

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinische Abteilung für Fischmedizin

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Mansour El-Matbouli)

**Anwendung einer auf dem DNA Polymerase Gen basierenden PCR  
zum Nachweis verschiedener DNA Viren bei Zierfischen**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sophie Schwarz

Wien, im Dezember 2019

Betreuerin: Dr. med. vet. Eva Lewisch Dipl. ECAAH

Klinische Abteilung für Fischmedizin

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der

Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn:

## INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung .....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	ii
1 Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1 Wirtschaftliche und globale Aspekte des Handels mit Zierfischen.....	1
1.2 Schwierigkeiten in der Diagnostik viraler Erkrankungen von Zierfischen .....	2
2 Die Bedeutung von Herpes-, Irido-, Adeno- und Poxviren bei Zierfischen.....	4
2.1 Herpesviren von Cypriniden und anderen Zierfischen .....	4
2.1.1 Koi Herpes Virus (KHV).....	4
2.1.2 Haematopoetische Nekrose der Goldfische .....	6
2.1.3 Karpfenpocken .....	7
2.2 Iridoviren .....	8
2.2.1 Megalozytivirus .....	8
2.2.2 Ranavirus .....	9
2.2.3 Lymphocystivirus .....	10
2.3 Adenoviren .....	11
2.4 Poxviren .....	11
2.4.1 Carp Edema Virus und Koi Sleepy Disease Virus .....	12
2.4.2 Salmon Gill Pox Virus .....	12
2.5 Fragestellung .....	13
3 Tiere, Material und Methodik .....	14
3.1 Zoofachhandlungen und Tiermaterial .....	14
3.1.1 Zoofachhandlungen.....	14
3.1.2 Tiermaterial .....	14
3.2 Methodik.....	19

3.2.1	Sektion .....	19
3.2.2	DNA-Extraktion .....	19
3.2.3	PCR.....	19
3.2.3.1	Primer.....	19
3.2.3.2	Mastermix.....	20
3.2.3.3	Kontrollen .....	21
3.2.3.4	Gel-Extraktion und Sequenzierung der Positivkontrollen .....	28
3.2.4	Klonierung der Positivkontrollen .....	29
3.2.5	Elektrophorese und DNA-Detektion .....	30
3.2.6	Untersuchungen von Feldproben.....	30
4	Ergebnisse .....	32
5	Diskussion.....	33
6	Zusammenfassung.....	37
7	Summary.....	38
8	Literaturverzeichnis .....	39
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	51

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Zuerst gebührt mein Dank Frau Dr. med. vet. Eva Lewisch Dipl. ECAAH, von der die Idee zu dieser Arbeit stammt, für die fundierte Unterstützung und geduldige Betreuung während des gesamten Zeitraums. Auch für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik möchte ich mich herzlichst bedanken!

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr.rer.nat. El-Matbouli, dem Leiter der klinischen Abteilung für Fischmedizin, für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in einem für mich besonders interessanten Bereich der Veterinärmedizin schreiben zu können.

Außerdem möchte ich Herrn Dr.med.vet. Hatem Soliman und Frau Dr. Mona Saleh, Mag.rer.nat. Adina Friedl MSc., Frau Mag.med.vet. Karoline Waldner und dem gesamten Team der klinischen Abteilung für Fischmedizin für Ihre Unterstützung danken!

Vielen herzlichen Dank auch an Frau Dipl.-Ing. Dr. techn. Jolanta Kolodziejek für das zur Verfügung stellen, der, in dieser Arbeit benutzten, Positivkontrollen!

Einen wichtigen Beitrag leisteten auch meine Freunde, Sarah, Adrian, Aaron, Grischa, Johannes und Agnes sowie mein Freund Martin, die mich bei der Korrektur unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben, sondern mich auch in jeder Entscheidung unterstützen und mir mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ohne Euch hätte ich das alles nie geschafft!

## Abkürzungsverzeichnis

Banggai cardinalfish iridovirus	BCIV
Basenpaar	bp
Canines Adenovirus	CAV
Carp edema virus	CEV
Cyprinides Herpesvirus 1	CyHV-1
Cyprinides Herpesvirus 2	CyHV-2
Cyprinides Herpesvirus 3	CyHV-3
Epizootische hämatopoetische Nekrose	EHN
Epizootisches Hämatopoetisches Nekrose Virus	EHNV
Equines Adenovirus	CAV
Escheria coli	E. coli
European catfish virus	ECV
Infectious spleen and kidney necrosis virus	ISKNV
Koi Herpes Virus	KHV
Koi-Flossen-1-Zelllinie	KF-1
koi sleepy disease virus	KSDV
Lymphocystis disease virus	LDV
Lymphocystis disease virus 1	LCDV-1
Lymphocystis disease virus 2	LCDV-2
Marbled sleepy goby iridovirus	MSGIV
Red sea bream iridovirus	RSIV
Salmon gill pox virus	SGPV
Salmon gill poxvirus Erkrankung	SGPVD
Singapore grouper iridovirus	SGIV
Species	sp
Species pluralis	spp
Threespine stickleback iridovirus	TSIV
Turbot reddish body iridovirus	TRBIV

## **1 Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Wirtschaftliche und globale Aspekte des Handels mit Zierfischen**

Aquaristik und der Handel mit Zierfischen ist seit Jahren weltweit ein aufstrebender Wirtschaftszweig und erfreut sich immer größerer Beliebtheit. Etwa 4000-5000 Spezies werden international als Zierfische in Gefangenschaft gehalten (Sales 2003). Der internationale Handel mit lebenden Zierfischen wächst seit 1985 jedes Jahr um durchschnittlich 14 % (Bartley 2000). Insgesamt wurde im Jahr 2016 ein Gesamtwert von 78,3 Millionen Euro durch Import von Zierfischen in EU-Mitgliedstaaten umgesetzt. Die größten Importeure sind Großbritannien, Deutschland, Niederlande, Frankreich und Italien. Mit 74,8% kommt der Großteil der gehandelten Zierfische aus nur 5 Ländern: Singapur, Israel, Japan, Thailand und Indonesien. In Mitteleuropa ist Tschechien der größte Drehpunkt im Handel innerhalb der EU-Mitgliedstaaten und hält insgesamt 23,7% des Gesamtvolumens. (Ornamental Aquatic Trade Association LTD). Für die EU enthält die Richtlinie 2006/88/EG Vorschriften für Tiere der Aquakultur zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten. Wildfänge für den Zoofachhandel sind von diesen Vorschriften nicht betroffen, ebenso sind Wassertiere zu Zierzwecken, welche nicht in direkten Kontakt mit natürlichen Gewässern kommen, von verschiedenen Teilen dieser Bestimmung ausgenommen. Die Einfuhr von Wassertieren für geschlossene Einrichtungen aus Drittländern ist nur dann zugelassen, wenn diese der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) angehören (RICHTLINIE 2006/88/EG, Verordnung (EG) Nr. 1251/2008). Es kommt jedoch durchaus vor, dass nicht heimische Zierfische, die eigentlich in geschlossenen Systemen gehalten werden sollten, in die Natur entkommen oder auch absichtlich entlassen werden. Auch wenn die meisten importierten tropischen Arten in heimischen Gewässern nicht überleben können, lassen sich die größten Krankheitsausbrüche der europäischen Wassertierpopulation der letzten Jahre auf einen Pathogentransfer durch die Einführung von nicht heimischen Arten zurückführen (Peeler et al. 2011). Nicht nur die aquatische Wildpopulation wird bei Einführung von Pathogenen gefährdet, sondern dies könnte auch verheerende Auswirkungen auf die Produktion von Fischen aus Aquakulturen haben. Nicht zuletzt wäre auch der Handel mit Zierfischen selbst durch wirtschaftliche Verluste und Verlust der Glaubwürdigkeit gefährdet (Ariel 2005).

## 1.2 Schwierigkeiten in der Diagnostik viraler Erkrankungen von Zierfischen

Zierfische sind anfällig für viele virale Pathogene. In manchen Fällen sind die Anzeichen einer viralen Erkrankung offensichtlich und die Diagnose kann schnell gestellt werden. Häufig jedoch zeigen Fische nur unspezifische Symptome oder die eigentliche Erkrankung wird durch sekundäre Infektionen verschleiert (Lewisch 2016). Jedoch stößt die notwendige Diagnostik viraler Erkrankungen von Zierfischen aus verschiedenen Gründen an ihre Grenzen. Zum einen sind die notwendigen virologischen Untersuchungen sehr teuer und aufwendig, da spezielles Equipment wie Elektronenmikroskope benötigt werden. Auf der anderen Seite muss der zu untersuchende Fisch für eine Diagnose meistens getötet werden (Bernoth und Crane 1995). Dies ist eine große Hemmschwelle für Tierbesitzer, da diese eigentlich wegen einer Behandlung und potentiellen Heilung ihres Tieres an den/die Veterinärmediziner/in herantreten. Zusätzlich ist die Behandlung von viralen Erkrankungen bei Fischen auf Immunostimulantien und generelle Haltungsverbesserung beschränkt (Lewisch 2016).

Es gibt verschiedene Methoden um Erkrankungen, die von Viren ausgelöst werden, zu diagnostizieren. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Verfahren. Direkte Nachweisverfahren, die bei Fischen allgemein zur Diagnostik eingesetzt werden, sind das Licht- und Elektronenmikroskop, Histopathologie und molekulare Methoden wie PCR (Ananda Raja und Jithendran 2015, OIE 2017). Eine allgemeine Methode zum Nachweis von Viren ist deren Vermehrung in Zellkulturen. Viren verursachen meistens einen typischen zytopathischen Effekt, der eine morphologische Veränderung der Zelle beziehungsweise des Zellrasens darstellt (Justus-Liebig-Universität Giessen, Leland und Ginocchio 2007). Problematisch ist allerdings, dass es häufig keine adäquaten Zellkulturen für Zierfische gibt. Im „Manual of diagnostic tests“ der OIE (2017) werden nur 11 Zelllinien angeführt, von denen zwei von Zierfischen (Koi (*Cyprinus carpio*) und Quergestreifter Schlangenkopffisch (*Channa striata*)) stammen, die für die Diagnostik bei Fischen eingesetzt werden. Da eine Zellkultur alleine meistens nicht für eine Diagnose ausreichend ist, müssen häufig noch weitere Testverfahren wie PCR eingesetzt werden (Leland und Ginocchio 2007). Die Histopathologie ist eine gute Methode für moribunde oder gerade verendete Tiere. Es werden Gewebeschnitte angefertigt, in denen die Präsenz mancher Viren durch charakteristische Einschlusskörperchen in Zytoplasma oder Kernen von Zielzellen festgestellt werden kann. Man muss jedoch auf die richtige Anfertigung und Fixierung der Probe achten. Schwierig ist auch die Detektion von geringen Virusmengen beziehungsweise geringgradigen Infektionen der Fische (Ananda Raja und Jithendran 2015). Auch hier kann eine Kombination mit anderen

Untersuchungsmethoden wie PCR nötig sein (Adams und Thompson 2008). Eine weitere Methode innerhalb der Histopathologie sind immunhistochemische Färbungen. Hierbei wird ein virales Antigen durch spezifische Antikörper gebunden und durch den Zusatz von speziellen Farbstoffen, die wiederum an den Antikörpern binden, mittels Lichtmikroskopie sichtbar gemacht (Ananda Raja und Jithendran 2015). Diese wird laut OIE (2017) zum Beispiel für die Diagnostik von Megalocytiviren verwendet. Die PCR ist eine molekulare Technik, die zur Identifikation von vielen Pathogenen bei aquatischen Lebewesen weiterentwickelt wurde (OIE 2017). Durch die PCR ist es möglich kleinste Mengen an spezifischen DNA Sequenzen zu amplifizieren, um diese dann zu analysieren (Adams und Thompson 2011, Garibyan und Avashia 2013). Diese Methode hat eine hohe Sensitivität und eignet sich sehr gut für den Nachweis verschiedener Viren wie dem Koi Herpes Virus (KHV) oder dem Red sea bream iridovirus (RSIV) (OIE 2017). Problematisch ist, dass die PCR sehr anfällig für technische Probleme ist und es häufig durch Kontamination zu falsch positiven oder negativen Resultaten kommt (Adams und Thompson 2011, OIE 2017). Auch die Interpretation der Ergebnisse ist oftmals schwierig (OIE 2017). Mittels konventioneller PCR kann nur eine qualitative Aussage bezüglich der Ergebnisse getroffen werden – das gesuchte PCR Produkt ist detektierbar oder nicht detektierbar (Garibyan und Avashia 2013, ILV o. J.). Somit kann diese Methode nur dazu verwendet werden ein bestimmtes Pathogen zu identifizieren (Garibyan und Avashia 2013). Eine Möglichkeit zur Analyse der Morphologie von Viren ist die Elektronenmikroskopie (Laue 2010). Diese wird besonders eingesetzt um die Identität und Struktur neuer unbekannter Viren zu bestimmen, aber auch für die Detektion bereits bekannter Viren (Ananda Raja und Jithendran 2015). Der größte Nachteil von Elektronenmikroskopie ist, dass diese Methode sehr kostenintensiv ist (Choudhary und Malik 2017, Curry 2003). Jede einzelne Probe muss einzeln untersucht und vorbereitet werden und die Verwendbarkeit der Ergebnisse ist stark von der Erfahrung des Mikroskopierers abhängig (Curry 2003). Aus diesen Gründen ist die Elektronenmikroskopie nicht für die Routine Diagnostik geeignet (Roberts 2012).

## 2 Die Bedeutung von Herpes-, Irido-, Adeno- und Poxviren bei Zierfischen

### 2.1 Herpesviren von Cypriniden und anderen Zierfischen

Das Genus *Herpesvirus* wurde 1971 vom Internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) eingeführt (Wildy 1971). Dieses wurde 1979 zu *Herpesviridae* umbenannt und in drei Unterfamilien geteilt: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae* sowie einige unbenannte Genera die sich nicht einteilen ließen (Fenner 1976). Bis 2009 wurde die Ordnung *Herpesvirales* eingeführt. Diese enthält nun die Familie *Herpesviridae*, mit den Unterfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae*, die Familie *Alloherpesviridae* und die Familie der *Malacoherpesviridae*. Innerhalb der *Alloherpesviridae* findet man Fisch- und Amphibienviren und innerhalb der *Malacoherpesviridae* Viren die Wirbellose betreffen. Säugetierviren finden sich in allen Unterfamilien der *Herpesviridae* (Davison et al. 2009). Für Herpesviren gibt es ein Benennungssystem, das vorschreibt, dass jedes Herpesvirus nach dem Taxon (entweder Familie oder Unterfamilie) des ersten natürlichen Wirts, bei dem das Virus aufgetreten ist, benannt werden soll (Davison 2010).

