

Tierärztliche Hochschule Hannover

KLINISCH-CHEMISCHE PARAMETER IM BLUT UND URIN  
VON KARPFFEN UNTER INFEKTION MIT DEM KOI-  
HERPESVIRUS

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von  
**Julia Negenborn**  
Rendsburg

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. Prof. Dr. Dieter Steinhagen  
*Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung des  
Zentrums für Infektionsmedizin*

Univ. Prof. Dr. Martin Ganter  
*Klinik für Kleine Klauentiere und Forensische Medizin*

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Dieter Steinhagen  
2. Gutachter: P.D. Dr. Martin Runge

Tag der mündlichen Prüfung: *6. November 2009*

**Meiner Familie gewidmet**



---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1	Überblick über das Koi-Herpesvirus.....	3
2.1.1	Ätiologie.....	3
2.1.2	Vorkommen und Verbreitung .....	4
2.1.3	Wirtsspektrum, Übertragung und Inkubationzeit.....	4
2.1.4	Klinik.....	5
2.1.5	Pathogenese.....	6
2.1.6	Histologie .....	7
2.1.7	Diagnostik .....	9
2.1.7.1	Nachweismethoden .....	9
2.1.8	Differentialdiagnose .....	11
2.1.9	Bekämpfung und Desinfektion von KHV .....	11
2.1.10	Therapie und Prophylaxe .....	11
2.1.11	Rechtslage .....	12
2.2	Überblick zur Anatomie und Physiologie der Karpfenkieme und -niere .....	12
2.2.1	Die Anatomie der Karpfenkieme und -niere .....	12
4.2.1.1	Kieme .....	12
4.2.1.2	Niere .....	13
2.2.2	Histologie des Mesonephros der Karpfen .....	13
2.2.3	Osmo- und Ionenregulation der Karpfen .....	14
2.2.4	Osmoregulatorische und exkretorische Funktion der Niere.....	15
2.2.5	Physiologische Zusammensetzung des Plasmas und Urins bei Karpfen .....	16
2.2.6	Physiologische Messwerte ausgewählter hämatologischer und chemischer Parameter im Karpfenblut .....	20

2.2.7	Pathophysiologische Veränderungen bei Nephritiden und resultierender Niereninsuffizienz .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Virus.....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Herkunft .....	24
3.1.2	Zellkultur.....	24
3.1.3	Virusvermehrung.....	25
3.1.4	Virustitration .....	25
3.1.5	Virusnachweis .....	26
3.1.5.1	Extraktion der DNA aus Gewebeproben und Urinproben .....	26
3.1.5.2	PCR .....	27
3.1.5.3	Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte.....	28
<b>3.2</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Fische .....	29
3.2.2	Aufzucht und Haltung .....	29
3.2.3	Handling.....	30
3.2.4	Versuchsaufbau .....	30
3.2.5	Infektion .....	31
3.2.6	Narkose und Töten .....	32
3.2.7	Katheterisierung der Urinblase.....	32
<b>3.3</b>	<b>Probensammlung.....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Entnahme des Urins .....	34
3.3.2	Blutentnahme .....	34
3.3.3	Töten und Entnahme der Organe .....	35
3.3.4	Entnahme von Gewebepoolproben zum Virusnachweis.....	35
3.3.5	Histologische Untersuchung .....	35
3.3.5.1	Entnahme von Organproben zur histologischen Untersuchung.....	35
3.3.5.2	Weiterverarbeitung histologischer Proben.....	36
3.3.5.3	Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) zur histologischen Beurteilung.....	36

---

3.4	Analyse von Plasma und Urinproben.....	37
3.4.1	Osmolarität.....	37
3.4.2	Natrium und Kalium.....	37
3.4.3	Kalzium und Magnesium.....	37
3.4.4	Phosphor.....	37
3.4.5	Gesamtproteine.....	38
3.4.6	Alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT).....	38
3.4.7	Kreatinin.....	38
3.5	Blutparameter.....	39
3.5.1	Hämatokrit.....	39
3.5.2	Hämoglobin-Konzentration.....	40
3.5.3	Bestimmung der Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl.....	40
3.5.4	MCV, MCH, MCHC.....	41
3.5.5	Blutausstriche und Differenzialblutbild.....	41
3.6	Statistische Methoden.....	42
4	ERGEBNISSE.....	43
4.1	Infektionserfolg und Verlauf der Infektion.....	43
4.2	Krankheitsverlauf nach experimenteller Infektion mit KHV.....	44
4.3	Sektion.....	45
4.4	Katheterisieren.....	46
4.5	Urintnahme.....	46
4.6	Histologische Ergebnisse.....	46
4.6.1	Histologische Befunde an der Kieme.....	47
4.6.1.1	Kiemenstruktur nicht infizierter Karpfen.....	47
4.6.1.2	Kiemenstruktur KHV-infizierter Karpfen.....	47
4.6.2	Histologische Befunde an der Niere.....	49
4.6.2.1	Nicht infizierte Karpfen.....	49

---

4.6.2.2	KHV-infizierte Karpfen .....	50
4.7	Hämatologische Ergebnisse .....	51
4.7.1	Das rote Blutbild .....	52
4.7.1.1	Nicht infizierte Karpfen .....	52
4.7.1.2	KHV-infizierte Karpfen .....	52
4.7.2	Differenzialblutbild .....	58
4.7.2.1	Nicht infizierte Karpfen .....	58
4.7.2.2	KHV-Infektion .....	59
4.8	Klinisch-chemische Parameter in Plasma und Urin .....	64
4.8.1	Osmolarität in Plasma und Urin .....	64
4.8.2	Natrium in Plasma und Urin .....	67
4.8.3	Kalium in Plasma und Urin .....	68
4.8.4	Kalzium in Plasma und Urin .....	70
4.8.5	Phosphor in Plasma und Urin .....	72
4.8.6	Magnesium in Plasma und Urin .....	73
4.8.7	Kreatinin in Plasma und Urin .....	75
4.8.8	Gesamtprotein im Plasma .....	76
4.8.9	Alkalische Phosphatase in Plasma und Urin .....	77
4.8.10	Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) im Urin .....	79
4.8.11	Urin-Plasma-Verhältnisse der Elektrolyte .....	84
4.8.12	Wasserprobe .....	85
5	DISKUSSION .....	87
6	SCHLUSSBETRACHTUNG .....	96
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	97
8	SUMMARY .....	99
9	LITERATURVERZEICHNIS .....	101
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	111



11	TABELLENVERZEICHNIS.....	113
12	CURRICULUM VITAE.....	114
13	DANKSAGUNG.....	116

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>AP</b>	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
<b>A. dest.</b>	<u>A</u> qua <u>d</u> estillatum
<b>Ca</b>	<u>C</u> alcium, Kalzium
<b>°C</b>	<u>G</u> rad <u>C</u> elsius
<b>bp</b>	<u>B</u> asenpaare
<b>bzw.</b>	<u>b</u> e <u>z</u> i <u>e</u> h <u>u</u> n <u>g</u> s <u>w</u> e <u>i</u> s <u>e</u>
<b>ca.</b>	<u>c</u> ir <u>c</u> a
<b>CCB</b>	<u>C</u> ommon <u>C</u> arp <u>B</u> rain Zelllinie
<b>CCG</b>	<u>C</u> ommon <u>C</u> arp <u>G</u> ill Zelllinie
<b>CCV</b>	<u>C</u> hannel <u>C</u> atfish <u>V</u> irus
<b>cm</b>	<u>c</u> entim <u>e</u> tre, Zentimeter
<b>CPE</b>	<u>c</u> ytopathogener <u>E</u> ffekt
<b>CyHV-1</b>	<u>C</u> yprinides <u>H</u> erpes <u>v</u> irus <u>1</u> , Virus der Karpfenpocken
<b>CyHV-2</b>	<u>C</u> yprinides <u>H</u> erpes <u>v</u> irus <u>2</u> , Virus der hämatopoetischen Nekrose der Goldfische
<b>CyHV-3</b>	<u>C</u> yprinides <u>H</u> erpes <u>v</u> irus <u>3</u> , Koi-Herpesvirus
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<u>d</u> ouble <u>d</u> istilled <u>w</u> ater, <u>d</u> oppelt <u>d</u> estilliertes <u>W</u> asser
<b>d.h.</b>	<u>d</u> as <u>h</u> eis <u>s</u> t
<b>dl</b>	<u>D</u> ezi <u>l</u> iter
<b>DNA</b>	<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid, Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	<u>D</u> eoxyribonukleotid <u>t</u> riphosphat
<b>EDTA</b>	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
<b>et al.</b>	und andere, <i>et alii</i> (m), <i>et aliae</i> (f), <i>et alia</i> (n)
<b>Fa.</b>	<u>F</u> irma
<b>g</b>	gramm
<b>GGT</b>	<u>G</u> amma- <u>G</u> lutamyl- <u>T</u> ransferase
<b>GFR</b>	<u>G</u> lomeruläre <u>F</u> iltrationsrate
<b>h</b>	<u>h</u> our, Stunde

---

<b>Hb</b>	<u>H</u> ämoglob <u>in</u>
<b>HCL</b>	<u>H</u> ydrogen <u>ch</u> lorid
<b>H. E.</b>	<u>H</u> ämalaun <u>E</u> osin
<b>Htk</b>	<u>H</u> ämatokrit
<b>IcHV-1</b>	<u>I</u> ctalurid <u>H</u> erpes <u>v</u> irus <u>1</u>
<b>IE</b>	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheiten
<b>IHN</b>	<u>I</u> nfektiöse <u>H</u> ämatopoetische <u>N</u> ekrose
<b>i. p.</b>	<u>i</u> ntraperitoneal
<b>ISA</b>	<u>I</u> nfectious <u>S</u> almon <u>A</u> naemia, Infektiöse Lachsanämie
<b>K</b>	<u>K</u> alium
<b>kbp</b>	<u>K</u> ilobasenpaare
<b>KF-1</b>	<u>K</u> oi- <u>F</u> in- <u>1</u> -Zelllinie, Koi- <u>F</u> lossen- <u>1</u> -Zelllinie
<b>Kg</b>	<u>K</u> ilogramm
<b>KHV</b>	<u>K</u> oi- <u>H</u> erpes <u>v</u> irus
<b>KID50</b>	Zellkultu <u>r</u> - <u>i</u> nfektiöse <u>D</u> osis
<b>l</b>	<u>L</u> iter
<b>LAMP</b>	<u>L</u> oop Mediated Isothermal <u>A</u> mplification
<b>M</b>	<u>M</u> ol
<b>MCH</b>	<u>M</u> iddle <u>C</u> oncentration of <u>H</u> ämoglobin, <u>M</u> ittlere <u>H</u> ämoglobinkonzentration
<b>MCV</b>	<u>M</u> iddle <u>C</u> orpusculare <u>V</u> olume, <u>M</u> ittleres <u>C</u> orpusculäres <u>V</u> olumen
<b>MCHC</b>	<u>M</u> iddle <u>C</u> orpusculare <u>H</u> ämoglobin <u>C</u> oncentration, <u>M</u> ittlere <u>c</u> orpusculäre <u>H</u> ämoglobinkonzentration
<b>MEM</b>	<u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
<b>min</b>	<u>M</u> inuten
<b>mg</b>	<u>M</u> illigramm
<b>Mg</b>	<u>M</u> agnesium
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<u>M</u> agnesium <u>ch</u> lorid
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<u>M</u> agnesium <u>s</u> ulfat
<b>mmol</b>	<u>M</u> illimol
<b>ml</b>	<u>M</u> illiliter
<b>mM</b>	<u>m</u> illimolar
<b>mOsm</b>	<u>M</u> illiosmol
<b>mRNA</b>	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, Überbringer-Ribonukleinsäure

---

<b>mWs</b>	<u>M</u> illiwatt <u>s</u> ekunde
<b>MS 222</b>	<u>M</u> etaaminobenzo <u>e</u> säureethylester
<b>Na</b>	<u>N</u> atrium
<b>NaCl</b>	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
<b>nm</b>	<u>N</u> anometer
<b>OD</b>	optische <u>D</u> ichte
<b>OP</b>	<u>O</u> peration
<b>P</b>	<u>P</u> hosphor
<b>PBS</b>	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, Phosphatpuffer
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction, Polymerase-Kettenreaktion
<b>PE</b>	<u>P</u> oly <u>e</u> thylen
<b><i>p.i.</i></b>	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
<b>pmol</b>	<u>P</u> ikomol
<b>RNA</b>	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, Ribonukleinsäure
<b>sec</b>	<u>S</u> ekunden
<b>SPF</b>	<u>s</u> pezifisch- <u>p</u> athogen- <u>f</u> rei
<b>Std.Fehler</b>	<u>S</u> tandard <u>f</u> ehler
<b>T</b>	<u>T</u> era (10 <sup>12</sup> )
<b>TKf</b>	<u>T</u> hymidink <u>i</u> naseprimer <u>f</u> orward
<b>TKr</b>	<u>T</u> hymidink <u>i</u> naseprimer <u>r</u> everse
<b>TBE</b>	<u>T</u> ris <u>b</u> orsäure <u>e</u> thylendiamintetraacetat
<b>Tris</b>	<u>T</u> rihydroxymethylaminomethanpuffer
<b>T. borreli</b>	Trypanoplasma borreli
<b>U/l</b>	international <u>u</u> nits per <u>l</u> itre, Internationale Einheiten pro Liter
<b>U</b>	international <u>u</u> nits
<b>UV</b>	<u>U</u> ltraviolett
<b>V</b>	<u>V</u> olt
<b>VHS</b>	<u>V</u> irale <u>H</u> ämorrhagische <u>S</u> eptikämie
<b>W</b>	<u>W</u> att
<b>z.B.</b>	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
<b>µg</b>	<u>M</u> ikrogramm
<b>µl</b>	<u>M</u> ikroliter
<b>µmol</b>	<u>M</u> ikromol

# 1 EINLEITUNG

---

Mittlerweile sind Koi-Karpfen für viele Menschen ein Begriff. Wurde ein Koi-Karpfenhalter noch vor 10 Jahren verständnislos angeschaut, so ist es heutzutage keine Seltenheit mehr, Koi in Privatteichen von Hobbyfischhaltern vorzufinden. Ihre Beliebtheit stieg in den letzten Jahren stark an, so dass der Handel mit Koi-Karpfen zum großen Interesse vieler Züchter und Halter wurde. Leider birgt eine Haltung dieser Tiere aus fischgesundheitlicher und epidemiologischer Sicht einige bedeutende Risiken, die häufig nicht bekannt sind.

So hat sich weltweit das Koi-Herpesvirus (KHV), das auch als Cyprinides Herpesvirus 3 (CyHV-3) klassifiziert worden ist, ausgebreitet (GILAD et al. 2002, WALTZEK et al. 2005). Es verursacht akute Erkrankungen mit hohen Mortalitäten innerhalb kürzester Zeit sowohl bei der domestizierten, farblichen Variante von *Cyprinus carpio*, den Koi-Karpfen, als auch bei Speisekarpfen (ARIAV et al. 1999, WALSTER 1999, BRETZINGER et al. 1999). Große Probleme verursacht nicht nur der finanzielle Verlust des individuellen Kois, sondern vor allem auch die Ausrottung ganzer Karpfenbestände in Aquakulturen.

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist bis heute nicht vollständig geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Pathophysiologie der KHV-Erkrankung näher zu erforschen, um mit diesem Wissen die Karpfen sowie die Bestände von Züchtern und Privatbesitzern vor weiteren Ausbrüchen zu schützen.

Es soll geklärt werden, wieso es durch diese Erkrankung innerhalb kürzester Zeit zu hohen Mortalitäten bei Karpfen kommt. Es wird diskutiert, ob Gewebeschädigungen in den Kiemen, dem Darm oder der Niere zu einem Verlust der Osmoregulation führen. Dieser Pathomechanismus scheint bei der Ausbildung der Symptomatik bis hin zur Mortalität des infizierten Karpfens beizutragen. Deshalb soll diese Arbeit insbesondere Aufschluss über den Elektrolythaushalt KHV-infizierter Karpfen geben, wobei speziell auf die Elektrolyte im Blut und Urin infizierter Karpfen eingegangen wird.

Hierzu wurden Karpfen mit einem Isolat des Koi-Herpesvirus infiziert und Blut und Urin an bestimmten Tagen nach der Infektion entnommen. Zur Uringewinnung war eine

Katheterisierung der Harnblase der Karpfen erforderlich. Eine erfolgreiche Infektion der Karpfen mit dem KHV sollte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht werden. Zusätzlich wurde mittels PCR geprüft, ob KHV-Virus-DNA mit dem Urin ausgeschieden wird, und somit eine Ansteckung gesunder Karpfen auch über den Urin möglich ist.

**In dieser Studie sollen folgende Fragen erläutert und geklärt werden:**

- Welche Auswirkungen hat eine KHV-Erkrankung auf das Blutbild? Kommt es zu einer Anämie? Wie sieht das Differenzialblutbild aus?
  - Wie sehen die pathologischen Veränderungen im Elektrolythaushalt nach einer KHV-Erkrankung aus? Bricht die Osmoregulation der Karpfen zusammen?
  - Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Verhaltensänderungen, der hohen Mortalität, der Organschädigung, dem veränderten Blutbild und dem Elektrolythaushalt der Karpfen?
  - Können neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie einer KHV-Erkrankung gewonnen werden?
-

## 2 LITERATURÜBERSICHT

---

### 2.1 Überblick über das Koi-Herpesvirus

#### 2.1.1 Ätiologie

Das Koi-Herpes-Virus gehört zu der Familie der *Herpesviridae* und wurde nach der Wirtstierart benannt, in der die Infektion zuerst entdeckt und aus der anschließend das Virus isoliert wurde. Es infiziert generell Fische der Spezies *Cyprinus carpio*, also sowohl Speise- als auch Koi-Karpfen. Das Virion zählt mit insgesamt 170-230 nm zu den größten der Familie der *Herpesviridae*. Es besitzt eine lineare doppelsträngige DNA aus 277 bp, die sich in einem ikosaedrischen Nucleokapsid befindet. Das Viruscore wird von einem proteinreichen Tegument umgeben und insgesamt von einer Lipiddoppelmembran umschlossen (MINSON et al. 2000). Es handelt sich systematisch gesehen um das Cyprinide Herpesvirus 3 (CyHV-3) (WALTZEK et al. 2005) und wurde anhand der Krankheitserscheinungen auch als „carp nephritis and gill necrosis virus“ beschrieben (RONEN et al. 2003). Das CyHV-3 ist morphologisch ähnlich mit dem CyHV-1, das die Karpfenpocken verursacht, und mit dem CyHV-2, das zu der hämatopoetischen Nekrose bei Goldfischen („haematopoetic necrosis herpesvirus“) führt. Es unterscheidet sich zu diesen in den Wachstums- und Antigen-Eigenschaften und in der Ausbildung des zytopathischen Effektes in der Zellkultur (HEDRICK et al. 2006). Als DNA-Virus vermehrt sich das KHV im Zellkern seiner Zielzelle. So wie viele Herpesviren, die eine Latenz in ihrem Wirt etablieren (FRASER et al. 1981), besitzt auch das Koi-Herpesvirus diese Eigenschaft und regelt die Genexpression in diesem latenten Stadium stark herunter. Ein Nachweis des Virus ist in diesem Falle stark erschwert (MEYER 2007). Die latent infizierten Karpfen werden als „Carrierfische“ bezeichnet. Sie tragen das Virus in sich, erkranken aber nicht. Stresssituationen wie Transport, starke Temperaturwechsel oder Überwinterung führen häufig zur Aktivierung und erneuten Ausscheidung des Virus und einer damit verbundenen Ansteckungsgefahr für andere Karpfen (NEUKIRCH 2003, MEYER 2007).

### 2.1.2 Vorkommen und Verbreitung

Das Koi-Herpesvirus ist heutzutage aufgrund der rapiden Ausbreitung eines einzigen Virusisolates weltweit zu finden (GILAD et al. 2002). Krankheitsausbrüche wurden in Deutschland, Dänemark, Österreich, der Schweiz, den Niederlanden, Belgien, Frankreich, Italien, dem Vereinigten Königreich, Polen, Südafrika, Indonesien, Japan, Taiwan, Thailand und den USA beobachtet (HAENEN et al. 2004). Erstmals wurde das Virus 1998 in Israel diagnostiziert (ARIAV et al. 1999). Es waren hierbei Koi-Karpfen und Speisekarpfen betroffen. Die erste Isolation des Virus erfolgte 1998 in den USA durch Hedrick (HEDRICK et al. 1998).

