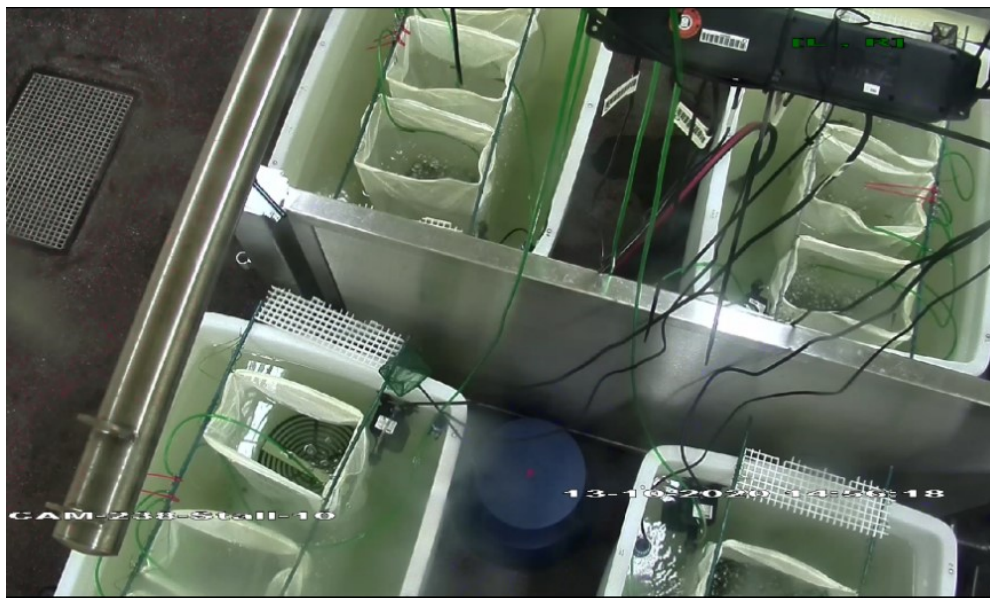


Abbildung 18: Infektion von Karpfen der Versuchsgruppen A, B und K mit KHV in getrennt eingehängten Netzkäfigen

Auf diese Weise wurden alle Brütlinge in der identischen Viruslösung infiziert. Als Kontrollen wurden die Karpfen aus den drei Betrieben (A, B und K) in gleicher Weise in eine Zellkulturlösung ohne Virus eingesetzt. Anschließend wurden die Fische in stabile Netzkäfige überführt, die in ein desinfiziertes, 300 Liter fassendes Kunststoffbecken eingehängt waren und bei ca. 23 °C über 14 Tage gehältert (Abbildung 19). Alle Versuche erfolgten in dreifacher Wiederholung.

Während der Haltung wurden die Versuchskarpfen 3 - 4 mal täglich hinsichtlich des Auftretens von Krankheitssymptomen und Mortalitäten beobachtet. Der Gesundheitszustand wurde anhand eines Bewertungsrahmens beurteilt. Tote und moribunde Fische wurden entnommen und die Moribunden durch Einsetzen in eine Lösung von 0,5 g MS 222 pro Liter Wasser euthanasiert. Nach Abschluss der Beobachtungszeit wurden die überlebenden Versuchstiere wie oben beschrieben euthanasiert, ihre Herkünfte re-

gistriert und für eine PCR-Untersuchung auf Infektion mit KHV beprobt. Um sicherzustellen, dass Unterschiede im Krankheitsverlauf nicht auf zufälligen Effekten (Beckeneffekt) beruhen, wurde der Krankheitsverlauf in drei parallel aufgestellten Becken verfolgt. Die nicht infizierten Kontrollkarpfen wurden in einem separat aufgestellten Becken gehalten. Die Empfänglichkeit von Karpfen für eine KHV-I wurde in Abhängigkeit von der Entwicklung des Immunsystems an Brütlingen bzw. vorgestreckte Karpfen nach ca. einem Monat, sowie nach drei und ca. neun Monaten Beckenhaltung geprüft. Dabei wurden aus Betrieb A, B und K jeweils 60 Karpfen in 3 Gruppen zu jeweils 20 Karpfen mit KHV infiziert und das Überleben der Karpfen nach der Infektion registriert. Außerdem wurden zur Kontrolle der Entwicklung der Infektion Karpfen einer gesonderten Versuchsgruppe am Tag 2 und 5 wie oben beschrieben getötet und es wurden Gewebeproben zur Bestimmung der Viruslast entnommen.



Abbildung 19: Haltung der Karpfen nach der Infektion in einem gemeinsamen Wasserkörper. Insgesamt wurde der Infektionsverlauf in drei parallel aufgestellten Becken verfolgt. In einem vierten Becken wurde die Entwicklung der Viruslast im Infektionsverlauf bei den Karpfen aus den verschiedenen Herkünften untersucht.

Die Infektionsversuche nach drei bzw. neun Monaten Beckenhaltung erfolgten mit Vorgestreckten des Brutjahrgangs 2020. Wegen der Verzögerung bei der Genehmigung des Tierversuchs konnte der Infektionsversuch an den einen Monat alten Vorgestreckten nicht mit diesen Fischen, sondern erst mit denen des Brutjahrgangs 2021 durchgeführt werden. Die Brut des Jahrgangs 2021 stammt jedoch teilweise sogar von denselben Elterntieren wie die des Jahrgangs 2020.

5.1.3 Extraktion von DNA aus Gewebeproben und Bestimmen der Viruslast

Die Extraktion von DNA aus Gewebeproben von Kontroll-Karpfen sowie Versuchs-Karpfen, erfolgte nach dem unter Punkt 4.1.1 beschriebenen Vorgehen. Die Untersuchung der extrahierten DNA auf für KHV spezifische Genomsequenzen sowie die Quantifizierung der Sequenzen erfolgte wie unter 4.1.2 beschrieben. Zum Nachweis einer möglichen Infektion von Karpfen mit dem Carp Edema Virus wurde DNA aus Kiemengewebe extrahiert und mittels quantitativer PCR unter Verwendung des von MATRAS et al. (2017) beschriebenen Verfahrens der „CEFAS qPCR“ untersucht.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Empfänglichkeit der Karpfenbrut für eine KHV-I, die von Laichkarpfen aus dem KHV-Risikogebiet abstammen

5.2.1.1 Empfänglichkeit der Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung

Die Karpfen aus den beiden Betrieben A und B aus dem KHV-Risikogebiet wiesen im Vergleich zur Karpfenbrut der Kontrolle (Betrieb K, ohne KHV-Historie) eine signifikant höhere Überlebensrate auf. Während nur $1,45 \pm 2,51$ % der Karpfen aus dem Betrieb K die Infektion überlebten, war dies bei $15,76 \pm 5,18$ % der Karpfen aus Betrieb A der Fall und bei $41,36 \pm 9,51$ % der Karpfen aus Betrieb B. Auch wenn der Verlauf der Verluste betrachtet wurde, konnte bei Karpfen aus dem Betrieb B ein verzögertes Auftreten der Mortalität beobachtet werden (Abbildung 20). In allen 3 Replikaten des Versuchs nahm das Auftreten der Mortalität einen gleichartigen Verlauf. Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen wurden keine Verluste beobachtet.

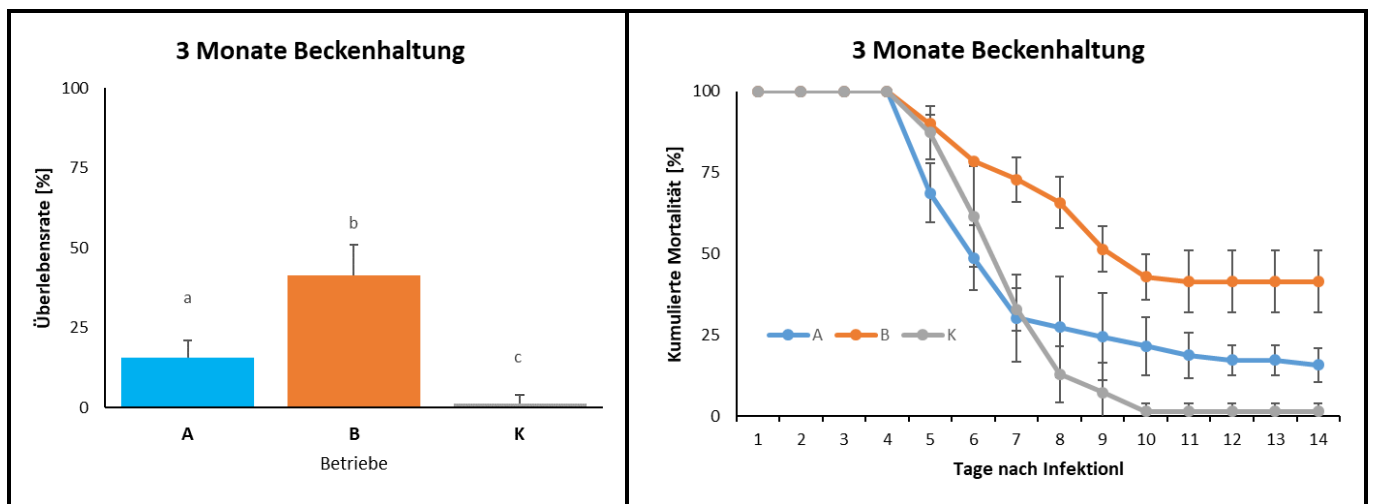


Abbildung 20 (links): Mortalität bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) nach drei Monaten Beckenhaltung im Vergleich zu Karpfen von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K). Dargestellt ist der Verlauf von Verlusten nach Infektion nach drei Monaten Beckenhaltung mit einem virulenten polnischen Isolat des KHV und die kumulative Überlebensrate als Mittelwert und Standardabweichung in 3 gleichen Versuchsgruppen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikant unterschiedliche Überlebensraten zwischen den Herkünften.

5.2.1.2 Verlauf der Infektion und Viruslasten nach drei Monaten Beckenhaltung

In allen Versuchsgruppen nahm die KHV-I, bedingt durch den virulenten Charakter des verwendeten KHV-Isolats, einen raschen Verlauf. Erste Verluste traten am Tag 5 nach der Infektion auf. Die Viruslasten der Karpfen, die an diesem Tag verstarben bzw. aus Tierschutzgründen getötet wurden, lagen zwischen 10.000 und 10.000.000 Viruskopien pro 250 ng DNA aus Hautgewebe und zwischen 1.000 und 1.000.000 Viruskopien pro 250 ng DNA aus Nierengewebe. Durch KHV-I bedingte Verluste setzten sich bis zum Tag 14 nach der Infektion fort, am Tag 15 nach der Infektion wurden die überlebenden Karpfen getötet und auf Viruslast untersucht. Im Verlauf der Infektion stieg die Viruslast in der Haut von Karpfen am Tag 6 nach der Infektion bis auf 100.000.000 Kopien an (Abbildung 21). In der Niere wurden über den Infektionsverlauf Viruslasten zwischen 1.000 bis 1.000.000 Genomkopien pro 250 ng DNA gemessen. Insgesamt wurden in der Haut über den Infektionsverlauf höhere Viruslasten gefunden als in der Niere. Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen aus allen drei Betrieben wurden keine KHV-spezifischen Genomsequenzen nachgewiesen. Bei einem Vergleich der Viruslasten in Haut, Kiemen, Niere und Gehirn von Karpfen aus den unterschiedlichen Herkünften am Tag 2 und Tag 5 nach Infektion wurden signifikant niedrigere Viruslasten in Kieme und Gehirn von Karpfen aus Herkunft B von Laichern aus einem KHV Risikogebiet ermittelt als in Karpfen der Herkunft K ohne KHV-Historie (Abbildung 22).