Die Familie der *Alloherpesviridae* enthält vier Genera welche bei den für die Aquakultur wichtigen Arten Karpfen (*Cyprinus carpio*), verschiedenen Salmoniden, Welsen, Aalen, Stören sowie Austern eine Rolle spielen (van Beurden und Engelsma 2012). Das für diese Arbeit wichtigste Genus ist das *Cyprinivirus*. Es enthält die Herpesviren der Cypriniden (Familie *Cyprinidae*), auch bekannt als Karpfenartige und ein Herpesvirus, das Europäische Aale als Wirt infiziert. 2011 wurden von der ICTV folgende Spezies in diesen Genus aufgenommen: *Cyprinides Herpesvirus 1*, *Cyprinides Herpesvirus 2*, *Cyprinides Herpesvirus 3* und *Anguillides Herpesvirus 1* (Dospoly et al. 2015, Pellet et al. 2011, Waltzek et al. 2005). Dospoly et al. (2015) beschreiben ein weiteres Herpesvirus beim Sichling (*Pelecus cultratus*), dessen eindeutige Charakterisierung noch ausständig ist. Im Folgenden soll auf die, für Österreich, relevanten Cypriniviren eingegangen werden.

#### 2.1.1 Koi Herpes Virus (KHV)

Das *Cyprinide Herpesvirus 3* (CyHV-3), auch bekannt als KHV ist ein Virus, das vor allem bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) einschließlich seiner bunten Zuchtform, dem Koi, eine große Bedeutung besitzt. Die ersten Berichte über eine Krankheit, die Massensterben bei Karpfen und Kois verursacht, stammen aus dem Jahr 1997 aus Deutschland (Bretzinger et al. 1999) und den USA (Hedrick et al. 2000) und 1998 aus Israel (Ariav et al. 1999). Aufgrund von elektronenmikroskopischer Untersuchung epithelialer Zellen des Respirationstrakts und

zerstörter Kiemenlamellen betroffener Fische ging man von einem Herpesvirus als ätiologisches Agens aus (Bretzinger et al. 1999). Durch unkontrollierten Fischverkehr breitete sich die Krankheit innerhalb kürzester Zeit rasant aus. So waren bis Ende des Jahres 2000 circa 90% aller israelischen Aquakulturen mit dem neuen Erreger infiziert (Perelberg et al. 2003). Die Erstisolation von KHV erfolgte 1997 durch Hedrick. Es wurden etliche Gewebeproben, inklusive Kiemen, Leber, Niere, Milz und Darm, von Fischen mit typischen Symptomen untersucht (Hedrick et al. 2005). Auch nach der Identifizierung verbreitete sich das Virus durch intensive Aquakultur, Koi Ausstellungen sowie regionalen und internationalen Handel in weiten Teilen der Welt (Gilad et al. 2003). KHV wurde bisher in 28 Ländern nachgewiesen und man geht davon aus, dass viele weitere betroffen sind und das Virus nur noch nicht identifiziert wurde (OIE 2017). Aufgrund der hohen Bedrohung für die Aquakultur von Karpfen ist KHV derzeit im Anhang 1 der Aquakultur-Seuchenverordnung (BGBl.II Nr. 315/2009) als anzeigepflichtige Seuche gelistet.

Auch bei Karpfen-Hybriden konnten in Versuchen Mortalitäten aufgrund einer Infektion mit CyHV-3 nachgewiesen werden (Hedrick et al. 2006). Darüber hinaus wurde das Virus bei Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*) sowie in Goldfischen (*Carassius auratus*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) und Schleien (*Tinca tinca*) nachgewiesen. Bei diesen Arten kam es jedoch zu keiner Erkrankung (Bergmann et al. 2010). Dabei konnte die Übertragung von infektiösem Virus vom Goldfisch (*Carassius auratus*) auf Karpfen gezeigt werden (Bergmann et al. 2010).

Die Übertragung von KHV erfolgt horizontal. Eine vertikale Übertragung über Eier wurde bisher nicht nachgewiesen. Die horizontale Übertragung kann entweder direkt von Fisch zu Fisch oder indirekt über Vektoren stattfinden. Wasser ist hierbei der wichtigste Vektor (OIE 2017). Es wurde nachgewiesen, dass das Virus bei 23-25° mindestens 4 Stunden im Wasser infektiös bleibt (Perelberg et al. 2003). Die Dauer der Infektiosität im Wasser hängt neben der Temperatur auch von anderen Faktoren wie dem jeweiligen Mikrobiom oder der Besiedelung mit anderen aquatischen Tieren ab und wurde mit bis zu vier Monaten beschrieben (Haramoto et al. 2007). Die für KHV wichtigste Eintrittspforte in den Wirt ist die Haut (Costes et al. 2009). Virus-DNA wurde in hohen Konzentrationen auch in den Kiemen, den Nieren, der Milz, der Schleimhaut, der Leber und dem Darm gefunden (Gilad et al. 2004). Ausgeschieden wird das Virus unter anderem über Urin und Faeces (Dishon et al. 2005).

Das klinische Auftreten von KHV ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Einer der wichtigsten Einflüsse ist die Temperatur. Die meisten Ausbrüche im Feld fanden im Frühling

bei 18-25 °C statt (Adamek et al. 2014). In experimentellen Studien wurde bewiesen, dass es zu keiner Mortalität bei Infektionen unter 13 °C und über 30 °C kommt (Bretzinger et al. 1999, Gilad et al. 2003). Auch bei der Replikation von KHV in Koi-Flossen-1-Zelllinien (KF-1) konnte ein optimales Wachstum des Virus zwischen 15 °C und 25 °C festgestellt werden. Hingegen wurde keine Virusvermehrung unter 10 °C und über 30 °C festgestellt (Gilad et al. 2003). Bei mehreren Studien wurde jedoch gezeigt, dass Karpfen sich bei niedrigen Temperaturen (unter 13 °C) sehr wohl infizieren können, ohne jedoch klinische Symptome zu zeigen. Erhöhte man in der Folge die Wassertemperatur machten die vormals scheinbar gesunden Tiere eine klinische Infektion mit KHV durch (Bretzinger et al. 1999, Gilad et al. 2003). Dies führte zu der Annahme, dass das Virus in Fischen persistiert und im Frühling, wenn die Temperaturen wieder steigen, reaktiviert wird und zu einem Ausbruch der Krankheit führt (Gilad et al. 2003). Fische, die eine Infektion bei niedriger Temperatur überleben, können also als Reservoir für das Virus dienen (Gilad et al. 2004). Das Auftreten solcher unauffälliger Carrier spielt eine wesentliche Rolle in der Verbreitung der Krankheit.

Zu den klinischen Symptomen zählen Lethargie, erhöhte Atemfrequenz, Anorexie oder Enophthalmus (Ariav et al. 1999, Bretzinger et al. 1999, Hedrick et al. 2000, Perelberg et al. 2003).

### **2.1.2 Haematopoetische Nekrose der Goldfische**

Die Hämatopoetische Nekrose der Goldfische wird verursacht durch das Cyprinide Herpesvirus 2 (CyHV-2). Von dieser Erkrankung betroffene Spezies, aus dem Genus *Carassius*, sind *C. auratus* und der Giebel (*Carassius gibelio*) (Daněk et al. 2012, Doszpoly et al. 2011, Jung und Miyazaki 1995). Der erste Bericht über diese Erkrankung stammt aus den Jahren 1992 und 1993 in Japan (Jung und Miyazaki 1995). Die Autoren berichteten von Krankheitsausbrüchen im Herbst und Frühling, als die Wassertemperaturen sich zwischen 15-25 °C befanden. Die Mortalität erreichte bis zu 100 % in betroffenen Populationen (Jung und Miyazaki 1995).

Klinisch zeigen infizierte Tiere Symptome wie blasse Kiemen, eine erhöhte Respirationsrate und Aszites. Man beobachtet häufig, dass betroffene Goldfische apathisch sind und sich bevorzugt am Boden aufhalten. Histologisch zeigte sich primär das hämatopoetische Gewebe von Leber und Niere betroffen. Es kommt aber auch zu Nekrose in Darm und Pankreas (Giovannini et al. 2016, Goodwin et al. 2006, Hedrick et al. 2006, Jung und Miyazaki 1995).

Mittlerweile gibt es publizierte Berichte zum Auftreten der Erkrankung aus der USA (Groff et al. 1998), Australien (Stephens et al. 2004) und Taiwan (Chang et al. 1999). In Europa ist diese Erkrankung bisher unter anderem in England (Philbey 2006), in Italien (Fichi et al. 2013) und in der Schweiz (Giovannini et al. 2016) beschrieben worden. Bei *C. gibelio* ist diese Erkrankung bisher in Tschechien (Daněk et al. 2012) und Ungarn (Dospoly et al. 2011) aufgetreten. Da diesem Pathogen bisher nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde und es in Zellkulturen sehr schwer anzuzüchten ist, ist die tatsächliche Verbreitung nicht bekannt. Durch den internationalen Handel mit Goldfischen kann man annehmen, dass weltweit Goldfisch-Populationen betroffen sind (Goodwin et al. 2006).

### 2.1.3 Karpfenpocken

Das Cyprinide Herpesvirus 1 (CyHV-1) verursacht eine Krankheit welche umgangssprachlich auch als Karpfenpocken oder Fischpocken bezeichnet wird. Es ist das am längsten bekannte virale Fischpathogen und wurde bereits im Mittelalter beschrieben (Calle et al. 1999). Die Infektion äußert sich in einer Hyperplasie der epidermalen Epithelzellen. Betroffen sind primär Cypriniden, hierbei vor allem Karpfen oder Koi. Es wurde aber zum Beispiel auch ein Ausbruch in Populationen von Orfen (*Leuciscus idus*) beschrieben (McAllister et al. 1985). Karpfenpocken sind weltweit verbreitet (McAllister et al. 1985).

Die hyperplastischen Veränderungen zeigen sich als milchig-weiße bis graue proliferative Hautläsionen, die sich von der normalen Haut ein bis mehrere Millimeter abheben (McAllister et al. 1985). Die Veränderungen sind benigne und zeigen sich vor allem an den Brustflossen und an der Schwanzflosse sowie am Körperstamm und an den Lippen (McAllister et al. 1985, Sano et al. 1991). Am häufigsten treten Karpfenpocken auf, wenn die Wassertemperaturen im Herbst und Winter fallen. Es wurde beobachtet, dass die Hautveränderungen mit steigenden Temperaturen wieder heilen und auch spontan verschwinden (Hedrick, Groff, Okihiro et al. 1990). In jungen Karpfen verläuft die Tumorprogression weitaus schneller als in älteren Tieren.

In einem Versuch von Sano et al. (1991) wurde Mortalität und die Auswirkung von CyHV 1 auf unterschiedlich alte Brut verschiedener Fischarten untersucht. Es wurde festgestellt, dass jüngere Fischbrut bei einer Infektion mit diesem Virus eine höhere Mortalität aufweist als ältere. Bis zu 60,8% der überlebenden Jungfische zeigen nach 6 Monaten Neoplasien an den Flossen, dem Körper und den Lippen. Zusätzlich zu den Läsionen zeigen infizierte Fische Symptome wie reduzierte Bewegungslust, das Aufhalten am Boden und Appetitlosigkeit. Histologische Untersuchungen dieser Fische über den gesamten Zeitraum des Versuchs von

Sano et al. (1991) zeigen eine ausgedehnte Nekrose im Leberparenchym, in den Nieren, und in der Lamina propria der intestinalen Mukosa. Auch fand man Cowdry-Körperchen vom Typ A in Zellkernen von Hepatozyten im nekrotischen Bereich und teilweise in den Zellkernen von neoplastischen Zellen der papillomatösen Veränderungen (Sano et al. 1991). Diese sind eosinophile Einschlusskörperchen, die man unter anderem bei Herpesvirus Infektionen antrifft.

## 2.2 Iridoviren

Die Familie der Iridoviridae enthält die Genera *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalozytivirus* (Fauquet et al. 2005). Die Gattung Chloriridovirus ist für diese Arbeit nicht relevant, weswegen auf diese nicht eingegangen wird.

### 2.2.1 Megalozytivirus

Megalozytiviren sind bedeutende Pathogene für Zier-, Wild- und Nutzfische im Süß- und Salzwasser. Innerhalb dieses Genus unterscheidet man 4 Spezies: erstens das RSIV, zweitens das Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), welches die 2 Genotypen ISKNV und Banggai cardinalfish iridovirus (BCIV) sowie marbled sleepy goby iridovirus (MSGIV) enthält, drittens das turbot reddish body iridovirus (TRBIV) und viertens das threespine stickleback iridovirus (TSIV) (Kurita und Nakajima 2012, Sriwanayos et al. 2013, Waltzek et al. 2012). Die erwähnten Viren zeigen eine signifikante Homologie von mindestens 97% Übereinstimmung der Aminosäuren für das major capsid protein (Hick et al. 2016). Innerhalb dieser Arbeit wird das ISKNV besprochen, da dieses besonders Süßwasserfische betrifft.

ISKNV wurde bei verschiedensten Fischarten in Salz-, Süß- und Brackwasser nachgewiesen (Jung-Schroers et al. 2016). Zu den empfänglichen Süßwasserfischen zählen unter anderem Zebrafische (*Danio rerio*) (Bermúdez et al. 2018), verschiedene Gourami-Spezies (*Trichogaster species pluralis* spp. und *Colisa* spp.) (Jeong et al. 2008), Skalare (*Pterophyllum* spp.) (Jung-Schroers et al. 2016), Schwertträger (*Xyphophorus hellerii*) (Paperna et al. 2001), Platy (*Xyphophorus maculatus*) (Paperna et al. 2001), Mandarinfisch (*Siniperca chuatsi*) (He et al. 2002) und Murray-Dorsch (*Maccullochella peelii*) (Go und Whittington 2006). Die Infektion mit ISKNV erfolgt horizontal über Wasser und Futter (He et al. 2002, Jung-Schroers et al. 2016). Klinische Symptome und Mortalität treten bei dieser Erkrankung bei Temperaturen ab 20° C auf. Bei tieferen Wassertemperaturen werden klinische Anzeichen unterdrückt. Man geht jedoch davon aus, dass infizierte Tiere bei Temperaturen unter 20° C als Carrier fungieren (He et al. 2002). Klinische Symptome reichen von Lethargie, Depression, nicht

Reagieren auf Wasserturbulenzen, Aufhalten an der Seite und am Boden, blasse Pigmentation des Körpers, blasse Kiemen, Appetitlosigkeit bis zu petechialen Hämorrhagien am Kiemendeckel, unter dem Kiefer, Augen, Basis der dorsalen und ventralen Flossen, sowie kaudaler Flosse und Bauch (Go und Whittington 2006, He et al. 2000, He et al. 2002, Jung-Schroers et al. 2016). Typische pathologische Läsionen sind eine geschwollene und braun verfärbte Niere, geschwollene Milz, blasse und vergrößerte Leber mit petechialen Hämorrhagien und eine blasse Verfärbung des Herzens. Histologisch findet man vor allem in der Milz und den Nieren hypertrophe Zellen mit basophilen Einschlüssen. Betroffene Zellen zeigten außerdem eine Pyknose des Zellkerns und ein basophiles granuliertes Zytoplasma (Go und Whittington 2006, He et al. 2000, He et al. 2002, Jung-Schroers et al. 2016).