Durch intensiven und unkontrollierten Handel mit Fischen breitete sich das Virus rasant aus. Hierbei spielen Ausstellungen von Koi, der internationale Fischhandel ohne Gesundheitsüberprüfungen und die intensive Aquakultur eine große Rolle (GILAD et al. 2003). Vor allem die Latenz des Virus und somit die Carrierfische (GILAD et al. 2002) trugen wesentlich zur rapiden globalen Verbreitung des KHV bei. Auch die jahrelang nicht vorhandene Bekämpfungspflicht förderte die Ausbreitung.

### 2.1.3 Wirtsspektrum, Übertragung und Inkubationszeit

Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass das Wirtsspektrum des KHV wie bei vielen Herpesviren sehr eng ist. Die Ausbildung von Morbiditäten und Mortalitäten sind auf die Spezies *Cyprinus carpio* beschränkt (ARIAV et al. 1999 und WALSTER 1999). Erkrankungen oder Todesfälle traten bei Goldfischen, Stören, Schleien, Goldorfen, Graskarpfen, Hechten und Zandern, die zusammen mit erkrankten Karpfen gehalten wurden, **nicht** auf (BRETZINGER et al. 1999 und HOFFMANN et al. 2000). Dies schließt diese Fische als potentielle Träger des Virus aber nicht aus. Meyer (2007) zeigte, dass nach dem Zusammensetzen von gesunden Karpfen mit Graskarpfen, Schleien, Goldfischen oder Silberkarpfen, die zuvor dem KHV ausgesetzt waren, die DNA des Koi-Herpesvirus anschließend auch bei den gesunden Karpfen gefunden werden konnte (MEYER 2007).

Die genaue Übertragung des Virus ist noch nicht geklärt. Bewiesen ist eine horizontale Übertragung unter Karpfen jeder Alterstufe. Dabei spielt Wasser als Vektor eine große Rolle, da das Virus in kontaminiertem Wasser mindestens vier Stunden lang infektiös bleibt (PERELBERG et al. 2003).



Ein weiterer wichtiger Vektor ist der Personenverkehr. So können Personen durch an feuchter Kleidung oder nassen Händen haftende Viruspartikel verschleppen. Eine Übertragung durch im Wasser lebende Tiere wie z.B. Enten, Kormorane und Frösche, die unmittelbaren Kontakt zu dem Hälterungswasser der infizierten Karpfen hatten, ist zwar nicht bewiesen, sie werden aber als potentielle Träger nicht ausgeschlossen. Auch eine Rolle der Karpfenlaus, *Argulus sp.*, als Überträger wird diskutiert.

Eine Zoonose ist aufgrund der sehr unterschiedlichen Milieubedingungen überaus unwahrscheinlich. In der Literatur sind bisher keine lokalen oder generalisierten Infektionen beim Menschen beschrieben worden. Der Grund hierfür ist unter anderem die Körpertemperatur des Menschen. Sie liegt mit *ca.* 37°C über dem Temperaturspektrum, in dem sich nach bisherigen Erkenntnissen das Koi-Herpesvirus vermehren kann.

Der Ausbruch der Krankheit hängt wesentlich von der Wassertemperatur ab (GILAD et al. 2003). Der empfängliche Temperaturbereich liegt zwischen 15 und 28°C (WALSTER 1999). Unter- und oberhalb dieses Bereichs kommt es trotz einer KHV-Infektion bei Karpfen nicht zum Ausbruch einer Erkrankung, vermutlich da die Temperatur maßgeblich die Virusreplikation beeinflusst, wie es auch von anderen piscinen Virusinfektionen (Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS), Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN)) bekannt ist (BLY & CLEM 1992, GILAD et al. 2003 und 2004).

Aufgrund des starken Temperatureinflusses kann die Inkubationszeit nicht genau bestimmt werden. Walster (1999) gab zwei bis drei Wochen an (WALSTER 1999), während Hoffmann (2001) eine Inkubationszeit von wenigen Tagen nannte (HOFFMANN 2001).

Das Virus scheint unter 13°C inaktiv zu sein (GILAD et al. 2003). Nicht erkrankte, aber infizierte Karpfen sind jedoch Träger des Virus und können auch nach Monaten der Haltung bei 12°C wieder vermehrungsfähiges, infektiöses Virus ausscheiden und andere Fische infizieren (MEYER 2007).

#### **2.1.4 Klinik**

Die erkrankten Tiere zeigen Apathie, Anorexie, Flossenklemmen, liegen regungslos auf dem Teichboden oder stehen in strömungsschwachen Zonen im Wasser wie z.B. am Einlauf eines Teiches. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung treten Koordinationsverluste und eine sporadische Hyperaktivität mit ziellosem Umherschwimmen auf (BLOOM 1998, ARIAV et al. 1999, WALSTER 1999).

Äußerlich erkennbare Symptome können stark variieren. Häufig tritt ein bilateraler Enophthalmus, teilweise abgelöst von einem Exophthalmus, und anfänglich eine vermehrte Schleimproduktion auf Haut und Kiemen auf. Die Schleimproduktion verringert sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung, so dass es zur Ausbildung einer „sandpapierartigen“ Haut kommt. Die betroffenen Tiere zeigen eine Dyspnoe, die vermutlich aufgrund der anfänglichen Kiemenschwellung und der anschließend folgenden fokalen oder ausgedehnten Nekrose des Kiemengewebes hervorgerufen wird. Die stark ausgeprägte Nekrose des Kiemengewebes äußert sich in weißen, abgestorbenen, scharf abgegrenzten Zellarealen zwischen weinroten, intakten Kiemenlamellen. Bei der Sektion sind alle inneren Organe pathologisch-anatomisch ohne besonderen Befund (BLOOM 1998, ARIAV et al. 1999, BRETZINGER et al. 1999, WALSTER 1999, HEDRICK et al. 2000, PERELBERG et al. 2003).

Die Morbidität einer KHV-Infektion beträgt 80-100% und die Mortalität 70-80%. Der Verlauf ist perakut bis akut (WALSTER 1999, BRETZINGER et al. 1999). Hoffmann und Mitarbeiter (2000) gaben die Mortalität sogar mit 100% an (HOFFMANN et al. 2000). Bretzinger und Mitarbeiter (1999) beschrieben eine Eradikation gesamter Karpfenbestände innerhalb weniger Tage (BRETZINGER et al. 1999).

Hohe Besatzdichten und schlechte Wasserqualitäten förderten den Ausbruch und das Fortschreiten der Erkrankung (WALSTER 1999).

Erkrankte Fische waren sehr anfällig gegenüber Sekundärinfektionen mit Parasiten, Bakterien oder Mykosen (BLOOM 1998, ARIAV et al. 1999). Bloom (1998) vermutete eine Suppression von Abwehrreaktionen, weshalb er den Namen „koi immune system suppressing disease“ für die KHV-Infektion vorschlug (BLOOM 1998).

### **2.1.5 Pathogenese**

Während der gesamten KHV-Infektion wurden hohe Viruskonzentrationen in Schleim, Haut, Kieme, Niere und Milz gemessen. Weiterhin wurde das Virusgenom im Darm, Leber, Gehirn und Blut detektiert (GILAD et al. 2004, PIKARSKY et al. 2004). Aufgrund der Krankheitssymptome und der Viruslasten wird ein Tropismus zur Haut, dem Respirationstrakt und dem Nervengewebe vermutet (GILAD et al. 2004).

Es ist unklar, auf welchem Wege das Virus in den Körper des Fisches eintritt. Anhand der hohen Viruskonzentrationen wird vermutet, dass das Virus über die Kiemen in den Körper gelangt und von dort über das Blut in den Leukozyten zur Niere transportiert wird

(PIKARSKY et al. 2004, BERGMANN 2004). Aber auch Darm und Haut werden als Eintrittspforte diskutiert (HEDRICK et al. 2000, PERELBERG et al. 2003, GILAD et al. 2004). Eine Virusvermehrung in Becherzellen könnte die anfänglich auftretende Hypersekretion des Hautschleims und anschließende „sandpapierartige“ Haut erklären (BRETZINGER et al. 1999, HEDRICK et al. 2000, PERELBERG et al. 2003).

Im Gegensatz zu den genannten Geweben konnte im zentralen Nervensystem das Virusgenom nicht regelmäßig nachgewiesen werden (PIKARSKY et al. 2004). Gray und Mitarbeiter (2002) stellten sich die Frage, ob dies mit der Latenz, wie es auch für andere Herpesviren typisch ist, erklärbar ist (GRAY et al. 2002). Sie konnten aber bisher keine eindeutigen Ergebnisse liefern. St-Hilaire und Mitarbeiter (2005) detektierten, dass dem KHV exponierte Karpfen eine **persistierende Infektion** etablieren können, die zu einer Virusreaktivierung und Übertragung auf andere Karpfen nach mehreren Monaten führen kann (ST-HILAIRE et al. 2005). Diese Beobachtung zeigte eindeutig, dass bei einer KHV-Infektion ein Latenzstadium ausgebildet wird, jedoch werden weitere Studien zur Latenz des KHV benötigt (HEDRICK et al. 2006). Meyer (2007) zeigte, dass Stresssituationen und Reinfektion latent infizierter Fische zu einer Virusreaktivierung und der Ausscheidung von infektiösem Virus führen (MEYER 2007).

### 2.1.6 Histologie

Im Verlauf einer KHV-Infektion getötete Karpfen hatten meist makroskopisch unauffällige Organe. Die histologische Untersuchung offenbarte jedoch in fast allen Organen ausgeprägte pathologische Veränderungen von unspezifischen Entzündungsreaktionen bis hin zu Degenerationen von Zellverbänden und Nekrosen des Gewebes (PIKARSKY et al. 2004). Am deutlichsten waren die Veränderungen im Kiemen- und Nierengewebe zu verzeichnen (HEDRICK et al. 2000).

Die histologische Untersuchung des Kiemengewebes ergab die Ausbildung von Hyperplasien, Hypertrophien und Nekrosen des Epithels, zum Teil mit Verschmelzungen der Kiemensekundärlamellen (HEDRICK et al. 2000). Pikarsky und Mitarbeiter (2004) beobachteten sogar den Verlust von Kiemensekundärlamellen sowie Entzündungsinfiltrate, die bereits am zweiten Tag *p.i.* auftraten. Ab dem sechsten Tag *p.i.* verstärkten sich die Kiemenschäden, welches bis zum Zusammenbruch der Kiemenlamellenstruktur führen konnte (PIKARSKY et al. 2004).

An den Spitzen der Primärlamellen wurden starke Nekrosen, häufig einhergehend mit massiver Bakterienbesiedlung, festgestellt. Es kam zu Lymphozyteninfiltrationen und bei schweren Infektionen zu eosinophilen Granulozyteneinlagerungen. Zum Teil wurde eine Ablösung des Kiemenepithels von der Basalmembran nachgewiesen (BRETZINGER et al. 1999, HOFFMANN et al. 2000).

In der Niere wurde bereits am zweiten Tag *p.i.* eine progressive interstitielle Nephritis diagnostiziert. Es kam zu einem Blutstau und anschließender Degeneration des Tubulusepithels vieler Nephrone (PIKARSKY et al. 2004). Auch das Interstitium wies proliferative Veränderungen auf. Nekrosen und Synzytien der Tubulusepithelzellen wurden nachgewiesen (HEDRICK et al. 2000, HOFFMANN et al. 2000).

Entzündungsbedingte Veränderungen und Nekrosen traten weiterhin in der Leber, im Pankreas, im Darm, der Milz und im zentralen Nervensystem auf. Neben ausgeprägten Nekrosen der Drüsenzellen im Pankreas traten Lymphozyteninfiltrate sowohl in der Leber als auch im Pankreas auf. In der Darmschleimhaut wurden nekrotische Herde (BRETZINGER et al. 1999) und submuköse Infiltrate (HOFFMANN et al. 2000) in den vorderen Darmabschnitten entdeckt. Hedrick und Mitarbeiter (2000) diagnostizierten eine Splenitis (HEDRICK et al. 2000), während Hoffmann und Mitarbeiter (2000) eine Milzatrophy feststellten (HOFFMANN et al. 2000). Im Zentralnervensystem konnten fokale menigeale und paramenigeale Entzündungen beobachtet werden (PIKARSKY et al. 2004).

Auch die Haut zeigte massive Schädigungen. Das Epithel löste sich von der Basalmembran ab und spezialisierte Zellen, wie zum Beispiel Schleimzellen und Clubzellen, degenerierten (BRETZINGER et al. 1999). In der Maulhöhle traten Epithelhyperplasien und Nekrosen auf (HEDRICK et al. 2000). Außerdem wurden in dem degenerierten Kiemen- und Maulhöhlenepithel, dem hämatopoetischen Nierengewebe und Milzparenchym die für Herpesviren typischen eosinophilen intranukleären Einschlusskörperchen entdeckt (ARIAV et al. 1999, BRETZINGER et al. 1999, HOFFMANN et al. 2000 und HEDRICK et al. 2000).

Bretzinger, Hedrick, Hoffmann und Perelberg (1999, 2000, 2003) beobachteten herpesvirusähnliche Partikel in den Zellkernen und im Zytoplasma der Kiemen-, Leber- und Darmzellen. Zusätzlich wurden diese Partikel auch in zirkulierenden Leukozyten detektiert (BRETZINGER 1999, HEDRICK et al. 2000, HOFFMANN et al. 2000 und PERELBERG et al. 2003).

### 2.1.7 Diagnostik

Bisher ist es nicht möglich, am lebenden Karpfen eine Infektion mit dem Koi-Herpesvirus nachzuweisen. Nach dem Auftreten entsprechender Krankheitssymptome besteht der Verdacht auf eine KHV-Infektion, es fehlt jedoch der diagnostische Beweis. Sicher diagnostiziert werden kann das Virus nur anhand der Untersuchung von Organpoolproben (Niere, Milz, Kieme, Gehirn, Leber) eines seziierten Fisches. Die Entnahme von Kiemen- und Flossenbiopaten unter Narkose zum Nachweis der KHV-Infektion am lebenden Tier ist zweifelhaft, da bei klinisch gesunden Carriern das Virus nicht sicher nachgewiesen werden konnte (PIKARSKY et al. 2004).

Da es sich bei den zu untersuchenden Fischen häufig um Koi-Karpfen handelt, die aufgrund ihres materiellen und ideellen Wertes nicht ohne weiteres zerlegt werden können, gibt es die Möglichkeit des Zusetzens eines Pilotfisches. Dieser Karpfen ist ein finanziell weniger wertvoller Speisekarpfen oder ein junger Farbfehlschlag bei Koi-Karpfen, der für einen bestimmten Zeitraum zu den zu untersuchenden Koi-Karpfen hinzugesetzt wird. Bei existierender KHV-Infektion wird dieser Pilotfisch angesteckt und kann anschließend seziiert werden. Diese Nachweismethode sollte jedoch nur nach tierschutzrechtlich kritischer Hinterfragung und im Einzelfall angewendet werden (NEUHAUS und MEYER 2005).

Einige Koiproduzenten nutzen den Einfluss der Wassertemperatur auf den Infektionsverlauf aus und halten die Koi-Karpfen bei nicht permissiven Temperaturen (unter 15°C und über 28°C) um eine Immunität gegen das Virus zu erzeugen (RONEN et al. 2003). Dieses Vorgehen erschwert den Nachweis einer Infektion, vermutete Neukirch (2003), da hierdurch latent infizierte Virusträger erzeugt werden, die später andere Karpfen anstecken können (NEUKIRCH 2003) (siehe Kapitel Wirtsspektrum, Übertragung und Inkubationszeit: Wassertemperatureinfluss).

Um eine größtmögliche Sicherheit hinsichtlich der Diagnostik einer KHV-Infektion in einem Bestand mit Koi-Karpfen oder Speisekarpfen zu erlangen, ist nach der Empfehlung des Fischgesundheitsdienstes in Deutschland bei unklarer Symptomatik eine hohe Stichprobenzahl wichtig.

#### 2.1.7.1 Nachweismethoden

Das Koi-Herpesvirus kann indirekt mit molekularbiologischen Methoden wie der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay

(ELISA) nachgewiesen werden. Direkt ist das Virus mit histopathologischen Methoden wie Elektronenmikroskopie und über die Anzucht in einer Zellkultur detektierbar.

Eine neue Methode stellt die Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) dar, die auf einer PCR basiert (GILAD et al. 1999 und 2002, HEDRICK et al. 2000, GUNIMALADEVI et al. 2004, ADKISON et al. 2005, BERCOVIER et al. 2005, GRAY et al. 2005). Leider ist jede Methode unterschiedlich sensitiv. Keine dieser Methoden erlaubt den immer korrekten positiven Nachweis einer positiven KHV-Organpoolprobe. Dies erschwert den Nachweis des Koi-Herpesvirus.

1. Die in der Routinediagnostik derzeit übliche und im Moment sicherste Methode ist die PCR, bei der Teile des Virusgenoms vermehrt und mittels Gelelektrophorese visualisiert werden. Hierfür sind verschiedene Primer beschrieben worden, deren Wahl sich auf die Sensitivität der Methode auswirkt (GILAD et al. 2002 und 2004, GRAY et al. 2002, BERCOVIER et al. 2005). Zur Prüfung der Spezifität der Primer wurde DNA anderer pisciner Herpesviren eingesetzt wie die DNA des CyHV-1 (Virus der Karpfenpocken) oder des CCV (Channel Catfish Herpesvirus) (BERCOVIER et al. 2005). Der Nachteil PCR basierter Methoden ist, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob in der untersuchten Probe vermehrungsfähiges Virus vorlag oder nicht.

2. Die LAMP-Technik ist sehr sensitiv und effizient. Sie dauert nur 90 min und benötigt im Gegensatz zur PCR keinen kostenintensiven Thermocycler. Allerdings muss sich diese Methode erst bewähren und findet deshalb noch keine Anwendung in der Routinediagnostik.

3. Zur Anzucht des Virus in einer Zellkultur stehen derzeit zwei Zelllinien zur Verfügung: Koi-Fin (KF-1) (HEDRICK et al. 2000) und die Cyprinus-Carpio-Brain (CCB) (NEUKIRCH et al. 1999) -Zelllinie. Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und unsicher, da sich nicht alle KHV-Isolate in die Zellkultur überführen, sich in ihr vermehren und erkennen lassen.

4. Auch der elektronenmikroskopische Nachweis ist schwierig und unsicher. Hierbei sind vor allem hohe Viruskonzentrationen erforderlich, die nicht immer vorhanden sind. Deshalb eignet sich diese Methode vor allem nicht als Virusnachweis bei der Fragestellung, ob eine latente KHV-Infektion vorliegt oder nicht.

### **2.1.8 Differentialdiagnose**

Die Differentialdiagnose zu anderen Krankheiten ist schwierig. Mängel bei der Wasserqualität, wie hohe Ammonium- und Nitritkonzentrationen führen ebenfalls zu hohen Morbiditäten und Mortalitäten (ARIAV et al. 1999). Sie können gleichermaßen wie die KHV-Infektion Haut- und Kiemenschäden, Dyspnoe, Apathie und zentralnervöse Ausfallerscheinungen auslösen (BAUR und RAPP 2003). Ebenso sind bakterielle, mykotische und parasitologische Primärinfektionen zu berücksichtigen, die auch zu Dermatitisen und Kiemennekrosen führen können.

### **2.1.9 Bekämpfung und Desinfektion von KHV**

Aufgrund ihrer Lipidhülle sind freie Herpesviren labil gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmitteln (NEUKIRCH 2003). Das Koi-Herpesvirus verliert seine Infektiosität in der Zellkultur nach zwei Tagen Lagerung bei 20-25°C. Bei einer Lagerung von - 80°C für 50 Tage bleibt das Virus infektiös, genauso wie bei einer Lagerung bei 15°C für 42 Tage.