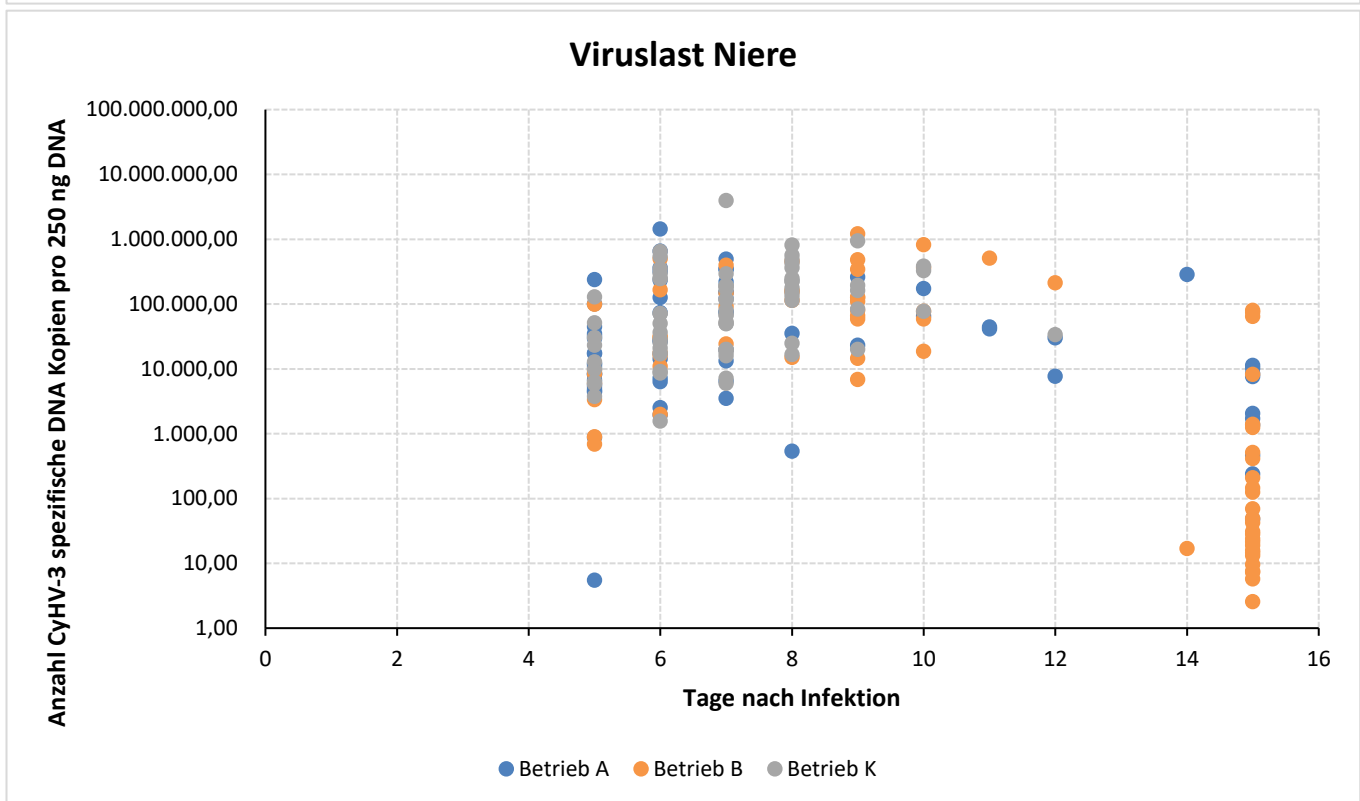
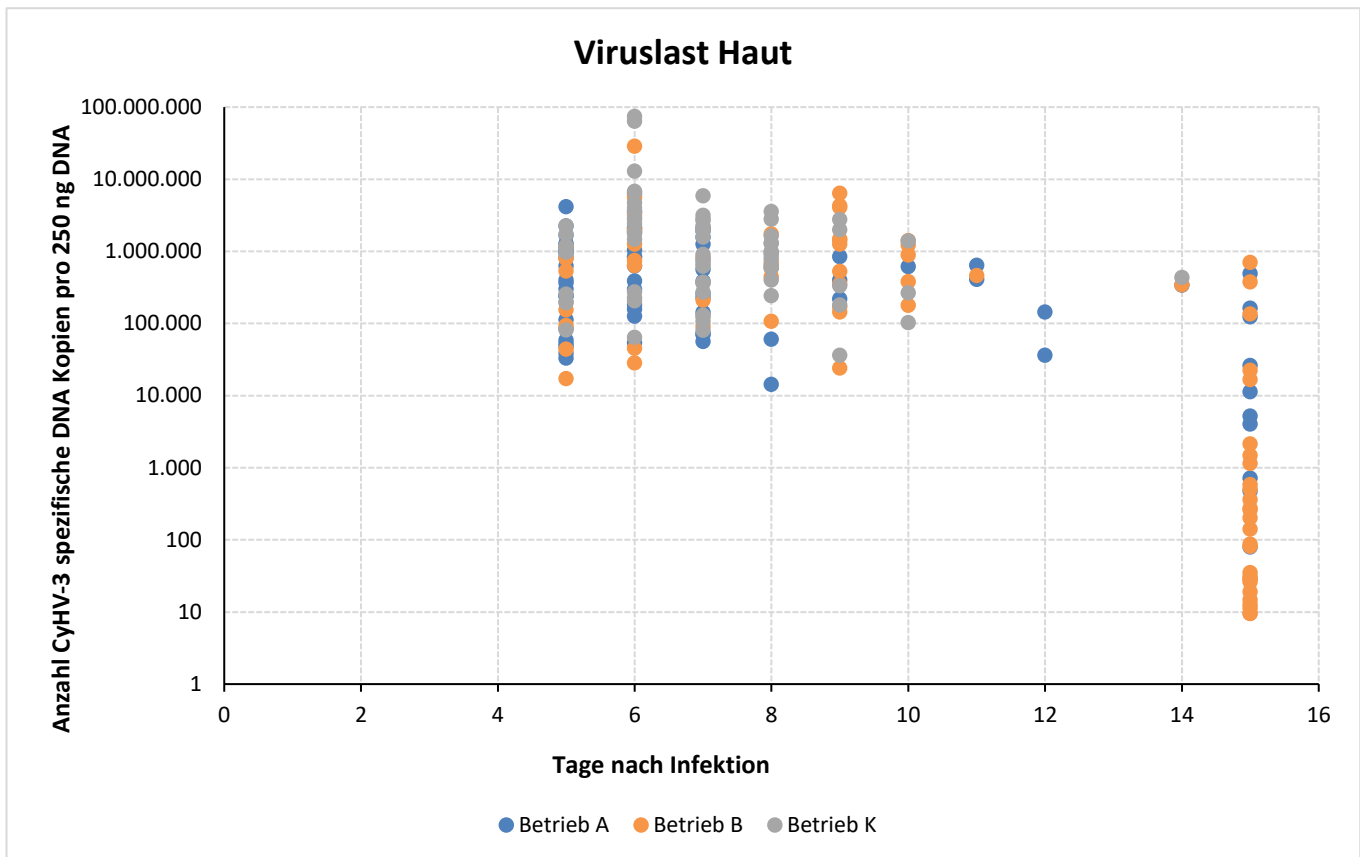


Abbildung 21: Viruslasten in der Haut und Niere von Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung aus unterschiedlichen Betrieben nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Angegeben sind die Viruslasten in Geweben von Karpfen, die in der Zeit von 5 bis 14 Tagen nach der Infektion verstarben oder aus Tierschutzgründen getötet wurden.

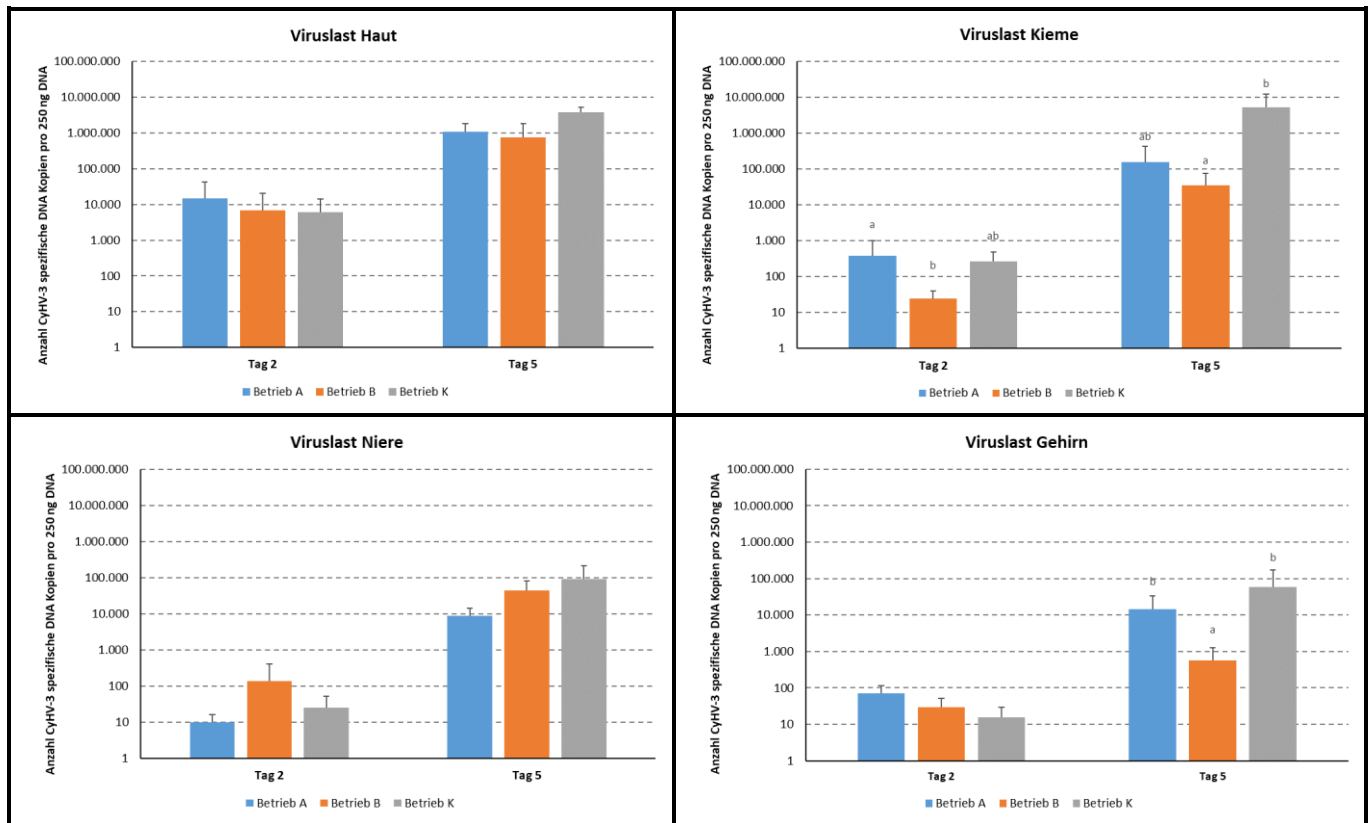


Abbildung 22: Viruslasten in Geweben von Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung aus einem KHV- Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV (Betrieb K). Historie am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an.