### 2.2.2 Ranavirus

Ranaviren verursachen systemische Krankheiten von Fischen, Amphibien und Reptilien. Das Genus umfasst derzeit die sechs Spezies *Ambystoma tigrinum virus*, Bohle iridovirus, Frog virus 3 (Viren von Amphibien und Reptilien), Epizootic haematopoietic necrosis virus (Epizootisches Hämatopoetisches Nekrose Virus, EHNV) sowie das genetisch nahe verwandte European catfish virus (ECV) und die Spezies Singapore grouper iridovirus (SGIV) und Santee-Cooper ranavirus (Fauquet et al. 2005).

Die Epizootische hämatopoetische Nekrose (EHN) wird durch das EHNV verursacht. Der erste Bericht über EHN betraf Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) und stammt aus Australien im Jahre 1984 (Langdon et al. 1986). Sowohl die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) als auch der Flussbarsch sind Beispiele für EHNV empfängliche Arten, die in europäischen Gewässern vorkommen. Auch einige Arten, die in Europa gerne als Zierfische gehalten werden, sind empfänglich für EHN. Dazu gehört zum Beispiel der Rotgesprenkelte Regenbogenfisch (*Melanotaenia fluviatilis*), der Moskitofisch (*Gambusia affinis*) oder der Östliche Moskitofisch (*Gambusia holbrooki*) (OIE 2017). Trotzdem ist der Nachweis einer Infektion mit EHNV bisher auf Australien beschränkt geblieben und es gibt bis dato keine Informationen über Erkrankungen von Fischen in Europa (OIE 2017). Die Übertragung geschieht horizontal über Wasser oder die Aufnahme von Gewebe infizierter Fische (Jensen et al. 2011, Langdon et al. 1988, Langdon 1989, Whittington et al. 2010). Als klinische Anzeichen wurden bei Langdon et al. (1988) eine reduzierte Futteraufnahme, dunkle Verfärbung der Haut und Ataxie beschrieben. Pathologisch sind vor allem geschwollene und vorgewölbte Nieren, und eine blasse, geschwollene Milz auffällig. Pathohistologisch findet man fokale Nekrosen in der Leber, vor allem auf oder in der Umgebung von Leberarterien oder -venen. In der Milz findet

man diffuse nekrotische Veränderungen in der roten und weißen Pulpa. Im hämatopoetischen Gewebe der Nieren findet man auch diffuse Nekrosen (Langdon et al. 1988).

### 2.2.3 Lymphocystivirus

Zur Unterfamilie *Lymphocystivirus* gehört die Spezies Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1) und die vorläufigen Spezies Lymphocystis disease virus 2 (LCDV-2), LCDV-C und das LCDV-RF (Borrego et al. 2017, Fauquet et al. 2005).

Das Lymphocystis Disease Virus (LDV) verursacht eine bei zahlreichen Süß- und Salzwasserfischen weltweit vorkommende Erkrankung (Whittington et al. 2010). In Europa sind vor allem die Nordsee und die mediterranen Zonen betroffen (Borrego et al. 2017). Bekannte Zierfischarten bei denen eine Infektion mit LDV bekannt ist sind zum Beispiel der Paradiesfisch (*Macropodus opercularis*) (Xu et al. 2014), *Chanda baculis*, der gepunktete Fadenfisch (*Trichogaster trichopterus*) oder der Mosaikgourami (*Trichogaster leeri*) (Hossain et al. 2008). Man geht momentan davon aus, dass die Infektion mit LDV horizontal, über die Haut oder die Kiemen durch direkten Kontakt oder Kontakt durch Wasser, geschieht (Borrego et al. 2017, Bowser et al. 1988, Kvitt et al. 2008). Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt ob LDV außerhalb der Wirtszelle überleben kann (Kvitt et al. 2008). Jedoch geht man davon aus, dass klinisch gesunde Fische, die eine Infektion mit typischen Läsionen durchgemacht haben, als Carrier für gesunde Individuen fungieren, nachdem die Läsionen abgeheilt sind (Kvitt et al. 2008). Die Autoren Hossain et al. (2009) beschreiben in einer experimentellen Infektion von Olivenflundern (*Paralichthys olivaceus*) eine temperaturabhängige systemische Ausbreitung der Erkrankung. Klinische Symptome wurden bei in 20°C, aber nicht in 10 oder in 30°C, gehaltenen Fischen beobachtet. Infizierte Fische zeigen graue, weiße oder auch pinke noduläre Läsionen, die sich über den gesamten Körper ausbreiten können (Paperna et al. 1982, Xing et al. 2006). Es kann jedoch zu ähnlichen Veränderungen auf dem Mesenterium, Peritoneum und inneren Organen kommen (Hossain et al. 2008, Xing et al. 2006). Die Autoren Iwamoto et al. (2002) beschreiben außerdem Anämie und eine geringe Wachstumsrate. Pathohistologisch erkennt man Fibroblasten-ähnliche Zellen, die vergrößert sind und zytoplasmatische Einschlusskörperchen beinhalten. Klinisch gesunde Fische dienen als Carrier (Cano et al. 2006). Die Mortalität bei LD ist sehr gering und beschränkt sich auf Individuen deren Fähigkeit, zu schwimmen, atmen oder fressen, durch große Umfangsvermehrungen eingeschränkt ist (Colorni und Padrós 2011).

### 2.3 Adenoviren

Die Familie der *Adenoviridae* unterteilt sich in die Unterfamilien *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* und *Siadenovirus* (Fauquet et al. 2005).

Infektionen mit Adenoviren bei Fischen sind sehr selten und es gibt nur wenige Publikationen über Erkrankungen, die auf diese Virusfamilie zurückzuführen ist (Nagy 2016). Eine der wenigen bekannten Erkrankungen ist die White sturgeon Disease. Diese wurde 1985 erstmals bei juvenilen weißen Stören (*Acipenser transmontanus*) beschrieben (Hedrick et al. 1985). Die Autoren Hedrick et al. (1985) beschreiben einen chronischen Charakter der Erkrankung. Betroffene Fische zeigen Abmagerung und Apathie bis hin zum Tod (Hedrick et al. 1985, Hedrick, Groff, McDowell et al. 1990, Nagy 2016). Histopathologische Veränderungen betrafen vor allem den Zellkern epithelialer Zellen des Verdauungstraktes. Dieser stellte sich hypertroph dar und enthielt im Elektronenmikroskop nachweisbare Viruspartikel. Man geht davon aus, dass die Aufnahme von Nährstoffen durch die Veränderungen im Darm nicht mehr ausreichend funktioniert, wodurch es zu der Abmagerung und darauf folgend zum Tod kommt (Hedrick et al. 1985). Weitere mit Adenoviren assoziierte Erkrankungen sind die Lymphatische Leukämie der Japanischen Seebrasse (*Pagrus major*) und die epidermale Hyperplasie von Kabeljau (*Gadus morhua*) und der Eisflunder (*Limanda limanda*) (Bloch et al. 1986, Miyazaki et al. 2000).

### 2.4 Poxviren

Die Familie der *Poxviridae* teilt sich in die Unterfamilien *Chordopoxvirinae* und *Entomopoxvirinae*. Zu ersterer gehören die Genera *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, und *Yatapoxvirus*. Zu der Unterfamilie der *Entomopoxvirinae* gehören 3 Genera: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* und *Gammaentomopoxvirus* (Fauquet et al. 2005).

Für Fische relevant ist das Salmon Gill Pox Virus (SGPV), welches die Salmon Gill Poxvirus Erkrankung (SGPVD) verursacht und das Carp Edema beziehungsweise Koi Sleepy Disease Virus (CEV/KSDV), welches die Ödemkrankheit beziehungsweise die Schlafkrankheit der Karpfen und Koi verursacht. Das SGPV ist das einzige Fisch-Poxvirus dessen Genom charakterisiert und dessen Ergebnisse publiziert wurden. Es gehört zu den *Chordopoxvirinae* (Gjessing et al. 2015, Gjessing et al. 2016). Kein Fisch-Poxvirus wurde jedoch bisher auf Zellkulturen angezüchtet und isoliert. Gemein haben die Poxviren der Fische eine Affinität zu den Kiemen und die Schädigung der Kiemenfunktion (Gjessing et al. 2016).

Innerhalb dieser Arbeit werden das CEV/KSDV und das SGPV besprochen.

#### **2.4.1 Carp Edema Virus und Koi Sleepy Disease Virus**

Hohe Mortalitäten von juvenilen Koi aufgrund von CEVD/KSD wurde erstmals 1974 in Japan beobachtet (Murakami et al. 1976, Ono et al. 1986). Mittlerweile gibt es Publikationen über den Ausbruch dieser Erkrankung in vielen Ländern. In Europa wurde dieses Poxvirus unter anderem in Deutschland, Österreich, England, Frankreich, Italien oder Polen entdeckt (Jung-Schroers et al. 2015, Lewisch et al. 2015, Sivasankar 2017). Betroffen sind sowohl Karpfen als auch ihre Zierform Koi (Lewisch et al. 2015). Man unterscheidet zwei klinische Manifestationen: die Ödemkrankheit und die Schlafkrankheit (Gjessing et al. 2016). Diese Erkrankungen treten vor allem im Frühling und Winter auf, wenn die Wassertemperatur sich zwischen 15 °C und 25 °C befindet (Miyazaki et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigten die CEV/KSDV positiven Fälle in Österreich klinische Symptome bereits zwischen 7 °C und 15 °C (Lewisch et al. 2015). Infizierte Fische zeigen vor allem Schwellung des Körpers durch Ödeme, bewegungsloses Liegen am Grund des Teiches, Apathie und Atemstörungen. Histopathologisch fällt besonders apikal eine keulenförmige Verdickung der Kiemenlamellen, mit sekundärer Fusion und Adhäsion, auf. Zusätzlich findet man eine Infiltration mit Entzündungszellen (Gjessing et al. 2016, Lewisch et al. 2015, Miyazaki et al. 2005, Ono et al. 1986). Eine horizontale Übertragung über Wasser ist bekannt (Adamek et al. 2017, Oyamatsu et al. 1997). Man geht davon aus, dass klinisch gesund erscheinende Fische als Carrier dienen (Lewisch et al. 2015). Der Nachweis eines Poxvirus als ursächliches Agens erfolgt durch die Amplifikation eines DNA Fragments, welches das Kernprotein P4a codiert. Alle Kultivierungsversuche des Virus sind bisher fehlgeschlagen und es sind bisher nur Sequenzen des Kernproteins P4a publiziert worden (Matras et al. 2017).

#### **2.4.2 Salmon Gill Pox Virus**

Erste Berichte über eine neue Erkrankung in norwegischen Lachsfarmen stammen aus den 1990ern (Gjessing et al. 2015, Gjessing et al. 2017). Die Autoren Nylund et al. (2008) beschrieben diese Krankheit als SGPVD. Eine Erkrankung, durch dieses Virus verursacht, ist bisher nur bei Wildlachs, Lachs aus Aquakulturen und Forellen bekannt (Garseth et al. 2018, Gjessing et al. 2016). Man geht momentan davon aus, dass eine Übertragung des Virus horizontal über die Umwelt geschieht. Eine vertikale Transmission kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Garseth et al. 2018). Die Autoren Gjessing et al. (2016) beschreiben Atemstörungen und Aneinanderdrängen am Boden als klinische Symptome. Mortalitätsraten

von bis zu 70% sind beschrieben (Gjessing et al. 2016). Pathoanatomisch findet man häufig blasse Kiemen und innere Organe (Gjessing et al. 2016). Die Milz erscheint vergrößert. Die Zielzellen von SGPVD sind epitheliale Kiemenzellen der sekundären Kiemenlamellen. Typische Läsionen, die man histologisch findet, sind Hypertrophie und ein degenerierter Zellkern. Mittels Elektronenmikroskop lassen sich perinukleäre Myelinfiguren darstellen (Nylund et al. 2008).

## **2.5 Fragestellung**

Die Entwicklung neuer, leistungsfähiger Diagnostikmethoden ist ein grundlegendes Problem in der veterinärmedizinischen Forschung und der Tiergesundheit (Belák 2007). Viele Viren sind schwer bis gar nicht zu kultivieren oder sind nicht mit einer für den Menschen bedeutungsvollen Krankheit assoziiert, sodass eine Charakterisierung unterbleibt. Auch bei kultivierbaren Viren fehlen häufig diagnostische Antikörper oder PCR Tests (Hanson et al. 2006). Die Limitation der Diagnostik bei Zierfischen wurde bereits in Kapitel „1.2. Schwierigkeiten in der Diagnostik viraler Erkrankungen von Zierfischen“ dargelegt.

Hanson et al. (2006) entwickelten eine PCR, um große DNA-Viren und Adenoviren verschiedener Spezies nachzuweisen. Diese basiert auf einem Abgleich bekannter konservierter Regionen des DNA Polymerase Gens der betreffenden Virusgruppen. Anhand dieser wurden bestimmte Primersets entwickelt. Verwendet wurde ein einziger reverse-Primer, da sich alle untersuchten Virusgruppen eine Sequenz teilen, an die dieser binden kann. Upstream dieser Region wurden drei verschiedene Sequenzen gefunden. Eine davon repräsentativ für Adenoviren, die andere repräsentativ für Herpes-, und Iridoviren und die Dritte für Poxviren. Daher wurden drei forward-Primer entwickelt, welche zum allgemeinen reverse-Primer passen. Da sich die Sequenzen, an die die Primer binden, in verschiedenen Regionen befinden, erhält man je nach Virusgruppe Amplifikate unterschiedlicher Länge, wodurch zwischen den Viren unterschieden werden kann (Hanson et al. 2006).

Innerhalb dieser Arbeit wird diese PCR Methode bei Süßwasser-Zierfischen als Ausgangsmaterial angewendet. Es soll untersucht werden, ob diese Methode bei Zierfischen angewendet werden kann und ob sie eine schnelle und unkomplizierte Methode darstellt, um in der Routinediagnostik verwendet zu werden. Auch soll untersucht werden inwieweit das Protokoll der Autoren Hanson et al. (2006) zur Diagnostik unbekannter Viren angewendet werden kann.

### 3 Tiere, Material und Methodik

#### 3.1 Zoofachhandlungen und Tiermaterial

##### 3.1.1 Zoofachhandlungen

Im Vorfeld der Untersuchungen wurden neun Zoofachhandlungen kontaktiert, das Projekt vorgestellt und die Möglichkeit einer Mitwirkung abgeklärt. Es nahmen sechs Betriebe an der Untersuchung teil. Diese befinden sich alle in Wien, Österreich in unterschiedlichen Bezirken. Die MitarbeiterInnen wurden in der Sammlung der Proben und Daten unterwiesen und führten diese dann selbstständig durch. Dazu gehörten das Entnehmen, Verpacken und Lagern der verwendeten Fische sowie das Ausfüllen der dafür entworfenen Datenblätter. Die Vorstellung der Ergebnisse erfolgt anonymisiert.