Hingegen konnte bei einem pH-Wert unter 3 (eingestellt durch Salzsäure) und über 11 (eingestellt mittels Natriumhydroxid) nach zweistündiger Einwirkzeit keine Infektiosität in der Zellkultur mehr festgestellt werden (NEUKIRCH 2003).

Außerdem kann von einer Inaktivierung des Virus bei einer UV-Strahlendosis von  $4,0 \times 10^3$   $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$  und bei Temperaturen über 50°C für eine Minute ausgegangen werden. Genauso inaktivieren eine Iodophor-Lösung in einer Konzentration von 200 mg/l, eine Benzalkoniumchlorid-Lösung in einer Konzentration von 60 mg/l oder 30%iger Ethanol jeweils mit einer Einwirkzeit von 20 min und Chlor in einer Konzentration von 3 mg/l das Virus (KASAI et al. 2005).

Grundsätzlich sollten Gerätschaften wie Kescher, Becken, Schläuche und Eimer, die mit infiziertem Wasser in Berührung gekommen sind, gründlich gereinigt und desinfiziert werden.

### **2.1.10 Therapie und Prophylaxe**

Perelberg und Mitarbeiter (2005) testeten einen attenuierten Virusstamm als Lebendvakzine an Karpfen (PERELBERG et al. 2005). Sie entdeckten protektive Eigenschaften, jedoch auch viele Nachteile einer Impfung der Karpfen. Eines der größten Probleme hierbei ist, dass eine Unterscheidung zwischen einer Feldvirusinfektion und dem Impfvirus nach vorausgegangener

Impfung nicht mehr möglich ist. Außerdem kann es bei dem Impfstamm zu einer Virulenzsteigerung kommen. Solche betroffenen Tiere können das Virus ausscheiden und verbreiten. Auch die Tiere, die nach erfolgreicher Impfung zusätzlich mit dem Feldvirus infiziert werden, erkranken nicht, scheiden das Feldvirus jedoch aus und tragen somit auch zur unkontrollierten Verbreitung des KHV bei (PERELBERG et al. 2005).

Eine Therapie gegen die Koi-Herpesvirus-Erkrankung gibt es bis *dato* nicht. Auch eine bedenkenlose Vakzine zur Prophylaxe existiert zurzeit nicht.

Aus diesen Gründen gibt es nur präventive Empfehlungen zur Verhinderung einer KHV-Infektion. Es sollten keine „immunisierten“, d.h. vakzinierte oder bei nicht permissiblen Temperaturen dem Virus exponierte, Koi ein- bzw. zugekauft werden. Nur der Zukauf von Individuen aus nachweislich gesunden Beständen sollte stattfinden. Hierzu sind PCR-Nachweise einer biometrisch aussagekräftigen Stichprobenuntersuchung unerlässlich. Bei negativen Ergebnissen wird zur zusätzlichen Sicherheit eine Quarantänehaltung und Beobachtung der Tiere über mindestens zwei Wochen empfohlen. Die Tiere werden hierbei bei 23°C gehalten. Ein Zusetzen eines Pilotfisches kann durchgeführt werden.

### **2.1.11 Rechtslage**

Das KHV ist in Deutschland im Dezember 2005 in die nationale Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen aufgenommen worden.

Bisher ist keine Bekämpfungspflicht vorgeschrieben, da die Fischseuchen-Verordnung nicht um eine die KHV-Infektion betreffende Bekämpfungsvorschrift ergänzt wurde, und es bisher noch keine eigene Verordnung über das Koi-Herpesvirus existiert.

Jeder KHV-Ausbruch und auch sein Verdacht ist aufgrund der Anzeigepflicht unverzüglich der zuständigen Behörde, dem Veterinäramt des Landkreises oder der kreisfreien Stadt, anzuzeigen.

## **2.2 Überblick zur Anatomie und Physiologie der Karpfenkieme und -niere**

### **2.2.1 Die Anatomie der Karpfenkieme und -niere**

#### **4.2.1.1 Kieme**

Die Kiemen sind paarig angeordnet und durch den Kiemendeckel geschützt. Sie bestehen aus vier einzelnen Kiemenbögen, an denen jeweils zwei Kiemenblätter sitzen. Ein Kiemenblatt



besteht aus vielen Primärlamellen, von denen tannenbaumartig Sekundärlamellen abgehen. Durch diesen Aufbau ist die Oberfläche der Kieme sehr stark vergrößert. An den Sekundärlamellen erfolgt der Gasaustausch, indem das Atemwasser in entgegengesetzter Richtung zum Blut über die Lamellen strömt. Dieses Gegenstromprinzip ermöglicht, dass an den Kiemen bis zu 80% der im eingeatmeten Wasser enthaltenen Sauerstoffmenge dem Wasser entzogen und in das Blut der Fische aufgenommen werden kann. Die Atmung erfordert einen permanenten Wasserstrom, der bei Karpfen durch Bewegungen von Maul und Kiemendeckel erzeugt wird. Die Sauerstoffaufnahme wird durch einen O<sub>2</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen Wasser und Blut ermöglicht (ROBERTS 1989).

#### 4.2.1.2 Niere

Die Niere der Karpfen lässt sich in eine craniale Kopfniere und eine caudale Rumpfniere unterteilen. Dies ist auch makroskopisch zu erkennen. Die Kopfniere, Pronephros, besteht aus hämatopoetischem Gewebe und hat die gleiche Funktion wie das rote Knochenmark der Säugetiere. Die Rumpfniere, Mesonephros, übernimmt harnexkretorische und osmoregulatorische Aufgaben (ROBERTS 1989, ALMACHER 1992). Die Niere liegt retroperitoneal als paariges Organ ventral entlang der Wirbelsäule sattelförmig zwischen dem cranialen und caudalen Anteil der Schwimmblase. Ihre dreiecksförmigen Lappen liegen dorsolateral der Schwimmblase auf (HICKMAN und TRUMP 1969, BOND 1979, SAKAI 1985, ROBERTS 1989). An den beiden Lateralflächen der Rumpfniere liegen die Harnleiter, die Wolff'schen Gänge, die sich kurz vor der Mündung in die Harnblase vereinigen (SAKAI 1985). Die Harnblase stellt eine Ausweitung der Harnleiter dar und ist mit der Harnblase der höheren Wirbeltiere nicht zu homologisieren (STOSKOPF 1993).

Der produzierte Urin wird aus den Nierentubuli über die Sammelrohre in die Harnleiter geleitet und von dort in die Harnblasenerweiterung überführt. Über einen als Urethra bezeichneten sehr kurzen Ausführungsgang mündet die Harnblase zusammen mit dem Gonodukt direkt caudal des Afters in der Urogenitalpapille nach außen (ROBERTS 1989).

### 2.2.2 Histologie des Mesonephros der Karpfen

Die Fischniere besitzt keine Aufteilung in Nierenrinde und Nierenmark, sondern ist segmental angelegt. Um die Nephrone befindet sich interstitielles Gewebe, das eine hämatopoetische Funktion besitzt. Somit hat die Rumpfniere zusätzlich zu ihrer exkretorischen und

osmoregulatorischen Funktion auch eine der Kopfniere vergleichbare Funktion als lymphoides Organ (HENTSCHEL 1977, SAKAI 1985). Da die Kopfniere bei Karpfen keine exkretorische Funktion hat, wird auf diese im Folgenden nicht mehr eingegangen.

Das Nephron der Karpfen besteht aus dem Nierenkörperchen und dem Tubulussystem. Das Nierenkörperchen, *Corpusculum renale*, setzt sich aus dem Glomerulum und der Bowmann'schen Kapsel zusammen. Das Tubulussystem besitzt die proximalen Segmente 1 und 2, das intermediäre Segment, den distalen Tubulus und das Sammelrohrsystem (HICKMAN und TRUMP 1969). Die Henle'sche Schleife existiert bei Fischen nicht (LEHMANN 1991, STOSKOPF 1993).

### 2.2.3 Osmo- und Ionenregulation der Karpfen

Das Süßwasser, in dem die Karpfen leben, ist im Vergleich zu ihrer Körperflüssigkeit hypoosmotisch, d.h. ihr Plasma ist gegenüber dem Wasser hyperosmotisch. Aufgrund dessen neigt Süßwasser dazu, entlang des osmotischen Gradienten über Kiemen und die permeablen Oberflächen des Pharynx in den Körper der Fische einzudringen, um diesen Gradienten auszugleichen (ROBERTS 1989, EVANS 1993). Salze hingegen diffundieren über die permeablen Oberflächen entlang des Konzentrationsgradienten nach außen (BONE und MARSHALL 1985). Das bedeutet, dass Süßwasserfische, wie z.B. Karpfen, ständig einem Wassereinstrom und einem Salzverlust entgegensteuern müssen, damit sie nicht Gefahr laufen, durch den Wassereinstrom an Volumen zuzunehmen und Salze zu verlieren. Dieses osmotische Problem wird hauptsächlich durch die Niere kompensiert. Sie produziert große Volumina eines verdünnten, hypotonen Urins.

Die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) gibt das Gesamtvolumen des Primärharns an, das von allen Glomeruli beider Nieren zusammen in einer definierten Zeiteinheit filtriert wird. Das besondere an der glomerulären Filtration der Karpfen ist, dass der Urin sehr niedrige Natrium- und Chloridkonzentrationen aufweist und deshalb im Vergleich zum Blutplasma weniger als 10% an osmotisch wirksamen Substanzen enthält (ROBERTS 1989, EVANS 1993).

Dafür benötigen die Fische einen hocheffektiven Reabsorptionsmechanismus für monovalente Ionen in Verbindung mit einer minimalen tubulären Permeabilität für filtriertes Wasser (HICKMANN und TRUMP 1969). Aufgrund der hohen Glomerulären Filtrationsrate wurde bei Karpfen ein Urinfluss von *ca.* 8 ml in der Stunde pro kg Körpergewicht gemessen (KAKUTA et al. 1986). Einige Fische sind in der Lage, die GFR herunterzuregulieren, so

dass im Süßwasser 45% aller Nephronen filtern, im Salzwasser hingegen nur 5%. Diese Fähigkeit wird **glomeruläre Intermittenz** genannt (HENTSCHEL et al. 1978, ELGER 1981).

Auch die Kieme steuert dem Salzverlust entgegen. Der passive Ionenverlust über die Kiemen wird durch eine aktive Aufnahme von Natrium und Chlorid über die Kiemen zusätzlich zur Absorption aus der Nahrung ausgeglichen (ROBERTS 1989). Die Stickstoffexkretion, die hauptsächlich über die Kiemen abläuft, unterstützt dies. Natrium wird hierbei im Austausch gegen Ammonium und zusätzlich auch gegen Protonen aufgenommen (BONE und MARSHALL 1985).

#### **2.2.4 Osmoregulatorische und exkretorische Funktion der Niere**

Aufgabe der Niere der Süßwasserfische ist, osmotisch aufgenommenes Wasser durch Ausscheiden des gleichen Volumens an verdünntem hypotonen Urin auszugleichen. Die Transportprozesse in den Nierentubuli sind zum Teil noch nicht genau geklärt. Vieles ergibt sich nur aus dem Vergleich mit homologen Strukturen anderer Wirbeltiere (HENTSCHEL und MEYER 1980, EVANS 1993).

Im proximalen Tubulus wird NaCl, wahrscheinlich über Na/Cl-Cotransport, in den Urin sezerniert und Wasser osmotisch nachgezogen (EVANS 1993). Außerdem werden hier zweiwertige Ionen wie Kalzium reabsorbiert, so dass ihre Konzentrationen im Urin sehr gering sind.

Eine hohe Aktivität der Na/K-ATPase, der Mitochondrien und oxidativer Enzyme lassen darauf schließen, dass im distalen Tubulus ein aktiver Ionentransport stattfindet. Hier erfolgt die Reabsorption von Natrium mit passivem Nachstrom von Chlorid. Dieser Abschnitt des Tubulus ist für Wasser undurchlässig (HENTSCHEL und MEYER 1980, HENTSCHEL und ELGER 1987). Es wird angenommen, dass der distale Tubulus und die Sammelrohre für die Urinverdünnung bei Süßwasserfischen notwendig sind, da der distale Tubulus bei fast allen stenohyalinen Salzwasserfischen fehlt (HICKMANN und TRUMP 1969). Aufgrund der starken Schleimhautauskleidung der Sammelrohre und der Harnleiter bei Süßwasserfischen wird vermutet, dass dies eine Anlagerung der Kationen an die Polyanionen des Mukus ermöglicht und somit eine Rolle beim Natriumrücktransport spielt (HENTSCHEL und MEYER 1980).

Auch bei der harnblasenähnlichen Erweiterung wird diskutiert, ob diese die Funktion einer Ionenrückresorption und Wasserimpermeabilität besitzt (EVANS 1993). Hirano und

Mitarbeiter (1973) bestätigten, dass die Harnblase der Karpfen eine sehr geringe Permeabilität für Natrium und Chlorid und keine Durchlässigkeit für Wasser besitzt (HIRANO et al. 1973). Die Harnblasen der Karpfen sind mit einem Fassungsvermögen von 1,5-2,0 ml pro kg Körpergewicht sehr klein (KAKUTA et al. 1986).

### **2.2.5 Physiologische Zusammensetzung des Plasmas und Urins bei Karpfen**

Bisher liegen nur wenige Studien zur Plasma- und Urinzusammensetzung bei Fischen und somit auch beim Karpfen vor. Kakuta und Mitarbeiter (1986) detektierten, dass die Urinosmolarität ungefähr ein Zehntel der Plasmaosmolarität ausmacht (KAKUTA et al. 1986). Sie reduziert sich im Mittel von einer Konzentration von 258 mOsm/l im Plasma auf 29,4 mOsm/l im Urin (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Natrium macht unter den untersuchten Elektrolyten mit *ca.* 70-80% den größten Anteil der Kationenkonzentrationen im Urin aus. Diese Untersuchungsergebnisse stimmen mit den von Hentschel und Mitarbeitern (1978) an Süßwassergiebeln gewonnenen Werten überein (HENTSCHEL et al. 1978).

Natrium reduziert sich im Mittel von 120 mmol/l im Plasma auf 12 mmol/l im Urin (Tabelle 1 und Tabelle 2). Ebenfalls verringern sich die Elektrolyte Kalium, Kalzium und Magnesium auf unter die Hälfte der im Plasma gemessenen Konzentrationen (KAKUTA et al. 1986). Im Gegensatz dazu konnte Ammonium in hohen Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden (KAKUTA et al. 1986), obwohl diese Stickstoffverbindung bei Fischen hauptsächlich über die Kiemen abgegeben wird. Proteine konnten Kakuta und Mitarbeiter (1986) in allen Urinproben nachweisen (KAKUTA et al. 1986). Es ließ sich aber keine Periodizität in den Proteinspiegeln nachweisen. Die Konzentrationen im Urin waren sehr niedrig. Sie machten einen Urinanteil von 0,12-0,3% des im Karpfenplasma gefundenen Proteinspiegels aus (KAKUTA et al. 1986 und 1992).

Untersuchungen zur Phosphatausscheidung wurden bisher nur bei Giebeln durchgeführt. Kaune (1980) fand heraus, dass sowohl ein resorbierender als auch ein sezernierender Mechanismus im Nephron existiert (KAUNE 1980). Der Phosphatspiegel im Plasma kann somit reguliert werden.

Zur Untersuchung der Nierenfunktion und des Urins empfehlen Kakuta und Mitarbeiter (1986) eine Dauerblasenkatheterisierung mit einer Urinsammlung in 6-Stunden-Intervallen beim Karpfen (KAKUTA et al. 1986). Damit werden ausreichende Urinmengen gesammelt und Veränderungen in der Urinzusammensetzung erkennbar. Kaune (1980) beobachtete

jedoch eine durch Stresshormone bei der Katheterisierung ausgelöste Labordiurese bei Fischen (KAUNE 1980). Nach 12 bis 24 Stunden waren der Urinfluß und die Urinzusammensetzung bei Regenbogenforellen und Giebeln wieder normal (KAUNE 1980). Deshalb wird in dieser Arbeit ein 24-Stunden-Intervall für die Urinsammlung eingehalten.

*Tabelle 1: Osmolarität und Elektrolytkonzentrationen im Urin von Cypriniden*

<b>AUTOR</b>	<b>KAKUTA et al. (1986)</b>	<b>KAKUTA et al. (1992)</b>	<b>KAUNE (1980)</b>	<b>MEYER (2001)</b>
Spezies	Karpfen	Karpfen	Giebel	Karpfen
Wassertemperatur [°C]	29	16	22 –24	20
Urinfluss [ml/kg/h]	8,37 ± 1,57	3,4 ± 0,5	3,86 ± 1,01	7,16 ± 2,43
Osmolarität [mOsm]	29,4 ± 1,2	11 ± 1,5	15 ± 1,4	28,25 ± 8,61
Natrium [mmol/l]	12,05 ± 0,68	4,8 ± 0,84	1,93 ± 0,5	8,50 ± 3,70
Kalium [mmol/l]	1,40 ± 0,28	0,8 ± 0,31	3,73 ± 0,59	0,70 ± 0,67
Kalzium [mmol/l]	0,27 ± 0,11	0,32 ± 0,13	n.b.	0,83 ± 0,47
Magnesium [mmol/l]	0,12 ± 0,03	0,19 ± 0,08	n.b.	0,04 ± 0,03
Phosphor [mmol/l]	n.b.	0,13 ± 0,07	1,97 ± 0,09	0,05 ± 0,06
Ammonium [mg/l]	107,1 ± 17,7	8,8 ± 3,7	18,4 ± 2,7	8,09 ± 2,93

Angaben als Mittelwerte aus verschiedenen Untersuchungsgruppen

±: Standardabweichung

*Tabelle 2: Osmolarität und Elektrolytkonzentrationen im Plasma von Karpfen*

<b>AUTOR</b>	<b>FUCHS u. ALBERS (1988)</b>	<b>KAKUTA et al. (1992)</b>	<b>MEYER (2001)</b>
Osmolarität [mOsm]	274	258	280 ± 11,93
Natrium [mmol/l]	133	120,8	138,56 ± 3,51
Kalium [mmol/l]	3,3	3,2	0,28 ± 0,09
Kalzium [mmol/l]	1,8	2,84	1,66 ± 0,60
Magnesium [mmol/l]	1,5	0,64	1,30 ± 0,20
Phosphor [mmol/l]	0,4	1,68	1,53 ± 0,49

Angaben als Mittelwerte der Werte verschiedener Untersuchungsgruppen, ±: Standardabweichung

*Tabelle 3: Gesamtprotein und Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) im Blut von Karpfen*

<b>AUTOR</b>	<b>HILGE (1980)</b>	<b>ALMACHER (1992)</b>	<b>OESTER- REICH (1996)</b>	<b>BÖTTCHER (1998)</b>	<b>MEYER (2001)</b>
Plasma/ Serum	Plasma	Serum	Serum	Plasma	Plasma
Proteine [g/l]	30,9 - 40,8	34,7 - 40,8	23 - 38	21,3 - 37,6	34,06 ± 4,29
AP [U/l]	n. b.	n. b.	n. b.	21 - 233	56,88 ± 21,92

Angaben als Mittelwerte oder als Minimum und Maximum der Werte verschiedener Untersuchungsgruppen

±: Standardabweichung

n. b.: nicht bestimmt

Die chemischen Parameter im Blut von Fischen sind einer starken individuellen Variation unterworfen. In der Literatur angegebene Messwerte dienen deshalb nur zur Orientierung (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

Die Gesamt-Osmolarität im Fischplasma wird zu 75% durch die Konzentration der Ionen Natrium und Chlorid bestimmt. Die restlichen 25% setzen sich aus Kalium, Kalzium, Magnesium, Phosphat, Sulfat und „non-protein-nitrogen“ Verbindungen, insbesondere Harnstoff, zusammen (EVANS 1993). Eine Erhöhung der Osmolarität tritt bei Salinitätsveränderungen des umgebenden Wassers, Verunreinigungen des Wassers, die zu Kiemenschäden führen, oder stressbedingter Muskellactatacidose auf. Hierbei kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Osmolarität, die mittels Wassereinstrom aus dem Extrazellularraum behoben wird, woraus eine extrazelluläre Erhöhung der Natrium- und Chloridkonzentration resultiert (MCDONALD und MILLIGAN 1992). Bei Schädigungen der Haut oder des Darms kommt es bei Süßwasserfischen zum verstärkten Einstrom von Wasser und somit zu einer Erniedrigung der Plasmaosmolarität (STOSKOPF 1993). Da bei einer KHV-Infektion eine Kiemennekrose und eine „sandpapierartige“ Haut auftritt, soll in dieser Studie untersucht werden, ob sich dies auch auf die Osmolarität des Plasmas auswirkt.