5.2.1.3 Empfänglichkeit der Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung

Nach Infektion von Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung nahm die KHV-I einen vergleichbaren Verlauf, wie bei den Fischen nach drei Monaten Beckenhaltung. Erste Verluste traten ebenfalls am Tag 4 – 5 auf und die Karpfen verstarben in den nachfolgenden Tagen. Bei Fischen aus den Betrieben B und K traten die Verluste bis Tag 9 und bei Fischen aus Betrieb A bis Tag 13 auf. Die kumulative Überlebensrate lag bei Karpfen aus dem Betrieb K (Kontrolle) bei nur $2,78 \pm 4,81\%$, demgegenüber bei Karpfen aus den Betrieben A ($25,79 \pm 7,81\%$) und B ($32,91 \pm 5,42\%$) signifikant höher. Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen aus allen drei Betrieben wurden keine Verluste beobachtet (Abbildung 23).

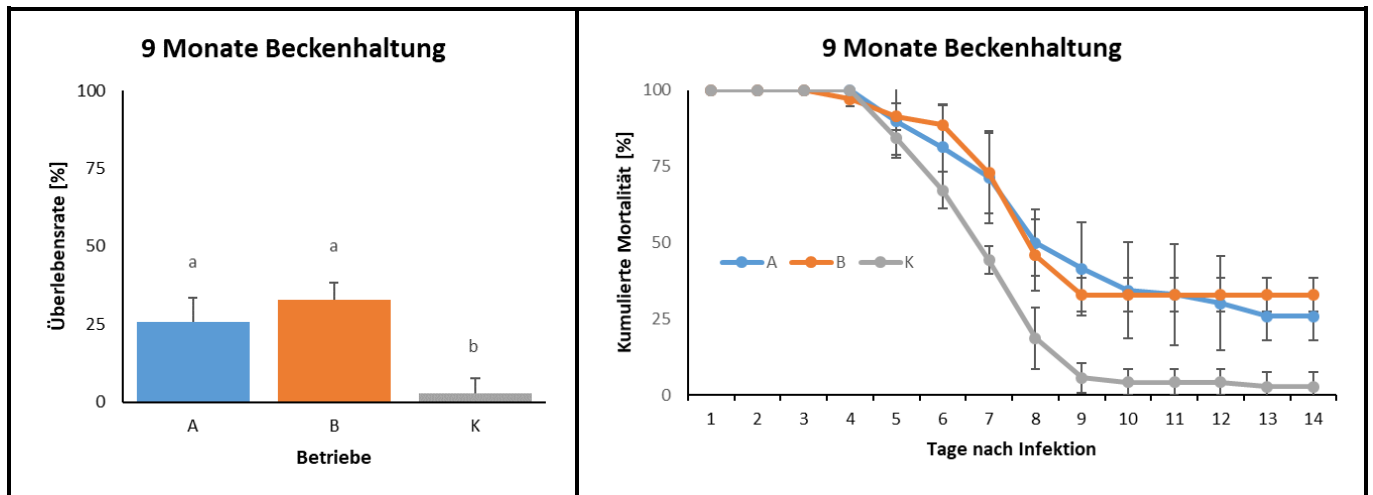


Abbildung 23: Mortalität bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) nach neun Monaten Beckenhaltung im Vergleich zu Karpfen von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K). Dargestellt ist der Verlauf von Verlusten nach Infektion nach neun Monaten Beckenhaltung mit einem virulenten polnischen Isolat des KHV und die kumulative Überlebensrate als Mittelwert und Standardabweichung in 3 gleichen Versuchsgruppen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben kennzeichnen signifikant unterschiedliche Überlebensraten zwischen den Herkünften.

5.2.1.4 Verlauf der Infektion und Viruslasten nach neun Monaten Beckenhaltung

Wie bei Karpfen nach drei Monaten Beckenhaltung beobachtet, nahm auch nach Infektion der Fische nach neun Monaten Beckenhaltung die KHV-I einen sehr raschen Verlauf. Erste Karpfen verstarben zwischen Tag 5 und 6 nach der Infektion, mit etwa 10.000 bis 10.000.000 KHV-spezifischen DNA-Kopien pro 250 ng DNA in Hautproben und 100 und 1.000.000 KHV spezifischer DNA Kopien pro 250 ng DNA aus der Niere (Abbildung 24).

Auch bei Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung lag die Viruslast in der Haut deutlich über der Viruslast in der Niere (Abbildung 25). Bemerkenswert ist, dass nach dem Abklingen der Mortalität, am Tag 14/15 nach der Infektion, bei einer relativ großen Zahl von Karpfen aus den Betrieben A und B (KHV-Risikogebiet) Viruslasten von weniger als 1.000 Virus-Genomkopien pro 250 ng DNA in der Haut und weniger als 100 Virus-Genomkopien in der Niere ermittelt wurden. Dies lässt vermuten, dass diese Karpfen die Infektion kontrollieren konnten.

Wurden die Viruslasten in Haut, Kiemen, Niere und Gehirn von Karpfen aus den KHV-Risikogebieten (Betrieb A und B) mit der Viruslast in den Geweben von Karpfen aus Betrieb K ohne KHV-Historie verglichen, wurden fünf Tage nach der Infektion signifikant niedrigere Viruslasten in Kiemen und Gehirn von Karpfen aus Betrieb B aus dem KHV Risikogebiet bestimmt als in den gleichen Geweben bei Karpfen ohne KHV-Historie (Betrieb K). Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen aus allen drei Herkünften wurden keine KHV-spezifischen Genomsequenzen nachgewiesen (Abbildung 25).

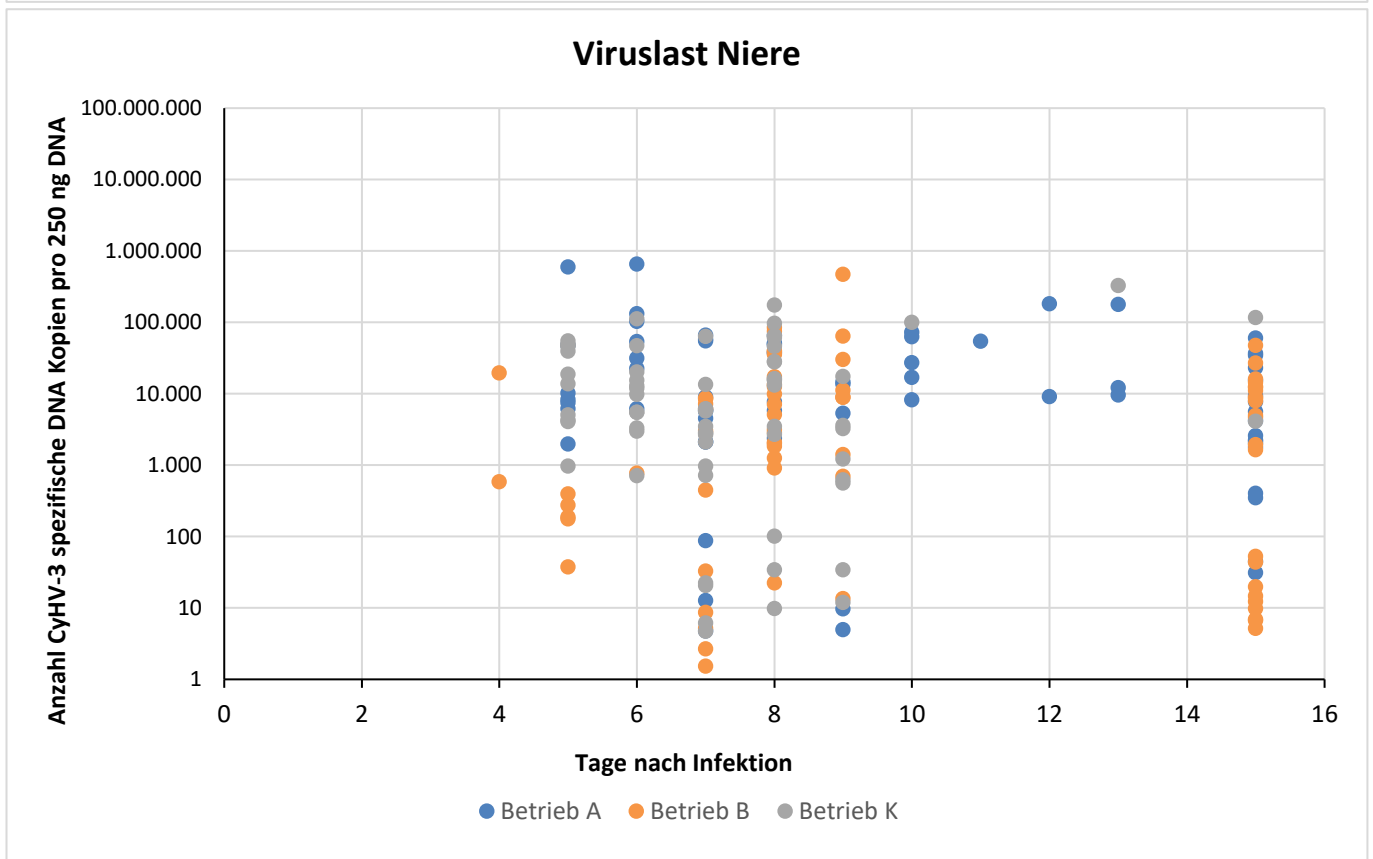
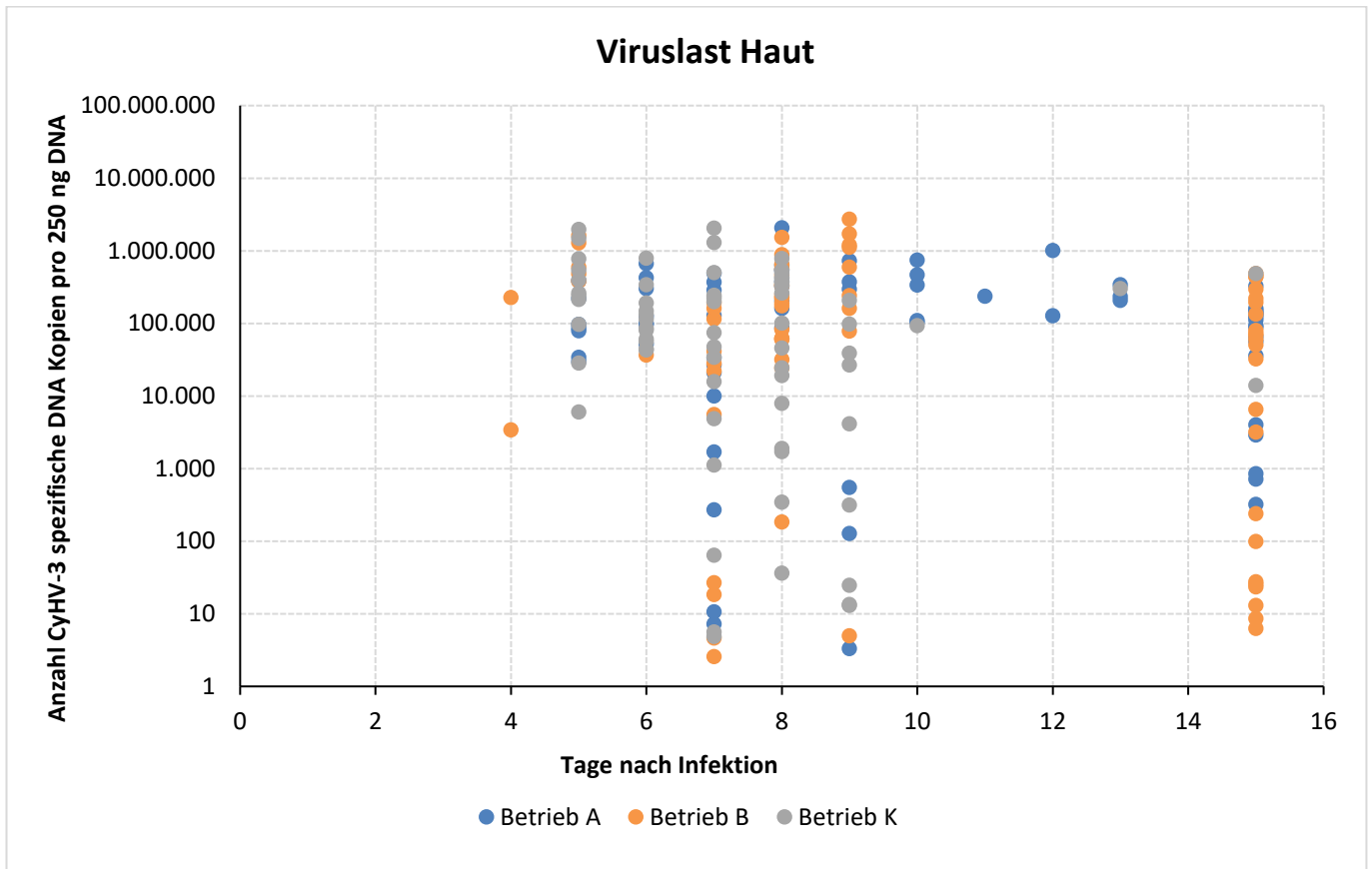