##### 3.1.2 Tiermaterial

Die verwendeten Zierfische wurden nach maximal 12 Stunden entnommen, in vorbereitete Einwegbehältnisse (Tiefkühlbeutel) verpackt und in Tiefkühlern des jeweiligen Betriebs bei -20 °C tiefgefroren. Mehrere Fische einer Art aus dem gleichen Becken und dem gleichen Todestag wurden gemeinsam verpackt, ansonsten erfolgte die Aufbewahrung einzeln. Anschließend wurden die Proben ohne Unterbrechung der Kühlkette in Styroporboxen mit Kühlakkus auf die Klinik verbracht, um sie dort bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C zu lagern.

Insgesamt wurden 29 der gesammelten Zierfische anhand ihres Erhaltungszustandes ausgewählt und verwendet (siehe Tabelle 1).

Zusätzlich wurden noch 37 Proben aus vorangegangenen Projekten der Abteilung für Fischmedizin herangezogen und verwendet (siehe Tabelle 2).

**Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Proben aus Zoofachgeschäften**

<b>Probennummer</b>	<b>Deutsche Artbezeichnung</b>	<b>Lateinische Artbezeichnung</b>	<b>Symptome und sonstiges</b>
FMR 17-060	Fadenfisch	<i>Trichopodus leeri</i>	
FMR 17-061	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	20 Stück verwendet

FMR 17-063	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	20 Stück verendet
FMR 17-064	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	22 Stück verendet; mit Erlenzapfen und Herbatana behandelt
FMR 17-065	Nicaragua Buntbarsch	<i>Vieja nickeraguensis</i>	Stress durch Brutpflege
FMR 17-066	Engel-Antennenwels	<i>Pimelodus victus</i>	Aufgetriebener Bauch; mit eSHa EXIT™ (keine Angabe von Inhaltsstoffen in der Packungsbeilage) und Temperaturerhöhung behandelt
FMR 17-067	Gelber Antennenwels	<i>Ancistrus species</i> (sp.) L-144	Aufgetriebener Bauch
FMR 17-068	Panzerwels	<i>Corydoras</i>	
FMR 17-069	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Mehrere Tiere verendet; mit Aufsalzen, Herbatana (Inhaltsstoffe laut Packungsbeilage „firmeneigen“) und Seemandelbaumblättern behandelt
FMR 17-070	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	
FMR 17-071	Zwergrasbora	<i>Microdevario kubotai</i>	Aufgetriebener Bauch; mit Aufsalzen und Herbatana behandelt
FMR 17-072	Roter Neon	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	

FMR 17-073	Schwarzflossen-Panzerwels	<i>Corydoras leucomelas</i>	Mit Aufsalzen, täglich 20 % Wasserwechsel und Herbatana behandelt
FMR 17-074	Buntbarsch	<i>Cichlid</i>	
FMR 17-075	Pastellgrundel	<i>Tateurndina ocellicauda</i>	Mit aufsalzen, täglich 20 % Wasserwechsel und Herbatana behandelt
FMR 17-077	Schwarzflossen-Panzerwels	<i>Corydoras leucomelas</i>	Mit aufsalzen, täglich 20 % Wasserwechsel und Herbatana behandelt
FMR 17-093	Zwergpanzerwels	<i>Corydoras pygmaeus</i>	
FMR 17-100	Gelber Antennenwels	<i>Ancistrus sp. L-144</i>	
FMR 17-111	Hexenwels	<i>Rineloricaria fallax</i>	
FMR 17-129	Metallpanzerwels	<i>Corydoras aeneus</i>	
FMR 17-131	Juli-Panzerwels	<i>Corydoras julii</i>	
FMR 17-133	Juli-Panzerwels	<i>Corydoras julii</i>	
FMR 17-134	Metallpanzerwels	<i>Corydoras aeneus</i>	Milchige Hautoberfläche
FMR 17-135	Metallpanzerwels	<i>Corydoras aeneus</i>	Milchige Hautoberfläche
FMR 17-136	Metallpanzerwels	<i>Corydoras aeneus</i>	Milchige Hautoberfläche
FMR 17-138	Zwergpanzerwels	<i>Corydoras pygmaeus</i>	
FMR 17-152	Ohrgitterharnischwels	<i>Otocinclus affinis</i>	
FMR 17-156	Panda-Panzerwels	<i>Corydoras panda</i>	
FMR 17-157	Störwels	<i>Sturisoma aureum</i>	

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Proben aus vorangegangenen Projekten der Abteilung für Fischmedizin

Probennummer	Deutsche Artbezeichnung	Lateinische Artbezeichnung
1-001	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-002	Koi	<i>Cyprinus carpio</i>
1-003	Koi	<i>Cyprinus carpio</i>
1-004	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-005	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-006	Koi	<i>Cyprinus carpio</i>
1-007	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>
1-008	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>
1-009	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>
1-010	Regenbogenforelle	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
1-011	Regenbogenforelle	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
1-012	Koi	<i>Cyprinus carpio</i>
1-013	Skalar	<i>Pterophyllum scalare</i>
1-014	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-015	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-016	Lifalllis Buntbarsch	<i>Hemichromis lifalilli</i>

1-017	Lifalilis Buntbarsch	<i>Hemichromis lifalilli</i>
1-018	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-019	Danakilia	<i>Danakilia</i>
1-020	Saibling	<i>Salvelinus</i>
1-021	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-022	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-023	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-024	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-025	Blauer Doktorfisch	<i>Acanthurus coeruleus</i>
1-026	Gelber Labidochromis	<i>Labidochromis caeruleus</i>
1-027	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-028	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-029	Goldfisch	<i>Carassius gibelio forma auratus</i>
1-030	Skalar	<i>Pterophyllum scalare</i>
1-031	Koi	<i>Cyprinus carpio</i>
1-032	Diskus	<i>Symphysodon</i>
1-033	Bachforelle	<i>Salmo trutta fario</i>
1-034	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>
1-035	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>
1-036	Zebrabärbling	<i>Danio rerio</i>

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Sektion**

Die gesammelten Proben wurden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und einzeln auf sterile Sektionsplatten verbracht. Um eine Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden, wurde bei der Sektion jedes einzelnen Fisches mit sterilem Einmalbesteck gearbeitet.

Die Proben wurden je nach Größe unterschiedlich aufbereitet. Bei Tieren unter 4 cm wurde der ganze Fisch, ausgenommen Schwanz und *Mandibula*, mit Skalpellklingen in einer Petrischale zerkleinert. Bei größeren Exemplaren ab 4 cm wurden die Organe (Milz, Leber, Niere, Kiemen, Gehirn) einzeln entnommen und danach zerkleinert. Etwa 50 mg Probematerial wurde in zwei ml Eppendorf Tubes verbracht und bis zur weiteren Verwendung wieder bei -20 °C tiefgekühlt.

### **3.2.2 DNA-Extraktion**

Die Organe wurden mittels Tissuelyser (TissueLyser II, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) homogenisiert und die DNA mit Hilfe eines DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstelleranweisungen mit leichter Modifikation extrahiert. Zu jeder Extraktion wurden Negativkontrollen angesetzt.

### **3.2.3 PCR**

Die PCR wurde nach dem Protokoll von Hanson et al. (2006) durchgeführt.

#### **3.2.3.1 Primer**

Es wurden drei verschiedene Vorwärtsprimer für jeweils Adenoviren, Herpes- und Iridoviren sowie Poxviren verwendet. Da bei allen Virusgruppen eine konservierte Downstream Sequenz gefunden wurde, konnte ein einziger Reverseprimer für alle erwähnten Virusgruppen verwendet werden (Hanson et al. 2006).

Es wurden folgende Primer laut Protokoll verwendet:

Tab. 3 Vorwärtsprimersequenzen für die zu detektierenden Viren (Hanson et al. 2006)

Virus	Forward-Primersequenz	Zu erwartendes Amplicon
Adenoviren	5'-gggaattctaGAYATHHTGYGGNATAYGC-3'	~ 1200 bp
Herpes- und Iridoviren	5'-cggattctaGAYTTYGCNWSNYTNTAYCC-3'	~ 400-700 bp
Poxviren	5'-TAYTGYATHCAYGAYGCBTG-3'	~ 882 bp

Tab. 4 Reverseprimersequenz für die zu detektierenden Viren (Hanson et al. 2006)

Viren	Reverse-Primersequenz
Alle DNA-Viren	5'-cccgaattcagatcTCNGTRTCNCCRTA-3'

### 3.2.3.2 Mastermix

Die Reaktionen werden in einem Gesamtvolumen von 25 µl in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Für jeden PCR-Mastermix wurde folgendes benötigt:

2x ReadyMixPCR Master Mix (REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich)	12,5 µl
Vorwärtsprimer (10pmol)	1 µl
Reverseprimer (10pmol)	1 µl
Aufbereitete Probe (100 ng DNA)	X µl
Steriles PCR Wasser ddH <sub>2</sub> O	Y µl

Die Menge an µl aufbereiteter Probe richtet sich nach der im Extrakt enthaltenen DNA Konzentration. Es sollte eine Endkonzentration von circa 100 ng DNA enthalten sein, was

durch entsprechende Verdünnung mit DNA-freiem Wasser erreicht wurde. Dementsprechend erfolgte eine Ergänzung des Volumens auf 25 µl.

Die Amplifikation der DNA wurde mit Thermocyclern (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad-Laboratories Ges.m.b.H.Österreich, Österreich; C1000™ Thermal Cycler, Rad-Laboratories Ges.m.b.H.Österreich, Österreich) durchgeführt. Das DNA-Amplifikationsprotokoll ist in Tabelle 5 ersichtlich. Anschließend wird bis zur Entnahme des Amplifikates auf 4 °C gekühlt.

**Tab. 5 DNA-Amplifikationsprotokoll**

Anzahl der Zyklen	Temperatur °C/Zeit	Temperatur °C/Zeit	Temperatur °C/Zeit
1x	93 °C/60 s		
35x	93 °C/30 s	45 °C/120 s	72 °C/180 s
1x	72 °C/240s		

### 3.2.3.3 Kontrollen

Bei jeder durchgeführten PCR müssen eine negative Extraktionskontrolle, eine Kontrollprobe der Mastermixreagenzien (non template control, NTC) sowie eine Positivkontrolle mitgeführt werden. Diese demonstrieren, dass keine Kontamination oder Kreuzkontamination während der Vorbereitung der PCR stattgefunden hat beziehungsweise, dass die PCR zum Nachweis der fraglichen Sequenz geeignet ist.

Auf eine positive Extraktionskontrolle musste aufgrund der hohen Anzahl an verschiedenen Fischarten verzichtet werden. Der Nachweis einer erfolgreichen DNA-Extraktion wurde nur über die DNA-Messung in den Extrakten erbracht.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob das gewählte PCR-Protokoll mit bekanntermaßen positiven DNA-Proben (von denen auch Sequenzierungsergebnisse vorlagen) die zu erwartenden Amplifikationsprodukte ergab. Anhand dieser Ergebnisse sollten im nächsten Schritt aus diesen Proben die Positivkontrollen für die weiteren Untersuchungen ausgewählt werden. Die folgenden ausgewählten Virus-DNA Proben wurden als Kontrolle zur Funktion der PCR nach dem verwendeten Protokoll herangezogen. Dabei handelte es sich teilweise um DNA aus Zellkulturüberstand und zum Teil aus Extrakten infizierter Gewebeproben.

Tab. 6 Liste der verwendeten DNA-Proben

Virusgruppe	Virus	Material	bp	Herkunft
<b>Adenovirus</b>	Canines Adenovirus (CAV Impfstoff Hund)		~1200bp	Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Adenovirus</b>	Equines Adenovirus (297/73 EAdV-1)		~1200bp	Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Iridovirus</b>	Megalocytivirus (ISKNV)		~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Iridovirus</b>	+ve Zebrafische		~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Iridovirus</b>	Epizootisches Hämatopoetisches Nekrose Virus (EHNV)		~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Herpesvirus</b>	Cyprinides Herpesvirus 1		~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Herpesvirus</b>	Cyprinides Herpesvirus 2		~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

<b>Herpesvirus</b>	Cyprinides Herpesvirus 3	~400- 700bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Poxvirus</b>	Felines Orthopoxvirus (443/02, 773/12)	~600bp	Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Poxvirus</b>	Avipoxvirus (+KCeloR76)	~600bp	Abteilung für Geflügel der Veterinärmedizinischen Universität Wien
<b>Poxvirus</b>	CEV	~600bp	Abteilung für Fischmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Die Auftrennung, der innerhalb dieser Arbeit mittels PCR amplifizierten DNA, erfolgt mittels Gel-Elektrophorese. Es wurden pro Probe 10 µl des Amplifikates in die Taschen eines 1,5%igen Agarose-Gels überführt. Zum Vergleich der Länge der DNA-Fragmente wurde ein 100 Basenpaar (bp) Leiterstandard verwendet. Die Elektrophorese wurde für 60 Minuten mit einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 450 mA durchgeführt. Das Sichtbarmachen erfolgte mit Hilfe von UV-Licht.

Im ersten Anlauf wurde für die Gruppe der Adenoviren ein Canines Adenovirus (CAV) und ein Equines Adenovirus (EAV), für die Iridoviren eine Probe mit einem Megalocytivirus, für die Herpesviren ein CyHV2 und für die Poxviren ein Felines Orthopoxvirus verwendet. Alle erwähnten Proben bis auf das CyHV2 und die Megalocytiviren wurden freundlicherweise vom Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt. Entsprechend dem Protokoll wurden drei Mastermix Reaktionen mit den jeweils unterschiedlichen Vorwärts-Primern angesetzt.

Bei der Auswertung der PCR mittels Gelelektrophorese erschien jedoch nur eine entsprechende Bande bei CAV, CyHV2 und Megalocytivirus (siehe Tabelle 6 für die zu erwartenden Basenpaare und Abbildung 1 für das entsprechende PCR Bild). Um

auszuschließen, dass zu wenig DNA amplifiziert wurde, um bei der Auswertung sichtbar zu werden, wurde die PCR mit den Amplifikationsprodukten der ersten Runde wiederholt. Die bereits ausgewerteten Banden aus der ersten Runde erschienen, bis auf die Megalocytprobe, in der zweiten Runde weitaus stärker. Auch bei EAV erschien nun eine entsprechende Bande. Die Probe für die Gruppe der Poxviren blieb in beiden Runden negativ (siehe Abbildung 2).