Kalium ist überwiegend intrazellulär vorzufinden, weniger als 2% des Gesamtkörperanteils an Kalium ist extrazellulär vorhanden. Jeder Ein- oder Ausstrom von Kalium wird durch einen Transfer in oder aus dem intrazellulären Kompartiment aufgefangen. Veränderungen der Kiemenpermeabilität haben deshalb kaum Auswirkungen auf den Plasmakaliumspiegel. Jedoch kann durch Freisetzung von Kalium aus Muskelzellen oder, aufgrund des hohen

Kaliumspiegels in Erythrozyten, durch Hämolyse ein Anstieg der Kaliumkonzentration im Plasma verursacht werden (MCDONALD und MILLIGAN 1992).

Der Kalziumhaushalt ist bei Fischen eng reguliert. Trotz massiver Veränderungen wie Stress, Hypoxie oder Vitellogenese bei weiblichen Fischen verändert sich die Konzentration von freiem Kalzium im Plasma nicht (KAKUTA et al. 1992, MCDONALD und MILLIGAN 1992). Eine Ursache dafür ist, dass ein Teil des Kalziums (30-48%) an Proteine gebunden ist. Auch der Magnesiumspiegel ist im Plasma eng reguliert. Bei Karpfen unter einer Hypoxie stieg jedoch die Magnesiumkonzentration stark an. Dies führte zu einer erhöhten renalen Magnesiumsekretion (KAKUTA et al. 1992).

Die Plasmaproteine spielen bei Säugetieren bei der vasalen und extravasalen Verteilung der extrazellulären Flüssigkeit eine große Rolle. Sie sind mitverantwortlich für den kolloidosmotischen Druck und dienen als Puffersubstanz (BICKARDT 1992). Die Gesamtproteine setzen sich bei Fischen aus Albuminen, Immunglobulinen, Gerinnungsproteinen, Kalzium-bindenden Proteinen, Metall-bindenden Proteinen, Lipoproteinen und Hormon-bindenden Proteinen zusammen. Ein Anstieg des Gesamtproteingehalts kann bei Fischen durch eine Verschiebung der extrazellulären Flüssigkeit in den Intrazellularraum begründet sein. Ein Abfall kommt durch eine Hydratation des Plasmas zustande (MCDONALD und MILLIGAN 1992).

Die Alkalische Phosphatase (AP) wird bei Säugetieren bei pathologischem Zellstoffwechsel synthetisiert (BICKARDT 1992). Bei Karpfen ist die AP Leitenzym der Niere und ist bei Nierenschäden erhöht (HACKERT-KORDE 1977, HENTSCHEL und MEYER 1980, SCHEINERT und HOFFMANN 1987).

Die Messung der Aktivitäten des Enzyms Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) im Urin ist bei Säugetieren ein sensibler Indikator für das Maß zerstörter Nierentubuli. Es ist physiologisch in Epithelzellen des proximalen Tubulus vorzufinden (GRAUER und LANE 1995).

Untersuchungen an Säugetieren zeigten, dass Kreatinin ein Produkt des endogenen Muskelstoffwechsels ist. Es wird aus Kreatin und Phosphokreatinin gebildet und hauptsächlich durch die Glomerula in den Urin filtriert. Kreatinin ermöglicht deshalb, Aussagen über das Glomerulumsystem zu machen. Es hat den Vorteil, dass die Bildung nicht nahrungsabhängig ist und vom endogenen Proteinmetabolismus nicht beeinflusst wird. Prärenal steht ein erhöhter Kreatininwert unter anderem für Dehydratation und

Elektrolytimbalance, renal unter anderem für eine akute generalisierte Nephropathie und Glomerulonephritis. Die Serumkonzentration steht in einer gewissen Beziehung zur Muskelmasse des Individuums (KRAFT und DÜRR 1999). Kreatininmesswerte liegen bis *dato* für Karpfen nicht vor. Deshalb orientiert sich das Wissen in dieser Arbeit an den Untersuchungen bei Säugetieren. Referenzwerte vom Serum liegen beim Hund bei 35-106  $\mu\text{mol/l}$ , bei der Katze bei 0-106  $\mu\text{mol/l}$  und beim Schwein bei 40-133  $\mu\text{mol/l}$  (KRAFT und DÜRR 1999).

### **2.2.6 Physiologische Messwerte ausgewählter hämatologischer und chemischer Parameter im Karpfenblut**

Untersuchungen zur Hämatologie von Karpfen zeigten, dass die Parameter Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin starken individuellen Schwankungen unterliegen (HAMERS 1994). Dombrowski (1953) detektierte bereits im morphologischen Blutbild von Karpfen große individuelle Unterschiede (DOMBROWSKI 1953), und Böttcher (1998) stellte einen Einfluss von Jahreszeit, Temperatur, Fütterung und Körpergröße auf klinisch-chemische Parameter im Blut von Karpfen fest (BÖTTCHER 1998). Daher wurde in dieser Studie von jedem Versuchskarpfen zehn Tage vor der KHV-Infektion eine Blutprobe zusätzlich zu der Blutprobe, die während der KHV-Infektion untersucht wurde, analysiert. Somit war ein Vergleich von Messwerten von vor und nach der Infektion möglich, was individuelle Schwankungen erkennen ließ. Bei Karpfen liegt der Hämatokritwert im Mittel bei 0,31 l/l, der Hämoglobinwert im Mittel bei 81 g/l und die Erythrozytengesamtzahl bei 1,67 Tera Erythrozyten/l (KAKUTA 1992) (siehe Tabelle 4). Die Leukozytengesamtzahl Karpfen liegt im Mittel bei  $7.590 \pm 1.682$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ .



Tabelle 4: Hämatologische Parameter gesunder Karpfen

AUTOR	HAMERS (1994)	KAKUTA (1992)	HILGE (1980)	MEYER (2001)
Erythrozyten [Tera Erythrozyten/l]	1,56	1,27	1,48 - 1,71	1,67 ± 0,40
Hämatokrit [l/l]	0,31	0,31	0,33 - 0,45	0,379 ± 0,279
Hämoglobin [g/l]	81	81	87 - 109	104,7 ± 25,8
MCV [ $\mu\text{m}^3$ ]	199,7	243	191,8 - 211	237,14 ± 47,7
MCH [pg]	52,8	64	55,6 - 66	64,63 ± 18,48
MCHC [g/l]	266	260	233 - 292	276,7 ± 69,9

Angaben als Mittelwerte oder als Minimum und Maximum der Werte verschiedener Untersuchungsgruppen

±: Standardabweichung

### 2.2.7 Pathophysiologische Veränderungen bei Nephritiden und resultierender Niereninsuffizienz

Aufgrund der bewiesenen Schädigungen der Niere (HEDRICK et al. 2000, PIKARSKI et al. 2004) wird vermutet, dass eine KHV-Erkrankung zu einer Niereninsuffizienz führt.

Es gibt jedoch nur wenige Veröffentlichungen (MEYER 2001, ELGER et al. 1986) zu funktionellen Beobachtungen von Nierenerkrankungen bei Süßwasserfischen. Hingegen sind bei Säugetieren eine Vielzahl patho-physiologischer Veränderungen bei Nephritiden beschrieben worden.

Die in der Studie von Meyer (2001) mit *T. borreli* infizierten Karpfen zeigten im Blut neben einer regenerativen Anämie, die zunächst normochrom und mikrozytär war und am Ende der Infektion hyperchrom und mikrozytär, eine Hyperkaliämie und Hypoproteinämie. Am 21. Tag *p.i.*, am Höhepunkt der Parasitämie, war 50-60% des exkretorischen Gewebes der Niere pathologisch verändert, so dass sich im Urin eine massiv erhöhte Osmolarität darstellte, und ebenso stark erhöhte Gehalte an Natrium gemessen wurden. Eine interstitielle Nephritis manifestierte sich. Zusätzlich waren erhöhte Magnesiumwerte und GGT-Aktivitäten im Urin der Karpfen zu verzeichnen. Meyer (2001) schloss daraus, dass Defekte der Epithelzellen im distalen Tubulus den hochgradigen renalen Verlust an Natrium verursachen und somit die energieintensive Natriumreabsorption in diesem Tubulusabschnitt behinderten. Im späteren Verlauf der Infektion traten auch Zelldefekte im proximalen Tubulus der Niere auf, die laut

Meyer (2001) die dort stattfindende Magnesiumreabsorption verringerten. Die Elektrolytmessungen von Kalzium und Phosphor zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen.

Die Mehrheit der infizierten Karpfen konnte die renalen Ionenverluste durch die Kiemen, Darm und unveränderte Nierenanteile kompensieren und zeigte eine stabile Osmolarität mit konstanten Natrium- und Magnesiumspiegeln im Plasma. Auch die stündlichen Urinflüsse der Karpfen veränderten sich kaum. Die Karpfen befanden sich vermutlich in einem Stadium der Pseudonormurie, und die Filtrationsleistung der defekten Nephrone konnte von noch intakten Nephronen übernommen werden. Aufgrund dessen wird in der Studie von Meyer (2001) nicht die interstitielle Nephritis, sondern vordergründig die hochgradige Anämie und die damit verbundene Sauerstoffarmut in Kombination mit einem hochgradigen Energiemangel für den Tod der Karpfen verantwortlich gemacht (MEYER 2001).

Untersuchungen zur Nierenfunktion der Regenbogenforelle von Elger und Mitarbeitern (1986) zeigten während der akuten Phase einer viralen hämorrhagischen Septikämie eine reduzierte Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und damit korrelierte Senkung des Urinflusses. Obwohl die renale Exkretionsrate von Natrium, Kalium, Kalzium und Magnesium und Protein sank, war die Urinosmolarität bei den erkrankten Forellen erhöht, und die Natrium-, Kalzium- und Magnesiumspiegel stiegen an. Die Plasmaosmolarität blieb trotz der reduzierten Reabsorption von Natrium, Kalium und Kalzium konstant. Die Osmolare Clearance blieb also trotz der Oligurie stabil. Als Grund für den Abfall der GFR wurde von Elger (1986) eine Veränderung der glomerulären Hämodynamik diskutiert, die mit den Veränderungen der Nierenfunktion von Süßwasserteleostern in Anpassung an ein hypertones Medium zu vergleichen ist (ELGER et al. 1986).

Der Hauptweg der Stickstoffsekretion führt bei Süßwasserfischen nicht über die Nieren, sondern über die Kiemen. Bei Verdacht auf eine Niereninsuffizienz ist im Gegensatz zu Säugetieren keine Erhöhung der Konzentration von Stickstoffderivaten im Plasma zu erwarten (BONE und MARSHALL 1985).

Bei Säugetieren führt eine interstitielle Nephritis zu einem zunehmenden Nephronenverlust. Infolgedessen steigen die Filtrationsleistung und der Harnfluss in den intakten Nephronen, nicht jedoch die tubulären Prozesse. Es kommt zu einer reduzierten Kalium- und Wasserstoffsekretion und zu einer reduzierten Natrium- und Wasserreabsorption. Die Folge ist eine Polyurie, Hyperkaliämie, Hyponatriämie, renale Acidose und die Senkung der

Urinosmolarität. Erst bei einer 50%igen Zerstörung der Nephrone können harnpflichtige Stoffe nicht mehr ausgeschieden werden. Dies führt zu einer Urämie, bei der die Spiegel von Kreatinin und Harnstoff im Plasma ansteigen. Schreitet die Zerstörung fort, nimmt auch die Retention von Kreatinin, Harnstoff, Ammonium, Aminen und Kalium zu. Die Osmolarität des Plasmas steigt. Die Plasmanatriumkonzentration hingegen bleibt anfänglich normal. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Pseudonormurie in Bezug auf Natrium, da sich unzureichende Filtration und unzureichende Reabsorption die Waage halten. Bei einer glomerulären Filtrationsrate von unter 10% stellt sich schließlich eine Oligo- bzw. Anurie ein. Dies führt unweigerlich zum Tod (BICKHARD 1992, DAVID et al. 1995).

Eine schwere akute oder terminale chronische Niereninsuffizienz zeigt einen erhöhten Serumphosphatspiegel. Er ist das Maß für die verbleibende funktionierende Nierenmasse. Darüber hinaus besteht hierbei eine Tendenz zur Hypocalcämie, Hypokaliämie und zu einer metabolischen Acidose (DAVID et al. 1995).

Auch eine Hämaturie einhergehend mit erhöhten Hämoglobingehalten im Urin ist ein Indikator für eine Tubulonephrose (SUTER 1994).

Eine nichtregenerative, zumeist normochrome, normozytäre Anämie zeigt sich häufig bei einer chronischen Niereninsuffizienz. Diese erklärt sich durch einen Rückgang der Erythropoetinproduktion in der Niere (BICKHARD 1992, DAVID et al. 1995).

Diese aufgezeigten Erkenntnisse werden in der vorliegenden Studie für Schlussfolgerungen herangezogen.

---

## 3 MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.1 Virus

#### 3.1.1 Herkunft

Für alle Versuche wurde Virus aus dem von Hedrick und Mitarbeitern (2002) in den USA isolierte KHV-I-Isolat verwendet (HEDRICK et al. 2002). Es wurde vom Friedrich-Löffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, bezogen und unter der Nummer KHV 182 gelistet. Bei dem von dort in Zellkultur erhaltenen Virus handelt es sich um den intern bezeichneten Pool G1. Es war die 6. Passage auf CCB-Zellen mit einem Titer von 5000 KID<sub>50</sub>/ml.

#### 3.1.2 Zellkultur

Für Virusvermehrung und -titration wurde die von Neukirch und Mitarbeitern (1999) etablierte Karpfenzelllinie CCB, *Cyprinus Carpio Brain*, genutzt. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde ein Medium auf der Grundlage des „Minimum Essential Mediums“ (MEM) mit „Earl's“ Salzen, supplementiert mit 2 mMol L-Glutamin (PAA, Pasching), 3,5 g D(+)-Glukose/l (Applichem, Darmstadt), 10% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) und 79,6 mg/l nichtessentiellen Aminosäuren (PAA, Pasching), verwendet. Die Zellen wurden bei 20°C bebrütet und im Abstand von 4 bis 5 Tagen subkultiviert. Hierzu wurde zum konfluenten Monolayer in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) 5 ml einer Lösung aus „Dulbecco's“ PBS (PAA, Pasching), 0,05% Trypsin (PAA, Pasching) und 0,02 % EDTA (PAA, Pasching) gegeben, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Zur Aufhebung der zellwandzerstörenden Wirkung des Trypsins wurde anschließend die gleiche Menge Zellkulturmedium zugegeben. Mittels Aufziehen und Ausblasen in einer 15-ml-Einmalpipette (Nunc, Wiesbaden) wurden die Zellen vereinzelt. So konnten diese in einem Verhältnis von 1:2 auf zwei neue mit jeweils 10 ml Zellkulturmedium befüllten 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aufgeteilt werden.

### 3.1.3 Virusvermehrung

Auf einen Tag alte konfluente CCB-Monolayer in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden 5 ml mit Virus infiziertes Zellkulturmedium gegeben. Dieses Zell-Virusgemisch wurde für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml reines Zellkulturmedium hinzugefügt und wieder bei 25°C inkubiert. Mit Virus infizierte Zellrasen wurden täglich mikroskopisch auf Viruswachstum und Zellsterben, d.h. auf cytopathische Effekte, untersucht und dies protokolliert. Zellkulturflaschen mit Pilzkontaminationen wurden verworfen. Am 6. Inkubationstag wurde die nun 15 ml vermehrtes Virus enthaltene Zellkulturflasche bei - 80°C eingefroren. Dieser Vorgang wurde bis zum Erhalt der entsprechenden Virusmenge, die für die Infektionsversuche benötigt wurde, wiederholt. Nach Abschluss des Vermehrungsvorganges wurde das Virus aliquotiert. Zur weiteren Virusanreicherung, zur Bestimmung der Infektiosität des Virus sowie zur Anwendung in den Infektionsversuchen wurde die zellhaltige Viruslösung bei Raumtemperatur aufgetaut und unmittelbar verwendet.

### 3.1.4 Virustitration

Zur Bestimmung der Infektiosität des vermehrten Virus wurde eine Titration mit logarithmischer Endpunktverdünnung auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Eine Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) mit 96 Vertiefungen wurde mit CCB-Zellen beimpft. Sobald die Vertiefungen nach einem Tag mit einem konfluenten Monolayer bewachsen waren, wurden jeweils 0,2 ml einer zehnfachen Verdünnungsreihe der Viruslösung dazugegeben. Jeweils vier Vertiefungen pro Verdünnungsstufe wurden beimpft. Zusätzlich wurde eine Kontrolle durchgeführt. Hierfür wurden vier Vertiefungen mit 0,2 ml Zellkulturmedium inokuliert. So beimpfte Mikrotiterplatten wurden 14 Tage bei 25°C in einer Atmosphäre mit 2% CO<sub>2</sub> aufgestellt. Der Zellrasen wurde täglich mikroskopisch auf Veränderungen wie Verfärbungen des Zellkulturüberstandes, abgelöste Zellen, Riesenzellbildung und cytopathische Effekte untersucht, die im Protokoll festgehalten wurden. Anhand der nach Bonin (1973) zitierten, modifizierten Methode nach Kärber (1931) wurde die Infektiosität anschließend kalkuliert (KÄRBER 1931, BONIN 1973).

Für die verwendete Viruslösung ergab dieses Verfahren einen Titer von 1000 KID<sub>50</sub> pro 0,2 ml bzw. 5000 KID<sub>50</sub> pro Milliliter.

### 3.1.5 Virusnachweis

Für den Virusnachweis wurde ein auf einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhendes Verfahren angewendet.

#### 3.1.5.1 Extraktion der DNA aus Gewebeproben und Urinproben

Zur Isolierung der KHV-Virus-DNA wurde ein kommerzielles Isolationskit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Fa. Roche, Mannheim) verwendet und die Herstellerangaben zur Durchführung befolgt. Bei den Proben handelte es sich um ein Organgemisch aus Kieme, Niere, Milz, Leber und Gehirn eines jeden Versuchsfisches. Von dieser Mischprobe wurden 25 mg aufgetaut, mit einer Schere zerkleinert, mit einem Pistill zermörsert und anschließend in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Dieses wurde mit 200 µl Gewebelysierungspuffer (Roche, Mannheim) und 40 µl Proteinase K (Roche, Mannheim) versetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 55°C bis zur kompletten Lyse der Organe. Anschließend wurden 200 µl Bindungspuffer (Roche, Mannheim) hinzugegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Mittels Zugabe von 100 µl Isopropanol (Roth, Karlsruhe) wurde die DNA daraufhin ausgefällt. Die Probe wurde auf eine Säule (Roche, Mannheim) in einem Sammelgefäß (Roche, Mannheim) überführt und bei *ca.* 6.500 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde in ein neues Sammelgefäß gehängt, mit 500 µl Waschpuffer (Roche, Mannheim) zweimal gewaschen und erneut bei *ca.* 6.500 x g für 1 min zentrifugiert. Das Sammelgefäß mit dem Filtrat wurde jeweils entsorgt. Um in der Säule zurückgebliebene Reste der Waschlösung zu entfernen, wurde das Gefäß 10 sec bei 19.800 x g zentrifugiert. Die komplett in der Säule gebundene DNA wurde durch die Zugabe von 200 µl 70°C warmen Elutionspuffer (Roche, Mannheim) resuspendiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 6.500 x g für 1 min wurde die DNA in das Sammelgefäß gewaschen. Diese Probe enthielt die in der ursprünglichen Organprobe vorhandene genomische DNA, darunter auch die Virus-DNA. Sie wurde bei -20°C gelagert.

Zur Isolierung der KHV-Virus-DNA im Urin wurde das gleiche Verfahren angewandt. Dazu wurden 200 µl Urin als Ausgangsmaterial verwendet. Die anschließenden Extraktionsschritte erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll.