Abbildung 24: Viruslasten in Haut und Niere von Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung aus unterschiedlichen Herkünften (Betrieb A, B und K) nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Angegeben sind die Viruslasten in Geweben von Karpfen, die in der Zeit von 5 bis 14 Tagen nach der Infektion verstarben oder aus Tierschutzgründen getötet wurden.

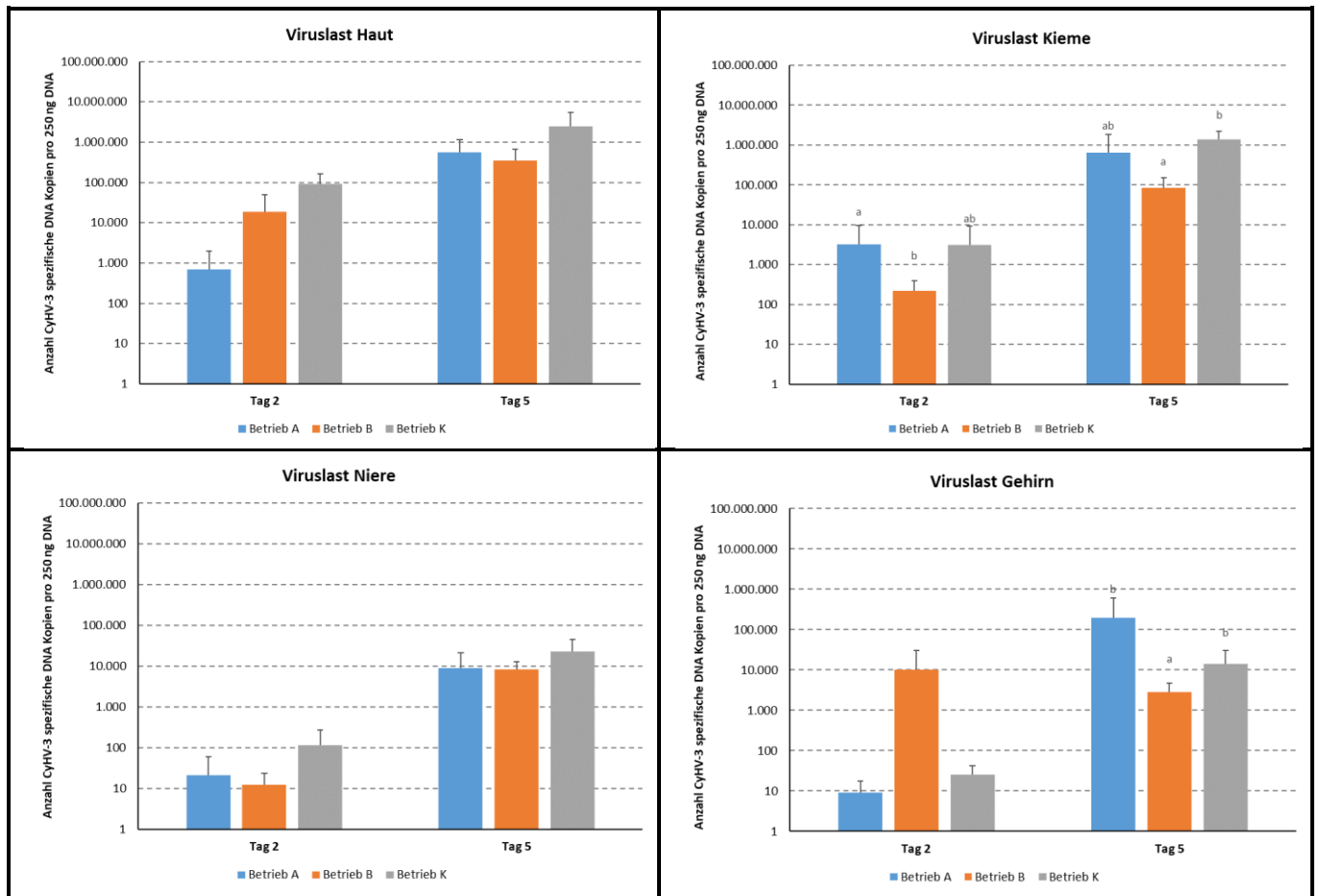


Abbildung 25: Viruslasten in Geweben von Karpfen nach neun Monaten Beckenhaltung aus einem KHV Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV Historie (Betrieb K) am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppen an. Fehlen Buchstaben, sind die Unterschiede nicht signifikant.

5.2.1.5 Empfänglichkeit von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung

Aufgrund der im Jahr 2020 verzögert erteilten Genehmigung für die erforderlichen Tierversuche durch die zuständige Behörde konnte der Infektionsversuch mit vorgestreckten Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung im Jahr 2020 nicht durchgeführt werden. Dank der Bereitschaft aller Partner, im Jahr 2021 erneut am Projekt teilzunehmen, standen 2021 erneut ein Monat alte vorgestreckte Karpfen aus den Betrieben A, B und K zur Verfügung. Die Behandlung der Laichfische sowie die Aufzucht der Brut erfolgte analog zu 2020. Erneut wurde bei Aufnahme der Fische in die Becken der TiHo aus beiden Partnerbetrieben aus dem KHV Risikogebiet und aus aus dem Betrieb ohne KHV-Historie keine Infektion mit KHV festgestellt. Die Infektion der Fische mit KHV und die nachfolgende Haltung erfolgte analog zu 2020. Nach der Infektion setzte die Mortalität ab Tag 4 bei allen Herkünften ein und alle Karpfen verstarben über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen. Die Verluste traten bei den Fischen aus Betrieb K (Laicher ohne KHV-Historie) und Betrieb B (Laicher aus dem KHV Risikogebiet) in zwei der drei replikaten Becken parallel und bei den Brütlingen aus Betrieb A in allen replikaten Becken etwas verzögert auf. In Abbildung 26 sind in Mortalitätskurven für die einzelnen Becken sowie die Mittelwerte dargestellt. Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen stellten sich ebenfalls Verluste ein, die zunächst bei Karpfen aus Betrieb A auftraten und anschließend auch in den Netzkäfigen mit Karpfen der Betriebe B und K auftraten (Abbildung 26).

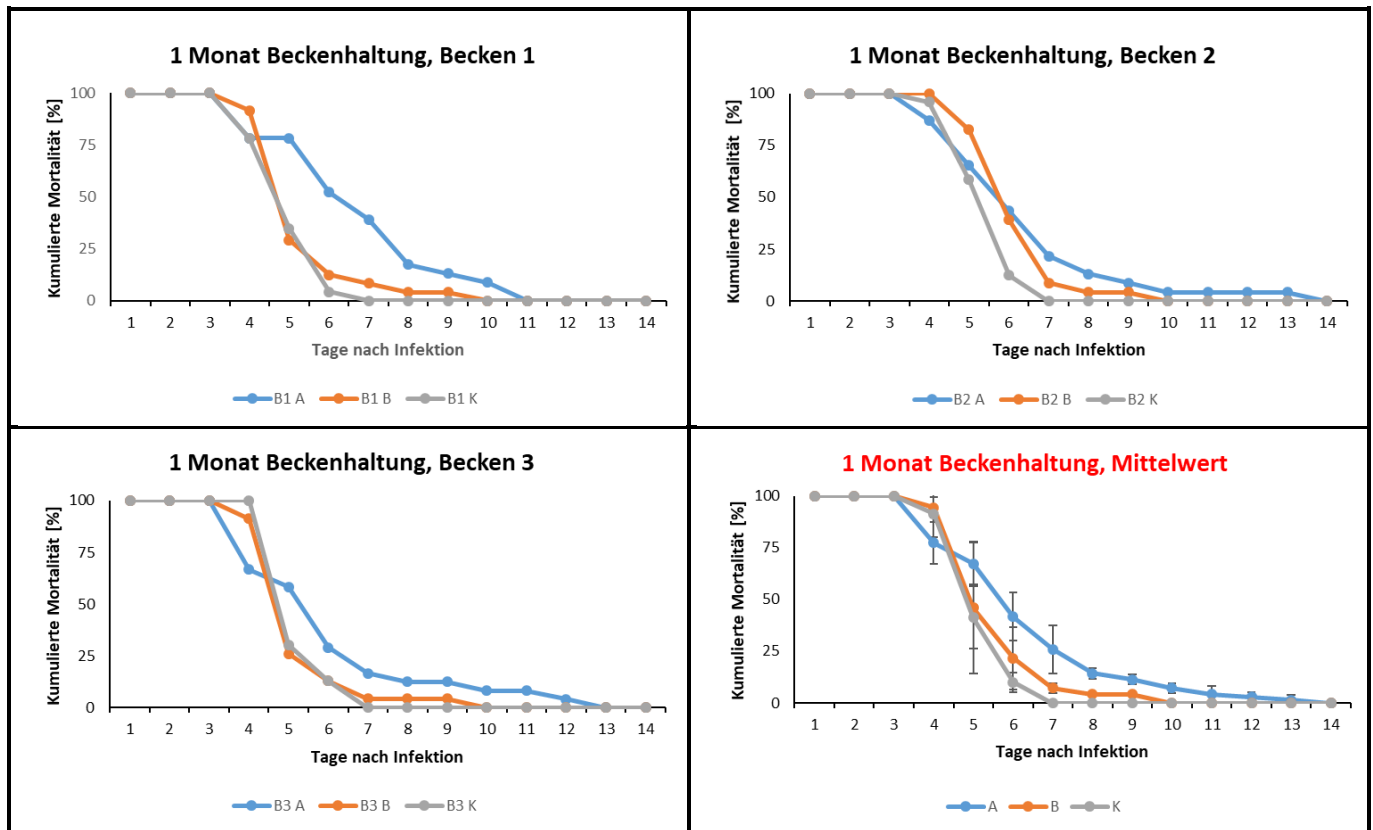


Abbildung 26: Überlebensrate bei Karpfen von Laichern aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfenbrut von Laichern aus einem Bestand ohne KHV-Historie (Betrieb K). Verlauf der Verluste nach Infektion von einem Monat alten vorgestreckten Karpfen mit einem virulenten polnischen Isolat des KHV in drei Versuchsbecken (Mittelwert und Standardabweichung).