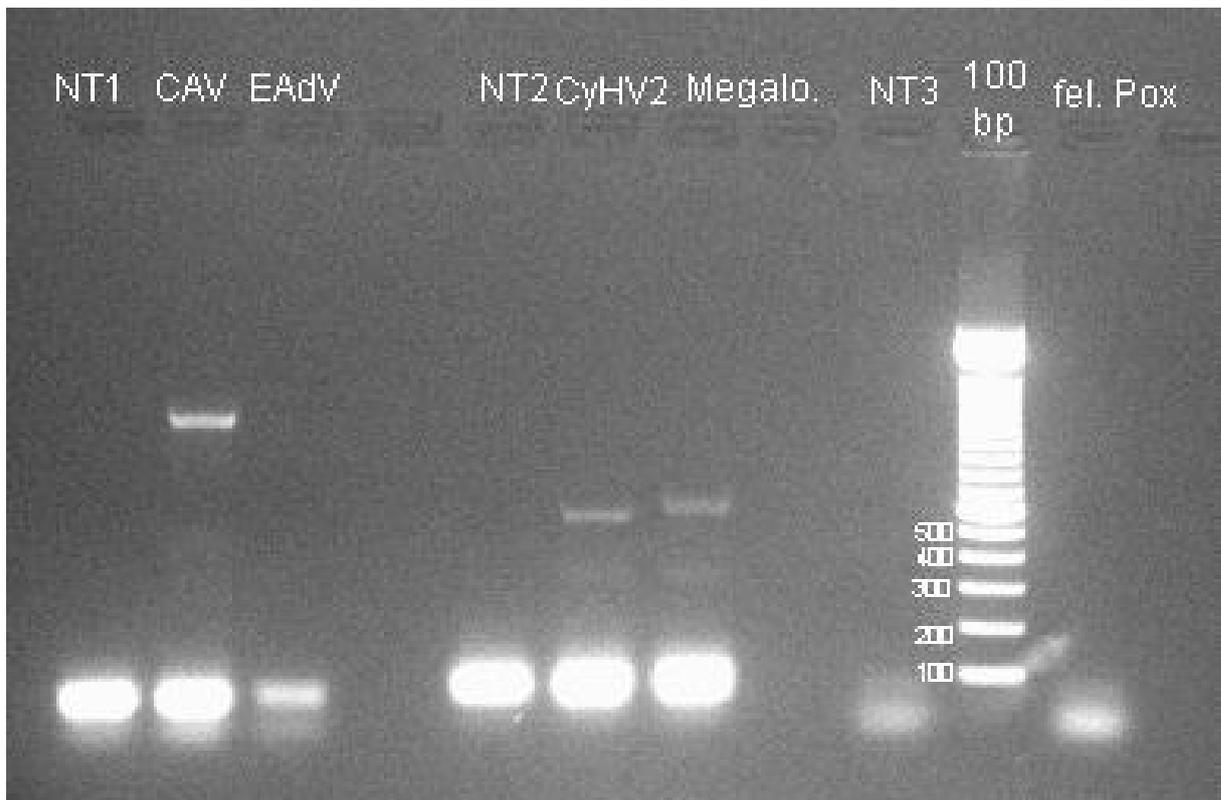
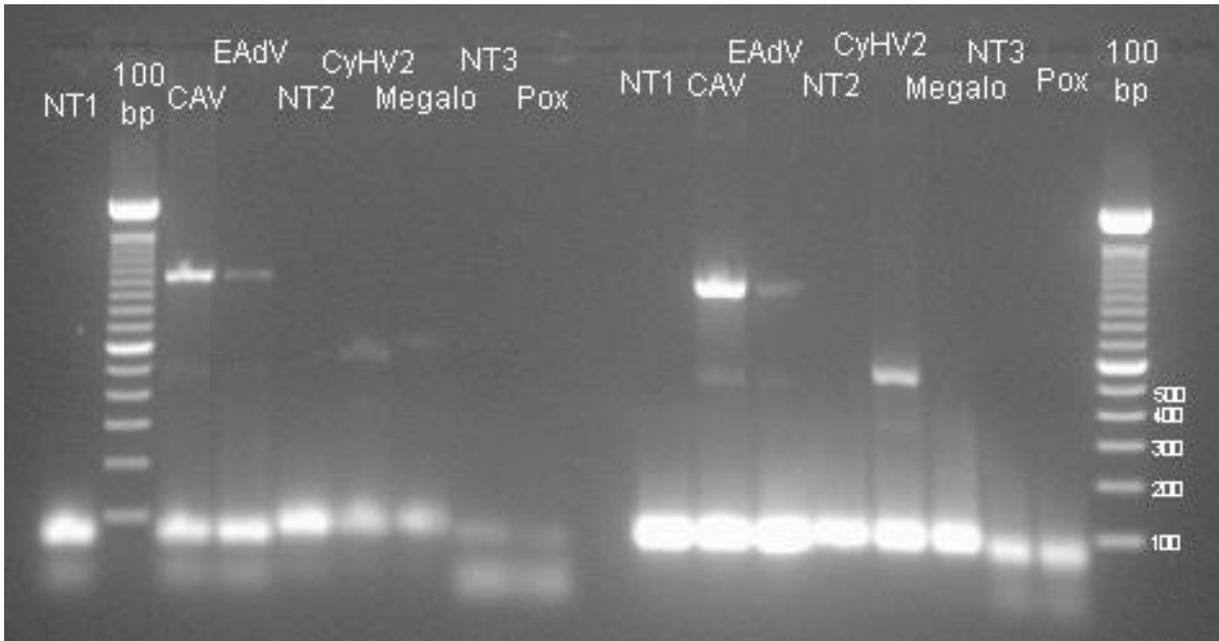
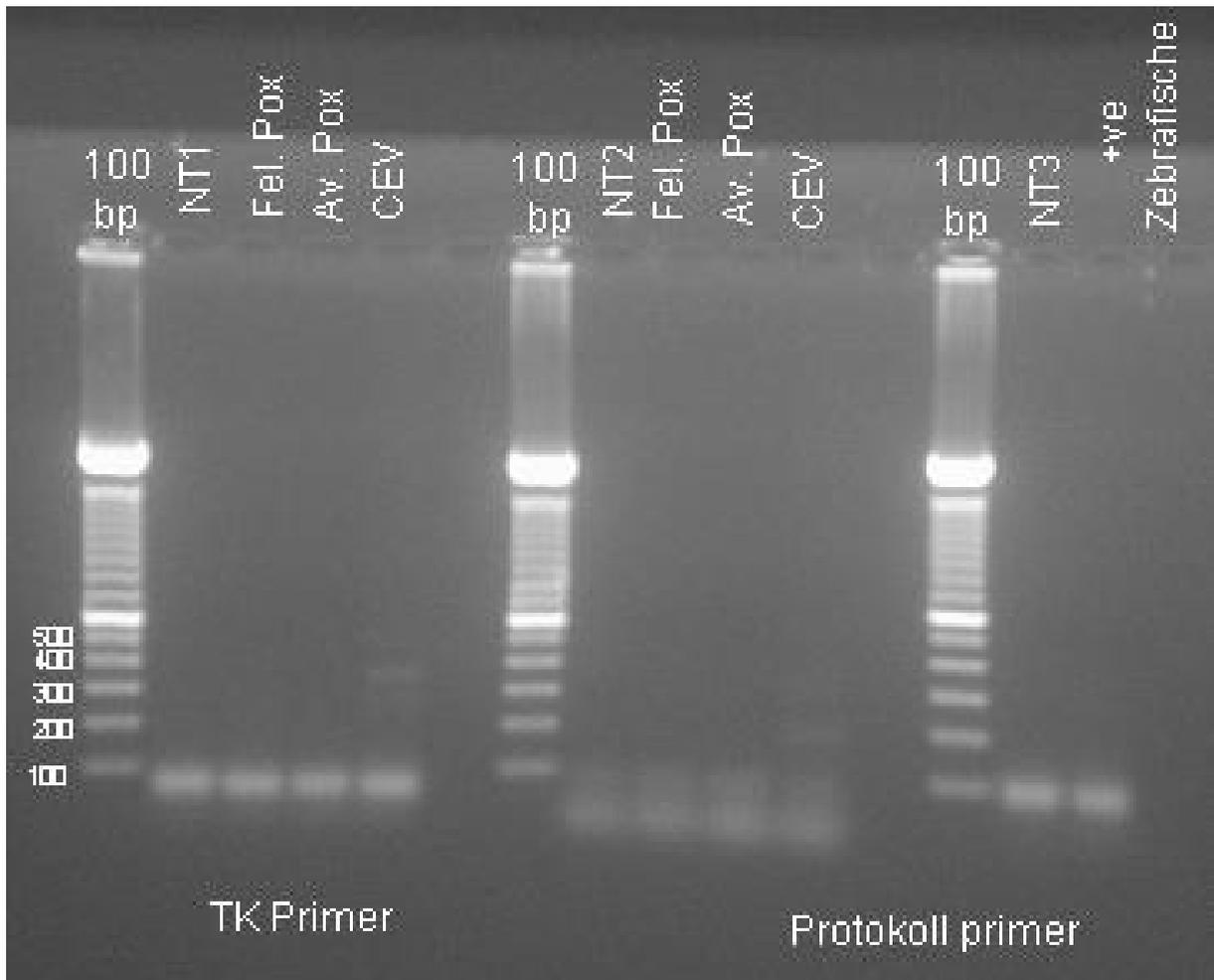


Abb. 1 Auswertung der ersten Runde PCRs für die Auswahl der Positivkontrollen



**Abb. 2 Auswertung des ersten und zweiten Laufs der zweiten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen**

Um ein falsch negatives Ergebnis bezüglich des Pox-Virus auszuschließen, wurden die Primer neu angesetzt und zusätzlich ein zweites Pox-Virus (Aviäres Poxvirus; siehe Tabelle 5) verwendet. Die PCR wurde mit den zwei erwähnten Pox-Viren einmal mit den alten Primern und einmal mit den neu angesetzten Primern wiederholt. Gleichzeitig wurde ein weiteres Iridovirus (+ve Zebrafische, siehe Tabelle 5) mitlaufen gelassen. Nach unserer Auswertung waren alle drei Proben negativ (siehe Abbildung 3).



**Abb. 3 Auswertung der dritten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen**

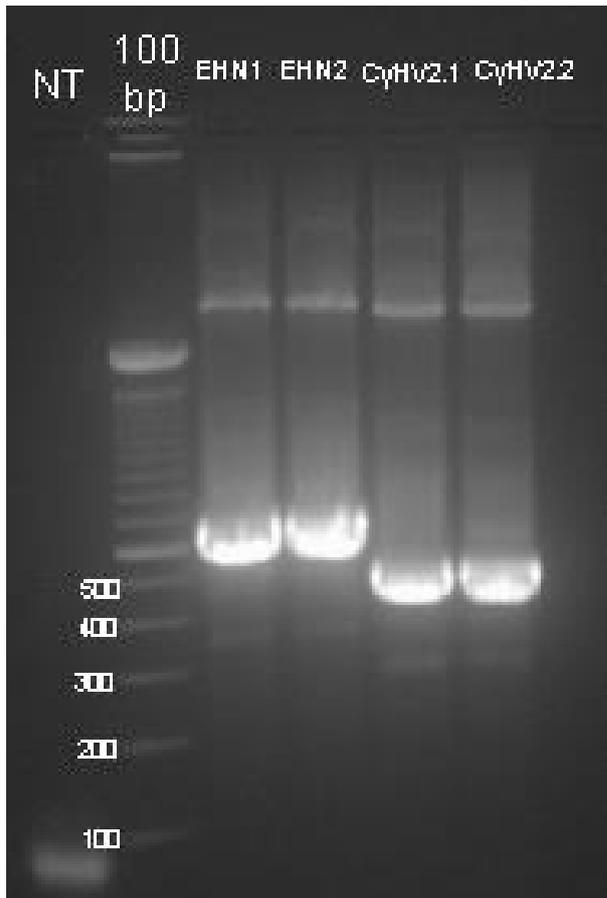
Aufgrund der wiederholt negativen Ergebnisse wurden die Poxviren von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Um einen besseren Eindruck von der universellen Anwendbarkeit der Methode bezüglich Fisch-Herpesviren zu erhalten, wurden im nächsten Schritt DNA-Proben welche CyHV-1 beziehungsweise CyHV-3 enthielten (siehe Tabelle 5), mit dem PCR Protokoll untersucht. Auch die Anwendbarkeit auf ein weiteres Iridovirus wurde überprüft, mit einer DNA-Probe, die das Virus der Epizootischen Hämato-poetischen Nekrose enthielt (siehe Tabelle 5). Entsprechend positive Banden waren bei der Auswertung bei EHNV und CyHV-2 zu sehen (siehe Abbildung 4).



Abb. 4 Auswertung der vierten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen

Für das weitere Vorgehen konnte nun zusammengefasst werden, dass das ausgewählte PCR Protokoll für den Nachweis von piscinen Herpesviren bedingt geeignet war und für zumindest zwei bedeutende fischpathogene Iridoviren geeignet schien. Daher wurden als repräsentative Viren für die Herpesviren CyHV-2 und für die Iridoviren EHNV als Positivkontrollen ausgewählt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den erhaltenen Amplifikaten auch tatsächlich um die Genfragmente der fraglichen Viren handelte, wurden die Amplifikationsprodukte sequenziert. Um ausreichend positive Kontrollproben für die Untersuchungen im zweiten Teil der Arbeit (Untersuchungen von Feldproben) zu haben, wurden die Amplifikationsprodukte kloniert (siehe Abbildung 5)



**Abb. 5 Klonierte Amplifikationsprodukte**

#### **3.2.3.4 Gel-Extraktion und Sequenzierung der Positivkontrollen**

Für die Sequenzierung wurde die amplifizierte DNA der Positivkontrollen mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aus dem Gel gewonnen. Es wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Für die Sequenzierung, die von der Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) extern durchgeführt wurde, wurden 10 µl extrahierte DNA der Positivkontrollen mit jeweils 4 µl der jeweiligen Primer zugesetzt verschickt. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten eine

entsprechende Abfolge der DNA-Basen und 100% Übereinstimmung für CyHV-2 und EHNV (National Center for Biotechnology Information).

### 3.2.4 Klonierung der Positivkontrollen

Die zu klonierende DNA der Positivkontrollen wurde mit dem MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aus dem Gel gewonnen. Es wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

Die Klonierung der Positivkontrollen wurde mit einem experimentellen Protokoll durchgeführt.

Die TOPO Klonierungsreaktion wurde mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

Reagent	Chemisch kompetente <i>E. coli</i>
Gereinigtes PCR Produkt	4 µl
Salzlösung	1 µl
TOPO Vektor	1 µl
Gesamtvolumen	6 µl

Man mischte das frische DNA-Produkt mit PCR 4-TOPO in PCR-Reaktionsgefäßen und inkubierte für 30 Minuten bei 23 °C.

Die Reaktion wurde auf Eis gelegt und zu kompetenten Zellen transformiert. Es wurden TOP 10 *Escheria coli* (*E. coli*) Zellen verwendet und zu diesen 4 µl der TOPO Klonierungsreagenz hinzugefügt und gemischt, indem man mit einer Pipette vorsichtig umrührte.

