

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Geflügel und Fische, Abteilung für Fischgesundheit
(Leiterin: Univ.-Prof. Astrid Holzer, PhD.)

**Untersuchung unterschiedlicher Fischarten auf das
Vorhandensein des Carp Edema Virus (CEV) und aus den
Ergebnissen resultierende Schlussfolgerungen**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Verena Seikovits

Wien, im März 2024

Betreuerin: Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl.ECAAH Eva Lewisch

Abteilung für Fischgesundheit

Universitätsklinik für Geflügel und Fische

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Dr. Arne Jungwirth

Konrad-Lorenz-Institut für vergleichende Verhaltensforschung

Abteilung Ornithologie

Department für Interdisziplinäre Lebenswissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken (dazu zählen auch Internetquellen) entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Datum/Ort: Wien am 20.04.2024

Unterschrift: 

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Abkürzungen	ii
Abstract	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Eigenschaften des Virus	1
1.2 Diagnostik von CEV	2
1.3 Methoden zur Behandlung	3
1.4 Anzeichen/Symptome von KSD	3
1.5 Ziel dieser Studie.....	5
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Hintergrund der Studie	7
2.2 Sammeln der Fische	7
2.3 Sektion und Beprobung.....	8
2.4 DNA-Extraktion.....	10
2.5 Real-Time PCR	10
3 Ergebnisse	13
3.1 Sektion	13
3.2 Real-Time PCR Ergebnisse.....	16
3.2.1 Nachweis von CEV	16
3.2.2 Nachweis von cgGluc.....	16
3.2.3 Kontrollen.....	17
3.2.4 Testdurchlauf 1	17
3.2.5 Testdurchlauf 2	20
3.2.6 Testdurchlauf 3	22
4 Diskussion.....	25
5 Zusammenfassung	33
6 Literaturverzeichnis	35
7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	40

Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank an alle aussprechen, die mich während der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben und zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Ohne die Unterstützung der Stadtgemeinde Saalfelden, und hier insbesondere von Herrn Bernhard Pfeffer, sowie dem Bewirtschafter des Ritzensees, Herrn Georg Grander, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Beiden möchte ich ganz herzlich für ihr Engagement danken. Zusätzlich bedanke ich mich bei Herrn Rene Huber für die Bereitstellung der Wassertemperaturen des Ritzensees.

Der Landesfischereiverband Salzburg hat diese Arbeit finanziell unterstützt. Ein großer Dank geht hier an den Verband und insbesondere an Frau Mag. Daniela Latzer.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin, Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl.ECAAH Eva Lewisch. Von ihr stammt die Idee zu dieser Arbeit, die mich für die Fischmedizin begeistern konnte. Auch für die stets freundliche Unterstützung und konstruktiven Ratschläge möchte ich mich bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Mag.rer.nat Adina Friedl MSc und Dr.med.vet Karoline Lipnik für ihre stets geduldige Unterstützung während dem praktischen Teil dieser Arbeit bedanken. Ihre fachliche Expertise war ein entscheidender Faktor für den Erfolg dieser Arbeit.

Und zu guter Letzt bei meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. Danke, dass ihr auch in schwierigen Zeiten immer für mich da seid und an mich glaubt, ohne euch wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Abkürzungen

CEFAS	Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science
CEV	Carp Edema Virus
CEVD	Carp Edema Virus Disease
cgGluc	Karpfen-Glucoginase
IgM	Immunglobulin M
IPN	Infektiöse Pankreasnekrose
KSD	Koi Sleepy Disease
N/A	No Amplification
NE	Negative Extraction Control
NTC	Non-template Control
PaPV	<i>Plecoglossus altivelis</i> Poxvirus
SGPV	Salmonid Gill Poxvirus
SHPV	Seahorse Poxvirus
Tcr a2	T-Zell-Rezeptor a2
VHSV	Virales Hämorrhagisches Septikämie Virus
WOAH	World Organisation of Animal Health

Abstract

Emerging outbreaks of the carp edema virus disease (CEVD, or koi sleepy disease, KSD) with high morbidity and mortality rates are a major threat to common carp and koi populations all over the world. Since the discovery of the carp edema virus (CEV) in Japan in the 1970s, the poxvirus was able to spread to large parts of Europe and America as well. Although KSD is one of the most important common carp diseases with considerable risk to the productivity of common carp and koi worldwide, there is still a lack of knowledge concerning factors of virus transmission and host range. While pathogenicity is only known in relation to carp and koi, other fish species commonly kept together with carp, may also act as reservoirs, hosts and/or vectors. In this study the aim was to further investigate a possible transmission of CEV under natural conditions. We investigated six fish species (n = 76 total fish) commonly kept together with carp in European waters. All fish originated from a small Austrian lake called "Ritzensee", where spring mortalities of carp due to KSD had happened in recent years. Tissue samples from the skin and gills were tested for the presence of CEV-DNA with Real-Time qPCR. There was no detection of CEV in any native fish or common carp.

Ausbrüche der Ödemkrankheit der Karpfen (Carp Edema Virus Disease, CEVD, oder Koi Sleepy Disease, KSD) treten üblicherweise mit hoher Morbidität und Mortalität auf und stellen eine große Bedrohung für Koi- und Karpfenpopulationen auf der ganzen Welt dar. Seit dem ersten Nachweis des verursachenden Poxvirus in Japan 1974, konnte sich das Carp Edema Virus (CEV) auch in weiten Teilen Europas und Amerika verbreiten. Obwohl diese Viruserkrankung somit eine der bedeutendsten Karpfenkrankheiten weltweit ist, ist immer noch wenig über Faktoren der Virusübertragung und das Wirtsspektrum von CEV bekannt. Während die Pathogenität nur in Verbindung mit *Cyprinus carpio* nachgewiesen wurde, könnten andere Fischarten, die üblicherweise zusammen mit Karpfen gehalten werden, ebenfalls eine Rolle als Reservoir, Wirt und/oder Vektor des Virus spielen. Ziel dieser Studie war es, die Übertragung von CEV unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen. Dafür wurden sechs Fischarten (n = 76 Fische insgesamt) getestet, die in europäischen Gewässern häufig zusammen mit Karpfen gehalten werden. Alle Fische stammen aus einem kleinen österreichischen See, dem Ritzensee, wo es in den letzten Jahren zu Frühjahrssterben von Karpfen aufgrund von KSD gekommen war. In der vorliegenden Studie wurden Gewebeprobe von Haut und Kiemen dieser Fische mittels Real-Time qPCR auf das Vorhandensein von CEV-DNA untersucht. Bei keinem der heimischen Fische oder Karpfen konnte CEV nachgewiesen werden.

1 Einleitung

Die Ödemkrankheit der Karpfen (Carp Edema Virus Disease, CEVD) wurde erstmals 1974 in Japan beschrieben, wo es zu Krankheitsausbrüchen in jungen Koi Populationen, der farbigen Zuchtform des Karpfens (*Cyprinus carpio*) kam (1). Aufgrund der typischen Symptome wie Lethargie und Teilnahmslosigkeit ist die Krankheit auch als Schlafkrankheit der Karpfen (engl.: Koi sleepy disease, KSD) bekannt (2). Mittlerweile hat sich diese Bezeichnung für die Erkrankung bei Koi und Karpfen durchgesetzt. Der Erreger ist ein Poxvirus, das Carp Edema Virus (CEV). Nachdem Infektionen mit diesem Virus längere Zeit auf Japan beschränkt waren, wurden schließlich 1997 auch in Amerika Ausbrüche von KSD nachgewiesen (3). In Europa wurde das Virus erstmals im Jahr 2009 in England festgestellt (4). Darauf folgten viele andere europäische Länder wie die Niederlande, Frankreich (5), Österreich (6), Deutschland (7), Polen (8) und Ungarn (9). Auch in weiteren Teilen Asiens wie China (10), Indien (11) und Thailand (12) wurde von Infektionen mit CEV von Koi und Karpfen berichtet.

Süßwasserfische, insbesondere Cypriniden, sind weltweit eine wichtige Nahrungsquelle. Der Karpfen (*Cyprinus carpio*) ist die am häufigsten gezüchtete Cyprinidenart und gehört zu den wirtschaftlich wertvollsten Arten in der Aquakultur (13). Neben der Produktion für den menschlichen Verzehr werden in Aquakulturen erzeugte Karpfen auch häufig in Angelgewässern eingesetzt. Zierarten von *C. carpio* wie Koifische, die für den Haustier-Fischmarkt produziert werden, stellen einen der teuersten Märkte für einzelne Süßwasserfische dar (14). Der internationale Handel mit Koi hat zur weltweiten Ausbreitung von KSD geführt, zumal Krankheitsausbrüche oft unerkannt blieben aufgrund von Sekundärinfektionen oder subklinischen Infektionen (15). Die hohen Ausfälle in Koi- und Karpfenbeständen bedingt durch KSD stellen somit nicht nur eine finanzielle Bedrohung für ZüchterInnen dar, sondern sind auch eine Gefahr für die globale Lebensmittelsicherheit (16).

1.1 Eigenschaften des Virus

Die KSD tritt bei Koi üblicherweise in Wassertemperaturen zwischen 15 und 25 °C auf, mit einer kumulativen Mortalität von 75–100 % innerhalb von zwei–drei Wochen (2,15). Bei

Karpfen und Koi in England und Österreich wurden auch Ausbrüche bei niedrigeren Wassertemperaturen von 7–15 °C beobachtet (4,6).

Der Krankheitserreger der KSD ist ein doppelsträngiges DNA-Poxvirus der Familie *Poxviridae* und Subfamilie *Chordopoxvirinae* (16,17). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von infiziertem Kiemengewebe zeigen ca. 400 nm große zytoplasmatische Viruspartikel oder Virionen mit einer typisch pockenartigen Maulbeerform (2). Obwohl die Krankheit üblicherweise mehrere Organe betrifft, sind die Kiemen der primäre Ort für das Eindringen, die Replikation und die Pathogenität des Virus (17).

Phylogenetische Analysen der Nukleotidsequenz offenbarten die Existenz von drei verschiedenen Genogruppen aus zwei Linien: Genogruppen I, IIa und IIb, mit einer genetischen Varianz von 6–10 %. Die Genogruppe I wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit Infektionen bei Zuchtkarpfen festgestellt, während die Genogruppe IIa überwiegend, aber nicht ausschließlich, bei Koi nachgewiesen wurde (17). Die Genogruppe IIb wurde 2017 in einigen Karpfenproben aus Polen entdeckt. Es wird vermutet, dass das CEV der Genogruppe IIa über den Koi-Handel weltweit verbreitet wurde und wahrscheinlich wiederholt aus Japan nach Europa eingeführt wurde (8). Eine weitere Genogruppe III wurde 2019 beschrieben, der aber bisher noch keine Isolate zugeordnet werden konnten. Zusätzlich konnten die Ergebnisse in aufbauenden Studien nicht repliziert werden, weshalb sie von fraglicher Relevanz sind (18,19)

1.2 Diagnostik von CEV

Die Kultivierung des Virus *in vitro* war bisher nicht erfolgreich und lange Zeit war nur ein kurzes Fragment der DNA-Sequenz bekannt. Phylogenetische Untersuchungen und molekulargenetische Nachweismethoden beschränkten sich daher auf das Kernprotein P4a codierende Gen (8,17). Mittlerweile konnte eine japanische Forschungsgruppe große Teile der kompletten Genomsequenz von CEV-Isolaten, welche von Koi stammten und der Genogruppe IIa angehören, publizieren (20).