5.2.1.6 Verlauf der Infektion und Viruslasten nach einem Monat Beckenhaltung

Bei der Analyse der Viruslast wurden ab Tag 5 nach der Infektion in der Haut bei verstorbenen Karpfen aus Betrieb K und Betrieb B sehr hohe Viruslasten im Bereich von 10.000 bis 10.000.000 KHV-spezifische Genomkopien pro 250 ng DNA ermittelt, während bei verstorbenen Fischen aus Betrieb A sehr niedrige KHV-spezifische Viruslasten im Bereich von nur 10 bis 1.000 Genomkopien pro 250 ng DNA vorlagen. Vergleichbare Befunde wurden auch für die Viruslasten bei verstorbenen Karpfen in der Niere erhoben. Hier wurden bei Karpfen aus Betrieb K und Betrieb B Viruslasten zwischen 1.000 bis 1.000.000 Genomkopien bestimmt, während insbesondere bei Fischen aus Betrieb A eine niedrige Anzahl von 10 bis 1.000 KHV-spezifische Genomkopien pro 250 ng DNA vorlag (Abbildung 27). Aufgrund der früh auftretenden Verluste bei Karpfen aus Betrieb A auch in der nicht infizierten Kontrollgruppe, wurden Gewebeproben dieser Karpfen zusätzlich auf eine Infektion mit dem Carp Edema Virus (CEV) untersucht. Bei dieser Untersuchung konnten in Kiemengewebe aus den verstorbenen Karpfen aus Betrieb A CEV-spezifische Genomsequenzen nachgewiesen werden, die für die Verluste verantwortlich gemacht werden konnten. In der Folge wurden CEV-spezifische Genomsequenzen auch bei verstorbenen Kontrollkarpfen aus den Betrieben B und K gefunden. Da die Karpfen aus allen Betrieben jeweils im gleichen Wasserkörper gehalten wurden, läßt dieser Befund vermuten, dass, ausgehend von den Karpfen aus Betrieb A das CEV über das Haltungswasser während des Versuches auch auf die Karpfen aus den Betrieben B und K übertragen wurden und dort Verluste auslöste. In gleicher Weise kann auch in den Becken mit KHV-infizierten Karpfen ausgehend von Karpfen aus Betrieb A eine Infektion der Fische aus den Betrieben B und K mit CEV erfolgt sein. Die Infektion mit diesem Virus kann neben KHV für die beobachteten Verluste verantwortlich gemacht werden.

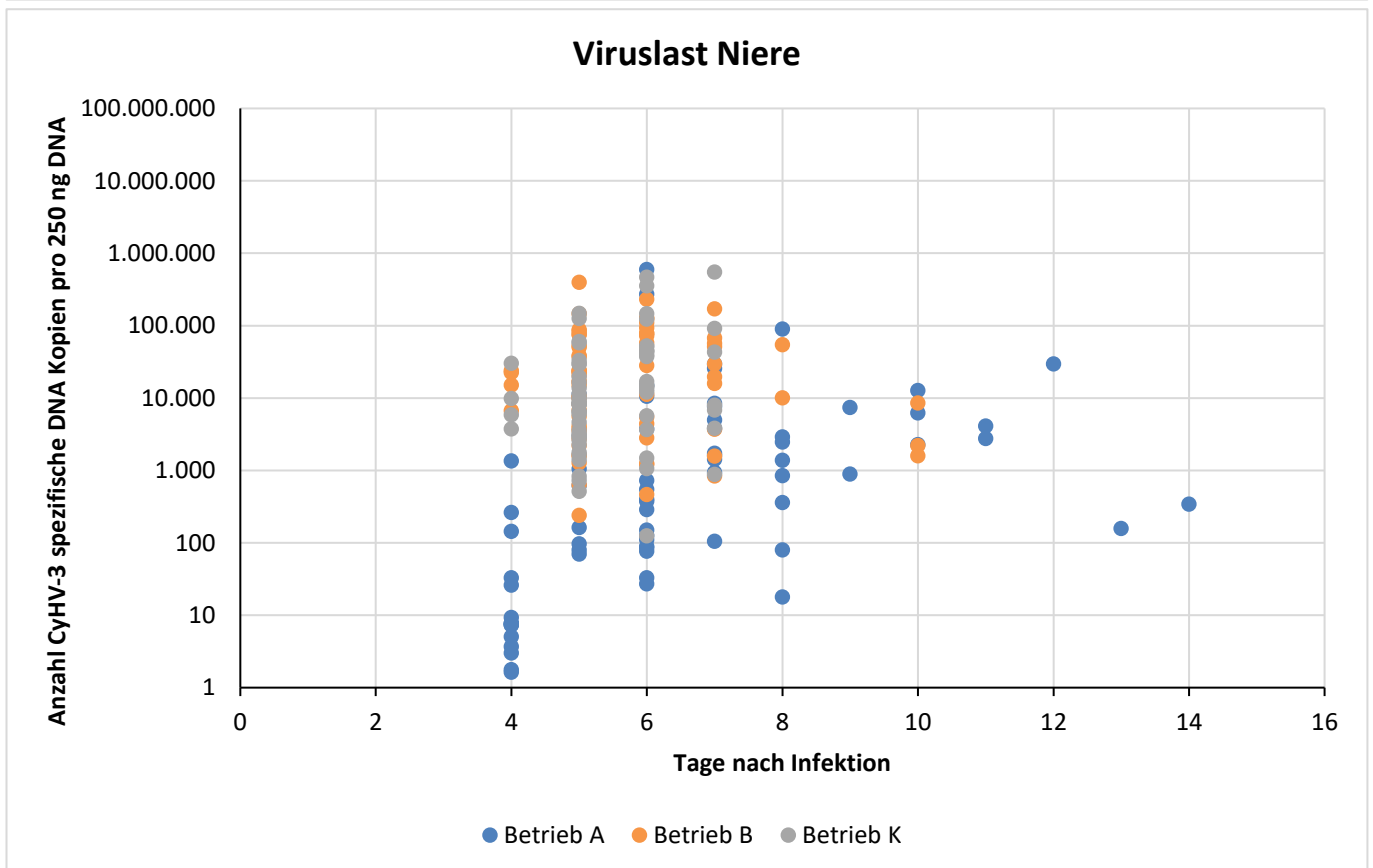
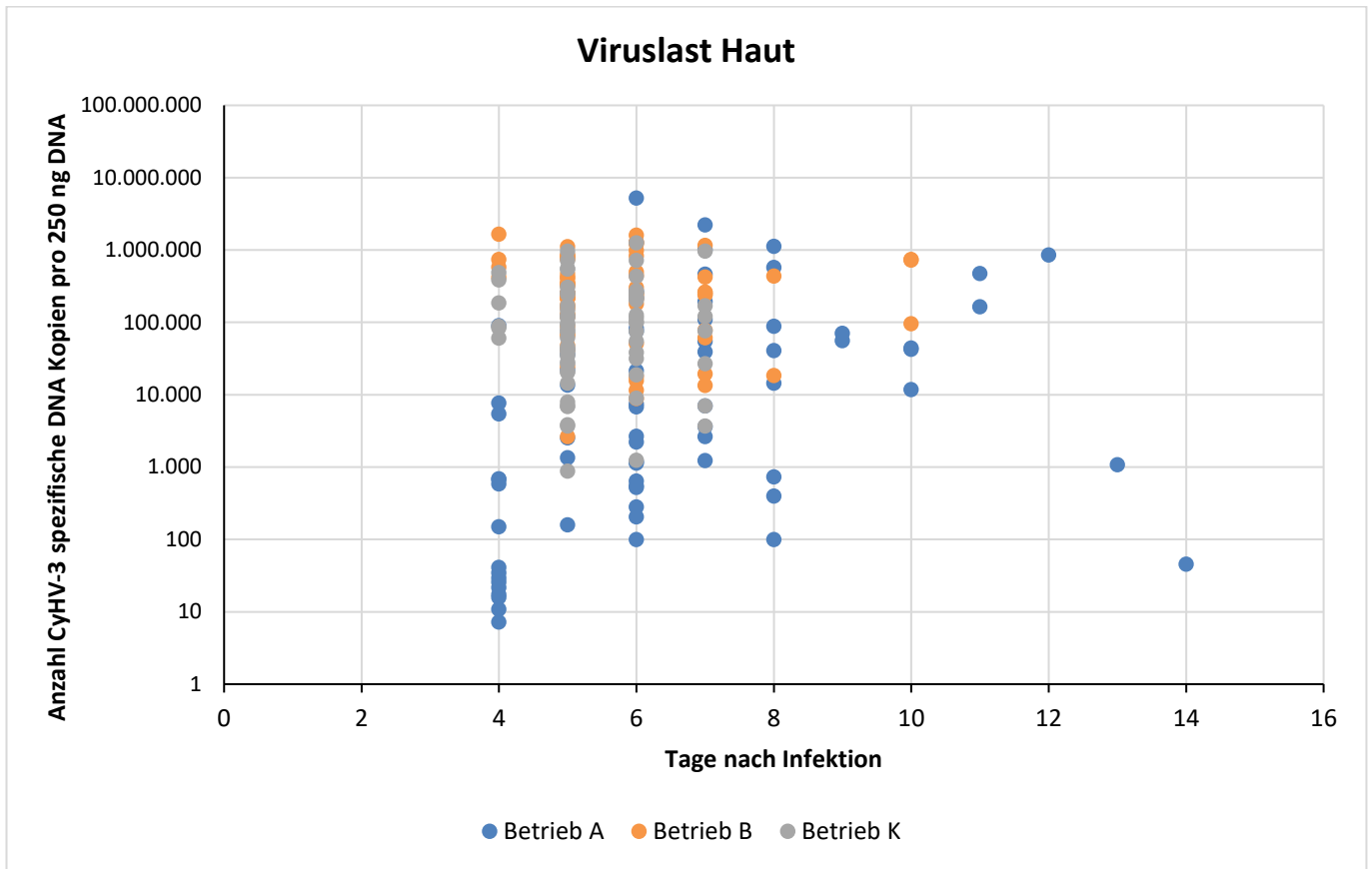


Abbildung 27: KHV-Viruslasten in Haut und Niere von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung aus unterschiedlichen Herkünften (Betrieb A, B und K) nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Angegeben sind die Viruslasten in Geweben von Karpfen, die in der Zeit von 5 bis 14 Tagen nach der Infektion verstarben oder aus Tierschutzgründen getötet wurden.

Bei der Analyse der Viruslast in den Organen Haut, Kieme, Niere und Gehirn wurde bei Karpfen aus Betrieb B in der Kieme am Tag 5 nach der Infektion eine signifikant niedrigere Anzahl von KHV-spezifischen Genomkopien bestimmt als in den Karpfen aus Betrieb K.