Die Mixtur wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 42 °C geschockt.

Das Reaktionsgefäß wurde für 1-2 Minuten auf Eis gelegt. Dann wurden 250 µl SOC Medium zugesetzt. Wichtig ist, dass dieser Schritt unter einer Lamina durchgeführt wurde. Das Röhrchen wurde mit Parafilm verschlossen und für 1 Stunde bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde mit einem sterilen Mikrobiologietupfer auf eine vorgewärmte selektive Platte aufgetragen. Wichtig ist, dass dieser Schritt unter einer Lamina durchgeführt wurde. Sobald die Platten trocken waren, wurden sie bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Für die weiteren Schritte wurden 4 g einer LB broth Lösung der Firma Invitrogen mit 200 ml destilliertem Wasser angemischt und für 15 Minuten bei 121 °C inkubiert und dann auf 50 °C abgekühlt. 5 ml dieses Gemisches wurden mit 5 µl Ampicillin Lösung (50 µl/ml H<sub>2</sub>O) in ein 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen gegeben.

Pro Falcon Zentrifugenröhrchen wurde mit einer Pipettenspitze eine Bakterienkolonie zugefügt und bei 37 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert.

Die Pipettenspitze wurde entfernt und bei 3220 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das übriggebliebene Sediment mit 250 µl P1 Puffer resuspendiert.

Danach wurden 250 µl P2 Puffer hinzugefügt und die Lösung gewendet bis sie klar wurde.

Es wurden dann 350 µl N3 Puffer hinzugefügt und die Lösung wurde gewendet bis sie farblos wurde.

Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein QIAprep Spinsäule gegeben und für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt.

Beim ersten Waschschrift wurden 500 µl PB Puffer hinzugefügt, 1 Minute zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Dies wiederholte man mit 700 µl PE Puffer. Im letzten Waschschrift zentrifugierte man „leer“ um die Waschpuffer zu entfernen.

Die Spinsäule wurde in ein 1.5 ml Tube gesteckt. Es wurden 50 µl EB Puffer hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die klonierte DNA.

### **3.2.5 Elektrophorese und DNA-Detektion**

Die mittels Klonierung gewonnenen DNA Abschnitte wurden zur Überprüfung, wie oben beschrieben, mittels PCR amplifiziert und sichtbar gemacht.

### **3.2.6 Untersuchungen von Feldproben**

Nach Vorbereitung der Positivkontrollen wurden die in Tabelle eins und zwei, des Punktes „2.3 Tiermaterial“, genannten Proben mit dem von Hanson et al (2006) entwickelten PCR-Protokoll (mit geringfügiger Modifikation) untersucht. Dabei wurden die Untersuchungen aus oben genannten Gründen auf Irido und Herpesviren eingeschränkt. Stellvertretend für diese beiden Virusgruppen wurden EHNV und CyHV-2 als Positivkontrollen für die PCR gewählt.

Die DNA-Extraktion sowie die Auftrennung mittels einer Gel-Elektrophorese und das Sichtbarmachen des amplifizierten PCR Produkts der Feldproben erfolgte wie in „Tiere, Material und Methodik“ beschrieben.

#### 4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 66 Proben von 162 Fischen aus dem Zoofachhandel, 130 klinischen Fällen und 56 verschiedenen Spezies mittels der oben beschriebenen PCR Protokolle auf Herpes- und Iridoviren untersucht. Dabei traten bei drei Proben (1-036, 1-037 und 1-008) Banden bei 600 bp sowie bei einer Probe (1-009) bei 400 bp auf. Diese Länge entsprach den Positivkontrollen (600 bp Irido-, 400 bp Herpesviren). Um die positiven Ergebnisse besser darzustellen wurde die PCR mit dem Amplifikat der erwähnten Proben wiederholt (siehe Abb. 6). Bei den positiven Proben handelte es sich um zwei Zebrafische und zwei Giebel aus jeweils einem Fall (siehe Tabelle 1), wobei eine Giebel-Probe mit 400 bp auf ein Herpesvirus schließen ließ, während sich die Banden der Zebrafische und des zweiten Giebels auf Höhe der Iridovirus-Positivkontrolle befanden. Die Sequenzierung der Banden brachte nur für einen Zebrafisch (Probe 1-037) ein Ergebnis, das eine 99%ige Übereinstimmung mit Abschnitten verschiedener Iridovirus Sequenzen zeigte. Nach einer Wiederholung der PCR konnte auch die 400 bp Bande der Giebel Probe sequenziert werden und zeigte >99% Übereinstimmung mit CyHV-2. Die 600 bp Banden waren jedoch nicht reproduzierbar. Alle anderen untersuchten Feldproben waren negativ auf die, innerhalb dieser Arbeit, untersuchten Viren.

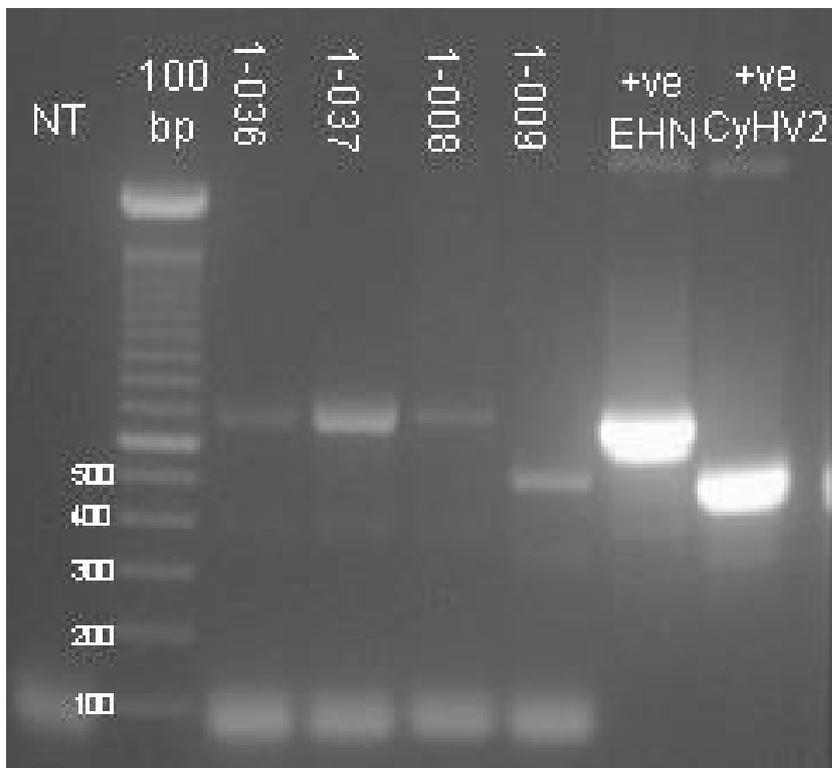


Abb. 6 Positive Ergebnisse der untersuchten Feldproben

## 5 Diskussion

Das Fehlen von schnellen, akkuraten und zuverlässigen Verfahren um Pathogene von Fischen zu detektieren und zu identifizieren ist eine der größten Limitationen innerhalb der Fischdiagnostik (Frans et al. 2008). Auf PCR basierende Methoden werden immer mehr in der Praxis implementiert, um eine zuverlässige Identifikation von pathogenen Organismen zu erlauben (Frans et al. 2008). Diese sind meistens gut geeignet um ein einzelnes Pathogen zu identifizieren. Um jedoch nach einer größeren Zahl verschiedener Erreger zu suchen, benötigt man mehrere parallele Tests oder auch unterschiedliche Technologien (Frans et al. 2008, Lievens et al. 2005). Die Autoren Hanson et al. (2006) entwickelten ein, auf PCR basierendes, diagnostisches Verfahren, welches auf ein weites Spektrum an Viren anwendbar ist. Die Ziel-Sequenz ist dabei ein in den untersuchten Viren hoch konservierter Abschnitt des DNA-Polymerase-Gens. Innerhalb meiner Arbeit wurde untersucht, ob diese Methode als kostengünstige und schnelle Routinediagnostik bei Zierfischen angewandt werden kann und ob unbekannte Viren detektiert werden können.

Während der Etablierung des PCR Protokolls nach Hanson et al. (2006) zeigte sich, dass keine Poxviren nachgewiesen werden konnten. Um die verwendeten Primer als Fehlerquelle auszuschließen, wurde die Detektion der Positivkontrollen mit neuen Primern wiederholt. Die Poxviren zeigten jedoch weiterhin keine entsprechenden Banden. Auch bei Hanson et al. zeigten sich Probleme bei der Amplifikation der Pox-Sequenz, da das Protokoll ursprünglich nicht die gewünschte Spezifität aufwies. Die Autoren erzielten bessere Ergebnisse nach Behandlung der Proben mit Nuclease und nach Konzentration des Virus. Dass es bei der hier vorliegenden Arbeit zu gar keine Amplifizierung kam ist dennoch verwunderlich, da es sich bei zwei der getesteten Proben um Chordopoxviren handelte (Avipox- und felines Orthopoxvirus), welche laut Hanson amplifizierbar sein müssten. Das ebenfalls getestete CEV hingegen ist nach wie vor nicht genetisch charakterisiert und keine Zuordnung zu einer Unterfamilie der Poxviren erfolgt. Insofern ist es möglich, dass für dieses keine genügende Übereinstimmung mit der Primersequenz vorlag.

Ein weiterer Grund für einen fehlenden Nachweis könnte sein, dass die Annealing-Temperatur des Vorwärtsprimers für Poxviren mit 39,2° C viel geringer ist als die Temperatur (45° C) die verwendet wurde und der Primer für die Poxviren somit eventuell nicht binden konnte (ThermoFisher Scientific 02.03.2019 10:21). Eine Abweichung zum Protokoll von Hanson et al. (2006) ist, dass der in meiner Arbeit verwendete ReadyMix von der Firma Sigma-Aldrich

statt Fisher-scientific, wie im Paper angegeben, stammt. Dies könnte eventuell auch der Grund sein, wieso keine Poxviren nachgewiesen werden konnten.

Bei Untersuchung der Positivkontrollen für die Gruppe der Herpes- und Adenoviren wurde ersichtlich, dass nicht alle der untersuchten Viren einer Gruppe nachgewiesen werden konnten. Von den drei untersuchten Herpesviren war nur die Positivkontrolle, welche CyHV-2 enthielt, positiv. Als Faktor, wieso die eigentlich bekannt positiven Proben nicht als solches nachgewiesen werden konnten, käme eine unsachgemäße Lagerung der Proben in Frage. Dies ist aber auszuschließen, da die Lagerung der verwendeten Proben strengen Vorgaben und Kontrollen unterliegt. Eine weitere Fehlerquelle wäre, dass die Sequenzen, an die die Primer binden sollten, eine Mutation aufweisen. Auch diese Möglichkeit ist auszuschließen, da unterschiedliche Proben mit dem selben Erreger getestet wurden und das Auftreten einer Mutation bei mehreren Proben unwahrscheinlich ist.

Für die Etablierung der Herpesviren Detektion verwendeten Hanson et al. das Ictalurid Herpesvirus 1 („channel catfish virus“, CCV) und das „blue catfish virus“ (BCV).

Für beide Viren wurde Zellkultur-Überstand und nicht Gewebe verwendet. Virustiter geben die Autoren keine an. Die von mir getesteten cypriniden Herpesviren sind nur äußerst schwierig in Zellkultur zu kultivieren, eine Vermehrung vor der PCR kommt daher nicht in Frage.

Die Sensitivität der Methode wird von den Autoren nicht thematisiert, und so bleibt die Frage offen, ob in den untersuchten Gewebeproben genug Virus-DNA vorhanden war. Jedenfalls war die Methode für einen Nachweis des CyHV-2 geeignet. Durch Ergänzung mit anderen Methoden (Zellkultur, realtime quantitative PCR) ließe sich hier die Sensitivität bestimmen. Ein Versagen der Methode für den Nachweis von CyHV-1 und CyHV-3 muss wohl auf mangelnde Übereinstimmung mit den Primern zurückgeführt werden. Für die verwendete CyHV-3 Probe lässt sich sagen, dass es sich dabei um validiertes Referenzmaterial der Klinik handelte und auch die CyHV-1 Probe war zuvor in einem spezifischeren PCR Protokoll überprüft und sequenziert worden.

Auffallend ist auch, dass bei Etablierung des Protokolls von Hanson et al. (2006) die Megalozytivirus Positivkontrolle zuerst positiv war und dann bei Wiederholung der PCR mit diesem Amplifikat eine entsprechende Bande nicht mehr erschienen ist. Der Fehler könnte in der Aufbereitung des Amplifikates liegen, sodass zu wenig oder keine DNA mehr bei der Wiederholung der PCR vorhanden war. Möglicherweise waren die Amplifikationsprodukte auch zu kurz und enthielten keine Bindungsstellen für die Primer.

Bei der Untersuchung der Feldproben fällt auf, dass bei den meisten der Proben keine Viren detektiert wurden. Eine mögliche Fehlerquelle könnte eine Inhibition der PCR Reaktion durch verschiedene Substanzen sein, welche zu einem falsch negativen Ergebnis führen kann. Ein wichtiger Punkt, der ein Grund für die Vielzahl an negativen Ergebnissen sein könnte, ist die Probensammlung durch die Zoohandlungen. Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und brauchen daher einen lebenden Wirt beziehungsweise lebende Zellen, um sich zu replizieren (Uhlenhaut 2011). Da die Tiere bereits tot waren als sie entnommen wurden, ist nicht bekannt, wie lange bereits autolytische Prozesse vorstatten gingen und welchen Einfluss dies auf das virale Genom hatte. Eine weitere Variable ist, dass keine Informationen vorliegen von wie vielen Händlern die untersuchten Fische stammen. Es könnte sein, dass diese nur von einem Unternehmen oder sehr wenigen Zwischenhändlern kommen und dadurch nie in Kontakt mit Carriern oder klinisch kranken Fischen gekommen sind. Hier gibt es Bedarf nach weiteren Studien, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob und wie viele Zierfische aus Wiener Zoohandlungen mit relevanten Viren infiziert sind.

Drei der untersuchten Feldproben (zwei Zebrafische, ein Giebel) zeigten in der PCR Banden auf Höhe der Iridovirus -Kontrolle, und eine der untersuchten Feldproben (Giebel) auf der von Herpesviren. Jedoch konnte bei der Sequenzierung nur bei einer der Zebrafisch-Proben tatsächlich das entsprechende Virus nachgewiesen werden. Bei schwachen Banden mit nur wenig Amplifikationsprodukt oder Überschneiden von Banden ist eine Sequenzierung mitunter nicht erfolgreich. Dies (schwache Banden) dürfte hier der Fall gewesen sein. Eine Wiederholung der PCR produzierte eine stärkere Bande und führte zu einer erfolgreichen Sequenzierung des entsprechenden Abschnittes von CyHV-2. Der Nachweis des CyHV-2 in der Giebelprobe stimmte darüber hinaus mit einem PCR-Ergebnis derselben Probe mit einem für CyHV-2 spezifischen Protokoll überein.