1.3 Methoden zur Behandlung

Eine gängige Methode zur Behandlung von KSD, die vor allem von japanischen Koizüchterinnen und -züchtern angewandt wird, sind langanhaltende Salzbäder bei einer Konzentration von 0,5 %. Solche Bäder zeigten sich schon effektiv bei Protozoenbefall der Kiemen und der Hautoberfläche von Fischen (2). Diese Behandlung verhindert zwar das Auftreten von Symptomen, garantiert aber nicht die Eradikation des Virus. Der Handel mit asymptomatisch infizierten Fischen war vermutlich ein entscheidender Faktor bei der globalen Verbreitung des Virus (17). Eine weitere Methode zur Behandlung beziehungsweise Vorbeugung von KSD-Ausbrüchen ist die Erhöhung der Wassertemperatur, da CEV temperaturabhängig ist. Ab Temperaturen von 28 °C wird das Virus inaktiviert, was sich in einer deutlichen Abnahme der Mortalität- und Morbiditätsrate zeigt (21). Das Virus kann jedoch weiterhin fortbestehen und bei Senkung der Wassertemperatur wieder infektiös werden (16).

Generell ist es von Bedeutung, gute Hygienemaßnahmen und Biosicherheit im Betrieb zu etablieren, sodass einem Ausbruch von Krankheiten einschließlich KSD vorgebeugt wird (16). Dazu gehören die Quarantäne und das Testen von Neuankömmlingen, die Vermeidung von Überbesatz und Stress, die Aufrechterhaltung einer guten Wasserqualität und die Bereitstellung einer hochwertigen Ernährung. Die empfohlene Quarantänezeit beträgt mindestens 30 Tage bei einer konstanten Temperatur zwischen 15 und 25 °C (15,22). Abgesehen von diesen Kontrollmethoden gibt es derzeit keine Therapie für KSD (21).

1.4 Anzeichen/Symptome von KSD

Wie der Name "Schlafkrankheit der Karpfen" schon andeutet, ist das typischste klinische Symptom die ausgeprägte Lethargie und mangelnde Reaktionsfähigkeit. Während sich junge erkrankte Karpfen üblicherweise an der Wasseroberfläche sammeln, tendieren ältere Karpfen dazu, am Boden des Teichs zu liegen, manchmal zur Seite gekippt, als würden sie schlafen (2,16). Äußerliche Anzeichen einer Erkrankung, die vor allem bei jungen Koi beobachtet werden, sind großflächige Erosionen und Blutungen der Haut mit Ödemen des darunter liegenden Gewebes (2). Außerdem kann es zu einer überschießenden Produktion von Haut- und

Kiemenschleim kommen (10) und, besonders bei ausgewachsenen Fischen, zu Enophthalmus (ingesunkene Augen), Anorexie, Ulcera um das Maul und am Flossenansatz, blassen ödematisierten Kiemen und Entzündung des Afters (2,6,15).

Die schwerwiegendsten Veränderungen sind im Kiemengewebe zu beobachten, wo die Replikation des Virus hauptsächlich stattfindet und die höchste Viruslast zu finden ist. Eine Infektion mit CEV führt zu Hypertrophie und Proliferation der branchialen Epithelzellen, einem Verschluss der branchialen interlamellaren Räume, Verschmelzung der Sekundärlamellen und Nekrosen (23,24). Dadurch werden nicht nur die respiratorischen, sondern auch die exkretorischen und osmoregulatorischen Funktionen der Kiemen eingeschränkt. Die Oxygenierung des Blutes wird verhindert, wodurch der CO₂-Gehalt im Gewebe ansteigt. Das wird durch eine Verschiebung vom sauerstoffabhängigen zum sauerstoffunabhängigen Metabolismus kompensiert, was sich im Blut in einem Rückgang des Zitronensäure- und Nukleotidgehalts widerspiegelt (23). Außerdem kommt es durch das geschädigte Kiemengewebe zu einem erhöhten Ionenverlust, was zu Hyponatriämie (23), Hypochlorämie (24) und Hypokalziämie führt. Weitere Zellschädigungen lösen eine Hyperkaliämie aus. Die Beeinträchtigung der Ammoniaksekretion macht sich durch eine Hyperammonämie bemerkbar. Dies führt zu einer Unterbrechung des Aminosäureabbaus und einem verstärkten Harnstoffzyklus, wodurch der Gehalt an Aminosäuren, Harnstoff und Harnsäure im Blut ansteigt. Hyponatriämie und Hyperammonämie könnten mit dem Einstrom von Wasser in das Gehirn und einer Immunsuppression verbunden sein, die sich in einer Herabregulierung der Expression von Immunmarkern wie CD4 (Oberflächenprotein von T-Helferzellen), Caspase 9 und tcr a2 (T-Zell-Rezeptor a2) in Kiemen und Nieren, sowie IgM (Immunglobulin M) in Kiemen zeigt. Das Virus unterdrückt somit die T- und B-Zell Immunantwort, wodurch betroffene Fische anfälliger für Sekundärinfektionen werden (23). Hyponatriämie und Hypochlorämie äußert sich im Allgemeinen durch Lethargie, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Muskelschwäche, vermindertes Bewusstsein und/oder Koma als Folge eines Hirnödems, was gut zu dem Krankheitsbild passt (24).

1.5 Ziel dieser Studie

Ausbrüche der Krankheit mit klinischer Manifestierung wurden bisher nur im Zusammenhang mit *Cyprinus carpio* inklusive deren farbigen Zuchtformen (Koi) beobachtet. Die Übertragung von Fischviren kann horizontal entweder direkt (von Fisch zu Fisch) erfolgen oder durch Vektoren vermittelt werden, wobei das Wasser als bedeutendster abiotischer Vektor fungiert. Es ist jedoch möglich, dass auch lebende Vektoren wie andere Fischarten, parasitäre Wirbellose sowie fischfressende Vögel und Säugetiere an diesem Übertragungsprozess beteiligt sind, wie es bei anderen Viruserkrankungen der Fische bekannt ist. Jedoch wurden Fischarten, die in Gewässern üblicherweise gemeinsam mit Karpfen gehalten werden, als mögliche Wirte, Reservoirre und/oder Vektoren von CEV noch nicht ausreichend untersucht (25).

Eine polnische Studie aus dem Jahr 2018 von Matras *et al.* lieferte Einblicke in die horizontale Übertragung von CEV über Vektoren, die andere Fischarten als Karpfen sind. Bei dieser Studie wurden sechs in Europa vorkommende Fischarten (*Alburnus alburnus* (Laube, Ukelei), *Carassius carassius* (Karasche), *Carassius gibelio* (Giebel), *Rutilus rutilus* (Rotauge), *Tinca tinca* (Schleie) und *Perca fluviatilis* (Flussbarsch)) nach Kohabitation mit CEV-positiven Karpfen in einer Laborumgebung positiv für CEV getestet, allerdings ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. Trotz fehlender Expression klinischer Symptome können diese Arten als Vektoren infrage kommen (25).

Zusätzlich konnte in einer unveröffentlichten Studie von Bergmann *et al.* im Jahr 2016 die Übertragung von CEV von infizierten Koi auf andere Fischarten nachgewiesen werden. Nach Kohabitation mit Karaschen (*Carassius carassius*), Goldfischen (*Carassius auratus*), Goldorfen (*Leuciscus idus*) und Karpfen (*C. carpio*) bei 22 °C zeigten Vertreter aller Arten klinische Anzeichen von KSD. Von den Goldfischen und Goldorfen wurde jeweils einer der beiden Testfische positiv auf CEV getestet. Bei den verwendeten Koi, Karpfen und Karaschen konnte sowohl CEV nachgewiesen werden, als auch eine klinische Erkrankung festgestellt werden. In einem zweiten Kohabitations-Versuch wurde das Virus von allen genannten Fischarten auf Karpfen und Karaschen übertragen. Demnach kämen Vertreter dieser Arten als Vektoren von CEV infrage. Leider wurde diese Untersuchung nie publiziert, weshalb die Methoden und Ergebnisse schwer nachvollziehbar sind.

In einer späteren Studie aus den USA wurde während eines Karpfensterbens in einem See in Minnesota untersucht, ob native Fische auch unter natürlichen Bedingungen für CEV empfänglich sind. Obwohl in der Karpfenpopulation eine hohe CEV-Viruslast nachgewiesen wurde, war keine der fünf untersuchten Fischarten und Amphibien *Pimephales promelas* (Amerikanische Dickkopfelritze), *Lithobates pipiens* (Leopardenfrosch-Kaulquappen), *Culaea inconstans* (Nordamerikanischer Bachstichling), *Lepomis cyanellu* (Grasbarsch), *Lepomis gibbosus* (Gemeiner Sonnenbarsch)) positiv auf CEV. Allerdings konnte in Regurgitations- und Kotproben einer Kormoran-Art (*Nannopterum auritus*, Ohrenscharben) CEV-DNA festgestellt werden. Sie kommen somit auch als potenzielle Vektoren infrage (26).

Bei einer Versuchsreihe mit verschiedenen Karpfenstämmen zeigte sich, dass es auch innerhalb der Art Unterschiede in der Anfälligkeit für CEV und der Entwicklung von KSD gibt. So stellte sich heraus, dass der Amur Karpfen weitaus resistenter gegen Infektionen mit CEV ist und es zu keiner Ausprägung von klinischen Anzeichen kommt. Ein Besatz mit diesem Karpfenstamm oder Kreuzungen weniger anfälligerer Stämme könnte den hohen Verlusten durch KSD vorbeugen (17).

Insgesamt lässt sich aber feststellen, dass überraschend wenig über mögliche Überträgerarten und Virusreservoirs für das CEV bekannt ist. Daher wurden für diese Studie sechs Fischarten mittels Real-Time PCR auf eine Infektion mit CEV getestet. Die untersuchten Arten werden in europäischen Gewässern häufig zusammen mit Karpfen gehalten und kommen somit als alternative Vektoren der Krankheit infrage. Die Fische stammen aus einem österreichischen See, in dem es in vergangenen Jahren zu massivem Karpfensterben im Zuge von CEV-Infektionen gekommen war. Ein besseres Verständnis der Übertragungsmechanismen und lebenden Vektoren ist ein wichtiger Schritt, um die Ausbreitung des Virus zu begrenzen.