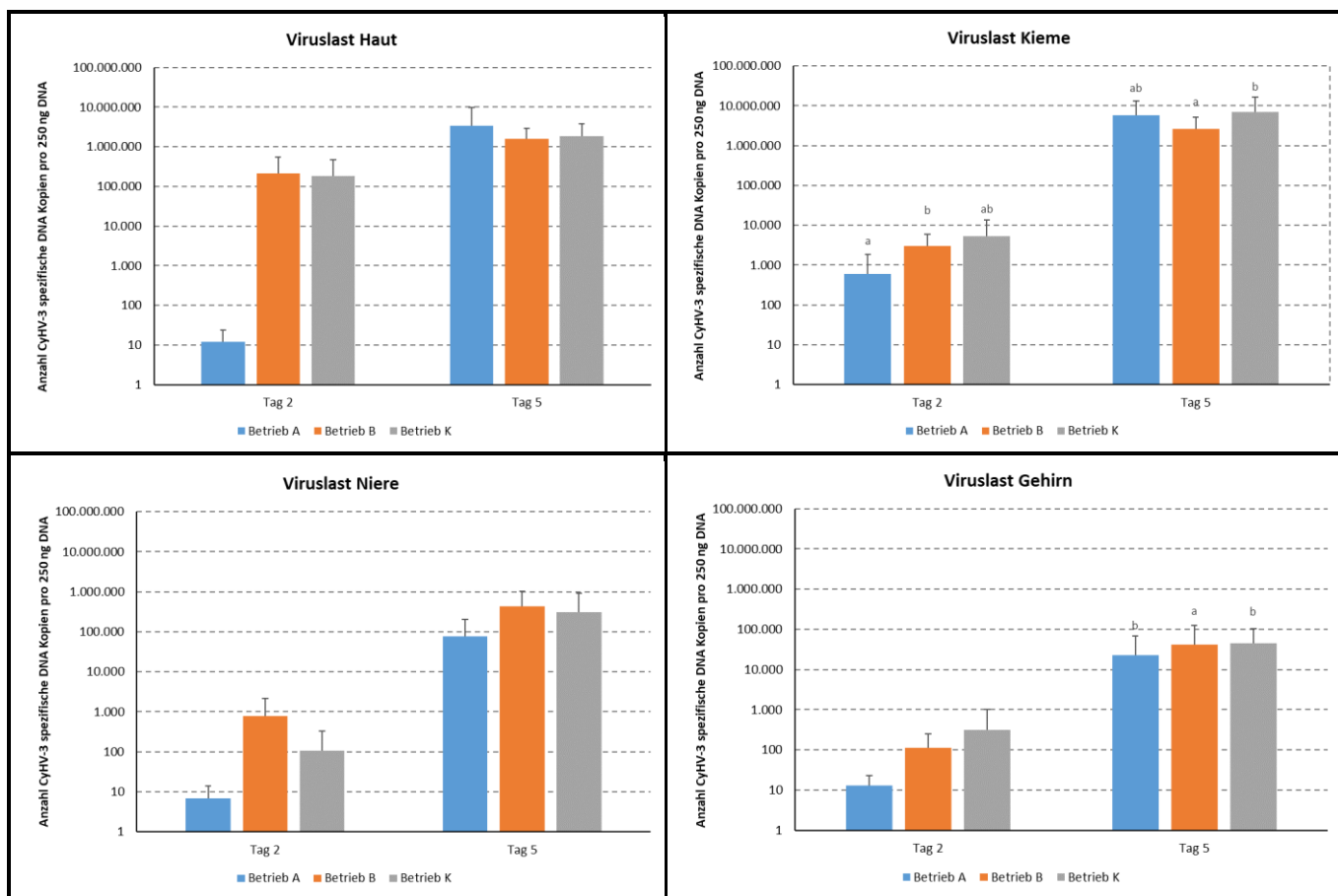


Abbildung 28: KHV-Viruslasten in Geweben von Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung aus einem KHV Risikogebiet (Betrieb A und B) im Vergleich zu Karpfen von Laichern ohne KHV Historie (Betrieb K) am Tag 2 und 5 nach Infektion mit einem virulenten polnischen KHV-Isolat. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppen an.

6 Beantwortung der Forschungsfragen und Schlussfolgerungen für die teichwirtschaftliche Praxis

6.1 Sind die Laichfischbestände in Unternehmen, die mehrere Jahre einem hohen Feldvirusdruck ausgesetzt waren, nachweislich latent mit dem KHV infiziert?

In Kiemenproben von Laichkarpfen aus zwei Betrieben (A und B) aus einem KHV Risikogebiet konnten bei einigen Karpfen KHV-spezifische DNA-Sequenzen in geringer Kopienzahl nachgewiesen werden. Bei Laichfischen aus Betrieb A und B wurden sowohl in 2020 als auch in 2021 jeweils nur einzelne Karpfen aus einer Kohorte von 60 bzw. 83 Fischen eindeutig als KHV-positiv befunden. Bei diesen Karpfen wurden KHV-spezifische DNA-Sequenzen in beiden Reaktionsansätzen aus der Kiemenprobe gefunden. Darüber hinaus wurde in beiden Betrieben bei weiteren Karpfen jeweils in nur einer der beiden Reaktionsansätze aus der Kiemenprobe KHV-spezifische DNA nachgewiesen. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Untersuchung von Serumproben aus den Laichkarpfen auf Serum-neutralisierende Antikörper (SNT) erzielt. Die Mehrzahl der Serumproben aus beiden Betrieben enthielt in beiden Versuchsjahren bei einem SNT-Titer von 1:20 bis 1:40 keine die Replikation des KHV neutralisierenden Antikörper. Lediglich das Serum einiger Karpfen wies mit einem SNT-Titer von 1:160 oder 1:320 eindeutig eine Virus-hemmende Aktivität auf, während das Serum von weiteren Karpfen mit einem SNT-Titer von 1:80 eine nur geringe neutralisierende Aktivität zeigte. Die Virusnachweise und der eindeutig positive Nachweis neutralisierender Antikörper im Serum erfolgte in der Regel nicht bei den gleichen Individuen. Lediglich bei einem Individuum war sowohl der Virusnachweis als auch der SNT positiv. Auch konnten in den beiden aufeinander folgenden Jahren virus-spezifische DNA oder neutralisierende Antikörper in der Mehrzahl der Fälle nicht wiederholt bei den gleichen Individuen festgestellt werden.

Die Arbeitshypothese, dass durch den Laichvorgang die Virusausscheidung erneut verstärkt wird, wurde in dieser Studie nur in Einzelfällen bestätigt.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die Laichfisch-Population in beiden Betrieben latent mit KHV infiziert war, dass allerdings in der Mehrzahl der Karpfen eine sehr geringe Viruslast vorlag, die nicht in jedem Fall durch eine molekularbiologische Untersuchung einer Kiemenprobe entdeckt werden konnte. Der geringe Titer neutralisierender Antikörper im Blut lässt vermuten, dass eine aktive Kontrolle der Virusvermehrung bereits längere Zeit zurück lag.

Diese Beobachtung bestätigt Befunde von MEYER (2007), die eine Kohorte von 12 latent mit KHV infizierten Karpfen über einen längeren Zeitraum beobachtete und verschiedenen Stress-Regimes aussetzte. Dabei gelang bei allen Karpfen der Nachweis der Virusinfektion und es kam zu einer Ausscheidung des Virus, allerdings in sehr unregelmäßigen Abständen (MEYER 2007).

Somit kann festgehalten werden, dass Laichfische aus KHV-Risikogebieten (vergl. Betrieb A und B) mit KHV infiziert sind, dass allerdings die Viruslast äußerst gering sein kann und die Infektion in der Routine-Diagnostik damit unentdeckt bleiben kann.

6.2 Ist die Infektion von Laichkarpfen serologisch nachweisbar?

Wie oben ausgeführt, war im Serum der Laichkarpfen, die nur eine sehr geringe Viruslast aufwiesen, der Titer von Virus neutralisierenden Antikörpern sehr gering oder nicht nachweisbar. Es wurden bei einigen Laichfischen aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) erhöhte Titer neutralisierender Antikörper nachgewiesen. Allerdings wurden im vorliegenden Fall bei Karpfen, die in der molekularbiologischen Untersuchung als „KHV-infiziert“ oder als „fraglich mit KHV infiziert“ identifiziert wurden, nur in einzelnen Fällen erhöhte Titer neutralisierender Antikörper gefunden. Somit muss aufgrund dieser Befunde festgestellt werden, dass wegen der sehr geringen Viruslast in den Laichfischbeständen weder mit molekularbiologischen noch serologischen Methoden ein sicherer Nachweis der KHV-I bei einzelnen Individuen möglich ist. Auf Bestandesebene ist der Nachweis einer latenten KHV-I jedoch mit einer angemessenen Probenzahl (mindestens 30 Fische) möglich.

6.3 Entspricht das nachgewiesene Virusgenom der in Deutschland zirkulierenden KHV-Variante?

Die Viruslasten in den als positiv befundeten Karpfen waren sehr gering, so dass nach Abschluss der PCR nur eine sehr geringe Menge eines Amplifikationsproduktes mit KHV-spezifischen Sequenzen vorlag. Aus diesen Produkten ließ sich trotz mehrfacher Bemühung keine Nukleotidsequenz identifizieren. Somit konnte diese Forschungsfrage nicht beantwortet werden.

6.4 Ist bei infizierten Laichkarpfen das Virus auch in den Geschlechtsprodukten (Eiern und Spermien) nachweisbar?

Von Laichkarpfen aus beiden Betrieben aus dem KHV-Risikogebiet wurden in beiden Untersuchungsjahren Spermien, Eier, befruchtete Eier und geschlüpfte Larven auf KHV-spezifische Genomsequenzen untersucht. In allen Probenarten konnten in einzelnen Proben KHV-Genomsequenzen in geringer Kopienzahl detektiert werden, in der Mehrzahl der untersuchten Proben war das KHV-Genom allerdings nicht nachweisbar. Somit muss festgestellt werden, dass Eier, Spermien und befruchtete Eier von latent mit KHV infizierten Laichkarpfen zwar überwiegend nicht infiziert sind, dass allerdings das Risiko besteht, dass Geschlechtsprodukte und befruchtete Eier von latent mit KHV infizierten Laichkarpfen das Virus tragen können.

Es konnte nicht abschließend ermittelt werden, ob es sich bei den in geringer Menge nachgewiesenen KHV-Genomsequenzen um eine oberflächliche Kontamination der Geschlechtsprodukte oder um eine tatsächliche vertikale Infektion handelt.

6.5 Findet eine Infektion der Brut durch latent infizierte Laichkarpfen statt?

In dieser Studie wurde in zwei Betrieben aus dem KHV-Risikogebiet (Betrieb A und B) in zwei aufeinander folgenden Jahren in einem natürlichen Laichakt Karpfenbrut von latent mit KHV infizierten Laichkarpfen erzeugt. Obwohl sowohl bei den Laichkarpfen, als auch bei den Geschlechtsprodukten und den befruchteten Eiern in Einzelfällen KHV-spezifische Genomsequenzen nachgewiesen wurden, waren die so erzeugten Nachkommen in vielfachen PCR-Untersuchungen KHV-negativ. In beiden Jahren wurden bei den untersuchten frisch geschlüpfte Brütlingen nur in Einzelfällen fragliche Befunde erhoben, bei den vorgestreckten Karpfen jedoch keine KHV-spezifischen Genomsequenzen detektiert. Zudem wurden in den Laichkammern oder während der Aufzuchtphase keine Phasen erhöhter Mortalität bei den Brütlingen beobachtet. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass aus Brut von latent infizierten Laichkarpfen KHV-freie Satzkarpfen aufgezogen werden können, die jedoch weiterhin für eine KHV-I empfänglich sind und dadurch bedingte Verluste auftreten können. Hat sich in der Nachkommenschaft gegenüber dem Virus bereits eine Resistenz aufgebaut?