Die Bande, entsprechend einem Iridovirus von der Giebelprobe, erschien wenig glaubwürdig und stimmte nicht mit schon früher in der Klinik erhobenen Befunden überein. Das Ergebnis konnte auch nicht reproduziert werden. Ein Faktor, welcher zu einem falsch positiven Ergebnis führen kann, ist die Kontamination während der Probenaufbereitung oder Vorbereitung der PCR. Jedoch wurde bei jeder DNA Extraktion eine negative Extraktionskontrolle und bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, wodurch eine Kontamination der Feldproben ausgeschlossen sein sollte. Daher ist es wahrscheinlicher, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung der Primer gehandelt hat.

Dies zeigt sehr deutlich, dass das Ergebnis einer molekulargenetischen Untersuchung immer im Zusammenhang mit anderen erhobenen Befunden gesehen werden muss. Nur so lässt sich die Glaubwürdigkeit und Relevanz eines PCR Ergebnisses abschätzen.

Für diese Arbeit wurde das von Hanson et al. vorgeschlagene PCR Protokoll verwendet. Es ist durchaus möglich, dass eine Änderung der PCR-Bedingungen wie Temperatur, Zyklusdauer oder Zykluszahl, zu anderen Resultaten geführt hätte. Dies hätte aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Die von Hanson et al. (2006) entwickelte, auf PCR basierende, Methode stellt einen interessanten Ansatz dar, um die Diagnostik viraler Erkrankungen bei Zierfischen zu vereinfachen. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Anwendung der Methode von Hanson et al. (2006) zur Diagnostik bei Zierfischen in der dargelegten Form bekannte spezifischere Protokolle nicht ersetzen kann. Auch die Detektion von unbekanntem Stämmen innerhalb der, von mir untersuchten, Virusgruppen durch dieses PCR Protokoll ist nur bedingt möglich, da nicht alle untersuchten Positivkontrollen als positiv erkannt wurden. Hierbei müssen allerdings die bereits besprochenen, möglichen Fehlerquellen überprüft werden, um eine genaue Aussage darüber treffen zu können. Verlässlich nachgewiesen werden konnte das CyHV-2; um die Verlässlichkeit für Iridoviren zu beurteilen, sind weitere Untersuchungen nötig.

## 6 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Anwendung und Evaluation einer PCR Methode nach Hanson et al. (2006) zum Nachweis verschiedener Virusgruppen bei Zierfischen als Ausgangsmaterial.

Es wurde gezeigt, dass die Diagnostik viraler Erkrankungen bei Zierfischen mit einigen Problemen und Limitationen verbunden ist. Deshalb wäre es wünschenswert, eine einfache und schnelle Methode zur Identifikation von viralen Pathogenen bei Zierfischen zu finden.

Anhand von 66 Proben wurde ein PCR Protokoll nach Hanson et al. (2006) angewandt, welches große DNA-Viren und Adenoviren verschiedener Spezies durch spezifische Primersets detektiert. Innerhalb dieser Arbeit wurde versucht, die für Zierfische relevanten Gruppen der Adeno-, Herpes-, Irido- und Poxviren nachzuweisen.

Bei der Anwendung dieser Methode konnten bestimmte Herpes- und Adenoviren, aber keine Poxviren nachgewiesen werden. Um eine Aussage bezüglich Iridoviren zu treffen, wären weitere Arbeiten nötig.

Die Arbeit zeigt, dass die von Hanson et al. (2006) entwickelte, auf PCR basierende, Methode eine interessante Möglichkeit wäre, die Diagnostik bei Zierfischen wesentlich zu vereinfachen. Jedoch zeigen die momentanen Resultate dieser Arbeit, dass die Anwendung bei Zierfischen nur bedingt geeignet ist. Weitere Untersuchungen und eine Optimierung des PCR Protokolls sind notwendig, um eine genaue Aussage über die Einsetzbarkeit dieser Methode treffen zu können.

## **7 Summary**

The main aim of this work was the implementation and evaluation of a PCR method according to Hanson et al. (2006) for identification of different virus groups. The tissue samples originated from ornamental fish.

It could be shown that the diagnosis of viral diseases of ornamental fish, is associated with a lot of problems and limitations. In consequence, there is an urgent need to find an easy and fast method to identify viral pathogens from ornamental fish.

66 tissue samples originating from ornamental fish were examined using a PCR protocol according to Hanson et al. (2006), which can detect large DNA-viruses and adenoviruses by employing specific primer sets. This work tried to detect four relevant groups of viruses for ornamental fish: adeno-, herpes-, irido- and poxviruses.

In the process of applying this method, certain herpes- and adenoviruses but no poxviruses could be detected. To make a statement regarding iridoviruses further work is needed.

This work shows that the PCR based method developed by Hanson et al. (2006) is an interesting option to simplify ornamental fish diagnostics. However, the present results of this work indicate that the usage of this method is not suitable for ornamental fish. Further studies are necessary to make an exact statement.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adamek M, Oschilewski A, Wohlsein P, Jung-Schroers V, Teitge F, Dawson A, Gela D, Piackova V, Kocour M, Adamek J, Bergmann SM, Steinhagen D. 2017. Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. *Veterinary research*, 48 (1): 12. DOI 10.1186/s13567-017-0416-7.
- Adamek M, Steinhagen D, Imnazarow I, Hikima J-i, Jung T-S, Aoki T. 2014. Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp. *Developmental and comparative immunology*, 43 (2): 151–159. DOI 10.1016/j.dci.2013.08.015.
- Adams A, Thompson KD. 2008. Recent applications of biotechnology to novel diagnostics for aquatic animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27 (1): 197–209.
- Adams A, Thompson KD. 2011. Development of diagnostics for aquaculture: challenges and opportunities. *Aquaculture Research*, 42: 93–102. DOI 10.1111/j.1365-2109.2010.02663.x.
- Ananda Raja R, Jithendran KP. 2015. Aquaculture Disease Diagnosis and Health Management. In: Perumal S, Thirunavukkarasu AR, Pachiappan P, Hrsg. *Advances in marine and brackishwater aquaculture*. New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer India, 247–255.
- Ariav R, Tinman S, Bejerano I. 1999. First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel. *Diseases of Fish and Shellfish*, 9th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Rhodes, Greece, Sept 1999.
- Ariel E. 2005. Ornamental Fish as Trans-Boundary Vectors of Viral Diseases. *Diseases in Asian Aquaculture*: 103–112.
- Bartley D. 2000. Responsible ornamental fisheries. *FAO Aquaculture Newsletter*, (24): 10–14. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/005/x4933e/x4933e00.pdf> (Zugriff 01.09.2019).
- Belák S. 2007. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*, 25 (30): 5444–5452. DOI 10.1016/j.vaccine.2006.11.068.

- Bergmann S, Lutze P, Schütze H, Fischer U, Dauber M, Fichtner D, Kempter J. 2010. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30 (2): 74–84. <https://eafp.org/download/2010-Volume30/Issue%202/Bergmann.pdf> (Zugriff 01.09.2019).
- Bermúdez R, Losada AP, Azevedo AM de, Guerra-Varela J, Pérez-Fernández D, Sánchez L, Padrós F, Nowak B, Quiroga MI. 2018. First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *Journal of fish diseases*. DOI 10.1111/jfd.12822.
- Bernoeth E-M, Crane MSJ. 1995. Viral diseases of aquarium fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 4 (2): 103–110. DOI 10.1016/S1055-937X(05)80046-5.
- Bloch B, Mellergaard S, Nielsen E. 1986. Adenovirus-like particles associated with epithelial hyperplasias in dab, *Limanda limanda* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 9 (3): 281–285. DOI 10.1111/j.1365-2761.1986.tb01015.x.
- Borrego JJ, Valverde EJ, Labella AM, Castro D. 2017. Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 9 (2): 179–193. DOI 10.1111/raq.12131.
- Bowser PR, Wolfe MJ, Forney JL, Wooster GA. 1988. Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. *Journal of wildlife diseases*, 24 (2): 292–298. DOI 10.7589/0090-3558-24.2.292.
- Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Mustapha O, Hoffmann R, Truyen U. 1999. Mass mortalities in Koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19. [https://pdfs.semanticscholar.org/dfae/21a906b85007dfb008a139613b66c6d531a7.pdf?\\_ga=2.73937495.433034341.1567324248-1159277948.1541516444](https://pdfs.semanticscholar.org/dfae/21a906b85007dfb008a139613b66c6d531a7.pdf?_ga=2.73937495.433034341.1567324248-1159277948.1541516444) (Zugriff 01.09.2019).
- Calle PP, McNamara T, Kress Y. 1999. Herpesvirus-associated papillomas in koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 30 (1): 165–169.
- Cano I, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Saint-Jean SR, Castro D, Borrego JJ. 2006. Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Veterinary microbiology*, 113 (1-2): 137–141. DOI 10.1016/j.vetmic.2005.10.024.

Chang PH, Lee SH, Chiang HC, Jong MH. 1999. Epizootic of Herpes-like Virus Infection in Goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. *Fish Pathology*, 34 (4): 209–210.

DOI 10.3147/jfsp.34.209.

Choudhary OP, Malik P. 2017. Scanning Electron Microscope: Advantages and Disadvantages in Imaging Components. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (5): 1877–1882. DOI 10.20546/ijcmas.2017.605.207.

Colorni A, Padrós F. 2011. Diseases and Health Management. In: Pavlidis M, Mylonas C, Hrsg. *Sparidae. Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. Erste. Aufl. s.l.: Wiley-Blackwell, 321–357.

Costes B, Raj VS, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L, Mast J, Lieffrig F, Bremont M, Vanderplasschen A. 2009. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *Journal of virology*, 83 (7): 2819–2830. DOI 10.1128/JVI.02305-08.

Curry A. 2003. Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 7 (4): 251–258. DOI 10.1016/S1201-9712(03)90103-2.

Daněk T, Kalous L, Vesel T, Krásová E, Reschová S, Rylková K, Kulich P, L MP, Pokorová D, Knytl M. 2012. Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). *Diseases of aquatic organisms*, 102 (2): 87–95. DOI 10.3354/dao02535.

Davison AJ. 2010. Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*, 143 (1): 52–69. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.02.014.

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of virology*, 154 (1): 171–177. DOI 10.1007/s00705-008-0278-4.

Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S, Kotler M. 2005. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Applied and environmental microbiology*, 71 (11): 7285–7291. DOI 10.1128/AEM.71.11.7285-7291.2005.

Doszpoly A, Mária B, György C, Ádám D, Mária L, Balázs H. 2011. Introduction of the family Alloherpesviridae: The first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 133 (3): 174–181.

[https://www.researchgate.net/publication/231059021\\_Introduction\\_of\\_the\\_family\\_Alloherpesviridae\\_The\\_first\\_molecular\\_detection\\_of\\_herpesviruses\\_of\\_cyprinid\\_fish\\_in\\_Hungary](https://www.researchgate.net/publication/231059021_Introduction_of_the_family_Alloherpesviridae_The_first_molecular_detection_of_herpesviruses_of_cyprinid_fish_in_Hungary) (Zugriff 01.09.2019).

Doszpoly A, Papp M, Deákné PP, Glávits R, Ursu K, Dán Á. 2015. Molecular detection of a putatively novel cyprinid herpesvirus in sichel (*Pelecus cultratus*) during a mass mortality event in Hungary. *Archives of virology*, 160 (5): 1279–1283. DOI 10.1007/s00705-015-2348-8.

Europäische Kommission. [https://ec.europa.eu/food/animals/traces\\_en](https://ec.europa.eu/food/animals/traces_en) (Zugriff 19.05.2019).

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. 2005. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Zweitend ed. Burlington: Elsevier, 1273.

Fenner F. 1976. *Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. *Intervirology*, 7 (1-2): 1–115. DOI 10.1159/000149938.

Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, Vendramin N, Toffan A, Eleni C, Siemoni N, Fischetti R, Susini F. 2013. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy. *Journal of fish diseases*, 36 (10): 823–830. DOI 10.1111/jfd.12048.

Frans I, Lievens B, Heusdens C, Willems K. 2008. Detection and Identification of Fish Pathogens: What is the Future? A Review. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 60: 213–229.

[https://pdfs.semanticscholar.org/160d/ddd76b75b01747772b0064a39c706c7d8b84.pdf?\\_ga=2.87440221.433034341.1567324248-1159277948.1541516444](https://pdfs.semanticscholar.org/160d/ddd76b75b01747772b0064a39c706c7d8b84.pdf?_ga=2.87440221.433034341.1567324248-1159277948.1541516444) (Zugriff 01.09.2019).

Garibyan L, Avashia N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133 (3): 1–4. DOI 10.1038/jid.2013.1.

Garseth ÅH, Gjessing MC, Moldal T, Gjevre AG. 2018. A survey of salmon gill poxvirus (SGPV) in wild salmonids in Norway. *Journal of fish diseases*, 41 (1): 139–145. DOI 10.1111/jfd.12688.

Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*, 84 (10): 2661–2667. DOI 10.1099/vir.0.19323-0.

- 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 (3): 179–187. DOI 10.3354/dao060179.
- Giovannini S, Bergmann SM, Keeling C, Lany C, Schütze H, Schmidt-Posthaus H. 2016. Herpesviral Hematopoietic Necrosis in Goldfish in Switzerland: Early Lesions in Clinically Normal Goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary pathology*, 53 (4): 847–852. DOI 10.1177/0300985815614974.
- Gjessing MC, Thoen E, Tengs T, Skotheim SA, Dale OB. 2017. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon. *Journal of fish diseases*, 40 (10): 1253–1265. DOI 10.1111/jfd.12608.
- Gjessing MC, Weli SC, Dale OB. 2016. Poxviruses of Fish. In: Kibenge FSB, Godoy MG, Hrsg. *Aquaculture virology*. London: Academic Press, 119–125.
- Gjessing MC, Yutin N, Tengs T, Senkevich T, Koonin E, Rønning HP, Alarcon M, Ylving S, Lie K-I, Saure B, Tran L, Moss B, Dale OB. 2015. Salmon Gill Poxvirus, the Deepest Representative of the Chordopoxvirinae. *Journal of virology*, 89 (18): 9348–9367. DOI 10.1128/JVI.01174-15.
- Go J, Whittington R. 2006. Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, 258 (1-4): 140–149. DOI 10.1016/j.aquaculture.2006.04.033.
- Goodwin AE, Khoo L, LaPatra SE, Bonar C, Key DW, Garner M, Lee MV, Hanson L. 2006. Goldfish Hematopoietic Necrosis Herpesvirus (Cyprinid Herpesvirus 2) in the USA: Molecular Confirmation of Isolates from Diseased Fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18 (1): 11–18. DOI 10.1577/H05-007.1.
- Groff JM, LaPatra SE, Munn RJ, Zinkl JG. 1998. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 10 (4): 375–378. DOI 10.1177/104063879801000415.