2 Material und Methoden

2.1 Hintergrund der Studie

Alle Fische, die für diese Studie herangezogen wurden, stammen aus dem “Ritzensee”, einem künstlich angelegten See in Saalfelden im österreichischen Bundesland Salzburg, in der Gemeinde Saalfelden. In den vergangenen Jahren ist es im Ritzensee zu Frühjahrssterben von Karpfen gekommen und CEV bei verendeten Karpfen nachgewiesen worden. Im Frühjahr 2023 war das Abfischen verschiedener überhandnehmender Weißfische notwendig, um das ökologische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Aufgrund eines potenziellen Übertragungsrisikos konnten diese Fische nicht in andere Gewässer verbracht werden und wurden daher der Abteilung für Fischgesundheit der Veterinärmedizinischen Universität in Wien für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

2.2 Sammeln der Fische

Alle Fische wurden von der Gemeinde Saalfelden und dem Bewirtschafter zur Verfügung gestellt. Es sollten unterschiedliche Arten von überhandnehmenden Weißfischen im Frühjahr, wenn sie zum Laichen die flacheren Uferzonen aufsuchen, abgefischt werden. Witterungsbedingt erfolgte das Ablachen im Ritzensee erst gegen Ende Mai 2023. Die Wassertemperaturen im Ritzensee betragen im April 2023 zwischen 8,6 °C und 13 °C. Auch in den ersten drei Maiwochen blieb die Wassertemperatur unter 18 °C mit einer Durchschnittstemperatur von 16,5 °C. In der letzten Maiwoche stiegen die Temperaturen auf durchschnittlich 18,9 °C und erreichten somit geeignete Werte, um ein Ablachen zu ermöglichen. Die Fische wurden mittels Elektrofischen entnommen und von einem lokalen Tierarzt nach Betäubung mit Strom euthanasiert. Anschließend wurden sie tiefgefroren, wobei keine individuelle Verpackung erfolgte, sondern alle Fische auf zwei Pakete aufgeteilt und tiefgefroren wurden. Der Versand erfolgte durch den Expressdienst der österreichischen Post und die Fische trafen in noch tiefgefrorenem Zustand an der Abteilung für Fischgesundheit ein. Insgesamt enthielt die Sendung Fische von sieben verschiedenen Arten und einen Signalkrebs.

Für die Untersuchungen wurden 76 Fische verwendet: 28 Rotfedern (*Scardinius erythrophthalmus*), acht Rotaugen (*Rutilus rutilus*), zwei Giebel (*Carassius gibelio*), ein Europäischer Wels (*Silurus glanis*), 30 Flussbarsche (*Perca fluviatilis*), fünf Kaulbarsche (*Gymnocephalus cernua*), zwei Schuppenkarpfen (*Cyprinus carpio*) und ein Signalkrebs (*Pacifastacus leniusculus*). Von den Flussbarschen waren mehr als 30 Fische vorhanden und vorerst nicht benötigte Tiere wurden für etwaige Beprobungen zu einem späteren Zeitpunkt bei -20 °C gelagert. Von allen anderen Fischarten wurden alle eingesendeten Individuen verwendet.

2.3 Sektion und Beprobung

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Tiere, der Art entsprechend, in Gruppen von maximal fünf Individuen eingeteilt. Jedes Tier wurde abgemessen und gewogen und die Ergebnisse des größten und schwersten bzw. des kleinsten und leichtesten Individuums der Gruppe notiert (Tab. 4). Anschließend wurden bei den Fischen Proben von den Kiemen und der Kopfniere jedes Tieres entnommen. Von der Haut wurden Epidermis und Hautschleim durch Schaben entlang der Körperseite mit einer sterilen Skalpellklinge gewonnen und in 2 ml Eprouvetten überführt. Nach Entfernung des Kiemendeckels wurde der Zustand der Kiemen makroskopisch beurteilt und Kiemegewebe steril entnommen. Nach Eröffnung der Körperhöhle wurden die Organe des Verdauungs- und Reproduktionstraktes entfernt und die Niere freigelegt. Von der Kopfniere wurde sodann Gewebe für die Untersuchung entnommen. Von dem Signalkrebs (*P. leniusculus*) wurden ebenfalls Proben von Teilen des Panzers (Ext.) und, nach Eröffnung der Leibeshöhle, der Organe (Int.) gewonnen. Alle Proben wurden von jedem einzelnen Tier und jedem Organ steril entnommen, sodass die Kontamination von Gewebe mit DNA von anderen Fischen oder anderem Gewebe ausgeschlossen wurde. Von jeder Gewebeart (Haut, Kiemen, Kopfniere) wurden sowohl Pools von maximal fünf Fischen als auch Einzelproben gewonnen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht mehr als 50 mg Material enthielten. Die Einzelproben wurden vorerst bei -20 °C archiviert und sollten dazu dienen, im Falle von positiv getesteten Pools die Anzahl der tatsächlich positiven Fische zu eruieren (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die Anzahl der beprobten Fische in den jeweiligen Poolproben

Probennummer	Artbezeichnung Deutsch	Artbezeichnung Latein	Anzahl der beprobten Fische
23/061	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	5
23/062	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	5
23/063	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	5
23/064	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	5
23/065	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	2
23/066	Rotaugen	<i>Rutilus rutilus</i>	4
23/067	Giebel	<i>Carassius gibelio</i>	2
23/068	Wels	<i>Silurus glanis</i>	1
23/069	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/070	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/071	Kaulbarsch	<i>Gymnocephalus cernua</i>	5
23/072	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/073	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/074	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/075	Flussbarsch	<i>Perca fluviatilis</i>	5
23/076	Rotaugen	<i>Rutilus rutilus</i>	4
23/077	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	3
23/078	Rotfeder	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	3
23/079	Schuppenkarpfen	<i>Cyprinus carpio</i>	2

23/080	Signalkrebs	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	1
--------	-------------	-------------------------------------	---

2.4 DNA-Extraktion

Alle gepoolten Gewebeproben von Haut und Kiemen wurden mithilfe eines TissueLyser (TissueLyser II, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) homogenisiert und die DNA mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die DNA wurde in 50 µl Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer eluiert. Zusätzlich wurde bei jeder DNA-Extraktion eine Negativkontrolle angesetzt. Hierzu wurde statt Gewebe 100 µl steriles PCR-Wasser (ddH₂O) in eine 2 ml Epprovette pipettiert und mit den übrigen Proben mitgeführt. Die Poolproben der Kopfnieren wurden für etwaige spätere Untersuchungen tiefgefroren (-20 °C) archiviert.

2.5 Real-Time PCR

Alle Proben wurden mittels Real-Time PCR auf CEV unter Verwendung eines kommerziellen QuantiTect Probe PCR-Kits getestet. Das verwendete Protokoll wurde vom Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) in Weymouth, Großbritannien, entwickelt und 2017 von Matras *et al.* (8) veröffentlicht. Bei der Entwicklung des Assays wurde CEV-spezifische DNA von Karpfen und Koi herangezogen. Er zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus, da CEV-DNA beider Genogruppen nachgewiesen werden kann. Durch die Quantifizierung können außerdem auch positive Proben mit einer geringen Viruslast diagnostiziert werden (16). Proben werden als positiv gewertet, sobald sich ein spezifisches Signal durch die Amplifizierung der CEV-DNA zeigt, unabhängig von der Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um den Schwellenwert zu erreichen. Proben, bei denen keine CEV-DNA detektiert und amplifiziert werden kann, gelten als negativ (8,27). Die Assays wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt, bestehend aus Vorwärts-CEV qFor1 (5'-AGTTTGTAKATTGTAGCATTTC-3') und Rückwärts-CEV qRev1 (5'-GATTCCTC AAGGAGTTTDCAGTAAA-3') Primern, der CEV qProbe1 (5'-AGAGT

TTGTTTCTTGCCATACAAACT-3'), dem QuantiTect Probe PCR Mastermix, und sterilem H₂O. Dem Reaktionsmix wurden anschließend 5 µl der zuvor extrahierten DNA beigelegt (Tab. 2).

Zusätzlich wurde ein zweiter Assay verwendet, der auf die exonische Sequenz der Karpfen-Glucokinase (cgGluc) abzielt, ein bekanntes single copy-Gen des Karpfens. Dieser Real-Time PCR wurde nach dem Protokoll von Gilad *et al.* (2004) (28) durchgeführt. Dieser TaqMan-Assay diente als genomische DNA-Extraktionskontrolle, um zu verifizieren, dass in jeder Probe eine ausreichende Anzahl an Wirtszellen enthalten ist. Der Reaktionsmix hierfür bestand aus Vorwärts- cgGluc-162f (5'-ACTGCGAGTGGAGACACATGAT-3') und Rückwärtsprimern cgGluc-230r (5'-TCAGGTGTGGAGCGGACAT-3'), der Probe cgGluc-185p (5'AAGCCAGTGTCAAAATGCTGCCCACT-3'), TaqMan PCR Mastermix und sterilem H₂O (28) (Tab. 3).

Beide Assays wurden mit dem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad-Laboratories GmbH, Österreich, Österreich) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst 15 Minuten lang bei 95 °C gehalten und durchliefen dann 45 Temperaturzyklen von 30 Sekunden bei 95 °C und anschließend eine Minute bei 55 °C.

Für jeden Testdurchlauf wurde eine Positivkontrolle für CEV, die negative Extraktionskontrolle (NE) und eine Negativkontrolle der Reaktionsmische (NTC) mitgeführt. Die Kontrollen dienen zur Überprüfung, ob Kontaminationen während der Aufbereitung stattgefunden haben, beziehungsweise ob der Reaktionsmix geeignet zum Nachweis des CEV-Virus ist.

Tab. 2: Reaktionsmix für CEV

ddH ₂ O	4,5 µl
Quanti Tect Probe PCR Puffer	12,5 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Probe (4 pmol/ µl)	1 µl
DNA	5 µl

Tab. 3: Reaktionsmix für cgGluc

ddH ₂ O	4,5 µl
Taqman Mastermix	12,5 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Probe (2 pmol/µl)	1 µl
DNA	5 µl

3 Ergebnisse

3.1 Sektion

Vor der Sektion wurde der Zustand der Fische adspektorisch anhand der Hautoberfläche und Augentrübung beurteilt. Die Fische wiesen vereinzelt leichte Trübungen der Hornhaut und eingefallene Augen auf. Anderweitige autolytische Veränderungen konnten nicht festgestellt werden. Anschließend wurde der Kiemendeckel vorsichtig entfernt und die Kiemenbögen beurteilt. Vor allem kleinere Fische wiesen im Vergleich zu ihrem üblichen Erscheinungsbild geringgradig blässere Kiemen auf, was auf mögliche Frostschäden durch das Einfrieren hinweisen könnte. Ein Karpfen zeigte blasse, lokal skelettierte Kiemen (Abb. 1). Bei der Beurteilung der Organe innerhalb der Körperhöhle zeigten einige Flussbarsche Auffälligkeiten an der Leber. Fünfzehn der 30 Individuen wiesen ggr.–hgr. granulomatöse Veränderungen der Leber auf (Abb. 2). Weiterführende Untersuchungen (Bakteriologische Untersuchung, histologische Untersuchung), welche nicht Gegenstand dieser Studie waren, zeigten dass es sich dabei um Gewebsreaktionen auf parasitäre Infektionen handelte. Insgesamt konnten keine Hinweise auf eine Infektion mit KSD oder andere Pathologien festgestellt werden. Die beobachteten Veränderungen wurden, abgesehen von den Veränderungen in den Flussbarsch-Lebern, der Tötungsmethode, dem Tieffrieren sowie autolytischen Vorgängen zugeschrieben. Der Zustand der eingesandten Fische wurde als zufriedenstellend und für eine Probenentnahme geeignet bewertet.