In insgesamt drei Infektionsversuchen wurden Nachkommen von latent mit KHV infizierten Laichkarpfen mit einem virulenten KHV-Isolat infiziert. Die Infektionsversuche erfolgten einen, drei bzw. neun Monaten nach Aufnahme in die Beckenhaltung. Einschließlich der einmonatigen Vorstreckphase in der VTA Königswartha waren die infizierten Karpfen dann zwei, vier bzw. zehn Monate alt. In allen Infektionsversuchen konnten die Fische, die von latent mit KHV infizierten Laichern abstammten, mit dem Virus infiziert werden und sie entwickelten eine typische Koi-Herpesvirose. Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Brütlinge zuvor nicht mit KHV infiziert waren. In den zwei Infektionsversuchen mit den Karpfen nach drei und neun Monaten Beckenhaltung aus dem Jahr 2020 waren die Nachkommen von latent infizierten Laichern in gleicher Weise wie die Kontrolle für eine KHV-I empfänglich. Gegenüber der Kontrollgruppe wiesen sie geringere Viruslasten, Symptome und Mortalitäten auf.

In beiden Infektionsversuchen überlebte ein größerer Anteil der Karpfen, die von latent mit KHV infizierten Laichern abstammte, als bei Nachkommen von Laichfischen ohne KHV-Geschichte. Ein großer Anteil der Karpfenbrut der latent infizierten Laichfische, die die Infektion überlebten und am Tag 14 nach Infektion beprobt wurden, hatte zu dem Zeitpunkt relativ geringe Viruslasten in Haut und Kiemen in einem Konzentrationsbereich von nur 10^1 bis 10^4 KHV-Genomkopien pro 250 ng DNA. Dieses lag deutlich unter der Viruslast von an KHV-I verstorbenen Karpfen mit 10^5 bis 10^7 KHV-Genomkopien pro 250 ng DNA aus Hautgewebe. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass bei Nachkommen von Laichkarpfen, die bereits Kontakt mit dem KH-Virus hatten, eine höhere Resistenz gegenüber einer KHV-I vorliegt.

Im Infektionsversuch mit Karpfen nach einem Monat Beckenhaltung aus dem Jahr 2021 verstarben alle infizierten Fische, auch die Nachkommen von latent mit KHV infizierten Laichern. Bei der Betrachtung der Viruslasten in den Geweben der verstorbenen Karpfen fiel auf, dass in den ersten Tagen nach der Infektion (insbesondere an Tag 6), eine größere Anzahl von Karpfen aus dem Betrieb A verstarb, die nur sehr geringe Viruslasten aufwiesen. Bei Karpfen aus dem Betrieb A wurde dann zusätzlich zu KHV eine Infektion mit dem CEV nachgewiesen. Dass dieses Virus für einen Teil der beobachteten Mortalitäten verantwortlich war, wird an der Mortalitätskurve von Becken 1 (Abbildung 26) deutlich. Das Wasser in diesem Becken wurde, nachdem eine Infektion mit CEV bei verstorbenen Karpfen nachgewiesen worden war, mit 0,5 % Kochsalz versetzt – eine Therapie, die zur Behandlung der durch CEV verursachten Schlafkrankheit der Koi und Karpfen (*Cyprinus carpio*) empfohlen wird. In diesem Becken ließ sich anschließend ein verzögerter Verlauf der Mortalität bei den Fischen aus Betrieb A beobachten (Abbildung 26). Somit beschreiben die Ergebnisse aus dem Infektionsversuch mit einem Monat alten Karpfenbrütlingen eine Infektion bei Interaktion von zwei Viren, die beide zu Sterblichkeiten bei Karpfen führen und widersprechen nicht den Ergebnissen der früheren Infektionsversuche, in denen die Karpfenbrut von latent mit KHV infizierten Laichern eine höhere Resistenz gegenüber der KHV-I aufwiesen.

Um einen möglichen Eintragungsweg der Infektion mit CEV zu identifizieren, wurde die Nukleotid-Sequenz eines Fragmentes des P4a Gens des CEV bestimmt. Diese Sequenz stimmte mit Sequenzen überein, die in früheren Untersuchungen von Karpfen aus sächsischen Teichwirtschaften isoliert wurden.

6.6 Können unter bestimmten Bedingungen die potenziell KHV-positiven Laichfischbestände während der Sanierungsmaßnahmen erhalten werden?

Nach den Ergebnissen dieser Studie können Laichfischbestände, die aus KHV-Risikogebieten stammen und während ihres Lebens potenziell Kontakt mit dem KHV hatten, für die Reproduktion von Karpfenbrut für KHV-Risikogebiete erhalten werden, insbesondere wenn eine Sanierung des eigenen Betriebes auf Grund der regionalen KHV-Seuchenlage in absehbaren Zeiträumen wirtschaftlich nicht möglich ist.

Bei potenziell KHV-positiven Laichfischen handelt es sich um an die örtlichen Bedingungen gut angepasste Elterntiere, deren Brut gegen einen hohen Feldvirusdruck durch eine höhere Resistenz besser geschützt sein kann.

Unabhängig von einer möglichen KHV-Sanierung des eigenen Betriebes können somit diese örtlich angepassten Laichfischbestände trotz latenter KHV-I als genetische Ressource erhalten werden. Die in naturnahen Verfahren im Laichteich erzeugte Brut sollte ausschließlich als Besatz im eigenen Betrieb bzw. in räumlich nahe gelegenen Betrieben mit gleichem Seuchenstatus eingesetzt werden.

6.7 Welche Konsequenzen ergeben sich aus den Ergebnissen für die Seuchenbekämpfung?

Eine Viruserkrankung wie die KHV-I des Karpfens kann mittels klassischer Methoden der Fischseuchenbekämpfung (Abfischen, Desinfektion, Neubesatz mit virusfreien Fischen) erfolgreich und nachhaltig zurückgedrängt werden. Das belegen die Ergebnisse der KHV-I-Sanierung in zahlreichen Teichwirtschaften im Freistaat Sachsen.

In den über Wasserläufe eng vernetzten und räumlich eng nebeneinander agierenden Unternehmen der Karpfenteichwirtschaft in der Oberlausitz ist das KHV schwieriger zurückzudrängen. Wegen der räumlichen Nähe der einzelnen Teichgruppen und der Betriebsgrenzen, die im Extremfall nur durch einen Teichdamm festgelegt sind, ist bei akutem Krankheitsausbruch kaum zu vermeiden, dass infizierte moribunde oder frisch tote Fische von Teich zu Teich durch verschiedenste Prädatoren auch über Betriebsgrenzen hinaus verbreitet werden.

Die in der vorliegenden Studie über natürliche Laichverfahren erzeugte Karpfenbrut von latent mit KHV infizierten Laichkarpfen aus Seuchenbetrieben war nicht mit KHV infiziert. Bei allen Nachkommen, die nach Aufnahme der Karpfen in die Fischhaltung der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der TiHo Hannover untersucht wurden, sowie bei allen in den nachfolgenden Infektionsversuchen als nicht infizierte Kontrollfische untersuchten Karpfen konnten KHV-spezifische Genomsequenzen nicht nachgewiesen werden. Auch konnte eine Übertragung des Virus auf Brütlinge aus einem Bestand ohne KHV-Historie nicht beobachtet werden. Somit kann geschlossen werden, dass im natürlichen Laichverfahren mit latent KHV infizierten Laichkarpfen KHV-freie Karpfenbrut erzeugt werden kann, von der dann keine Infektionsgefahr für nicht infizierte Karpfenbestände ausgeht. Es wurde jedoch in Geschlechtsprodukten, befruchteten Eiern und Larven in Einzelfällen KHV in geringer Menge nachgewiesen, sodass ein Restrisiko für die Infektion erhalten bleibt. Deshalb ist es auch bei dieser Verfahrensweise erforderlich, den KHV-Status der Satzkarpfenbestände regelmäßig zu überprüfen. Wird bei diesen Untersuchungen eine KHV-I nicht nachgewiesen, wäre es möglich, mit der Nachkommenschaft aus latent infizierten Laichkarpfenbeständen eine stabile, zunächst KHV-freie Satzkarpfenproduktion für die Versorgung regionaler Betriebe zu erreichen.

Die Grundsätze der betrieblichen Vorsorge, wie die Einhaltung von Biosicherheitsmaßnahmen (u. a. Kontrolle des überbetrieblichen Satzfishhandels, betriebsinterne Desinfektionsregeln, Teichhygienemaßnahmen) sind weiter zu beachten. Bei Abgabe der aus latent infizierten Laichern stammenden Brut hat ein Hinweis an den Käufer zu erfolgen

Der Erhalt von Laichkarpfenbeständen, die im Verlauf ihres Lebens bereits Kontakt mit dem KHV hatten, kann in Endemiegebieten sinnvoll sein. Die Brut solcher Laichkarpfen kann für den eigenen Betrieb das am besten geeignete Besatzmaterial sein. Diese Karpfenbrut weist nach der vorliegenden Studie eine höhere Resistenz gegenüber der KHV-I auf.

Obwohl eine vertikale Übertragung des Virus wohl nicht stattfindet, sollte allein aus Gründen der Vorsorge Brut dieser Laichfische aber nicht in bisher KHV-freien Betrieben als Besatzmaterial verwendet werden.

Ob überlebende Karpfen aus akut und verlustreich an KHV erkrankten Beständen gezielt als Nachwuchs-laichfische ausgewählt werden, entscheidet die jeweilige Sanierungsstrategie des Betriebs. Es darf nicht unterschätzt werden, dass die Nachkommen dieser Elterntiere empfänglich für eine Feldvirusinfektion bleiben und KHV-bedingte Verluste ausbilden können.

KHV-freie Gebiete müssen nach wie vor durch Prävention geschützt und bei eventuellem Seuchenausbruch durch klassische Methoden der Seuchenbekämpfung saniert werden. Die Verwendung von Brut aus latent infizierten Laichfischbeständen ist abzulehnen.

In KHV-Endemiegebieten ohne Aussicht auf erfolgreiche Tilgung könnte jedoch die Arbeit mit latent KHV-infizierten Laichfischen ein Baustein für das Überleben von durch das KHV stark beeinträchtigten Karpfenteichwirtschaften sein.

Literaturverzeichnis

- Adamek M, Syakuri H, Harris S, Rakus KŁ, Brogden G, Matras M, Irmazarow I, Steinhagen D (2013): Cyprinid herpesvirus 3 infection disrupts the skin barrier of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Microbiology* 162: 456-470
- Adamek M, Matras M, Rebl A, Stachnik M, Falco A, Bauer J, Miebach AC, Teitge F, Jung-Schroers V, Abdullah M, Krebs T, Schröder L, Fuchs W, Reichert M, Steinhagen D (2022): Don't let it get under your skin! – Vaccination protects the skin barrier of common carp from disruption caused by Cyprinid herpesvirus 3. *Frontiers in Immunology* 13, Article 787021 (doi: 10.3389/fimmu.2022.787021)
- Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hedrick RP (2004): 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* 60:179–87
- Matras M, Borzym E, Stone D, Way K, Stachnik M, Maj-Paluch J, Palusińska M, Reichert M (2017): Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J Fish Dis* 40: 319–325
- Meyer K (2007): Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirus-Infektionen durch symptomlose Carrierfische. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Abrufbar unter: https://elib.tiho-hannover.de/dissertations/meyerk_ss07
- TSK (2021): Jahresbericht Hinweise zum Schutz der Tierbestände vor Tierseuchen und Tierkrankheiten. Sächsische Tierseuchenkasse Dresden: 59 S.