- Hanson LA, Rudis MR, Vasquez-Lee M, Montgomery RD. 2006. A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virology journal*, 3: 28. DOI 10.1186/1743-422X-3-28 (Zugriff 17.02.2018).
- Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S. 2007. Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 30 (1): 59–61. DOI 10.1111/j.1365-2761.2007.00778.x.
- He JG, Wang SP, Zeng K, Huang ZJ, Chan S-M. 2000. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases*, 23 (3): 219–222. DOI 10.1046/j.1365-2761.2000.00213.x.
- He JG, Zeng K, Weng SP, Chan S-M. 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical–chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204 (1-2): 11–24. DOI 10.1016/S0044-8486(01)00639-1.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, McDowell T, Waltzek T, O Kelley G, Adkison M. 2005. Initial isolation and characterization of a Herpes-like virus (KHV) from Koi and Common Carp. *Bulletin of the Fisheries Research Agency*, 2: 1–7.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A. 2000. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12 (1): 44–57. DOI 10.1577/1548-8667(2000)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2.
- Hedrick RP, Groff JM, McDowell T, Wingfield WH. 1990. An iridovirus infection of the integument of the white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of aquatic organisms*, 8: 39–44. DOI 10.3354/dao008039.
- Hedrick RP, Groff JM, Okihiro MS, McDowell TS. 1990. Herpesviruses detected in papillomatous skin growths of koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of wildlife diseases*, 26 (4): 578–581. DOI 10.7589/0090-3558-26.4.578.
- Hedrick RP, Speas J, Kent ML, McDowell T. 1985. Adenovirus-Like Particles Associated with a Disease of Cultured White Sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42 (7): 1321–1325. DOI 10.1139/f85-165.
- Hedrick RP, Waltzek TB, McDowell TS. 2006. Susceptibility of Koi Carp, Common Carp, Goldfish, and Goldfish × Common Carp Hybrids to Cyprinid Herpesvirus-2 and Herpesvirus-3. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18 (1): 26–34. DOI 10.1577/H05-028.1.

Hick P, Becker J, Whittington R. 2016. Chapter 8 - Iridoviruses of Fish. In: Kibenge FSB, Godoy MG, Hrsg. Aquaculture virology. London: Academic Press, 127–152.

Hossain M, Kim S-R, Kitamura S-I, Kim D-W, Jung S-J, Nishizawa T, Yoshimizu M, Oh M-J. 2009. Lymphocystis disease virus persists in the epidermal tissues of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch & Schlegel), at low temperatures. *Journal of fish diseases*, 32 (8): 699–703. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01048.x.

Hossain M, Song J-Y, Kitamura S-I, Jung S-J, Oh M-J. 2008. Phylogenetic analysis of lymphocystis disease virus from tropical ornamental fish species based on a major capsid protein gene. *Journal of Fish Diseases*, 31 (6): 473–479. DOI 10.1111/j.1365-2761.2008.00917.x.

ILV VU. o. J. <http://www.la-vetmed.at/site.aspx?menu=pcr> (Zugriff 01.09.2019).

Iwamoto R, Hasegawa O, LaPatra S, Yoshimizu M. 2002. Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14 (2): 114–123. DOI 10.1577/1548-8667(2002)014<0114:IACOTJ>2.0.CO;2.

Jensen BB, Holopainen R, Tapiovaara H, Ariel E. 2011. Susceptibility of pike-perch *Sander lucioperca* to a panel of ranavirus isolates. *Aquaculture*, 313 (1-4): 24–30. DOI 10.1016/j.aquaculture.2011.01.036.

Jeong JB, Kim HY, Jun LJ, Lyu JH, Park NG, Kim JK, Jeong HD. 2008. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. *Diseases of aquatic organisms*, 78 (3): 209–215. DOI 10.3354/dao01879.

Jung SJ, Miyazaki T. 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 18 (3): 211–220. DOI 10.1111/j.1365-2761.1995.tb00296.x.

Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F, Hellmann J, Bergmann SM, Schütze H, Kleingeld DW, Way K, Stone D, Runge M, Keller B, Hesami S, Waltzek T, Steinhagen D. 2015. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC veterinary research*, 11: 114. DOI 10.1186/s12917-015-0424-7.

Jung-Schroers V, Adamek M, Wohlsein P, Wolter J, Wedekind H, Steinhagen D. 2016. First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in

ornamental fish in Germany. *Diseases of aquatic organisms*, 119 (3): 239–244.

DOI 10.3354/dao02995.

Justus-Liebig-Universität Giessen. [https://www.uni-giessen.de/fbz/fb10/institute\\_klinikum/institute/virologie/diagnostik/untersuchungen/untersuchungsverfahren/zellkultur](https://www.uni-giessen.de/fbz/fb10/institute_klinikum/institute/virologie/diagnostik/untersuchungen/untersuchungsverfahren/zellkultur) (Zugriff 01.09.2019).

Kurita J, Nakajima K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses*, 4 (4): 521–538.

DOI 10.3390/v4040521.

Kvitt H, Heinisch G, Diamant A. 2008. Detection and phylogeny of Lymphocystivirus in sea bream *Sparus aurata* based on the DNA polymerase gene and major capsid protein sequences. *Aquaculture*, 275 (1): 58–63. DOI 10.1016/j.aquaculture.2008.01.007.

Langdon JS. 1989. Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 12 (4): 295–310. DOI 10.1111/j.1365-2761.1989.tb00318.x.

Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM. 1988. Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 11 (1): 93–96. DOI 10.1111/j.1365-2761.1988.tb00527.x.

Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM, HYATT AD, WESTBURY HA. 1986. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*, 9 (3): 263–268. DOI 10.1111/j.1365-2761.1986.tb01011.x.

Laue M. 2010. Chapter 1 - Electron Microscopy of Viruses. In: Müller-Reichert T, Hrsg. *Methods in Cell Biology : Electron Microscopy of Model Systems*. : Academic Press, 1–20.

Leland DS, Ginocchio CC. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical microbiology reviews*, 20 (1): 49–78. DOI 10.1128/CMR.00002-06.

Lewis E. 2016. *Viral diseases of Ornamental Fish*.

Lewis E, Gorgoglione B, Way K, El-Matbouli M. 2015. Carp edema virus/Koi sleepy disease: an emerging disease in Central-East Europe. *Transboundary and emerging diseases*, 62 (1): 6–12. DOI 10.1111/tbed.12293.

Lievens B, Grauwet TJMA, Cammue BPA, Thomma BPHJ. 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: A review. *Recent Research Developments in Microbiology*, (9): 57–79.

- 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.). *Journal of fish diseases*, 40 (3): 319–325. DOI 10.1111/jfd.12518.
- McAllister PE, Lidgerding BC, Herman RL, Hoyer LC, Hankins J. 1985. Viral diseases of fish: first report of carp pox in golden ide (*Leuciscus idus*) in North America. *Journal of wildlife diseases*, 21 (3): 199–204. DOI 10.7589/0090-3558-21.3.199.
- Miyazaki T, Asai Y, Kobayashi T, Miyata M. 2000. Lympholeukemia in madai *Pagrus major* in Japan. *Diseases of aquatic organisms*, 40 (2): 147–155. DOI 10.3354/dao040147.
- Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H. 2005. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan. *Diseases of aquatic organisms*, 65 (3): 197–207. DOI 10.3354/dao065197.
- Murakami, Shitanaka, Toshida, Matsuzato. 1976. Studies on mass mortality of juvenile carp: about mass mortality showing edema.
- Nagy É. 2016. Adenoviruses of Fish. In: Kibenge FSB, Godoy MG, Hrsg. *Aquaculture virology*. London: Academic Press, 173–176.
- National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Zugriff 07.09.2019).
- Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Karlsen M, Sæther PA, Arnesen CE, Karlsbakk E. 2008. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of virology*, 153 (7): 1299–1309. DOI 10.1007/s00705-008-0117-7.
- OIE. 2017. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Chapter 2.3.7. Koi Herpesvirus disease. Achteth edition. Paris: World Organisation for Animal Health, xiv, 589.
- Ono S-i, Nagai A, Sugai N. 1986. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. *Fish Pathology*, 21 (3): 167–175. DOI 10.3147/jsfp.21.167.
- Ornamental Aquatic Trade Association LTD. *EU Ornamental Fish Import & Export Statistics 2016. Third Countries & Intra-EU Community trade*. <https://www.ornamentalfishexporters.com/wp-content/uploads/sites/3/2018/01/StatisticsOrnamentalFishEU-Trade-Stats-Report-2016.pdf> (Zugriff 01.09.2019).

- Oyamatsu T, Hata N, Yamada K, Sano T, Fukuda H. 1997. An Etiological Study on Mass Mortality of Cultured Colorcarp Juveniles Showing Edema. *Fish Pathology*, 32 (2): 81–88. DOI 10.3147/jfsp.32.81.
- Paperna I, ILANA SABNAI H, Colorni A. 1982. An outbreak of lymphocystis in *Sparus aurata* L. in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Journal of Fish Diseases*, 5 (5): 433–437. DOI 10.1111/j.1365-2761.1982.tb00500.x.
- Paperna I, Vilenkin M, Matos AP de. 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Diseases of aquatic organisms*, 48 (1): 17–25. DOI 10.3354/dao048017.
- Peeler EJ, Oidtmann BC, Midtlyng PJ, Miossec L, Gozlan RE. 2011. Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Invasions*, 13 (6): 1291–1303. DOI 10.1007/s10530-010-9890-9.
- Pellet, Davison, Eberle, Ehlers, Hayward, Lacoste, Minson, Nicholas, Roizman, Studdert, Wang. 2011. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/) (Zugriff 01.09.2019).
- Perelberg A, Smirnov R, Hutorian M, Diamant A, Bejerano Y, Kotler M. 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. *The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh*, 55. <https://pdfs.semanticscholar.org/97b3/9f58820191d747175817ed35d5e76a70fae6.pdf> (Zugriff 01.09.2019).
- Philbey AW. 2006. Herpesvirus haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) in the UK. *The Veterinary record*, 158 (23): 800–801.
- RICHTLINIE 2006/88/EG. RICHTLINIE 2006/88/EG DES RATES vom 24. Oktober 2006. mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0088&from=en> (Zugriff 19.02.2018).
- Roberts RJ. 2012. *Fish pathology*. Vierteth ed. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell.
- Sales J. 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, 16 (6): 533–540. DOI 10.1016/j.aquiliv.2003.06.001 (Zugriff 18.02.2018).
- Sano T, Morita N, Shima N, Akimoto M. 1991. Herpesvirus cyprini: lethality and oncogenicity. *Journal of Fish Diseases*, 14 (5): 533–543. DOI 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00608.x.

Sivasankar P. 2017. A review on DNA viral diseases of fish. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5 (4): 443–450.

<http://www.fisheriesjournal.com/archives/2017/vol5issue4/PartF/5-4-44-714.pdf> (Zugriff 01.09.2019).

Sriwanayos P, Francis-Floyd R, Stidworthy MF, Petty BD, Kelley K, Waltzek TB. 2013. Megalocytivirus infection in orbiculate batfish *Platax orbicularis*. *Diseases of aquatic organisms*, 105 (1): 1–8. DOI 10.3354/dao02594.

Stephens FJ, Raidal SR, Jones B. 2004. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. *Australian veterinary journal*, 82 (3): 167–169.

ThermoFisher Scientific. 02.03.2019 10:21.

<https://www.thermofisher.com/at/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html#instruction> (Zugriff 01.09.2019).

Uhlenhaut C. 2011. Tenazität von Viren – Stabilität und Erhalt der Infektiosität von Viren. DOI 10.25646/957.

van Beurden S, Engelsma M. 2012. Herpesviruses of Fish, Amphibians and Invertebrates. DOI 10.5772/29575 (Zugriff 15.03.2019).

Verordnung (EG) Nr. 1251/2008. Verordnung (EG) Nr. 1251/2008 der Kommission vom 12. Dezember 2008 zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates hinsichtlich der Bedingungen und Bescheinigungsvorschriften für das Inverkehrbringen und die Einfuhr in die Gemeinschaft von Tieren in Aquakultur und Aquakulturerzeugnissen sowie zur Festlegung einer Liste von Überträgerarten. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?qid=1400751089902&uri=CELEX%3A32008R1251> (Zugriff 19.05.2019).

Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H, Hirono I, Aoki T, Davison AJ, Hedrick RP. 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *The Journal of general virology*, 86 (Pt 6): 1659–1667. DOI 10.1099/vir.0.80982-0.

Waltzek TB, Marty GD, Alfaro ME, Bennett WR, Garver KA, Haulena M, Weber ES, Hedrick RP. 2012. Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*

represents a new megalocytivirus species (family Iridoviridae). *Diseases of aquatic organisms*, 98 (1): 41–56. DOI 10.3354/dao02415.

Whittington RJ, Becker JA, Dennis MM. 2010. Iridovirus infections in finfish - critical review with emphasis on ranaviruses. *Journal of fish diseases*, 33 (2): 95–122. DOI 10.1111/j.1365-2761.2009.01110.x.

Wildy P. 1971. First Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monographs in Virology*, (5): 33–34. DOI 10.1159/isbn.978-3-318-04027-2.

Wirtschaftskammer Österreich.

<https://www.wko.at/branchen/handel/agrarhandel/tiertransport-und-tierschutz.html#traces>  
(Zugriff 01.09.2019).

Xing J, Sheng X, Zhan W. 2006. Lymphocystis disease and diagnostic methods in China. *Aquaculture Asia Magazine*, 11 (1): 30–33. <http://aquaticcommons.org/1433/1/aa-jan-06-web.pdf#page=31> (Zugriff 01.09.2019).

Xu L, Feng J, Huang Y. 2014. Identification of lymphocystis disease virus from paradise fish *Macropodus opercularis* (LCDV-PF). *Archives of virology*, 159 (9): 2445–2449. DOI 10.1007/s00705-014-2060-0.

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Auswertung der ersten Runde PCRs für die Auswahl der Positivkontrollen .....	24
Abb. 2 Auswertung des ersten und zweiten Laufs der zweiten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen.....	25
Abb. 3 Auswertung der dritten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen .....	26
Abb. 4 Auswertung der vierten PCR für die Auswahl der Positivkontrollen.....	27
Abb. 5 Klonierte Amplifikationsprodukte.....	28
Abb. 6 Positive Ergebnisse der untersuchten Feldproben.....	32
Tab. 1 Übersicht über die verwendeten Proben aus Zoofachgeschäften.....	14
Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Proben aus vorangegangenen Projekten der Abteilung für Fischmedizin.....	17
Tab. 3 Vorwärtsprimersequenzen für die zu detektierenden Viren (Hanson et al. 2006) .....	20
Tab. 4 Reverseprimersequenz für die zu detektierenden Viren (Hanson et al. 2006).....	20
Tab. 5 DNA-Amplifikationsprotokoll.....	21
Tab. 6 Liste der verwendeten DNA-Proben.....	22