Beim Abmessen und -wiegen der Individuen ergaben die Rotfedern Körpergrößen zwischen 10 cm und 21 cm mit einer Spannweite von 11 cm und Körpergewichte von 8,5 –138 g bei einer Spannweite von 129,5 g. Die Rotaugen waren zwischen 10 cm und 12 cm groß (Spannweite: 2 cm) und 11,3–21,5 g schwer (Spannweite: 10,2 g). Die beiden Giebel hatten eine Körperlänge von 17 cm bzw. 19 cm. (Spannweite: 2 cm) und wogen 62,5 g und 87,1 g (Spannweite: 24,6 g). Die Flussbarsche waren zwischen 7,2 cm und 12,5 cm lang (Spannweite: 5,3 cm) und wogen 4–24,6 g (Spannweite: 20,6 g). Die Körperlänge der Kaulbarsche lag bei 7,5–8,5 cm (Spannweite: 1 cm) und das Gewicht zwischen 4,1 g und 6,6 g (Spannweite: 2,5 g). Die Schuppenkarpfen waren 36 cm und 38 cm lang (Spannweite: 2 cm) und 1,1 kg bzw. 1,14 kg

schwer (Spannweite: 40 g). Der Signalkrebs hatte eine Länge von 8 cm und ein Gewicht von 5,3 g. (Tab. 4)



Abb. 1: Karpfen mit dunkelrotem Bereich am äußeren Kiemenbogen



Abb. 2: Flussbarsch mit granulomartigen Veränderungen der Leber

Tab. 4: Gewicht und Größe der verschiedenen untersuchten Arten

Art	Größe (in cm)	Spannweite (in cm)	Gewicht (in g)	Spannweite (in cm)
Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>		11		129,5
23/061	11–21		10,7–18	
23/062	11–12		12,4–138	
23/063	10–13		11,8–22,5	
23/064	13–16		17–47,3	
23/065	12; 12		14,6; 14,3	
23/077	10–14		8,5–26,7	
23/078	11,5–18		15–67,3	
Rotauge <i>R. rutilus</i>		2,5		10,2
23/066	10,5–12		13,4–19,9	
23/076	10–12,5		11,3–21,5	
Giebel <i>C. gibelio</i>		2		24,6
23/067	17; 19		62,5; 87,1	
Europäischer Wels <i>S. glanis</i>		/		/
23/068	25		19,6	
Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>		5,3		20,6
23/069	7,5–8,5		4–6,9	
23/070	10–12,5		10,3–24,6	
23/072	7,5–9		4,3–7,8	
23/073	8–11		6,3–13,8	
23/074	8–8,5		5,3–5,8	
23/075	7,2–8		4,8–5,9	

Kaulbarsch <i>G. cernua</i>		1		2,5
23/071	7,5–8,5		4,1–6,6	
Schuppenkarpfen <i>C. carpio</i>		2		40
23/079	36; 38		1100; 1140	
Signalkrebs <i>P. leniusculus</i>		/		/
23/080	8		5,3	

3.2 Real-Time PCR Ergebnisse

3.2.1 Nachweis von CEV

Insgesamt wurden 20 Pools von Hautproben und 20 Pools von Kiemenproben von insgesamt 76 Fischen, sieben verschiedener Arten, sowie eine Gewebeprobe von den Organen und eine von Teilen des Panzers eines Süßwasser-Krebse (*P. leniusculus*) auf CEV untersucht. Alle Proben zeigten kein spezifisches Signal auf CEV-DNA, da die Amplifikation den Schwellenwert für den Nachweis nicht vor Ende der Zyklen überschritt und wurden somit als negativ gewertet. Sie wurden in insgesamt drei Testdurchläufen untersucht; für eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse siehe Abb. 3–6 auf Seiten 18–26.

3.2.2 Nachweis von cgGluc

Die Inhibitionskontrolle mit Primern, die auf Karpfen-Glucoginase abzielen, zeigte je nach Fischart und Gewebe unterschiedlich hohe CT-Werte. Die Poolproben der Haut zeigten spezifische Signale bei CT-Werten von 23,38 bis 35,37. Der niedrigste Wert war bei der Poolprobe der Schuppenkarpfen zu erkennen, der höchste Wert bei einer Probe von Flussbarschen. Grundsätzlich zeigten Cypriniden-Arten niedrigere CT-Werte als Vertreter anderer Arten, wobei Gewebe von Fischen der Ordnung *Perciformes* (Barschartige) die höchsten CT-Werte zeigten und das Gewebe des Signalkrebs gar nicht auf die cgGluc targeting

Primer ansprach. Auch bei den Poolproben der Kiemen machte sich diese Tendenz bemerkbar. Hier reichten die CT-Werte von 21,65 bei einer Poolprobe der Schuppenkarpfen bis 35,28 bei einer Poolprobe von Flussbarschen. Eine Kiemenprobe von Rotaugen (23/066) sowie eine von Flussbarschen (23/070) ergaben kein Signal, weshalb sie erneut untersucht wurden. Im zweiten Testdurchlauf zeigte die Probe der Rotaugen ein spezifisches Signal bei einem CT-Wert von 27,52, während die Probe der Flussbarsche erneut nicht amplifiziert werden konnte.

3.2.3 Kontrollen

Für CEV: Die Negativkontrollen waren bei allen Durchläufen negativ. Die Positivkontrollen zeigten spezifische Signale zwischen CT-Werten von 21,58 und 22,26.

Für cgGluc: Eine der Negativ-Extraktionskontrollen zeigte ein spezifisches Signal bei einem CT-Wert von 38,03, was auf eine leichte Kontamination der Kontrollprobe schließen lässt. Bei den davon betroffenen Proben handelte es sich um Poolproben 23/070 und 23/075–23/080 der Haut.

3.2.4 Testdurchlauf 1

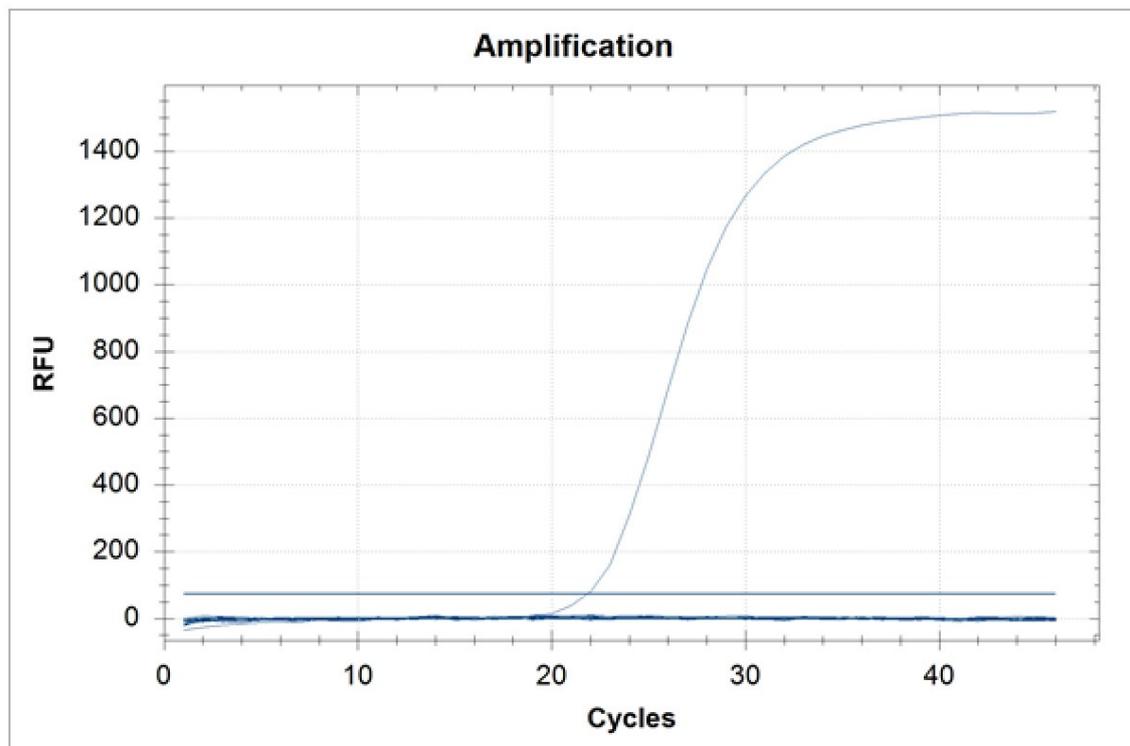


Abb. 3: Real-Time PCR Ergebnisse der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen auf CEV

Alle untersuchten Gewebeproben (23/061–23/071 der Kiemen) und Negativkontrollen ergaben kein spezifisches Signal auf CEV-DNA. Lediglich bei der Positivkontrolle ist eine Amplifikationskurve bei einem CT-Wert von 21,86 zu erkennen.

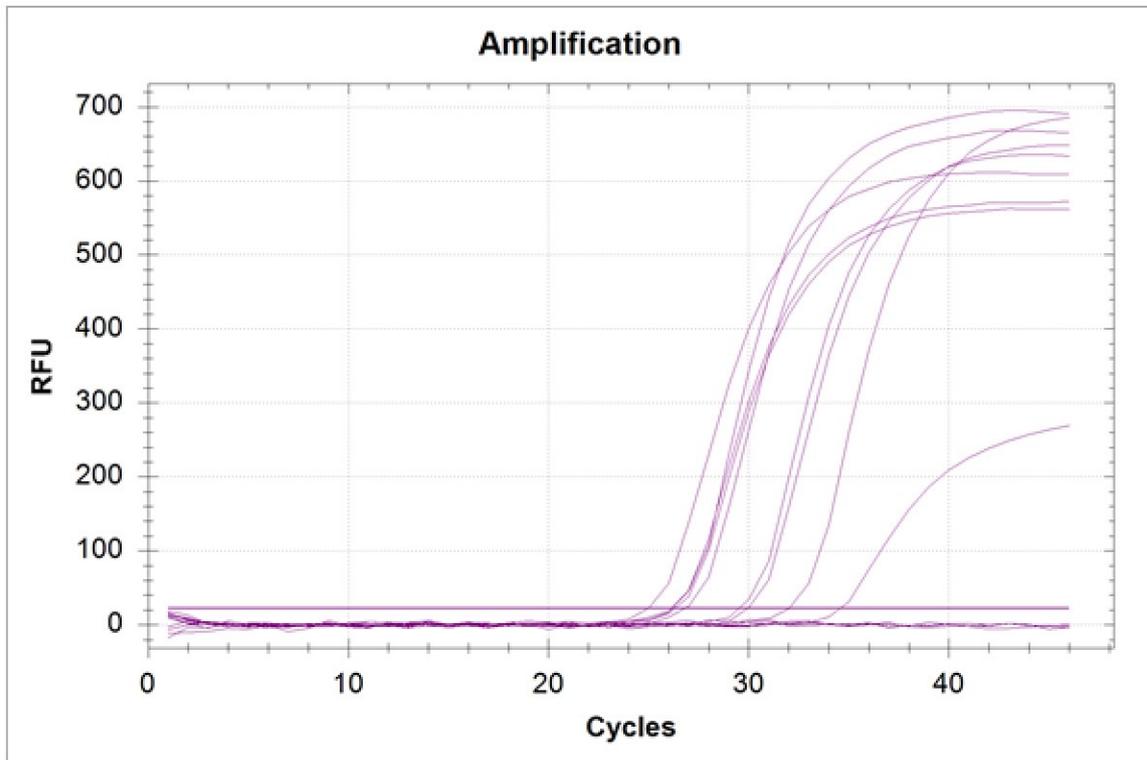


Abb. 4: Inhibitionskontrolle der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen mittels cgGluc

In Abb. 4 sind die Amplifikationskurven der Inhibitionskontrolle für die Poolproben des ersten Testdurchlaufs zu erkennen. Poolproben 23/066 und 23/070 der Kiemen zeigten kein spezifisches Signal. Sie wurden in den nachfolgenden qPCR-Tests erneut untersucht, um mögliche Pipettierfehler zu überprüfen.