### 3.1.5.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain Reaction, PCR) ist eine enzymvermittelte *in vitro*-Technik zur Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Dieser wird durch zwei Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz abgegrenzt. Ein Zyklus einer PCR setzt sich aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation zusammen. Eine PCR besteht aus einer Anzahl von Wiederholungen dieser Zyklen. Die drei Schritte der Zyklen unterscheiden sich vor allem in der verwendeten Reaktionstemperatur. Bei der als erstes stattfindenden Denaturierung kommt es durch eine Erhitzung auf 95°C zur Auftrennung der Doppelstränge der DNA-Helix. Es resultiert daraus eine denaturierte, d.h. in zwei Einzelstränge aufgeteilte, DNA. Beim anschließend folgenden Annealing lagern sich zwei bekannte, synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge. Primer sind ca. 18-30 Basen lange synthetische Oligonukleotide. Sie werden so entworfen, dass ein Primer an eine bestimmte Sequenz des einen Stranges bindet, der andere an eine meist 100-1000 Basen entfernt liegende Sequenz des komplementären Stranges. Die beiden Primer umschliessen den gewünschten, zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt. Durch Absenken der Temperatur auf etwa 40-60°C erfolgt die Bindung der Primer an die DNA über Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basen. Die Temperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer. Anschließend erfolgt die Polymerisation. Hierbei synthetisiert eine DNA-Polymerase ausgehend von den Primern, den Startpunkten, einen komplementären DNA-Abschnitt zum jeweiligen Einzelstrang. Hierbei wird eine Reaktionstemperatur von ca. 72°C, abhängig von der Art der Polymerase, benötigt. Die PCR besteht aus 30-40 Wiederholungen dieses kompletten Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation. Die Fragmentanzahl steigt theoretisch exponentiell. Das Ergebnis ist eine Vielzahl ein und desselben gewünschten DNA-Abschnittes.

Als Primer wurde das von Bercovier und Mitarbeitern (2005) entwickelte Thymidinkinaseprimerpaar KHV-TKf und KHV-TKr verwendet (KHV-TKf 5'-GGGTTACCTGTACGAG-3' bei 51,7°C und KHV-TKr 5'-CACCCAGTAGATTATGC-3' bei 50,4°C) (BERCOVIER et al. 2005). Diese amplifizierten ein DNA-Fragment von einer Größe von 409 Basenpaaren. Zur Polymerisation wurde die Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Diese Polymerase wurde mit 1x Amplifikationspuffer (Invitrogen, Karlsruhe) zur Verwendung mit MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Karlsruhe), 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, 0,03 µmol TKf-Primer und 0,03 µmol TKr-Primer (Invitrogen, Karlsruhe), 400 µmol dNTPs

(Nukleotide, Roth, Karlsruhe) und 1 U Platinum *Taq* Polymerase, zum sogenannten Mastermix angesetzt. Die DNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Es folgten 39 Zyklen von 94°C für 1 min, 52 °C für 1 min und 72°C für 30 sec. Die finale Polymerisation fand bei 72°C für 7 min statt.

Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Zusätzlich wurden bei jedem PCR-Durchlauf sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um die DNA aus einer mit Virus infizierten CCB-Zellkultur, bei der Negativkontrolle um ddH<sub>2</sub>O. Zur Amplifikation der DNA nach der Extraktion aus den Gewebe- und Urinproben wurde ein Thermocycler (Modell: Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) verwendet.

Die PCR-Produkte wurden anschließend bis zur Agarosegelelektrophorese bei 4°C kühl gelagert.

### 3.1.5.3 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Die Gelelektrophorese dient zur sichtbaren Darstellung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe wandern diese Fragmente im elektrischen Feld verschieden schnell und weit. So findet eine Auftrennung entsprechend ihrer Größe statt. Zur Erkennung KHV-spezifischer DNA-Banden wurde als Größenstandard eine 100 bp DNA-Leiter (Roth, Karlsruhe) und die Positivkontrolle verwendet. Als positiv wurden die Proben bezeichnet, bei denen DNA-Banden auf der Höhe der Bande der Positivkontrolle lagen und anhand des Größenstandards die richtige Größe bzw. Basenpaarlänge aufwiesen.

Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) im Gel unter UV-Licht in einem UV-Transilluminator (Modell: Biometra, Tl 1, Göttingen) sichtbar gemacht. Als Lauf- und Gelpuffer wurde ein TBE-Puffer benutzt. Er wurde aus 5,4 g Tris (Roth, Karlsruhe), 2,75 g Borsäure (Roth, Karlsruhe) und 2 ml 0,5 M EDTA (Applichem, Darmstadt) hergestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Als Gelelektrophoresekammer diente eine horizontale Mini-Elektrophoresekammer (Modell: SubSystem 70, Axon, Kaiserslautern) und als Stromquelle wurde das Modell „Power Supply EV243“ (Roth, Karlsruhe) verwendet.

Es wurden je 6 µl des PCR-Produkts bzw. 8 µl des Urin-PCR-Produkts mit 2 µl Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) gemischt und in die Taschen eines 1%igen Agarosegels (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert. Zusätzlich wurden je eine Positiv- und eine Negativprobe aufgetragen.



Die Laufzeit betrug 30 min bei einer Stromstärke von 90 Volt. Anschließend konnten die Proben unter UV-Licht bewertet werden.

## **3.2 Versuchstiere**

### **3.2.1 Fische**

In allen Infektionsversuchen kamen Spiegelkarpfen, *Cyprinus carpio*, zum Einsatz. Die Tierversuche wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 04856 genehmigt. Die Fische entstammen einer Zuchtlinie der Agricultural University Wageningen in den Niederlanden. Sie waren *ca.* 9 Monate alte Geschwistertiere der Kreuzung R8S8 x R3S8 und hatten im Mittel ein Gewicht von 70 g und eine Größe von 14 cm.

### **3.2.2 Aufzucht und Haltung**

Die Karpfen wurden als befruchtete Eier von der Universität Wageningen (Niederlande) bezogen. Sie wurden in der Abteilung für Fischkrankheiten und Fischhaltung des Zentrums für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter spezifisch parasiten- und virusfreien (SPF) Bedingungen aufgezogen und in einer mit rezirkulierendem Leitungswasser befüllten Kreislaufanlage bei 20°C gehalten. Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit pelletiertem Karpfenfutter.

Die Versuchsfische wurden in mit Leitungswasser befüllten und zuvor desinfizierten 400 l Plastikbecken mit Außenfilter gehalten. Die Temperatur wurde allmählich über den Zeitraum von einer Woche auf 25°C eingestellt und mit Hilfe von 2 Aquarienheizungen (120 W, 220-240 V, Jäger) gehalten. Die Fütterung wurde ab Versuchsbeginn eingestellt, d.h. 10 Tage vor der Infektion. Täglich wurde das Allgemeinbefinden der Tiere und die Wassertemperatur kontrolliert und protokolliert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Teilwasserwechsel durchgeführt.

Die Versuchsfische, denen während der Versuchsreihen ein Dauerkatheter (Polyethylenschlauch, Omnilab) in die Harnblase implantiert wurde, wurden über 24 Stunden in einem belüfteten 12 l Acrylglasstoffwechselbecken (Rebie, Bielefeld) gehalten. Die Bewegungsfreiheit der Karpfen konnte durch Acrylglastrenngitter herabgesetzt werden, so dass ein unerwünschtes selbstständiges Entfernen der Katheter von den Versuchsfischen

durch starke Schwimmbewegungen verhindert werden konnte. Die Wassertemperatur betrug ebenfalls 25°C.



*Abbildung 1: Versuchsaufbau zum Sammeln von Urinproben mittels Dauerkatheter*

### **3.2.3 Handling**

Bei allen Manipulationen mit den Karpfen wurden Einmalhandschuhe getragen. Jedes Becken und sämtliche Versuchsutensilien wurden vor und nach jeder Versuchsreihe mit 80°C heißem Wasser gereinigt und nach anschließender Trocknung mit 0,5 M Natronlauge (Applichem, Darmstadt) desinfiziert. Für jedes Becken wurden separate Kescher, Schläuche, Heizungen und Lüftungsanlagen verwendet, die nach jedem Neubesatz erneut gereinigt, desinfiziert und trockengelegt wurden. Der Harnblasenkatheter (Polyethylenschlauch, Omnilab) wurde für jeden Fisch neu angefertigt. Die Wiederverwendung war zur Vermeidung unkontrollierter Virusübertragung ausgeschlossen. Die Instrumente wurden direkt nach jedem Einsatz mit Leitungswasser gereinigt, in 0,5 M Natronlauge für 30 min gelegt und anschließend in einem Ultraschallbad (Modell: Sonorex, Bandelin, Ettlingen) für 30 min bei 70°C gereinigt.

Karpfen aus Kontroll- und infizierten Versuchsgruppen wurden aufgrund der Infektionsgefahr für die Kontrollgruppe räumlich getrennt gehalten.

### **3.2.4 Versuchsaufbau**

Ziel war es, Informationen über die Auswirkungen einer KHV-Infektion auf die Karpfenphysiologie zu bekommen. Hierzu war eine experimentelle Infektion der Karpfen im Labor, eine Blutabnahme vor und nach der Infektion und die Implantation von Dauerkathetern in die Harnblase zur Erfassung der Urinparameter erforderlich.

Insgesamt wurden 70 SPF-Karpfen untersucht. Von jedem einzelnen Karpfen wurde 10 Tage vor der Infektion eine Blutprobe genommen. Sie galt als Vergleichsprobe, um anschließend durch die Erkrankung hervorgerufene Veränderungen bei jedem einzelnen Fisch erkennen zu können.

56 Versuchsfische wurden mit dem in der Zellkultur vermehrten Koi-Herpesvirus mittels einer Knopfkanüle oral infiziert. 12 weitere Karpfen bekamen als Kontrollgruppe die gleiche Injektionsmenge einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) eingeführt. Zwei Karpfen wurden nicht infiziert. Sie dienten zur Untersuchung, ob über den Untersuchungszeitraum spontane Veränderungen der Blutparameter auftraten.

Der Infektionstag wurde als Tag 0 angesehen. Weitere Proben wurden 2 bis 3, 5 bis 6, 8 bis 9, 13 bis 14 Tage nach der Infektion genommen. Sie wurden aufgrund von ähnlichen Ergebnissen auf vier Proben tage zusammengefasst, d.h. Tag 2, Tag 5, Tag 8 und Tag 13 (siehe statistische Auswertungen). Pro Untersuchungstag wurden Proben von 12 KHV-infizierten Fischen und 3 Kontrollfischen gesammelt. Zur Sammlung der Urinprobe wurden Karpfen einen Tag vor dem jeweiligen Proben tag katheterisiert und über Nacht in dem vorgesehenen Becken gehalten. Nach 24 Stunden wurden die Urinproben entnommen, der Fisch sediert, Blut abgenommen und nach Tötung zerlegt. Der Fisch wurde vermessen, gewogen sowie Gewebeproben für die PCR und die histologischen Untersuchungen entnommen. Es wurden im Blut die Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl bestimmt und ein Differenzialblutbild erstellt. Im Plasma und Urin wurden neben der Osmolarität und den Elektrolyten Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und Phosphor, die AP- und GGT-Aktivität sowie die Kreatininkonzentration ermittelt. Im Plasma wurde zusätzlich der Proteingehalt gemessen.

### **3.2.5 Infektion**

Narkotisierte Versuchskarpfen erhielten die Virussuspension *per os* mittels einer Knopfkanüle verabreicht. Es wurde 0,5 ml Viruslösung mit einer Konzentration von 5000 KID<sub>50</sub>/ml Viruslösung appliziert. Die Infektionsdosis betrug somit 2500 KID<sub>50</sub>. Die Kontrollkarpfen erhielten jeweils 0,5 ml PBS-Lösung (PAA, Pasching). Zum Aufwachen wurden die Tiere in ein 400 l-Becken mit 25°C warmen Leitungswasser gesetzt.

### 3.2.6 Narkose und Töten

Für jede Narkose wurde ein neues mit frischem Leitungswasser befülltes 1,5-l-Plastikaquarium (Rebie, Bielefeld) verwendet. Das Narkosemittel MS 222 (Metaaminobenzoesäureethylester, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde mit 0,15 g/l Wasser dosiert. Versuchsfische wurden vor jeder Manipulation in das Narkosebecken umgesetzt. Sie verblieben dort solange, bis ihr Augendrehreflex erloschen war.

Zur Tötung der Karpfen wurde eine Dosierung von 0,5 g MS 222/ l Wasser verwendet. Die Fische wurden solange diesem Narkosewasser ausgesetzt, bis keine Atembewegungen mehr festgestellt werden konnten.

### 3.2.7 Katheterisierung der Urinblase

Die Katheterisierung der Karpfen zur Sammlung von Urinproben erfolgte nach einer von Kakuta und Mitarbeitern (1986) beschriebenen, modifizierten Methode (KAKUTA et al. 1986). Als Katheter diente ein Polyethylenschlauch (Innendurchmesser: 0,86 mm, Wandstärke: 0,33 mm; Omnilab), der auf 70 cm gekürzt wurde. Unter offener Flamme wurde dieser an dem einzuführenden Ende erhitzt und mittels einer Pinzette trichterförmig erweitert (ELGER 1982). Der erzeugte Trichter hatte einen Außendurchmesser von *ca.* 3 mm. Der Katheter erhielt nach *ca.* 5 mm einen 90° Winkel und nach weiteren *ca.* 10 mm einen 120° Winkel, so dass er einem asymmetrischen U ähnelte.

Zur Katheterisierung wurden Karpfen narkotisiert und in Seitenlage auf einen mit feuchtem Zellstoff versehenen Operationstisch gelegt. Die Urinblase des Karpfens ist eine harnröhrenähnliche Erweiterung und liegt beim Karpfen caudal der Genitalöffnung und des Afters, der sich cranial der Genitalöffnung befindet. Zusammen münden diese drei Öffnungen in der Urogenitalpapille oder Uroporus. Der Katheter wurde vor der Benutzung mit Hilfe einer Einwegspritze (Henke-Sass Wolf, Tuttlingen) und -kanüle („Erosa“, Fa Rose, Trier) mit sterilem destilliertem Wasser befüllt, um den freien Abfluss des Katheters zu prüfen und das Fließen des Urins zu gewährleisten. Das trichterförmige Ende des Katheters wurde von caudoventral 0,3 mm in die Urogenitalpapille eingeführt, ohne dass das Ende mit Exkrementen des Darms in Berührung kam. Zur Befestigung wurde der erste Knopfheft (Polyamide EP 3) 0,5 mm caudal der Urogenitalpapille und ein weiterer Knopfheft 1 cm cranial der Schwanzflosse dorsal des Seitenlinienorgans gesetzt. Die letzte Fixierung erfolgte durch eine Tabaksbeutelnaht rund um den Uroporus, die nach der Einführung des

Kathetertrichters zugezogen wurde. Nach der Anbringung wurde der Katheter zur Kontrolle des Abflusses erneut mit sterilem, destilliertem Wasser gespült. Ein im Sekundentakt stetiges Tropfen aus dem Schlauch bestätigte ein einwandfreies korrektes Platzieren. Anschließend wurde der Karpfen unverzüglich in das schon vorbereitete Stoffwechselbecken gesetzt. Die Acrylglastrennscheiben wurden so eng an den Fisch geschoben, dass er sich noch bewegen konnte, aber ein selbstständiges Herausziehen des Katheters durch Flossenbewegungen verhindert wurde. Das Ende des Schlauches wurde über den Beckenrand geführt und in einem Auffangbehälter (50 ml-Zentrifugenröhrchen, Fa. Corning Incorporated), dessen Deckel mit einem Loch für den Schlauch versehen wurde, mit Klebeband fixiert. Dieser Behälter wurde 20 cm unterhalb des Stoffwechselbeckens in einen Reagenzglasständer gestellt. Durch den Höhenunterschied konnte nach wiederholtem Spülen ein einwandfreier Abfluss des Urins gewährleistet werden. Der Versuchsfisch verblieb bis zur Probensammlung 24 Stunden in diesem Becken.

Die Katheterisierung wurde innerhalb einer Minute abgeschlossen. So konnte auf eine Zufuhr von Wasser und Narkoselösung während der Manipulation verzichtet werden.



*Abbildung 2: Katheterisierter Karpfen*



Abbildung 3: Karpfen: Sitz des Katheters mit dazugehörigen Knopfheften

### 3.3 Probensammlung

#### 3.3.1 Entnahme des Urins

Der innerhalb von 24 Stunden aufgefangene Urin wurde in 1,8-ml-Schraubprobengefäße (Henke-Sass Wolf, Tuttlingen) gefüllt. Es wurde die Menge protokolliert und die Osmolarität bestimmt. Anschließend wurde der Urin bis zur weiteren Untersuchung bei - 80°C eingefroren.

#### 3.3.2 Blutentnahme

Allen Versuchsfischen wurde 10 Tage vor der Infektion Blut abgenommen, um einen Ausgangswert für die Blutparameter zu erhalten. Die zweite Blutentnahme fand an den entsprechenden Proben Tagen statt. Sie erfolgte bei sedierten Karpfen aus der caudalen Hohlvene. Hierzu wurden 2-ml-Einwegspritzen (Henke-Sass Wolf, Tuttlingen) mit aufgesetzter 0,9 x 40 mm Einwegkanüle („Erosa“, Fa. Rose, Trier) verwendet. In die Einwegspritzen wurde je ein mit Lithium-Heparin bedampftes Kügelchen aus einem 1,3 ml-Mikro-Probengefäß LH (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Die Kanüle wurde bei den Fischen caudal der Afterflosse von ventral bis kurz vor die Wirbelsäule eingeführt. So konnten im Mittel 1 ml Blut aus der Hohlvene entnommen werden. Von diesem Blut wurde ein Viertel zur Vollblutanalyse entnommen, der Rest wurde unverzüglich in 1,3 ml-Mikro-Probengefäße LH (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt und bei ca. 600 g in einer Zentrifuge (Modell: Biofuge A mit Mikroliterrotor 1379, Heraeus, Osterode) zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und die Osmolarität gemessen. Bis zur weiteren Untersuchung wurde das Plasma in Mikroprobengefäße gefüllt und bei - 80°C gelagert.



Abbildung 4: Blutabnahme beim Karpfen

### 3.3.3 Töten und Entnahme der Organe

Nach erfolgreicher Katheterisierung, Urinprobensammlung und Blutabnahme wurden die Karpfen mit einer hohen Dosis an Narkosemittel (0,5g/l) in einem 1,5 l Becken getötet. Anschließend wurden die Fische auf ein mit Zellpapier ausgelegten Operationstisch gelegt, der Katheter samt der Nähte entfernt, und es folgte die Sektion mit Entnahme der gewünschten Organe. Hierzu wurde ein Sektionsfenster erstellt, das durch einen Schnitt kurz vor dem After begann, in einem Bogen entlang der dorsalen Rückenmuskulatur nach cranial verlief, am Kiemendeckel nach ventral abbog und an der ventralen Bauchseite wieder nach caudal zum Ausgangspunkt zurückführte. Die Körperhöhle mit den Organen wurde makroskopisch auf Veränderungen untersucht und dies protokolliert.

### 3.3.4 Entnahme von Gewebepoolproben zum Virusnachweis

Es wurden zum Nachweis der KHV-Virus-DNA und somit der erfolgreichen KHV-Infektion ein Organpool von Niere, Kieme, Milz, Leber und Gehirn entnommen. Hierzu wurde mittels Schere und Pinzette ein Teil der Organe entfernt und in ein 1,5 ml Probengefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben und bis zur DNA-Extraktion bei - 80°C eingefroren.

### 3.3.5 Histologische Untersuchung

#### 3.3.5.1 Entnahme von Organproben zur histologischen Untersuchung

Zur Untersuchung von Gewebeschäden während einer KHV-Infektion wurden Kieme und Niere histologisch untersucht. Hierzu wurde mittels Schere und Pinzette ein Teil der Niere und ein Teil der Kieme mit Kiemenbogen herauspräpariert, zusammen in eine

Histologiekassette (Vogel, Gießen) gelegt und sofort in 4%igem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert.