Anhang

Tabelle A 1: Übersicht über den KHV-Genomnachweise in Laichkarpfen und Geschlechtsprodukten von individuellen Laichern aus Betrieb A im KHV-Endemiegebiet in den Jahren 2020 und 2021.

Chip-Nr. Endziffer	Geschlecht	Abfischung 21.04.2020		Ablaichen 30.05.2020		Abfischung 15.04. 2021			Ablaichen 04.06. 2021	
		Kiemen-probe	SNT Titer	Kiemen-probe	Probe Milch/Rogen	Kiemen-probe	Milch-probe	SNT Titer	Kiemen-probe	Probe Milch/Rogen
3617	m					neg		160		
3618	m					neg		20	neg	
3625	m					neg		20	neg	neg
3633	m					neg		20	neg	neg
3634	m					neg		80		
3662	m					neg		20	neg	neg
3678	m					neg		320	neg	neg
3685	m					neg		40		
3686	m					neg		40		
3691	m					neg		20		
3692	m					frag		80	frag	neg
3693	m					neg		20	neg	neg
3694	m					neg		80		
3695	m					neg		20	neg	neg
3696	m					neg		20	neg	neg
3697	m					neg		20	neg	neg
3698	w					neg		20	neg	neg
3699	w					neg		20		
3700	w					neg		20	neg	neg
3701	w					neg		20	neg	neg
3702	w					neg		20		
3705	w					neg		20	neg	frag
3706	w					frag		20	neg	neg
3708	w					neg		20	neg	
3709	w					neg		20	neg	
3710	w								neg	
7405	m					neg	neg	20		

Chip-Nr. End-ziffer	Ge-schlecht	Abfischung 21.04.2020		Ablaichen 30.05.2020		Abfischung 15.04. 2021			Ablaichen 04.06. 2021	
		Kiemen -probe	SNT Titer	Kiemen -probe	Probe Milch/ Rogen	Kiemen -probe	Milch- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen
7426	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7427	m	neg	20	neg	neg	neg		40	neg	
7430	m	neg	20	neg		neg		80	pos	neg
7431	m	neg	20	pos		neg	neg	20	frag	neg
7440	m	neg	20	neg	pos	neg		20		
7441	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7444	m	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7445	m	neg	20	neg		neg	neg	20	neg	neg
7460	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7466	m	neg	20	neg	neg					
7467	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7468	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7469	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	
7472	w	neg	20	neg		neg		20	neg	
7473	m	neg	20	neg		pos		20	neg	
7476	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7477	m	neg	20	neg		neg	neg	20	neg	neg
7480	m	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7481	m	pos	20	neg		neg	neg	160	neg	neg
7484	m	neg	20	neg		neg	frag	20	neg	
7488	m	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7489	m	neg	20	neg	neg				frag	neg
7491	m	neg	20	neg		neg	frag	20	neg	neg
7493	m	neg	40	pos	neg	neg		20	neg	
7496	m	neg	20	neg						
7497	m	neg	20	neg		neg		20	neg	
7498	m	neg	20	neg		neg		20		
7499	m	neg	20	neg		neg		160	neg	
7500	m	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7501	m	neg	20	neg					neg	neg

7502	m	neg	20			neg		80	neg	neg
Chip-Nr. End-ziffer	Ge-schlecht	Abfischung 21.04.2020		Ablaichen 30.05.2020		Abfischung 15.04. 2021			Ablaichen 04.06. 2021	
		Kiemen -probe	SNT Titer	Kiemen -probe	Probe Milch/ Rogen	Kiemen -probe	Milch- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen
7504	m	neg	20	neg					neg	
7505	m	neg	20	neg	neg				neg	
7517	m	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7520	m	neg	40	neg		neg		20	neg	neg
7521	m	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7530	m	neg	20	neg		neg		160	neg	neg
7536	m	neg	20	neg		neg		20		
7538	m	neg	160	neg	neg	neg		20	neg	neg
7540	w	neg	20	neg	neg			20		
7541	w	neg	20						neg	
7544	w	neg	20	neg		neg		20	neg	
7545	w	neg	20	neg		neg			neg	
7548	w	neg	20	neg					frag	
7549	w	neg	20						neg	
7554	w	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7555	w	frag	20	pos		neg		160	neg	
7558	m	neg	20	neg		neg		20	neg	
7569	w	frag	20	pos	neg	neg		20	neg	neg
7570	w	neg	20	neg		neg		20	neg	
7571	w	neg	20	neg		neg		20	neg	
7572	w	pos	20	neg	neg			20		
7573	w	neg	20	neg		neg		80	neg	
7577	w	neg	20	neg	neg			40	neg	
7578	w	neg	40	neg					neg	
7579	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7581	w	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
7798	w	neg	20	neg	neg	pos		20	neg	neg
7830	w	neg	20	neg		neg		20	neg	frag
7831	w	neg	20	neg		neg		20	neg	neg
9136	m					neg	neg	20		

Anmerkungen: Geschlecht: m: männlich, w: weiblich, KHV-Nachweis: neg: negativ, kein Genomnachweis in der PCR sowie ein SNT-Titer von 1:20 oder 1:40. Frag: KHV-Nachweis fraglich, KHV-Genomnachweis in nur einer Probe des PCR-Doppelan-satzes oder ein SNT-Titer von 1:80, pos (oder Ziffer): positiv, KHV-Genomnachweis in beiden Proben des PCR-Doppelan-satzes. Leere Zellen: keine Probe.

Tabelle A 2: Übersicht über den KHV-Genomnachweise in Laichkarpfen und Geschlechtsproduk-ten von individuellen Laichern aus Betrieb B im KHV-Endemiegebiet in den Jahren 2020 und 2021.

Chip-Nr. End-ziffer	Ge-schlecht	Abfischung 15.04.2020		Ablaichen 25.05.2020		Abfischung 23.04.2021			Ablaichen 28.05. 2021	
		Kiemen- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen	Kiemen- probe	Milch- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen
3330	m	neg	20	neg	neg	neg	frag	20	neg	neg
3333	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3334	m	neg	20	neg	pos	neg	neg	20	neg	neg
3335	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3336	m	neg	20	neg		frag	neg	20	neg	neg
3337	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3338	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3341	m	neg	40	neg	pos	neg	neg	20	neg	neg
3342	m	neg	80	neg	pos	neg		20	frag	neg
3343	m	neg	40	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3345	m	neg	20	neg	pos	neg		80	neg	frag
3380	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	320	frag	neg
3416	m	frag	20	neg	neg					
3418	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3449	m	neg	80	neg	neg	neg	neg	80	neg	neg
3451	m	neg	20	neg	neg					
3477	m	neg	40	neg	neg	neg	neg	20	neg	frag
3479	m	neg	80	neg	neg	frag	neg	40	neg	neg
3483	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
3485	m	neg	20	neg	neg					
3711	m					neg	neg	20	neg	neg
3712	w					neg		40		
3713	w					neg		40	neg	neg
3714	w					neg		20		
3715	m					frag	neg	320		
3716	w					neg		20	neg	neg

Chip-Nr. End-ziffer	Ge-schlecht	Abfischung 15.04.2020		Ablaichen 25.05.2020		Abfischung 23.04.2021			Ablaichen 28.05. 2021	
		Kiemen- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen	Kiemen- probe	Milch- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen
3717	m					frag		20		
3718	m					neg	neg	20	neg	neg
3719	m					neg	neg	20	frag	neg
3720	m					pos	neg	20		
6154	m	neg	80	neg	neg	neg	neg	80	neg	neg
6303	m	neg	20	neg		neg	neg	40	neg	neg
6308	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
6307	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
6313	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
6314	m	neg	80	neg	neg	frag	frag	80	neg	neg
6316	m	neg	20	neg	pos					
6317	m	neg	20	neg	neg					
6318	m	neg	20	neg	pos	neg	neg	80	neg	frag
7358	m	pos	20	neg	neg	neg	pos	80	neg	neg
7359	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7364	m	neg	40	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7365	m	neg	20	neg	neg	neg	frag	20	neg	neg
7366	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7367	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	40	neg	neg
7368	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7369	m	neg	20	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7370	m	neg	20	neg	pos					
7372	m	neg	80	neg	neg	neg	neg	20	neg	frag
7373	m	neg	40	neg	neg	neg	neg	20	neg	neg
7382	w	neg	20	neg	neg					
7383	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7385	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	frag
7386	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7387	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7388	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7389	w	neg	20	neg	neg	neg		20		

Chip-Nr. End-ziffer	Ge-schlecht	Abfischung 15.04.2020		Ablaichen 25.05.2020		Abfischung 23.04.2021			Ablaichen 28.05. 2021	
		Kiemen- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen	Kiemen- probe	Milch- probe	SNT Titer	Kiemen- probe	Probe Milch/ Rogen
7394	w	neg	20	neg	neg					
7395	w	neg	20	neg	pos					
7397	w	neg	20	neg	neg	neg		80	frag	
7398	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	
7399	w	neg	20	pos		neg	neg	20	neg	neg
7412	w	neg	40	neg	neg	neg		20	neg	neg
7413	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7415	w	neg	20	neg	neg	neg		320	neg	neg
7416	w	neg	20	pos	neg					
7417	w	pos	20	neg	pos	pos		160	neg	
7420	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7421	w	neg	20	neg	neg	neg		20	neg	neg
7422	w	neg	20	neg	pos	frag		20	neg	frag

Anmerkungen: Geschlecht: m: männlich, w: weiblich, KHV-Nachweis: neg: negativ, kein Genomnachweis in der PCR sowie ein SNT-Titer von 1:20 oder 1:40. Frag: KHV-Nachweis fraglich, KHV-Genomnachweis in nur einer Probe des PCR-Doppelan-satzes oder ein SNT-Titer von 1:80, pos (oder Ziffer): positiv, KHV-Genomnachweis in beiden Proben des PCR-Doppelan-satzes. Leere Zellen: keine Probe.

Herausgeber:

Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und
Geologie (LfULG)
Pillnitzer Platz 3, 01326 Dresden
Telefon: + 49 351 2612-0
Telefax: + 49 351 2612-1099
E-Mail: Poststelle.LfULG@smekul.sachsen.de
www.lfulg.sachsen.de

Autoren:

Dieter Steinhagen, Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17, 30559 Hannover
Grit Bräuer, Kerstin Böttcher
Sächsische Tierseuchenkasse
Löwenstraße 7a, 01099 Dresden
Gert Füllner, Sebastian Grosser
LfULG Abteilung 7, Referat 76
Gutsstraße 1, 02699 Königswartha

Redaktion:

Gert Füllner
Alexandra Segelken-Voigt
Abteilung 7, Referat 76
Gutsstraße 1, 02699 Königswartha
Telefon: + 49 35931 29610
Telefax: + 49 35931 29611
E-Mail: gert.fuellner@smekul.sachsen.de

Fotos:

Autoren

Redaktionsschluss:

31.03.2022

ISSN:

1867-2868

Hinweis:

Die Broschüre steht nicht als Printmedium zur Verfügung,
kann aber als PDF-Datei unter <https://publikationen.sachsen.de> heruntergeladen werden.

Verteilerhinweis

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben.

Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen. Missbräuchlich ist insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken oder Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist auch die Weitergabe an Dritte zur Verwendung bei der Wahlwerbung.

*Täglich für
ein gutes Leben.*

www.lfulg.sachsen.de