Tab. 5: CT-Werte der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen für cgGluc und der Kontrollen

Da die Gewebeproben kein spezifisches Signal für CEV-DNA (Testergebnis „N/A“) aufwiesen, sind im Folgenden nur die Ergebnisse für cgGluc und die Kontrollen angeführt.

Probennummer	Fischart	CT-Wert
--------------	----------	---------

23/061 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,13
23/062 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,31
23/063 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,19
23/064 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,82
23/065 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	24,99
23/066 Kiemen cgGluc	Rotaugen <i>R. rutilus</i>	N/A
23/067 Kiemen cgGluc	Giebel <i>C. gibelio</i>	29,51
23/068 Kiemen cgGluc	Wels <i>S. glanis</i>	32,02
23/069 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	29,95
23/070 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	N/A
23/071 Kiemen cgGluc	Kaulbarsch <i>G. cernua</i>	34,51
NTC cgGluc	/	N/A
NE cgGluc	/	N/A
Pos CEV	/	21,86
NTC CEV	/	N/A
NE CEV	/	N/A

3.2.5 Testdurchlauf 2

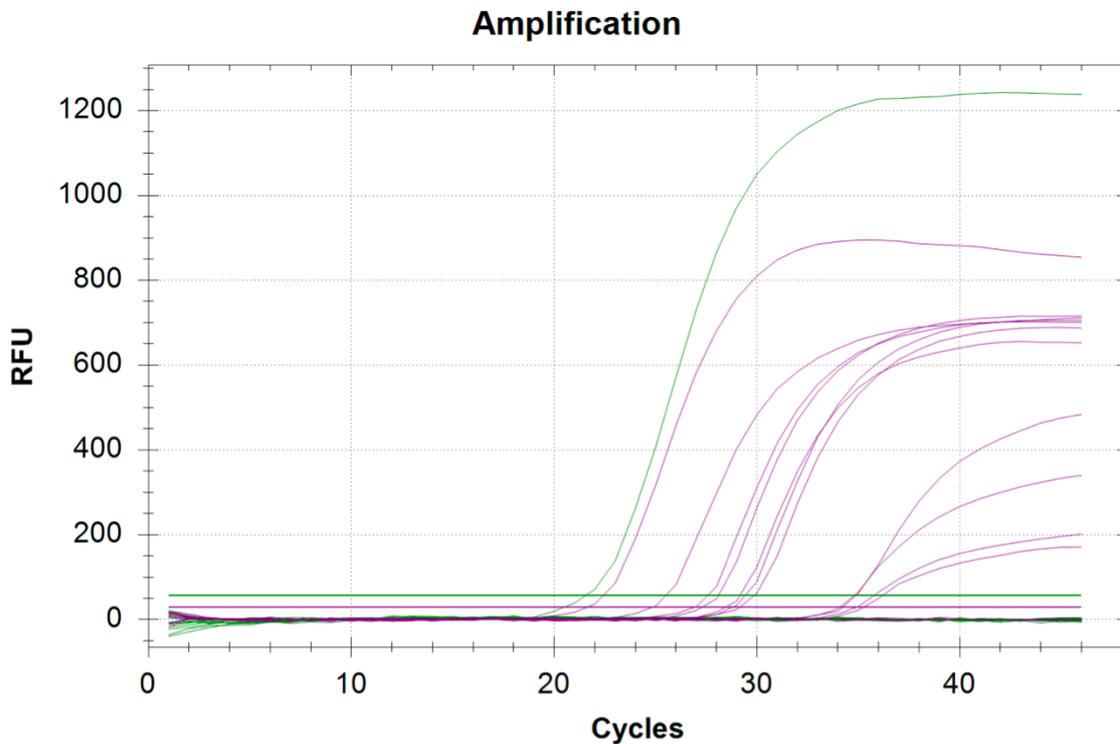


Abb. 5: Real-Time PCR Ergebnisse der Poolproben 23/072–23/080 der Kiemen, 23/061–23/062 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung von Poolprobe 23/066 der Kiemen

Zu sehen sind die Amplifikation der Positivkontrolle von CEV (grün) und die Amplifikation der Inhibitionskontrollen mittels cgGluc (rot). Poolprobe 23/066 der Kiemen wurde erneut untersucht und zeigte ein spezifisches Signal bei einem CT-Wert von 28,24. Daher kann auf einen Pipettierfehler bei Testdurchlauf 1 geschlossen werden.

Tab. 6: CT-Werte der Poolproben 23/07223/080 der Kiemen, 23/061–23/062 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung von Poolprobe 23/066 der Kiemen

Die untersuchten Proben zeigten kein spezifisches Signal für CEV-DNA (Testergebnis „N/A“) und sind daher nicht angeführt.

Probennummer	Fischart	CT-Wert
23/072 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	35,28
23/073 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	34,96

23/074 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	34,11
23/075 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	34,24
23/076 Kiemen cgGluc	Rotauge <i>R. rutilus</i>	29,17
23/077 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	24,88
23/078 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	28,47
23/079 Kiemen cgGluc	Schuppenkarpfen <i>C. carpio</i>	21,65
23/080 Int. cgGluc	Signalkrebs <i>P. leniusculus</i>	N/A
23/061 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,98
23/062 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	27,3
23/066 Kiemen cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	28,84
NTC cgGluc	/	N/A
NE cgGluc	/	N/A
Pos CEV	/	21,58
NTC CEV	/	N/A
NE CEV	/	N/A

3.2.6 Testdurchlauf 3

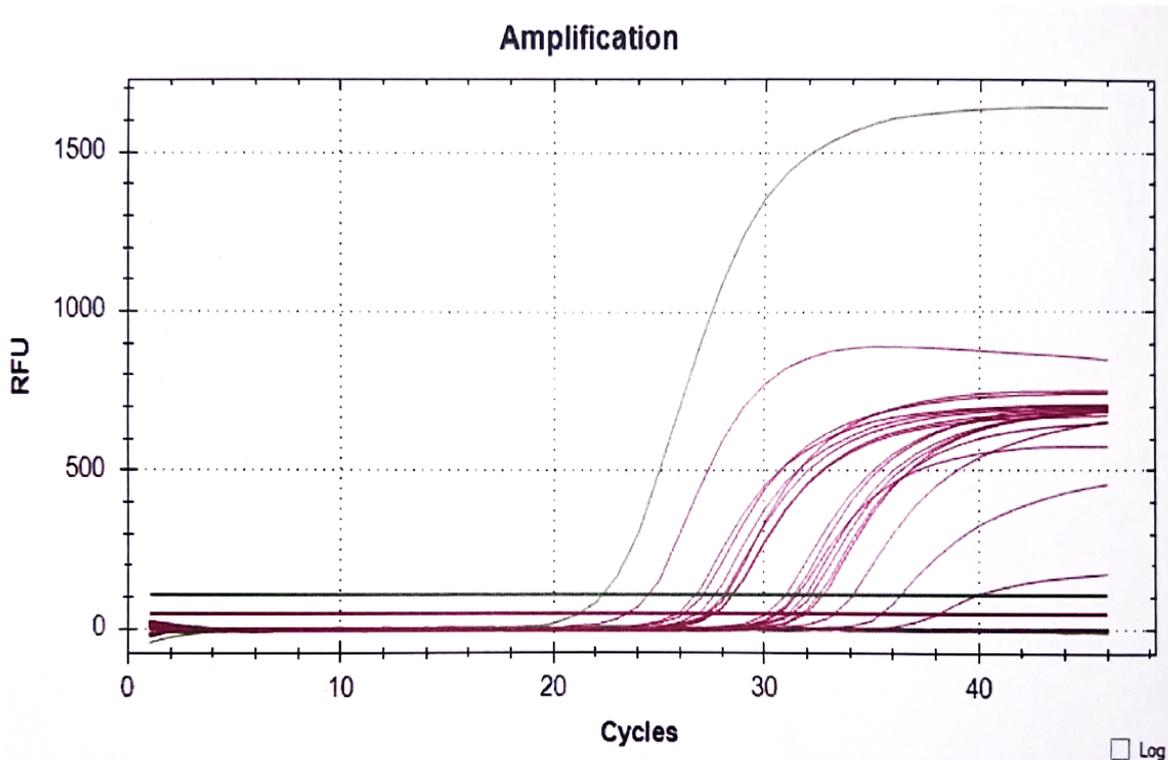


Abb. 6: Real-Time PCR Ergebnisse für der Poolproben 23/063–23/080 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung der Poolprobe 23/070 der Kiemen.

Zu sehen sind die Amplifikation der Positivkontrolle von CEV (dunkelgrüne Kurve links) und die Amplifikation der Inhibitionskontrollen mittels cgGluc (rot).

Tab. 7: CT-Werte der Poolproben 23/063–23/080 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung der Poolprobe 23/070 der Kiemen.

In diesem Testdurchlauf wurden die Proben aus zwei DNA-Extraktionen zusammengeführt. Daher ergeben sich die zwei Negativ-Extraktionskontrollen (NE 1 und NE 2). Die Poolprobe 23/070 der Kiemen von Flussbarschen zeigte erneut kein spezifisches Signal. Alle untersuchten Gewebeproben ergaben kein spezifisches Signal für CEV-DNA („N/A“) und sind daher nicht angeführt.

Probennummer	Fischart	CT-Wert
23/063 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	27,52

23/064 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	27,17
23/065 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	26,74
23/066 Haut cgGluc	Rotauge <i>R. rutilus</i>	31,62
23/067 Haut cgGluc	Giebel <i>C. gibelio</i>	30,55
23/068 Haut cgGluc	Wels <i>S.glanis</i>	27,49
23/069 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	33,18
23/070 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	35,37
23/071 Haut cgGluc	Kaulbarsch <i>G. cernua</i>	31,23
23/072 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	31,9
23/073 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	30,42
23/074 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	31,06
23/075 Haut cgGluc	Flussbarsch <i>P.fluviatilis</i>	30,06
23/076 Haut cgGluc	Rotauge <i>R. rutilus</i>	26,14
23/077 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	25,76
23/078 Haut cgGluc	Rotfeder <i>S. erythrophthalmus</i>	27,26

23/079 Haut cgGluc	Schuppenkarpfen <i>C. carpio</i>	23,38
23/080 Ext. cgGluc	Signalkrebs <i>P. leniusculus</i>	N/A
23/070 Kiemen cgGluc	Flussbarsch <i>P. fluviatilis</i>	N/A
NTC cgGluc	/	N/A
NE 1 cgGluc	/	N/A
NE 2 cgGluc	/	38,03
Pos CEV	/	22,26
NTC CEV	/	N/A
NE 1 CEV	/	N/A
NE 2 CEV	/	N/A

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte kein Nachweis auf Infektionen mit CEV in der untersuchten Fischpopulation festgestellt werden. Weder Gewebsproben von Karpfen noch von anderen Fischarten oder dem Krebs ergaben positive Ergebnisse mittels qPCR.