### *3.3.5.2 Weiterverarbeitung histologischer Proben*

Nach mindestens 24 Stunden wurde das Formalin aus den Organen unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Dann wurden die Organe in aufsteigender Reihe von 50-100%igem Ethanol entwässert und anschließend über Chloroform in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mittels eines Schlittenmikrotoms (Modell: 1150/Autocat, Fa. Reichert-Jung, Nußloch) 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Sie wurden nach der Streckung in einem 48°C heißen Wasserbad auf mit Eiweißglyzerin beschichteten Objektträgern (Menzel, Braunschweig) aufgezogen und bei 37°C getrocknet.

### *3.3.5.3 Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) zur histologischen Beurteilung*

Für eine genaue mikroskopische Betrachtung und Beurteilung der Gewebe wurden die histologischen Schnitte angefärbt. Dies erfolgte durch eine Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung), eine Zweifachfärbung mit dem Kernfarbstoff Hämalaun und dem Plasmafarbstoff Eosin. Hierzu wurde zunächst mittels zweimaligem Einlegens der Schnitte über 1-3 Minuten in Xylol das Paraffin aus den Geweben herausgelöst. Das Xylol wurde mit Isopropylalkohol für 2 Minuten wieder entfernt. Anschließend erfolgte mit 96%igem und 70%igem Alkohol für jeweils 2 Minuten eine stufenweise Zuführung von Wasser. Der Alkohol wurde mit Aqua dest. für 2 Minuten herausgespült. Zur Kernfärbung wurde der Objektträger 5-10 Minuten lang in eine Lösung mit Hämalaun nach Harris (Fa. Merck, Darmstadt) eingestellt, im Anschluss für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser geklärt, kurz mit Aqua dest. gespült und 3 Minuten lang mittels Eosin die Plasmafärbung durchgeführt. Zum Abspülen der Farbe wurde erneut Aqua dest. genutzt. Dann wurde das Präparat kurz in 70%igen Alkohol gestellt und jeweils 2 Minuten mit 96%igem Alkohol und Isopropylalkohol entwässert. Zuletzt wurde es zweimal jeweils für 1-3 Minuten in Xylol gestellt. Dies diente zum Entfernen des Alkohols und als Lösungsmittel für das anschließend zum Eindecken mit Deckgläschen benötigte Corbit-Balsam (Fa. Hecht, Kiel).

Nach der Trocknung des Corbits konnte das Histologiepräparat unter dem Lichtmikroskop (Modell BHS, Fa. Olympus, Japan) bei 100-, 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung betrachtet und beurteilt werden.



### **3.4 Analyse von Plasma und Urinproben**

#### **3.4.1 Osmolarität**

Die Osmolarität von Urin und Plasma wurde jeweils in einer 50 µl Probe mit einem Kryo-Osmometer (Modell: OM 80l, Fa.Vogel, Gießen) mit Hilfe der Gefrierpunktsbestimmung gemessen. Vor den Messungen wurde das Gerät mit einer Eichlösung (Eichlösung für Osmometer, 300 mOsm/kKg H<sub>2</sub>O, Fa. Vogel, Gießen) kalibriert und der Nullpunkt mit Aqua dest. eingestellt.

#### **3.4.2 Natrium und Kalium**

Mit einem Flammenphotometer (Modell: 480 Flame Photometer, Fa. Bayer Diagnostics, Fernwald) wurde jeweils der Natrium- und Kaliumgehalt im Urin und im Plasma bestimmt. Die aufgetauten Proben wurden bei 7.000 g für 5 min zentrifugiert und im Anschluss wurden jeweils 50 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Nullpunkteinstellung mit Aqua dest. und Kalibrierung mit standardisierten Proben (140 mmol Na/l und 5 mmol K/l) wurden die Proben gemessen.

#### **3.4.3 Kalzium und Magnesium**

Der Kalzium- und Magnesiumgehalt des Urins und des Plasmas wurde durch kolorimetrische Endpunktbestimmung mit einem Photometer (Modell: Uvikon 930, Fa. Biotech) ermittelt. Hierbei wurde das Testprinzip zur Kalziummessung der Firma Roche (Katalognummer 1489216) angewendet. Kalzium bildet mit Kresolphthalein-Komplexon in alkalischer Lösung einen violetten Komplex, der bei 546 nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden kann. Magnesium hingegen bildet mit Calmagit einen Farbkomplex (Fa. Sigma-Aldrich, Katalognummer 595 A). Dieser bleibt *ca.* 30 min stabil und kann bei 520 nm gemessen werden.

#### **3.4.4 Phosphor**

Die Phosphorkonzentration im Urin und Plasma wurde ebenfalls mittels kolorimetrischer Endpunktbestimmung gemessen. Der anorganische Phosphor liegt im Urin und Plasma als Phosphat vor, das mit Natriummolybdat (Fa. Merck, Darmstadt) Phosphormolybdat bildet. Dies wird durch Reduktion in Molybdänblau überführt und kann schließlich photometrisch

bestimmt werden. Die Blaufärbung und somit die Messwerte des Molybdänblaus sind proportional zu dem Phosphorgehalt im Urin und Plasma.

### 3.4.5 Gesamtproteine

Der Gesamtproteingehalt der Plasmaproben wurde mit einem Refraktometer (Modell: Atago Hand-Refraktometer, Fa. Obladen, Hamburg) ermittelt. Nach Nullpunkteinstellung mit Aqua dest. und der Kalibrierung mit einer der Fischphysiologie entsprechenden 0,85%igen isotonischen Kochsalzlösung wurden 100 µl Plasma auf die vorgesehene Stelle im Refraktometer pipettiert. Der Brechungsindex ist die Grenzlinie, an der sich die blaue und weiße Farbe trifft. Sie zeigt den Gesamtproteingehalt in der Probe an, der anhand der Skala abgelesen werden kann. Die Skalierung reicht von 0,0 bis 12,0g/ 100ml. Die Genauigkeit liegt bei ± 0.2g / 100ml.

### 3.4.6 Alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT)

Mit der enzymatischen Endpunktmethode bei 25°C konnten die Enzymaktivität der AP im Plasma und Urin und der GGT im Urin bestimmt werden. AP bildet mit Paranitrophenylphosphat (Fa. Roche, Katalognummer 1087517) und Wasser einen photometrisch nachweisbaren gelben Farbkomplex (Paranitrophenol und Phosphat). Das Enzym GGT hingegen katalysiert die Reaktion von G-Glutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilid und Glycylglycin zu G-Glutamyl-Glycylglycid und 3-Carboxy-4-Nitroanilin (Fa. Roche, Katalognummer 1087584). Das Produkt 3-Carboxy-4-Nitroanilin ist gelb gefärbt und konnte photometrisch bestimmt werden. Die Enzymaktivitäten von AP und GGT wurden über folgende Formel berechnet:  $\Delta E \cdot V \cdot 1000 / (t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v) = \text{Enzymaktivität in U/l}$ .

$\Delta E$ : Extinktionsdifferenz zwischen Analysen- und Leerwert bzw. durch Verbrauch oder Bildung von NAD(P)H, V: Gesamtvolumen der Messlösung in ml, 1000: Umrechnung von ml auf l, t: Messzeit in Minuten,  $\epsilon$  µmol: spezifischer mikromolarer Extinktionskoeffizient (für NADH bei 25°C und 365nm Wellenlänge = 3,4 cm<sup>2</sup>/µmol), d: Schichtdicke der Küvette in cm, v: Probenvolumen in ml.

### 3.4.7 Kreatinin

Zur Kreatininmessung wurde eine enzymatische Methode (Fa. Roche, Katalognummer 10875418) angewandt. Nach Zugabe von R1 (Puffer/Enzym/2,4,6-Trijod-3-hydroxybenzoesäure) und R2 (Puffer/Enzym/4-Aminophenazon) wurde die Reaktion gestartet. Kreatinin wird unter der Einwirkung von Kreatininase zu Kreatin und Kreatin

mittels der Kreatinase zu Sarcosin und Harnstoff hydrolysiert. Sarcosin wird unter Mitwirkung von Sarcosinoxidase und Sauerstoff zu Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und 2,4,6-Trijod-3-hydroxybenzoesäure unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen Chinonimin-Farbstoff, dessen Farbintensität photometrisch gemessen wird. Sie ist zur Kreatinin-Konzentration direkt proportional.

### **3.5 Blutparameter**

Die Untersuchung beschränkte sich im Blut auf das rote und weiße Blutbild. Hierfür wurden der Hämatokrit- und Hämoglobinwert, die Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl bestimmt und ein Blutausschlag angefertigt. Zur Erstellung des Differenzialblutbildes wurden die Leukozyten, Segmentkernige (Neutrophile) Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Retikulozyten prozentual gezählt und auf morphologische Unterschiede vor und unter der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus untersucht.

Hierbei ist es wichtig, die individuellen Schwankungen einzelner Karpfen zu erkennen und diese nicht in das Krankheitsgeschehen einfließen zu lassen. Dies wurde durch die Blutabnahmen zehn Tage vor der Infektion ermöglicht. So existierten für jeden Fisch zwei Werte, ein Ausgangs- und ein Probetagewert (Doppelprobe). Zur besseren Erkennung von Veränderungen, insbesondere signifikanter Unterschiede, wurden vom Hämatokrit- und Hämoglobinwert, der Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl und der Gesamtosmolarität im Plasma die Differenzen von den Ausgangswerten zu den entsprechenden Probetagewerten gebildet. Im Folgenden, insbesondere im Ergebnisteil, wird der Blutwert zehn Tage vor der Infektion als Ausgangswert bezeichnet.

#### **3.5.1 Hämatokrit**

Zur Hämatokritwertbestimmung wurde die Mikrohämatokrittechnik angewandt. Hierbei wurden heparinisierte Mikrohämatokritröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) mit Blut, das den Karpfen unmittelbar entnommen wurde, befüllt und in einer Mikrozentrifuge (Fa. Heraeus, Hanau) 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Anschließend konnte der Hämatokritwert abgelesen werden. Er wurde in Liter/Liter (l/l) angegeben.

### 3.5.2 Hämoglobin-Konzentration

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin (Hb) ist ein eisenhaltiges Protein, das für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist. Da untersucht werden soll, ob während einer Koi-Herpes-Virus-Infektion im Blut der Karpfen eine Anämie auftritt, wurde die Hämoglobinkonzentration bestimmt. Hierzu wurde die Cyanmethämoglobin-Methode genutzt. Es wurde das Reagenz zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung von Hämoglobin (Diaglobal-Test HB 500, Berlin) verwendet. In diesem Verfahren wird Hämoglobin mit Kaliumhexacyanoferrat (III) zu Methämoglobin oxidiert und dies mit Cyanid in Cyanmethämoglobin umgewandelt. Die Farbintensität des Cyanmethämoglobins ist proportional zu der Hämoglobin-Konzentration in der Probe und wird photometrisch gemessen. Es wurden 20 µl Blut mit 5 ml des Reagenz vermischt und bei 546 nm Wellenlänge im Photometer (Modell: Fluostar Optima, BMG, Offenburg) gemessen. Die Hämoglobinkonzentration wurde durch Multiplikation des Extinktionswertes mit dem Faktor 36,8 errechnet. Sie wurde in g/l angegeben.

### 3.5.3 Bestimmung der Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl

Die Gesamtzahl von Erythrozyten und Leukozyten im Blut wurde im Lichtmikroskop bei 250-facher Vergrößerung (Modell: BHS, Fa. Olympus) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Anfärbung der Blutzellen für die Zählung wurden zwei Lösungen angesetzt. Für Lösung A wurden 0,025 g Neutralrot und 0,9 g NaCl mit 100 ml Aqua dest. versetzt. Für Lösung B hingegen wurden 0,012 g Kristallviolett, 3,8 g Natriumcitrat, 0,4 ml Formaldehyd mit 100 ml Aqua dest. vermischt. Das frisch entnommene Blut wurde mittels einer Erythrozytenmischpipette bis zur Marke 0,5 aufgezogen. Anschließend wurde Lösung A bis zur Hälfte des Pipettenbauches und Lösung B danach bis zu der Marke 101 aufgezogen. Die Pipette wurde für 4-5 Minuten geschwenkt, bis sich das Blut mit den beiden Reagenzien gut vermischt hatte. Nach Anfeuchten der beiden Gleitschienen der Neubauer-Zählkammer wurde ein Deckglas unter Bildung von Newton'schen Farbringen aufgeschoben. Die ersten drei bis vier Tropfen aus der Erythrozytenpipette wurden verworfen. Die nächsten Tropfen wurden auf der Mittelrippe der Zählkammer aufgetragen und durch vorsichtiges Kippen unter das Deckgläschen geschwemmt. Vor dem Betrachten unter dem Phasenkontrastmikroskop sollten die Blutzellen 1-2 Minuten lang sedimentieren. Dann konnte die Auszählung erfolgen. Zur Ermittlung der Erythrozytenzahl wurden alle roten Zellen gezählt, die sich innerhalb von

fünf Kleinquadraten des aus 25 solcher Quadrate bestehenden in der Mitte liegenden großen Quadrats befanden. Bei den Leukozyten wurden alle weißen Zellen ausgezählt, die sich innerhalb der vier außenliegenden Großquadrate mit je 16 kleineren Quadraten befanden.

Die Erythrozytengesamtzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Erythrozytengesamtzahl}/\mu\text{l Vollblut} = E \times V \times 50$$

E= Erythrozytengesamtzahl, die durch Auszählen festgestellt wurde

V= Verdünnungsfaktor, hier: 200

Die Leukozytengesamtzahl wurde mittels folgender Berechnungsformel errechnet:

$$\text{Leukozytengesamtzahl}/\mu\text{l Vollblut} = (L \times V \times 10) : 4$$

L= Leukozytengesamtzahl, die durch das Auszählen festgestellt wurde

V= Verdünnungsfaktor, hier: 200

### **3.5.4 MCV, MCH, MCHC**

Das mittlere corpusculäre Volumen der Erythrozyten (MCV) wurde nach der Formel

$$\text{MCV} = \text{Hämatokrit (l/l)} \times 1000 : \text{Erythrozytenzahl (in Tera/l)} \text{ ermittelt.}$$

Der mittlere Hämoglobingehalt einzelner Erythrozyten (MCH) wurde nach der Formel

$$\text{MCH} = \text{Hämoglobin (g/l)} : \text{Erythrozytenzahl (in Tera/l)}$$

und die mittlere Hämoglobinkonzentration je Erythrozyt (MCHC) nach der Formel

$$\text{MCHC} = \text{Hämoglobin (g/l)} : \text{Hämatokrit (l/l)} \text{ errechnet.}$$

### **3.5.5 Blutausstriche und Differenzialblutbild**

Zum Aufstellen eines Differentialblutbildes wurden Blutausstriche angefertigt. Hierfür wurde ein Tropfen Blut unmittelbar nach dem Abnehmen auf eine Seite eines Objektträgers gegeben und mittels eines zweiten Objektträgers im 45° Winkel dünn ausgestrichen. Nach vollständiger Trocknung wurde der Blutaustich nach Pappenheim (ROMEIS 1989) angefärbt. Dazu wurde der Objektträger mit Farblösung nach May-Grünwald (Fa. Merck, Darmstadt) vollständig bedeckt. Die Einwirkzeit betrug 3 Minuten. Im Anschluss wurde die Lösung mit Aqua dest. bis zur Hälfte verdünnt und nach 1 Minute der Objektträger mit Farblösung nach Giemsa (Fa. Merck, Darmstadt) bedeckt. Diese wirkte 20 Minuten ein und

wurde zum Schluss mit Leitungswasser vorsichtig abgespült. Der Blutausschlag wurde mittels Filterpapier getrocknet und konnte anschließend unter dem Lichtmikroskop (Modell: BHS, Fa. Olympus) bei einer 1000-fachen Vergrößerung mit Ölimmersion betrachtet werden. Es erfolgte zum einen eine prozentuale Auszählung der Lymphozyten, segmentkernige Granulozyten und Monozyten anhand von 100 Zellen und zum anderen ebenfalls eine prozentuale Auszählung von Erythrozyten, Thrombozyten und Retikulozyten. Aufgrund der im Verhältnis zu den Erythrozyten geringen Thrombozytenzahl wurden hierfür jedoch 200 Zellen ausgezählt.

### **3.6 Statistische Methoden**

Die statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm „WinSTAT“ (Kulima Co., Cambridge, USA) durchgeführt.

Zunächst wurden alle Messwerte auf Normalverteilung geprüft. Als Tag 0 wurden Messwerte aus der Blutprobe eines jeden Karpfens vor der Infektion angesehen. Für sämtliche Parameter dieser Gruppen und der Kontrollgruppe wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Bei allen Parametern mit normalverteilten Messwerten wurden die Gruppen auf signifikante Unterschiede mittels Varianzanalyse und multiplen t-Test geprüft. Bei nicht normalverteilten Messwerten erfolgte die Prüfung auf Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Es wurden alle Behandlungsgruppen an den Proben Tagen und die Kontrollen untereinander verglichen.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von kleiner als 0,05 wurde als signifikant bezeichnet.

---

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Infektionserfolg und Verlauf der Infektion

Bei allen mit KHV infizierten Karpfen konnte mittels PCR in den Organproben die Koi-Herpesvirus-DNA nachgewiesen werden (Abbildung 5). Nur bei 2 Karpfen, die 2 Tage nach der Infektion untersucht wurden, ließ sich die KHV-DNA nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Die Gewebe aller Karpfen der Kontrollgruppe waren in der PCR KHV-negativ. Die Karpfen aus dieser Gruppe zeigten ein physiologisches Schwimmverhalten. Haut und Kiemen wiesen keine Veränderungen auf. Die Narkoseverträglichkeit war sehr gut.

Auch im Urin KHV-infizierter Karpfen ließ sich das Koi-Herpesvirus mittels PCR nachweisen. In 52% der Urinproben infizierter Karpfen wurde ein positives Ergebnis erzielt, wobei im Verlauf der Erkrankung die Häufigkeit des KHV-DNA-Nachweises im Urin anstieg (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Nachweis der Koi-Herpesvirus-DNA im Urin von Karpfen nach experimenteller Infektion*

Tage nach Infektion	Karpfen mit PBS-Applikation		Karpfen mit KHV-Applikation	
	Anzahl untersucht	Anzahl PCR-positiv	Anzahl untersucht	Anzahl PCR-positiv
2	3	0	12	3
5	3	0	12	6
8	3	0	12	8
13	3	0	12	8
Gesamt	12	0	48	25
Prozentuales Ergebnis	100%	0 %	100%	52%

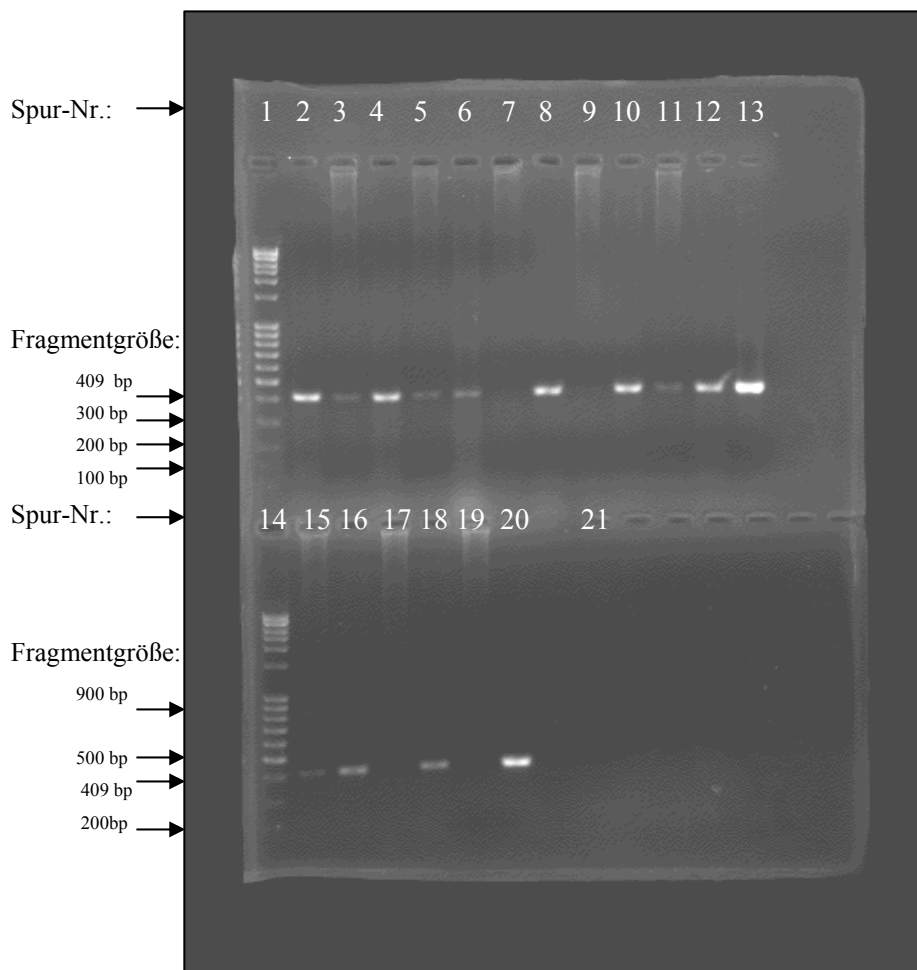


Abbildung 5: Agarosegel nach Auftrennung von PCR-Produkten aus Proben experimentell mit KHV infizierten Karpfen.