Ein Anlass für die Durchführung dieser Studie war, dass es in den vorangegangenen Jahren im Ritzensee aufgrund von KSD zu Karpfensterben gekommen war. Zum Untersuchungszeitpunkt dieser Studie wurden jedoch keine erneuten Ausbrüche oder Meldungen über kranke oder verendete Tiere verzeichnet. Vor allem bei Karpfen korreliert die Viruslast mit dem Ausmaß der Symptomatik und der Mortalität der Fische. Je höher die Viruslast, desto eher und stärker treten klinische Anzeichen der Krankheit (Kiemenpathologien wie Schwellungen und Nekrosen, Apathie und Anorexie) auf und desto höher ist die Mortalitätsrate (17,19,29). Somit könnten die negativen Ergebnisse auf CEV-DNA in dieser Studie sowie das Ausbleiben von Meldungen über erkrankte Fische, darauf zurückzuführen sein, dass die Viruslast im Ritzensee in diesem Frühjahr sehr gering war.

Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass ausschließlich klinisch gesunde Fische, die in der körperlichen Konstitution waren, um zum Laichen an die Wasseroberfläche zu schwimmen, abgefischt und für diese Studie verwendet wurden und womöglich nicht die gesamte Population akkurat widerspiegeln. Zusätzlich war die vorliegende Studie durch eine kleine Stichprobengröße begrenzt, wodurch die Zuverlässigkeit und allgemeine Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigt sein könnten. Es wurden beispielsweise nur zwei Karpfen zur Verfügung gestellt, sodass das negative Ergebnis statistisch nicht signifikant für die Karpfenpopulation ist. Eine größere, umfassendere Stichprobengröße, die verschiedene Altersgruppen und Gesundheitszustände berücksichtigt, wäre notwendig, um eine bessere Repräsentativität der Population sicherzustellen.

Die Wassertemperaturen im Ritzensee erreichten in diesem Frühjahr erst später als üblich wärmere Temperaturen. Im April stiegen die Werte nicht über 12,8 °C und auch in den ersten drei Maiwochen blieben die Temperaturen bei durchschnittlich 16,5 °C. Erst Ende Mai erreichte der See Werte von über 18 °C. Daher verzögerte sich die Laichzeit und die Fische konnten erst

Ende Mai abgefischt und untersucht werden. Die kälteren Wassertemperaturen könnten auch einen Einfluss auf die Virulenz des Erregers zu dieser Zeit gehabt haben, da CEV temperaturabhängig aktiv ist. Ausbrüche von KSD mit klinischen Anzeichen treten üblicherweise im Juni bis Juli bei Temperaturen von 15–25 °C auf (28). Obwohl Infektionen mit CEV und die Verbreitung des Virus auch bei niedrigeren Temperaturen von 7–15 °C möglich sind, sind die Ausprägung klinischer Symptome und die Mortalitätsrate tendenziell geringer (21).

Derzeit ist noch nicht geklärt, wie und ob das Karpfenödempvirus in Fischpopulationen persistiert, die bereits in Kontakt mit dem Virus gekommen sind (19). Obwohl Pockenviren grundsätzlich als nicht-latent gelten, konnte in experimentellen Untersuchungen mit anderen Pockenviren (Vacciniavirus, Yaba monkey tumor Virus, Ektromelie Virus und Shope Papillomavirus) festgestellt werden, dass längere Latenzzeiten vermutlich auftreten können (30). Auslöser für erneute Ausbrüche und Reinfektion könnten chronisch infizierte Carrier-Tiere sein, die durch Stress oder bei passenden Umweltbedingungen wieder zu aktiven Ausscheidern des Erregers werden. Untersuchungen zeigten, dass klinisch gesunde Koi kurz nach dem Import aus Asien nach Deutschland einen hohen Gehalt an CEV-DNA im Kiemengewebe aufwiesen. Dies könnte auf eine stressbedingte Reaktivierung einer persistierenden CEV-Infektion hinweisen (31). In einer Studie von Adamek *et al.* hingegen konnte die Persistenz von CEV in Karpfen nicht bestätigt werden. Hier wurden Karpfen drei Monate nach einer überstandenen CEV-Infektion für neun Tage zusammen mit zehn naiven Koi Fischen gehalten. Anschließend wurden alle Fische euthanasiert und untersucht. Weder bei den Karpfen noch bei den Koi konnte CEV-DNA nachgewiesen werden (17). Eine mögliche Persistenz des Virus im Bestand vom Ritzensee und anderen Gewässern, die zu wiederholten Ausbrüchen führt, ist dennoch nicht auszuschließen. Weitere experimentelle Studien und genaue Beobachtungen der betroffenen Feldpopulationen sind nötig, um diese Fragen zu untersuchen. Vor allem der Einfluss von Stress auf klinisch gesunde Tiere nach einer überstandenen Infektion wäre interessant.

Eine Möglichkeit, wiederholte Ausbrüche in Karpfenbeständen durch latent infizierte Tiere zu verhindern, bietet die Zucht mit alternativen Karpfenstämmen. Karpfenstämme asiatischer Herkunft, im Speziellen der Amur-Karpfen und der Ropsha scaly carp, zeigten sich schon

gegenüber KHVD deutlich weniger anfällig als europäisch-stämmige Karpfen (32). In darauffolgenden experimentellen Versuchen offenbarte sich bei Amur-Karpfen auch eine höhere Resistenz gegenüber CEV der Genogruppe I und IIa. Nach Kohabitation mit infizierten Fischen konnten weder morphologische Veränderungen noch Verhaltensänderungen bei den Amur-Karpfen festgestellt werden. Außerdem scheint der Virus nicht in den Fischen zu persistieren. Durch den Besatz von Zuchtteichen mit weniger anfälligen Karpfenstämmen oder deren Kreuzungen könnte somit das wirtschaftliche Risiko einer CEV-Infektion verringert werden (17).

Derzeit sind vier Pockenviren bei Fischen beschrieben. Das Carp edema virus, das Salmonid Gill Poxvirus (SGPV), das *Plecoglossus altivelis* Poxvirus (PaPV) und das Seahorse Poxvirus (SHPV). Neben CEV weisen auch SGPV und PaPV eine hohe Affinität zu Kiemen auf. Durch die Schädigung des Kiemenepithels treten bei betroffenen Fischen aller dieser Krankheiten respiratorische, osmoregulatorische und metabolische Störungen auf. Außerdem wirken diese Fischpockenviren immunsuppressiv, wodurch es vermehrt zu Sekundärinfektionen kommt (33).

Der Hauptwirt von SGPV ist der Atlantische Lachs (*Salmo salar*), wobei die Übertragung auf andere Salmoniden noch nicht ausreichend untersucht wurde. In einer Studie konnten geringe Mengen an Virus-DNA (CT-Werte von 31,8–37,3) bei Meerforellen (*Salmo trutta trutta*) nach Kohabitation mit SGPV-positiven Lachsen nachgewiesen werden, jedoch ohne klinische Manifestation (34). Ähnlich wie bei KSD korreliert auch hier die Viruslast mit der klinischen Manifestation der Krankheit. Eine potenzielle Funktion als Überträger des Virus bei Meerforellen wurde noch nicht untersucht (35).

Als natürliche Wirte von PaPV gelten junge Ayu Fische (*Plecoglossus altivelis*) und Sardinen (*Sardinops* spp.). Alternative Wirte und Carrier konnten auch bei diesem Pockenvirus bisher nicht gefunden werden (36).

Wenn man Poxviren im Allgemeinen betrachtet, lässt sich feststellen, dass sie ein weites Wirtsspektrum von verschiedenen Insektengruppen und Vertebraten besitzen. Bei Untersuchungen der einzelnen Mitglieder der *Poxviridae*-Familie zeigt sich jedoch ein variables Wirtsspektrum. Einige Viren können eine Vielzahl an Wirten infizieren, während andere auf einzelne Wirte beschränkt sind. Pockenviren, die wie CEV zu der Subfamilie der

Chordopoxvirinae zählen (Vertebraten-infizierende Viren), tendieren dazu auf eine geringe Anzahl an Wirten beschränkt zu sein. Nach derzeitigem Wissensstand hat mehr als die Hälfte dieser Viren (25/40) nur einen Wirt (37). Einige Chordopockenviren sind aber auch in der Lage, ein breiteres Spektrum an Wirten zu infizieren, mit bekannten Reservoirwirten wie Nagetieren (38). Das breiteste Wirtsspektrum mit mindestens 27 verschiedenen Wirtsgruppen zeigt das Kuhpockenvirus (CPXV) (39).

Das Kiemengewebe stellt den primären Ort der Replikation des Karpfenödempvirus dar. In mehreren Experimenten konnte nachgewiesen, dass Kiemengewebe auch das zuverlässigste Gewebe zum Nachweis von CEV-DNA ist (9,17). In einer Studie von Matras *et al.* ergaben neben Kiemengewebe auch Proben von der Haut am häufigsten positive Ergebnisse. Auch in Proben von Haut, Gehirn, Darm, Niere und Milz konnte in einigen Fällen Virusmaterial nachgewiesen werden, sie gelten aber als unzuverlässiger (27). In der vorliegenden Studie wurde daher ein Augenmerk auf das Testen der entnommenen Kiemen- und Hautproben gelegt. Nach aktueller Literatur wäre ein positiver Nachweis von CEV vor allem in diesen Organen zu erwarten.

Grundsätzlich wurden von allen Fischen Proben von der Haut, den Kiemen und der Kopfniere entnommen. Die Proben der Kopfniere dienen in erster Linie dazu, um bei positiven Ergebnissen auch die Viruslast in diesem Organ untersuchen zu können. Zusätzlich zu den Einzelproben wurden Poolproben von Fischen derselben Art und ähnlicher Größe erstellt, um effizient auf das Virus testen zu können. Dazu werden Proben mehrerer Fische in einer „Poolprobe“ kombiniert und gemeinsam analysiert. Wenn der Pool negativ ist, können alle Proben als negativ betrachtet werden. Sollte er positiv sein, können anschließend Einzeltests durchgeführt werden, um das infizierte Individuum zu identifizieren. Da in dieser Studie alle Poolproben negativ waren, wurde auf das Untersuchen der Einzelproben verzichtet.

Eine der Negativ-Extraktionskontrollen zeigte ein spezifisches Signal für cgGluc bei einem CT-Wert von 38,03, was auf eine leichte Kontamination der Kontrollprobe während der DNA-Extraktion schließen lässt. Bei den davon betroffenen Proben handelte es sich um Poolproben 23/070 und 23/075–23/080 der Haut. Da dadurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch eine Kontamination der betreffenden Poolproben untereinander stattgefunden hat, wäre bei einem positiven Ergebnis für CEV keine eindeutige Zuordnung zu einer der Poolproben

möglich gewesen. Aufgrund der negativen Ergebnisse für CEV hat das positive Ergebnis der NE-Kontrolle jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf das Testergebnis.

Außerdem war auffällig, dass eine der Poolproben der Kiemen von Flussbarschen (23/070) keine Amplifikationskurve für cgGluc zeigte. Gewebeproben von Barschartigen (*Perciformes*) wiesen generell höhere CT-Werte auf als solche von Cypriniden, wobei Schuppenkarpfen die niedrigsten CT-Werte hatten. Dies war zu erwarten, da der Assay auf Glukoginase von Karpfen (*C. carpio*) ausgerichtet ist und somit weniger auf Gewebe anderer Fischarten anspricht. Es wäre daher naheliegend, dass die negative Poolprobe 23/070 der Flussbarsche dadurch zustande gekommen ist. Des Weiteren könnte das negative Ergebnis auch durch eine zu geringe Probenmenge oder Schädigung der gewonnenen DNA bedingt sein.

Die in dieser Studie beprobten Fische wurden nach der Euthanasie in gefrorenem Zustand versendet. Die verschiedenen Individuen wurden in zwei Eisblöcken transportiert. Durch den engen Kontakt beim Transport wären CEV-positive Hautproben der Haut wenig aussagekräftig für das einzelne Tier gewesen und hätten durch die steril entnommenen Proben des Kiemen- und Milzgewebes verifiziert werden müssen.

Postmortales Tiefgefrieren gilt als geeignete Methode, um die Qualität des Gewebes für molekular genetische Untersuchungen zu erhalten (40). Bei korrektem und zeitgerechtem Transport von gefrorenen Fischen hat das Einfrieren üblicherweise keinen bedeutenden Einfluss auf den Virusgehalt. Bei jedem Auftauen verringert sich jedoch die messbare spezifische CEV-DNA (41). Fehler in der Transportkette und Lagerung können daher einen bedeutenden Einfluss auf das Testergebnis haben und dazu führen, dass Infektionen unerkant bleiben. Die zugesendeten Fische wiesen makroskopisch vereinzelt Frostschäden und Hinweise beginnender Autolyse auf, die im Allgemeinen aber auf keine Qualitätsminderung hindeuten. Der Zustand der eingesandten Fische wurde als zufriedenstellend und geeignet für den Erregernachweis bewertet.

Alle Proben wurden mit dem CEFAS qPCR-Protokoll untersucht, das von Matras *et al.* (2017) veröffentlicht wurde (8). Diese Art der Diagnostik gilt als sehr zuverlässig, da das Virus sowohl in Gewebematerial von moribunden als auch asymptomatisch infizierten Tieren nachgewiesen werden kann (27). Auch die World Organisation of Animal Health (WOAH) empfiehlt die

Verwendung vom CEFAS qPCR oder end-point PCR zum verlässlichen Nachweis von KSD (42). Diese beiden Assays weisen eine hohe diagnostische Sensitivität und analytische Diversität auf, da sie alle derzeit bekannten Genotypen nachweisen können. Sie können für umfassende Screeningtests herangezogen werden (43).

In der europäischen Karpfenaquakultur wandern Fische unterschiedlicher Arten aus der heimischen Fischfauna in Produktions- oder Überwinterungsteiche ein oder werden in Polykulturen mit Karpfen aufgezogen (17). Grundsätzlich kann die horizontale Übertragung von Fischviren entweder direkt über Haut- oder Kiemenschleim oder Vektor-vermittelt stattfinden, wobei Wasser der bedeutendste abiotische Vektor ist. Lebende Vektoren wie andere Fischarten, parasitäre Wirbellose oder fischfressende Vögel und Säugetiere können maßgeblich an der Übertragung beteiligt sein, wurden im Zusammenhang mit CEV aber noch nicht ausreichend untersucht (25). Bei anderen viralen Fischkrankheiten ist die Bedeutung von alternativen Fischarten als Vektoren schon länger bekannt. Der Erreger der infektiösen Pankreasnekrose (IPN), ein Aquabirnavirus, kann beispielsweise über Graueiher (*Ardea cinerea*) übertragen werden, deren Exkrememente und Regurgitation von infizierten Fischen in Kontakt mit gesunden Fischen kommen (44). Auch bei der Verbreitung des Koi Herpes Virus (KHV) sind lebende Vektoren beteiligt. Es gibt eine große Anzahl von Fischen, die mit dem Virus infiziert werden können, es intern replizieren und den Erreger an *C. carpio* abgeben, ohne selbst zu erkranken. Dazu zählen etwa der Goldfisch (*Carassius auratus*) (45), ein weites Spektrum an Cypriniden, aber auch *Ictaluridae*, *Percidae*, *Esocidae* (46) und Salmoniden (47). Bisher sind klinische Ausbrüche der Krankheit nach einer Infektion mit CEV nur im Zusammenhang mit *Cyprinus carpio* beschrieben (21). Studien mit anderen Fischarten haben jedoch ergeben, dass auch native, kohabitierte Fische anderer Arten das Virus beherbergen können. Die erste umfangreiche Studie zum Wirtsspektrum von CEV wurde von Matras *et al.* (2019) durchgeführt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass das Virus in geringen Mengen (CT-Werte von 34 bis 43) auch auf andere Fischarten übertragen werden kann. In dieser Studie wurden Fischarten verschiedener Spezies für einige Stunden (12 h und 72 h) unter Laborbedingungen in engen Kontakt mit CEV-positiven Karpfen gebracht. Obwohl es zu keinen klinischen Anzeichen der Karpfenödemkrankheit kam, konnte bis zu 42 Tage nach Kohabitation in Haut- und Kiemenproben einiger Fische CEV nachgewiesen werden.

In einer darauffolgenden Studie von Tolo *et al.* im Jahr 2021 wurde die Übertragung von CEV unter natürlichen Bedingungen während eines Karpfensterbens aufgrund von KSD in einem See in Minnesota untersucht. Obwohl in der Karpfenpopulation des Sees eine hohe Viruslast festgestellt wurde, lieferten alle untersuchten heimischen Fische und Amphibien negative Ergebnisse auf CEV (26).

Der fehlende Nachweis von CEV in der genannten Studie könnte auf Unterschiede in der Übertragungsdynamik in einem natürlichen Gewässersystem zurückzuführen sein, im Vergleich zu Matras *et al.*, wo die Fische in Aquarien für Versuchszwecke und unter kontrollierten Umweltbedingungen gehalten wurden. Dies könnte auch eine Erklärung für die negativen Ergebnisse in der Population des Ritzensees sein. Jedoch muss angemerkt werden, dass der Grad der genetischen Verwandtschaft ebenfalls eine Rolle bei der Übertragung spielen könnte. Bei Tolo *et al.* wurden andere Spezies (*Pimephales promelas*, *Lithobates pipiens*, *Culaea inconstans*, *Lepomis cyanellus* und *Lepomis gibbosus*) untersucht als bei Matras *et al.* (*Alburnus alburnus*, *Carassius carassius*, *Carassius gibelio*, *Rutilus rutilus*, *Tinca tinca*, *Perca fluviatilis*). Fünf von sechs der untersuchten Spezies bei Matras *et al.* zählen zu derselben Familie wie Karpfen, den Cypriniden. Bei Tolo *et al.* stammte nur eine Fischart, die amerikanische Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) aus der Familie der Weißfische (25,26). In der vorliegenden Studie überschneiden sich zwei der verwendeten Spezies mit denen bei Matras *et al.*, und zwar der Giebel (*Carassius gibelio*) und das Rotauge (*Rutilus Rutilus*).

Weitere Untersuchungen wurden in einer Studie über das Vorkommen des Karpfenödemvirus in Karpfenpopulationen in Deutschland gemacht. Hier wurden 40 Kiemenproben von elf verschiedenen Fischarten, die entweder in Co-Kultur mit Karpfen gezüchtet wurden, oder zusammen mit Koi als Zierfische gehandelt wurden, auf CEV getestet. Bei sechs der elf untersuchten Arten, darunter der Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*), der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und der Hecht (*Esox lucius*), konnte CEV-spezifische DNA in geringen Mengen ($1,0$ bis $1,2 \times 10^3$ DNA-Kopien pro 250 ng DNA) nachgewiesen werden (19).

Eine weitere Studie untersuchte Kiemenproben von den invasiven Schwarzmund-Grundeln (*Neobobius melanostomus*) von verschiedenen Standorten in Polen und Deutschland. Hier konnte bei keinem der Fische CEV-DNA nachgewiesen werden (48).

In Betracht der Ergebnisse der vorliegenden und vorangegangener Studien, in denen unterschiedliche Fischarten entweder negativ auf CEV-DNA getestet wurden oder nur eine geringe Viruslast zeigten, lässt sich vermuten, dass hauptsächlich Karpfen und Koi infiziert werden. Kohabitierende Fischarten könnten als Überträger des Virus infrage kommen, spielen aber womöglich nur eine untergeordnete Rolle. Im vorliegenden Fall konnte trotz der Infektionsgeschichte des untersuchten Gewässers keine Gefährdung der Karpfenpopulation hinsichtlich einer CEV-Infektion durch andere kohabitierte Fischarten festgestellt werden. Prinzipiell ist es aber für den Umgang mit „überschüssigen“ Fischen und jede andere Besatzmaßnahme anzuraten, das Risiko spezifischer Infektionsverbreitungen zu ermitteln und durch gezielte Untersuchungen zu minimieren.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Übertragung von KSD durch verschiedene Fischarten zu untersuchen, die in europäischen Gewässern üblicherweise zusammen mit Karpfen gehalten werden, um alternative Wirte und Carrier des Virus zu identifizieren. Es ist derzeit noch wenig über Übertragungswege von CEV in einer natürlichen Umgebung bekannt. Diese Erkenntnisse sind jedoch von großer Bedeutung, um die Verbreitung von KSD zu limitieren.

Dazu wurden im Mai 2023 76 Fische, sieben verschiedener Arten und ein Signalkrebs aus einem kleinen See in Salzburg (Ritzensee), der in den vergangenen Jahren mit Karpfensterben aufgrund von KSD zu kämpfen hatte, untersucht. Es konnten keine Infektionen mit CEV mittels qPCR bei den Karpfen oder anderen Spezies nachgewiesen werden. Auch makroskopisch konnten keine Hinweise auf eine Erkrankung gefunden werden.

Unter der Annahme, dass sich das Virus zu dieser Zeit in der Fischpopulation befunden hat, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die untersuchten Fischarten und der Krebs nicht als Wirte und/oder Überträger von CEV unter natürlichen Bedingungen infrage kommen. Es muss jedoch beachtet werden, dass in dem untersuchten Jahr weder Erkrankungen noch Mortalitäten im Karpfenbestand von den Bewirtschaftern des Sees verzeichnet wurden, wodurch die negativen Ergebnisse auch einer geringen oder fehlenden Viruslast in diesem Gewässer geschuldet sein können.

Weitere Untersuchungen mit einer repräsentativeren Gruppe an Individuen sind nötig, um klarere Aussagen über die Übertragungswege von CEV treffen zu können. Solange einzelne Fischarten nicht als Überträger der Krankheit ausgeschlossen werden können, ist es jedenfalls sinnvoll, repräsentative Stichproben von Fischen vor Einbringung in ein neues Gewässer zu testen.