Spuren 2-6, 8, 10-12, 15, 16, 18: **positiv** befundene Proben KHV-infizierter Karpfen

Spuren 17, 19: **negativ** befundene, KHV-infizierte Karpfen

Spuren 7, 9: **Kontrollfische**, KHV-negativ

Spur 13: **positiv Kontrolle**

Spur 21: **negativ Kontrolle**

Spuren 1,14: 100 bp **DNA-Leiter**

#### 4.2 Krankheitsverlauf nach experimenteller Infektion mit KHV

Die ersten Krankheitssymptome traten bei Karpfen ab **Tag 2** nach der Infektion auf. Die Fische zeigten verringerte Schwimmaktivität, jedoch normale Fluchtreaktionen. Auf der Haut waren einzelne veränderte Areale mit „sandpapierartigem“ Aussehen zu erkennen. Die Kiemen waren geschwollen, teilweise „ausgefranst“, aber noch gut durchblutet. Die Narkose war gut verträglich.



**Fünf Tage** nach der Infektion traten die Hautveränderungen regelmäßig auf, die Kiemen waren verschleimt und blass. Einige Fische zeigten unkoordinierte, schnelle Schwimmbewegungen und verminderte Fluchtreaktionen.

**Acht Tage** nach der Infektion waren die Karpfen apathisch und Fluchtreaktionen stark vermindert. Die Haut war großflächig verändert mit „sandpapierartigen“ Stellen am ganzen Körper und weißen Schleimablösungen. Die Verankerung der Schuppen war gelockert. Die Kiemen waren hochgradig verschleimt und wiesen meist einseitig vereinzelt kleine weiße Bereiche von Kiemennekrosen auf. Die Narkose trat sehr rasch ein. Es waren erste Todesfälle zu verzeichnen.

Ab dem **13. Tag** nach der Infektion zeigten Karpfen unkoordiniert kreisende Schwimmbewegungen am Wassereinlauf, die Kiemendeckel waren „abgestellt“ und nervale Zuckungen traten auf. Ein Enophthalmus konnte beobachtet werden. Die Haut war weich, ödematös, wirkte stumpf, matt und „aufgelöst“. Die Schuppen fielen aus. Die Karpfen zeigten keine Fluchtreaktionen. Die Kiemen waren hochgradig verschleimt und wiesen beidseitig an allen Kiemenbögen fokale Nekrosen auf. Bei der Narkose setzte die Betäubung sehr rasch ein, und es kam zu Todesfällen.



*Abbildung 6: Unkoordiniert im Aquarium treibende Karpfen 13 Tage nach der Infektion mit 2500 KID<sub>50</sub> KHV I.*

### 4.3 Sektion

Die Organe wiesen bei der Sektion keine deutlichen Veränderungen im Krankheitsverlauf auf. Es konnte lediglich eine Tendenz zur Vergrößerung des Pronephros und des Mesonephros beim Fortschreiten der Erkrankung beobachtet werden sowie eine Tendenz zur Atrophie der Milz. Je ausgeprägter die Krankheitssymptome waren, desto stärker geschwollen war die

Niere, und desto weniger scharfkantig waren die Ränder der Milz. Die übrigen Organe und das Peritoneum waren ohne besonderen Befund.

#### **4.4 Katheterisieren**

An den Wunden der Katheternähte waren keine Entzündungsanzeichen zu erkennen. Nur bei wenigen Karpfen entstanden um die Knopfhefte geringgradig Hämatome. Alle Kontrollkarpfen zeigten nach der Implantation der Blasenkateter und 24-stündigem Aufenthalt im Stoffwechselbecken sehr gutes Allgemeinbefinden. Anfänglich hatten auch die KHV-infizierten Karpfen durch das Katheterisieren keine Beeinträchtigung. Nur die Karpfen, bei denen das Krankheitsgeschehen schon sehr vorangeschritten war (Tag 8 und 13), schwächte die Implantation und dazugehörige Narkose sehr.

#### **4.5 Urinentnahme**

Das Sammeln des Urins erwies sich bei Kontrollkarpfen als problemlos. Es wurden im Mittel 13 ml Urin in 24 Stunden aufgefangen. Das Implantieren des Katheters und Auffangen des Urins war bei den an KHV erkrankten Karpfen umso schwieriger, je ausgeprägter die Krankheitssymptome waren, da die Haut im Krankheitsverlauf um die Urogenitalpapille weich und ödematös wurde. Zudem war im Laufe der KHV-Erkrankung der Urinfluss vermindert. Anfangs konnten im Durchschnitt 12 ml Urin in 24 Stunden aufgefangen werden, wohingegen am Tag 13 im Mittel nur noch 2 ml in 24 Stunden entnommen werden konnten. Der Urin war bei den Kontrollfischen und im Anfangsstadium der KHV-Erkrankung klar hellgelb, während er im Endstadium eine Farbe von sattgelb bis hin zu gelbgrün hatte und eine Trübung zeigte.

#### **4.6 Histologische Ergebnisse**

Um pathologische Veränderungen im Blut und Urin, die im Laufe einer Erkrankung mit dem Koi-Herpesvirus bei Karpfen auftraten, mit Gewebeschäden korrelieren zu können, wurden Nieren und Kiemen infizierter Karpfen histologisch untersucht.

#### 4.6.1 Histologische Befunde an der Kieme

##### 4.6.1.1 Kiemenstruktur nicht infizierter Karpfen

Bei nicht infizierten Karpfen waren die Sekundärlamellen frei beweglich (Abbildung 7a) und die Lamellenzwischenräume nur geringgradig mit Zellen gefüllt. Die Epithelzellen waren flach, schmal und lagen geradlinig wie ein Saum den Lamellen auf (Abbildung 7b). Verklebungen der Lamellen traten nicht auf. Es zeigte sich in der Übersicht ein geordnetes Bild der Kiemenarchitektur.

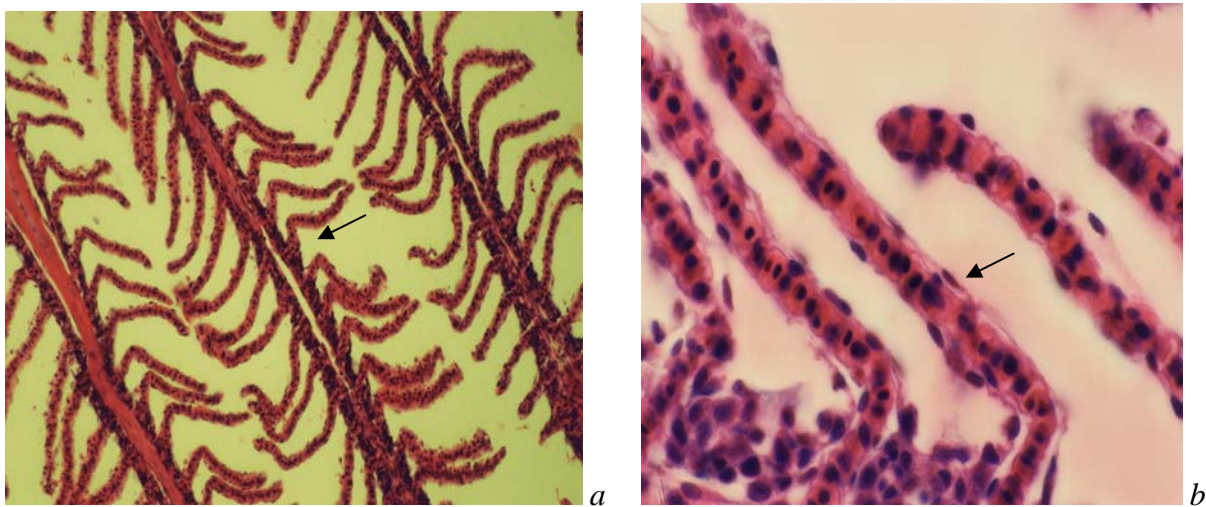


Abbildung 7ab: Lichtmikroskopische Aufnahme des Kiemengewebes nicht infizierter Karpfen (HE-Färbung).

a) Kiemengewebe ohne Zellfüllung im Kiemensekundärlamellenzwischenraum, s. Pfeil (x100)

b) Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 7a, Epithelzellen flach und anliegend, s. Pfeil (x1000)

##### 4.6.1.2 Kiemenstruktur KHV-infizierter Karpfen

Es konnte beobachtet werden, dass es bei den KHV-infizierten Karpfen dem progressiven Krankheitsverlauf entsprechend zu einer vermehrten Zellansammlung in den Zwischenräumen der Kiemensekundärlamellen und zu einer Verdickung der Epithelzellen kam (Abbildung 8a-c). Die Epithelzellen waren zum Teil abgerundet und kugelförmig und lagen der Lamelle nicht mehr eng an (Abbildung 8b,c). An den Lamellenspitzen traten Verklebungen auf und die Kiemenarchitektur löste sich auf. Es konnte hierbei zu einer vollständigen Auffüllung der gesamten Zwischenräume mit Verklebungen aller Sekundärlamellen kommen (Abbildung 8d).

Im Endstadium der Erkrankung traten vermehrt nekrotische Bereiche auf, die anhand der „skelettartigen“ Statur der Kiemenlamellen erkannt wurden.

Die Veränderungen schritten im Laufe der Infektion progressiv fort.

**Zwei Tage** nach der Infektion wies das Kiemengewebe eine geringgradige Füllung der Zwischenräume zwischen den Lamellen auf mit einer leichten Verdickung der Epithelzellen. Zu Verklebungen kam es in diesem Stadium noch nicht.

Nach **fünf Tagen** waren die Epithelzellverdickungen verstärkt und in einzelnen Bereichen traten Verklebungen der Sekundärlamellen auf, der Lamellenzwischenraum war gering- bis mittelgradig mit Zellmaterial gefüllt.

Nach **acht Tagen** waren die Veränderungen weiter fortgeschritten, und **13 Tage** nach der Infektion, im Endstadium der Erkrankung, kam es zu einer hochgradigen Zellauffüllung der Lamellenzwischenräume. Alle Epithelzellen waren hochgradig verdickt und lösten sich teilweise von der Lamelle ab. In ganzen Kiemenbereichen traten Verklebungen von Sekundärlamellen auf.

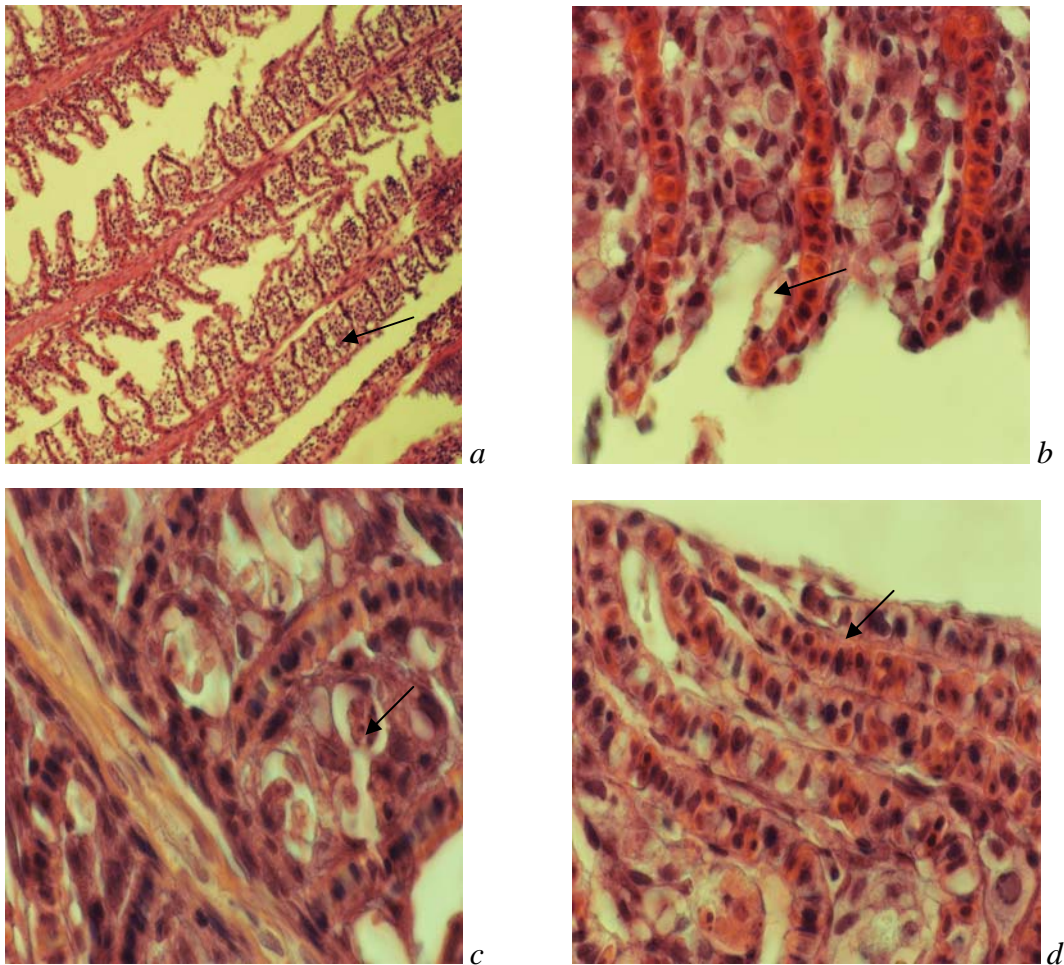


Abbildung 8a-d: Kiemengewebe von Karpfen 13 Tage nach Infektion mit dem Koi-Herpesvirus (HE-Färbung).

a) Übersicht zeigt eine komplette Auffüllung des Zwischenraums zwischen Sekundärlamellen und Verklebungen der Lamellen, s. Pfeil (x100)

b,c) : Kiemenlamellen mit stark verdickten , vakuolisierten und abgelösten Epithelzellen, Zellauffüllungen im Zwischenraum, s. Pfeil (x1000)

d) starke Verklebungen von Kiemenlamellen, s. Pfeil

#### 4.6.2 Histologische Befunde an der Niere

##### 4.6.2.1 Nicht infizierte Karpfen

Das histologische Bild der Niere nicht infizierter Karpfen entsprach den Beobachtungen von Reichle (1959) zur Rumpfnierenphysiologie gesunder Karpfen (REICHLE 1959). Die Anschnitte waren bei allen Karpfen mit zahlreichen unterschiedlichen Nephronenabschnitten und Nierenkörperchen gefüllt. Diese waren von wenig interstitiellem, hämatopoetischen

Gewebe umgeben. Das Verhältnis von Nephronen zu interstitiellem Gewebe entsprach physiologischen Beobachtungen vorangegangener Untersuchungen (REICHLER 1959) (Abbildung 9a). Eine quantitative Auswertung ergab  $92 \pm 3$  % intakte Tubuli und  $8,33 \pm 2,51$  % sich auflösende Tubuli.

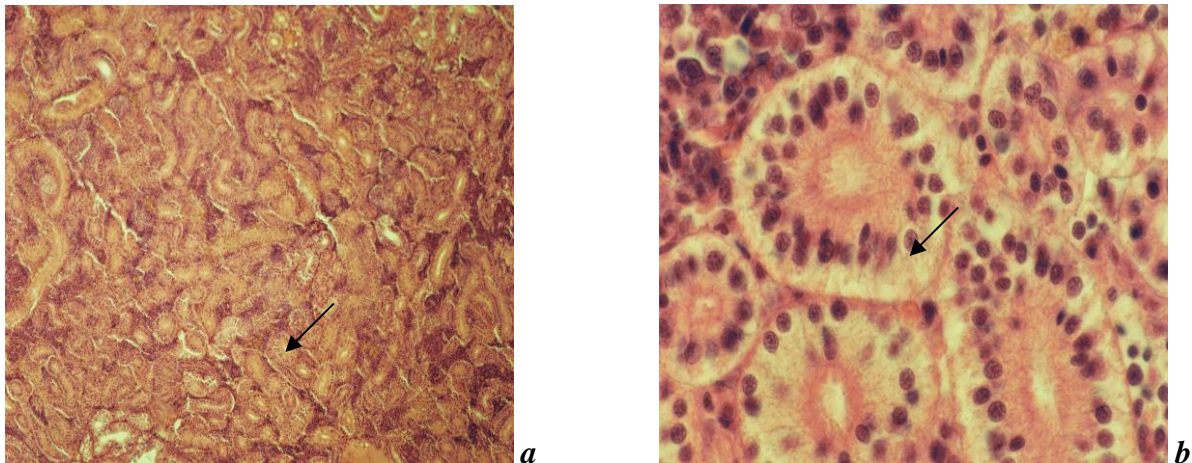


Abbildung 9ab: Lichtmikroskopische Aufnahme vom Nierengewebe eines Kontrollkarpfens (HE-Färbung).

a) Nierengewebe übersät mit Anschnitten von Nierentubuli und Glomerula, s. Pfeil (x100)

b) Vergrößerung eines Ausschnitts von Abb. 1, intakte Nierentubulusepithelzellen, s. Pfeil (x1000)

#### 4.6.2.2 KHV-infizierte Karpfen

Im Verlauf einer KHV-Erkrankung konnten vermehrt degenerierte und atrophierte Tubuli beobachtet werden. Die Zellverbände der Tubulusepithelzellen lösten sich auf und die Zellen verloren ihre Integrität. Auch am hämatopoetischen Interstitium traten Veränderungen auf. Es konnte eine stetige Zunahme des Interstitiums verzeichnet werden. Im Endstadium der Erkrankung war im Mittel über die Hälfte des Nierengewebes mit interstitiellem Gewebe aufgefüllt (Abbildung 10).

Die Einzelergebnisse der Probenliste sind in Tabelle 6 veranschaulicht.