Eine Möglichkeit, um wiederholte Ausbrüche von KSD, die oft mit hohen wirtschaftlichen Verlusten verbunden sind, zu verhindern, bietet die Zucht mit alternativen Karpfenstämmen. Vor allem der Amur-Karpfen zeigt eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen mit CEV beider

Genogruppen. Neben allgemeinen Hygienemaßnahmen und Stressvermeidung ist das Einkreuzen dieses Karpfenstammes in europäische Karpfenpopulationen eine vielversprechende Strategie, um der Verbreitung und den Auswirkungen von KSD entgegenzuwirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Ono S ichi, Nagai A, Sugai N. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. *Fish Pathol.* 1986;21(3):167–75.
2. Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio* koi in Japan. *Dis Aquat Organ.* 18. Juli 2005;65(3):197–207.
3. Hedrick R, Antonio D, Munn R. Poxvirus like agent associated with epizootic mortality in juvenile koi (*Cyprinus carpio*). *FHS Newsl.* 1997;(25):1–2.
4. Way K, Stone D. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *CEFAS Finfish News.* 2013;(15):32–4.
5. Haenen O, Way K, Stone D. Koi Sleepy Disease (KSD) door ‘Carp Edema virus’: eerste detectie in Nederlandse Koi. 2013.
6. Lewisch E, Gorgoglione B, Way K, El-Matbouli M. Carp Edema Virus/Koi Sleepy Disease: An Emerging Disease in Central-East Europe. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62(1):6–12.
7. Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F, Hellmann J, Bergmann SM, Schütze H, u. a. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC Vet Res.* 15. Mai 2015;11(1):114.
8. Matras M, Borzym E, Stone D, Way K, Stachnik M, Maj-Paluch J, u. a. Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J Fish Dis.* März 2017;40(3):319–25.
9. Adamek M, Baska F, Vincze B, Steinhagen D. Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary. *J Fish Dis.* 2018;41(3):463–8.
10. Zhang X, Ni Y, Ye J, Xu H, Hou Y, Luo W, u. a. Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China. *Aquaculture.* 1. Mai 2017;474:34–9.
11. Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, *Cyprinus carpio* koi, in India | Microbiology Society [Internet]. [zitiert 29. September 2023]. Verfügbar unter: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000649>
12. Pikulkaew S, Phatwan K, Banlunara W, Inatanon M, Bernard JK. First Evidence of Carp Edema Virus Infection of Koi *Cyprinus carpio* in Chiang Mai Province, Thailand.

Viruses [Internet]. 2020 [zitiert 29. September 2023];12(12). Verfügbar unter:

<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/12/1400>

13. FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. Global production by production source 1950-2021 (FishStatJ) [Internet]. FAO. 2023; Verfügbar unter:

www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj

14. Rakus K, Ouyang P, Boutier M, Ronsmans M, Reschner A, Vancsok C, u. a. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research. *Vet Res.* 27.

September 2013;44(1):85.

15. Way K, Haenen O, Stone D, Adamek M, Bergmann S, Bigarré L, u. a. Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Organ.* 18. Oktober 2017;126(2):155–66.

16. Phaya X, Zhou JX, Wang ZY, Wang H, Liang J. Carp edema virus a rising threat to global carp population. *Thai J Vet Med.* 1. September 2021;51(3):405–14.

17. Adamek M, Oschilewski A, Wohlsein P, Jung-Schroers V, Teitge F, Dawson A, u. a. 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. *Vet Res.* Dezember 2017;48(1):12.

18. Soliman H, Lewisch E, El-Matbouli M. Identification of new genogroups in Austrian carp edema virus isolates. *Dis Aquat Organ.* 17. Oktober 2019;136(2):193–7.

19. Adamek M, Heling M, Bauer J, Teitge F, Bergmann SM, Kleingeld DW, u. a. It is everywhere—A survey on the presence of carp edema virus in carp populations in Germany. *Transbound Emerg Dis.* Juli 2022;69(4):2227–41.

20. Mekata T, Kawato Y, Ito T. Complete Genome Sequence of Carp Edema Virus Isolated from Koi Carp. *Microbiol Resour Announc.* 22. April 2021;10(16):10.1128/mra.00239-21.

21. Rehman T, Yin L, Latif MB, Zhou Y, Wang K, Geng Y, u. a. Current findings on carp edema virus, control challenges, and future outlook. *Aquac Int.* Oktober 2020;28(5):2015–26.

22. Hesami S, Viadanna P, Steckler N, Spears S, Thompson P. EDIS Publication FA189. University of Florida. 2015 [zitiert 6. Oktober 2023]. Carp Edema Virus Disease (CEVD) / Koi Sleepy Disease (KSD). Verfügbar unter: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FA189>

23. Adamek M, Teitge F, Baumann I, Jung-Schroers V, El Rahman SA, Paley R, u. a. Koi

- sleepy disease as a pathophysiological and immunological consequence of a branchial infection of common carp with carp edema virus. *Virulence*. 31. Dezember 2021;12(1):1855–83.
24. Pikula J, Pojezdal L, Papezikova I, Minarova H, Mikulikova I, Bandouchova H, u. a. Carp Edema Virus Infection Is Associated With Severe Metabolic Disturbance in Fish. *Front Vet Sci*. 19. Mai 2021;8:679970.
25. Matras M, Stachnik M, Borzym E, Maj-Paluch J, Reichert M. Potential vector species of carp edema virus (CEV). *J Fish Dis*. Juli 2019;42(7):959–64.
26. Tolo IE, K. Padhi S, Hundt PJ, Bajer PG, K. Mor S, Phelps NBD. Host Range of Carp Edema Virus (CEV) during a Natural Mortality Event in a Minnesota Lake and Update of CEV Associated Mortality Events in the USA. *Viruses*. 3. März 2021;13(3):400.
27. Matras M, Stachnik M, Borzym E, Maj-Paluch J, Reichert M. Distribution of carp edema virus in organs of infected juvenile common carp. *J Vet Res*. 1. September 2023;67(3):333–7.
28. Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara F, Leutenegger C, Bercovier H, Hedrick R. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally-infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Organ*. 2004;60:179–87.
29. Oyamatsu T, Hata N, Yamada K, Sano T, Fukuda H. An Etiological Study on Mass Mortality of Cultured Colorcarp Juveniles Showing Edema. *Fish Pathol*. 1997;32(2):81–8.
30. Abdelsalam EEE, Piačková V. Carp edema virus: host selection and interaction, and potential factors affecting its introduction to the common carp population, distribution, and survival. *Aquaculture*. 30. Januar 2023;563:739009.
31. Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J, Teitge F, Bergmann S, Runge M, u. a. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD). *Dis Aquat Organ*. 26. Mai 2016;119(3):245–51.
32. Piačková V, Flajšhans M, Pokorová D, Reschová S, Gela D, Čížek A, u. a. Sensitivity of common carp, *Cyprinus carpio* L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV). *J Fish Dis*. 2013;36(1):75–80.
33. Zawisza M, Chadzinska M, Steinhagen D, Rakus K, Adamek M. Gill disorders in fish: Lessons from poxvirus infections. *Rev Aquac*. 2024;16(1):234–53.
34. Garseth ÅH, Gjessing MC, Moldal T, Gjevre AG. A survey of salmon gill poxvirus

(SGPV) in wild salmonids in Norway. *J Fish Dis.* 2018;41(1):139–45.

35. Tartor H, Dahle MK, Gulla S, Weli SC, Gjessing MC. Emergence of Salmon Gill Poxvirus. *Viruses.* Dezember 2022;14(12):2701.

36. Nakayama H, Uno E, Ashizawa T, Miwa S. PCR-Detection of *Plecoglossus altivelis* Poxvirus-Like Virus (PaPV) in Wild Ayu. *Fish Pathol.* 2016;51(3):121–4.

37. Oliveira GP, Rodrigues RAL, Lima MT, Drumond BP, Abrahão JS. Poxvirus Host Range Genes and Virus-Host Spectrum: A Critical Review. *Viruses.* 7. November 2017;9(11):331.

38. Villarreal LP, Defilippis VR, Gottlieb KA. Acute and Persistent Viral Life Strategies and Their Relationship to Emerging Diseases. *Virology.* 20. Juni 2000;272(1):1–6.

39. Mauldin MR, Antwerpen M, Emerson GL, Li Y, Zoeller G, Carroll DS, u. a. Cowpox virus: What's in a Name? *Viruses.* 9. Mai 2017;9(5):101.

40. Malik IA, Elgasim EA, Adiamo OQ, Ali AA, Mohamed Ahmed IA. Effect of frozen storage on the biochemical composition of five commercial freshwater fish species from River Nile, Sudan. *Food Sci Nutr.* 26. Mai 2021;9(7):3758–67.

41. Bergmann SM, Klafack S, Jin Y, Jung-Schroers V, Kappe A, Nardy E, u. a. Assessment of genetic tools for detection of carp edema virus (CEV) by a laboratory comparison test in Germany. 8. Januar 2021;

42. World Organisation for Animal Health: Infection with carp edema virus (CEV). WOA [Internet]. 2023 [zitiert 27. Februar 2024]; Verfügbar unter: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/03/a-woah-cev-disease-card-nov-2022.pdf>

43. Adamek M, Matras M, Jung-Schroers V, Teitge F, Heling M, Bergmann S, u. a. Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus. *Dis Aquat Organ.* 20. September 2017;126(1):75–81.

44. Peters F, Neukirch M. Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J Fish Dis.* 1986;9(6):539–44.

45. Bergmann S, Lutze P, Schütze H, Fischer U, Dauber M, Fichtner D, u. a. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* [Internet]. 19. März 2010 [zitiert 12. Februar 2024]; Verfügbar unter: [https://www.semanticscholar.org/paper/Goldfish-\(Carassius-auratus-auratus\)-is-a-species-Bergmann-](https://www.semanticscholar.org/paper/Goldfish-(Carassius-auratus-auratus)-is-a-species-Bergmann-)

Lutze/2b9e21ebf5e44dca299fd4e965ad5bbdc2142338

46. Fabian M, Baumer A, Steinhagen D. Do wild fish species contribute to the transmission of koi herpesvirus to carp in hatchery ponds? *J Fish Dis.* Mai 2013;36(5):505–14.
47. Bergmann SM, Monaghan S, Cieslak M, Wang Q, Zeng W, Fichtner D, u. a. Is There Any Species Specificity in Infections with Aquatic Animal Herpesviruses?—The Koi Herpesvirus (KHV): An Alloherpesvirus Model. *Fish Aquac J.* 23. Mai 2016;7:1–5.
48. Jin Y, Adamkowska N, Kiełpińska J, Bergmann SM. Detection of Koi Herpesvirus (KHV) and Carp Oedema Virus (CEV) in Invasive Round Goby, *Neogobius Melanostomus Pallas, 1814*, from Poland and Germany. *J Vet Res.* 27. Mai 2020;64(2):247–51.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Anzahl der beprobten Fische in den jeweiligen Poolproben	9
Tab. 2: Reaktionsmix für CEV	11
Tab. 3: Reaktionsmix für cgGluc	12
Tab. 4: Gewicht und Größe der verschiedenen untersuchten Arten	15
Tab. 5: CT-Werte der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen für cgGluc und der Kontrollen	18
Tab. 6: CT-Werte der Poolproben 23/07223/080 der Kiemen, 23/061–23/062 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung von Poolprobe 23/066 der Kiemen.....	20
Tab. 7: CT-Werte der Poolproben 23/063–23/080 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung der Poolprobe 23/070 der Kiemen.	22
Abb. 1: Karpfen mit dunkelrotem Bereich am äußeren Kiemenbogen.....	14
Abb. 2: Flussbarsch mit granulomartigen Veränderungen der Leber.....	14
Abb. 3: Real-Time PCR Ergebnisse der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen auf CEV ...	17
Abb. 4: Inhibitionskontrolle der Poolproben 23/061–23/071 der Kiemen mittels cgGluc	18
Abb. 5: Real-Time PCR Ergebnisse der Poolproben 23/072–23/080 der Kiemen, 23/061–23/062 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung von Poolprobe 23/066 der Kiemen	20
Abb. 6: Real-Time PCR Ergebnisse für der Poolproben 23/063–23/080 der Haut und der Kontrollen. Wiederholung der Poolprobe 23/070 der Kiemen.	22