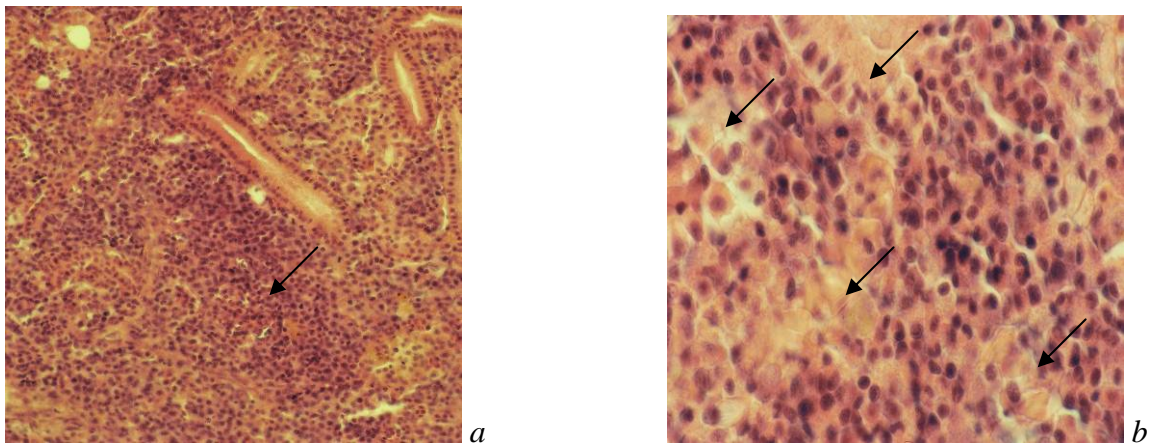


Abbildung 10ab: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Karpfens Tag 13 nach Infektion (HE-Färbung).

a) Übersichtsaufnahme Nierengewebe (x100), nur noch vereinzelt Tubuli auffindbar, Ausbreitung des interstitiellen Gewebes, s. Pfeil

b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. a (x1000), degenerierte Nierentubuli, s. Pfeile

Tabelle 6: Anteil degenerierter Nierentubuli in der Niere von Karpfen im Verlauf einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

Tage nach Infektion	Anteile Nierentubuli (%)		Anteil Interstitielles Gewebe (%)
	Intakt	Degeneriert	
Nicht infizierte Karpfen	92 ± 3	8,33 ± 2,51	9,9 ± 2,1
Tag 2 p.i.	82,8 ± 7,22	17,2 ± 7,22	21,2 ± 4,83
Tag 5 p.i.	63,4 ± 10,19	34,9 ± 9,06	37,9 ± 7,62
Tag 8 p.i.	52,07 ± 9,78	46,15 ± 8,19	76,12 ± 6,3
Tag 13 p.i.	42 ± 6,35	57,85 ± 6,41	88,66 ± 9,31

Ergebnis: Mittelwert ± Standardabweichung

#### 4.7 Hämatologische Ergebnisse

Um das Ausmaß der KHV-Erkrankung und einen Krankheitsverlauf erkennen zu können, wurde das Blut und der Urin der infizierten Karpfen und der Kontrollfische untersucht. Zur Erkennung der Art und Höhe der Nierenschädigung wurden im Plasma die Konzentration von Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium, Phosphor, Kreatinin, die Gesamtproteine und die

Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt und im Urin zusätzlich die Aktivität der GGT.

Im folgenden Abschnitt werden zuerst die Blutergebnisse und im Anschluss daran die Ergebnisse zum Elektrolythaushalt aufgezeigt. In dem folgenden Text und den dazugehörigen Tabellen ist zusätzlich zu den Ergebnissen die Standardabweichung angegeben, während in den Abbildungen 11-33 der Standardfehler dargestellt ist.

#### **4.7.1 Das rote Blutbild**

##### *4.7.1.1 Nicht infizierte Karpfen*

Die Messwerte zum roten Blutbild nicht infizierter Karpfen entsprachen den Daten, die in vorangegangenen Studien bei gesunden Karpfen festgestellt wurden (DOMBROWSKI, 1953). Der Hämatokritwert betrug im Mittel 0,361 l/l mit einer Standardabweichung von  $\pm 0,026$  l/l und der mittlere Hämoglobingehalt 80 g/l mit einer Standardabweichung von  $\pm 9,6$  g/l. Es wurden im Mittel  $1,91 \pm 0,17$  Tera Erythrozyten/l gezählt und  $6.863 \pm 1.913$  Leukozyten/ $\mu$ l. Bei allen Parametern trat eine individuelle physiologische Variabilität bei den Kontrollkarpfen auf. Anhand der Messwerte aus der ersten und der zweiten Blutabnahme wurde deutlich, dass diese Variabilität auf individuellen Unterschieden beruhte. So waren die Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Probenahme bei dem Hämatokritwert kleiner als 0,001 l/l, bei dem Hämoglobinwert kleiner als 1 g/l und bei der Erythrozytengesamtzahl kleiner als 0,1 T Erythrozyten/l. Bei der Leukozytengesamtzahl betrug die Differenz 1.454 Leukozyten/ $\mu$ l (Tabelle 7). Die Unterschiede zwischen den Meßwerten von den beiden Probenentnahmen waren nicht signifikant (Tabelle 8).

Das mittlere corpusculäre Volumen der einzelnen Erythrozyten (MCV) betrug  $189,0 \pm 0,9$   $\mu$ m<sup>3</sup>, der mittlere Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten (MCH)  $41,8 \pm 2,1$  pg und die mittlere Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyten (MCHC) lag bei  $221,6 \pm 3,1$  g/l (Tabelle 7).

##### *4.7.1.2 KHV-infizierte Karpfen*

Gesamtergebnis:

Im Verlauf der KHV-Infektion sank die Erythrozytengesamtzahl auf  $1,22 \pm 0,22$  Tera Erythrozyten/l, der Hämatokritwert gleichzeitig auf  $0,229 \pm 0,044$  l/l und der Hämoglobingehalt auf  $65,5 \pm 16,4$  g/l. Die Leukozytengesamtzahl stieg hingegen bis zum



Endstadium der Erkrankung auf  $14.629 \pm 5.050$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  an (Tabelle 7). Dies spiegelte sich auch im Differenzialblutbild wider, das im Anschluss an dieses Kapitel beschrieben wird. Die Differenz zum Ausgangswert vor der Infektion betrug bei der Erythrozytengesamtzahl  $0,50 \pm 0,47$  Tera Erythrozyten/l und bei der Leukozytengesamtzahl  $4.389 \pm 7.399$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (Tabelle 7).

Erythrozytengesamtzahl, Hämatokritwert und Leukozytengesamtzahl waren bei allen infizierten Karpfen signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert vor der Infektion und zu den Messwerten der nicht infizierten Karpfen. Die Erythrozytengesamtzahl und der Hämatokritwert waren signifikant kleiner als Ausgangswert und Kontrollwert. Die Leukozytengesamtzahl war hingegen signifikant größer. Die Hämoglobingehalte waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 8).

Das mittlere corpusculäre Volumen der einzelnen Erythrozyten (MCV) betrug bei Karpfen unter KHV-Infektion  $187,7 \pm 1,2 \mu\text{m}^3$ , der mittlere Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten (MCH)  $53,6 \pm 1,6 \text{ pg}$  und die mittlere Hämoglobinkonzentration in g auf 1 Liter Erythrozyten (MCHC) lag bei  $286,0 \pm 2,8 \text{ g/l}$ . Diese Messparameter waren somit bei infizierten Karpfen bis auf das MCV alle größer als bei den Kontrollkarpfen (siehe Tabelle 7).

Ergebnisse der einzelnen Probenentnahmetage:

Im Einzelnen wurden an den Probenentnahmetagen folgende Veränderungen beobachtet (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8):

Am **Tag 2 p.i.** war die mittlere Erythrozytengesamtzahl um  $0,32 \pm 0,51$  Tera Erythrozyten/l auf  $1,32 \pm 0,28$  Tera Erythrozyten/l abgesunken. Diese Differenz zum Ausgangswert war jedoch nicht signifikant. Der Hämatokritwert war von  $0,361 \text{ l/l}$  bei Kontrollfischen auf im Mittel  $0,248 \text{ l/l} \pm 0,056$  signifikant erniedrigt. Der Hämoglobinwert lag im Mittel bei  $60 \pm 15,2 \text{ g/l}$ , der Ausgangswert bei  $71,0 \pm 6,1 \text{ g/l}$ . Diese Differenz war nicht signifikant. Die Leukozytengesamtzahl war im Vergleich zu nicht infizierten Karpfen um *ca.*  $10.400$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  auf im Mittel  $17.650 \pm 5.006$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  signifikant erhöht.

Am **5. Tag p.i.** war die Erythrozytengesamtzahl weiter signifikant auf  $1,13 \pm 0,22$  Tera Erythrozyten/l erniedrigt und der Hämatokritwert mit  $0,225 \pm 0,045 \text{ l/l}$  vom Ausgangswert  $0,35 \pm 0,011 \text{ l/l}$  signifikant verringert. Der Hämoglobingehalt war mit  $65 \pm 15,8 \text{ g/l}$  im Vergleich zu  $72 \pm 5,32 \text{ g/l}$  als Ausgangswert erniedrigt, aber nicht signifikant kleiner.

Die Leukozytengesamtzahl war gegenüber dem Ausgangswert von 7.115 Leukozyten/ $\mu$ l auf  $10.961 \pm 2.917$  Leukozyten/ $\mu$ l signifikant erhöht.

Am **Tag 8 p.i.** war die Erythrozytengesamtzahl von  $1,48 \pm 0,11$  Tera Erythrozyten auf  $1,27 \pm 0,31$  Tera Erythrozyten/l signifikant erniedrigt. Der Hämatokritwert war von 0,353 l/l vor der Infektion auf  $0,224 \pm 0,045$  l/l signifikant verringert und der Hämoglobingehalt von 67 g/l auf  $61 \pm 15,7$  g/l verringert, aber nicht signifikant kleiner als vor Infektion. Die Leukozytenzahl war auch 8 Tage nach der Infektion deutlich von 9.313 Leukozyten/ $\mu$ l auf  $15.031 \pm 8.344$  Leukozyten/ $\mu$ l erhöht.

Auch am **Tag 13 p.i.** waren vergleichbare hämatologische Veränderungen zu beobachten. Die Erythrozytengesamtzahl war von  $2,2 \pm 0,21$  Tera auf  $1,19 \pm 0,09$  Tera Erythrozyten/l signifikant erniedrigt, der Hämatokritwert von  $0,363 \pm 0,019$  l/l zu  $0,223 \pm 0,03$  l/l signifikant kleiner, und der Hämoglobingehalt von  $90,9 \pm 11,2$  g/l auf  $76 \pm 18,9$  g/l reduziert. Die Leukozytengesamtzahl war im Blut der infizierten Fische von  $7.330 \pm 2.231$  Leukozyten/ $\mu$ l signifikant auf  $14.875 \pm 3.936$  Leukozyten/ $\mu$ l angestiegen.

Tabelle 7: Hämatologische Parameter im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus, Fortsetzung auf der nächsten Seite

Parameter im Blut	Nicht infizierte Karpfen	KHV-infizierte Karpfen				
		gesamt	gesamt	Tag 2 <i>p.i.</i>	Tag 5 <i>p.i.</i>	Tag 8 <i>p.i.</i>
Anzahl Karpfen [n]	12	48	12	12	12	12
Ausgangswert	1,98 ±	1,72 ±	1,62 ±	1,74 ±	1,48 ±	2,2 ±
Erythrozytengesamtzahl [Tera Erythrozyten/l]	0,13	0,15	0,25	0,12	0,11	0,21
<b>Erythrozytengesamtzahl [Tera Erythrozyten/l]</b>	1,91 ±	1,22* ±	1,32 ±	1,13* ±	1,27*±	1,19* ±
	0,17	0,22	0,28	0,22	0,31	0,09
Differenz zum Ausgangswert	< 0,1	0,50 ±	0,32 ±	0,61* ±	0,41 ±	1,01* ±
		0,47	0,51	0,40	0,57	0,41
Ausgangswert Hämatokrit [l/l]	0,360 ±	0,353 ±	0,35 ±	0,35 ±	0,353 ±	0,363 ±
	0,013	0,014	0,021	0,011	0,013	0,019
<b>Hämatokrit [l/l]</b>	0,361 ±	0,229* ±	0,248* ±	0,225* ±	0,224* ±	0,223*
	0,026	0,044	0,056	0,045	0,045	±0,03
Differenz zum Ausgangswert	< 0,001 ±	0,124 ±	0,102* ±	0,125* ±	0,129* ±	0,14* ±
	0,013	0,077	0,091	0,06	0,058	0,10
Ausgangswert Hämoglobin [g/l]	79,5 ± 5,3	75,2 ±	71 ± 6,1	72 ±	67 ± 7,2	90,9 ±
		4,2		5,32		11,2
<b>Hämoglobin [g/l]</b>	80 ± 9,6	65,5 ±	60 ±	65 ±	61 ±	76 ±
		16,4	15,2	15,8	15,7	18,9
Differenz zum Ausgangswert	< 1 ± 4,9	-9,7 ±	-11 ±	-7 ± 29,5	-6 ± 30,3	-14,9 ±
		30,17	14,6			46,3
Ausgangswert	8.317 ±	10.240 ±	7.200 ±	7.115 ±	9.313 ±	7.330 ±
Leukozytengesamtzahl [Leukozyten/μl]	1.452	2.349	3.214	2.120	1.876	2.231
<b>Leukozytengesamtzahl [Leukozyten/μl]</b>	6.863	14.629*	17.650*	10.961*	15.031*	14.875*
	± 1.913	± 5.050	± 5.006	± 2.917	± 8.344	± 3.936

Parameter im Blut	Nicht infizierte Karpfen	KHV-infizierte Karpfen				
		gesamt	gesamt	Tag 2 <i>p.i.</i>	Tag 5 <i>p.i.</i>	Tag 8 <i>p.i.</i>
<b>Leukozytengesamtzahl</b> [Leukozyten/ $\mu$ l] Differenz zum Ausgangswert	1.454 $\pm$ 2.376	-4.389* $\pm$ 7.399	-10.450* $\pm$ 8.525	-3.846* $\pm$ 5.565	-5.718* $\pm$ 10.259	-7.545* $\pm$ 5.250
MCV [ $\mu$ m <sup>3</sup> ]	189,0 $\pm$ 0,9	187,7 $\pm$ 1,2	187,8 $\pm$ 1,5	199,1 $\pm$ 0,79	176,3 $\pm$ 1,1	187,3 $\pm$ 0,89
MCH [pg]	41,8 $\pm$ 2,1	53,6 $\pm$ 1,6	45,45 $\pm$ 1,8	57,5 $\pm$ 2,1	48,0 $\pm$ 0,26	63,8 $\pm$ 0,31
MCHC [g/l]	221,6 $\pm$ 3,1	286,0 $\pm$ 2,8	241,9 $\pm$ 2,1	288,8 $\pm$ 3,22	272,3 $\pm$ 1,9	340,8 $\pm$ 4,1

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

\*: Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum Meßwert bei Kontrollfischen

*Tabelle 8: Übersicht zur statistischen Auswertung der Hämatologie-Messdaten/  
Übersichtstabelle der signifikanten Unterschiede:*

Blutparameter	Kontrollkarpfen	KHV-infizierte Karpfen
Erythrozytengesamtzahl	n.s.	K/ Tag 0 > Infizierte
Differenz Erythrozytengesamtzahl	n.s.	Tag 5/ 13 > K/ Tag 0/ 2/ 8
Hämatokrit	n.s.	K/ Tag 0 > Infizierte
Differenz Hämatokrit	n.s.	K/ Tag 0 < Infizierte
Hämoglobin	n.s.	n.s.
Differenz Hämoglobin	n.s.	n.s.
Leukozytengesamtzahl	n.s.	K/ Tag 0 < Infizierte
Differenz Leukozytengesamtzahl	n.s.	K/ Tag 0 < Infizierte

n.s.: nicht signifikant, >/ <: signifikant erhöht/ erniedrigt

K: Gesamtergebnis nicht infizierter Kontrollkarpfen, Infizierte: Ergebnis aller KHV-infizierten Karpfen

Tag 0: Ausgangswert zehn Tage vor der Infektion, Tag 2/ 5/ 8/ 13: entsprechende Probenentnahme nach der Infektion

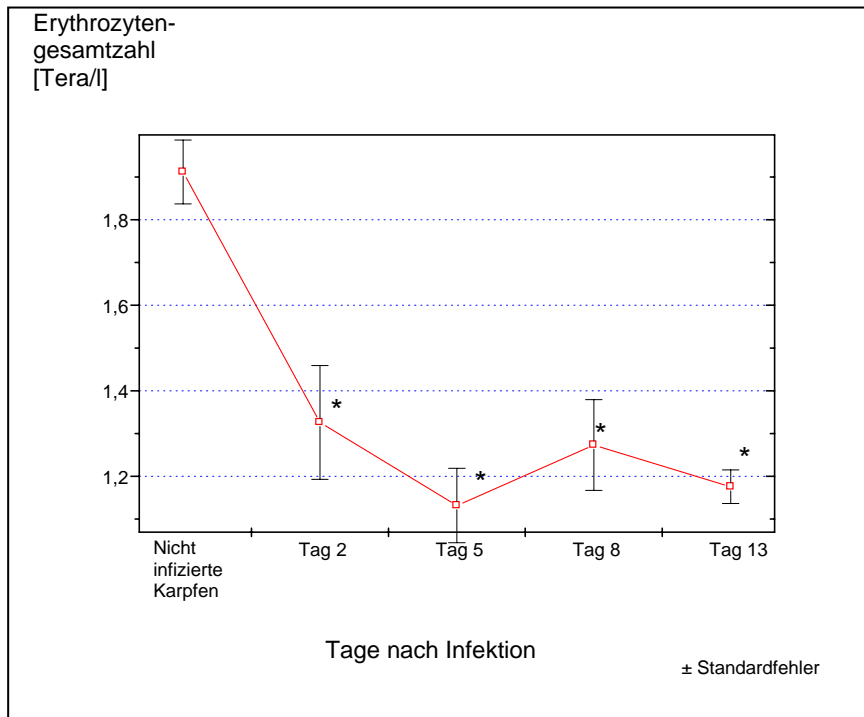


Abbildung 11: Erythrozytenzahl im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

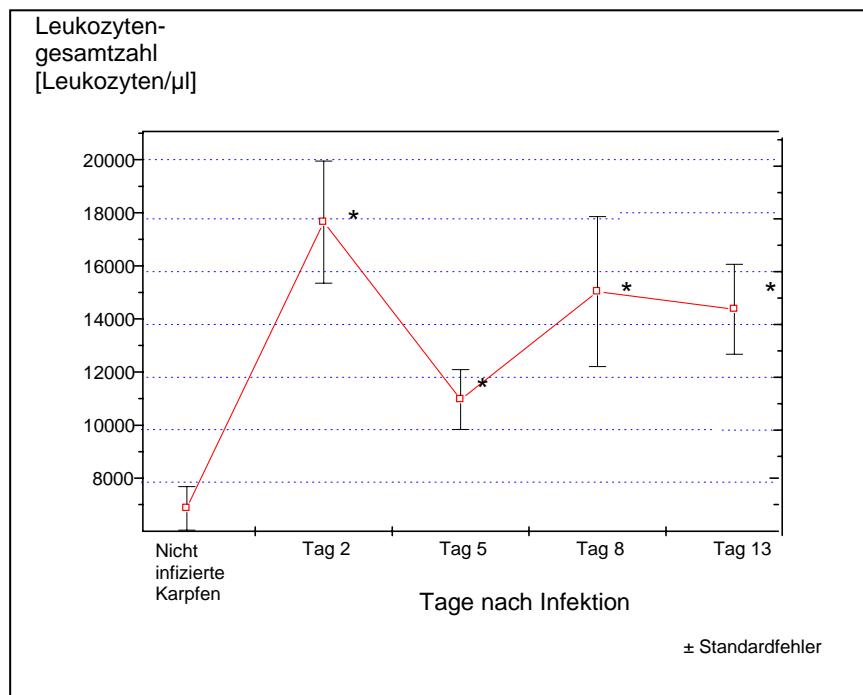


Abbildung 12: Leukozytenzahl im Blut von Karpfen unter der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

#### 4.7.2 Differenzialblutbild

Weiterhin wurde ein Differenzialblutbild aller Karpfen sowohl vor der Infektion als auch unter der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus erstellt.

Im Differentialblutbild wurden Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile Granulozyten sowie Erythrozyten und Thrombozyten differenziert. Von allen Zellpopulationen wurde die relative Häufigkeit bestimmt. Retikulozyten wurden auf ihr Vorkommen geprüft. Zusätzlich wurden die Blutzellen auf morphologische Unterschiede vor und unter der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus untersucht.

##### 4.7.2.1 Nicht infizierte Karpfen

Zehn Tage vor einer PBS-Applikation wurden bei Kontrollkarpfen im zirkulierenden Blut im Mittel  $94\% \pm 4,9\%$  Lymphozyten,  $1,4\% \pm 0,3\%$  Monozyten und  $4,6\% \pm 3,7\%$  Neutrophile Granulozyten gezählt. Die einzelnen Proben-tage nach der PBS-Infektion wurden zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Dies ergab im Mittel ein Verhältnis von  $93\% \pm 5,4\%$  Lymphozyten,  $1,8\% \pm 0,9\%$  Monozyten und  $5,2\% \pm 5,3\%$  Neutrophile Granulozyten. Beim

Vergleich dieser beiden Ergebnisse vor und nach der PBS-Applikation wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Außerdem wurden in beiden Proben im Mittel  $3,5\% \pm 0,9\%$  Thrombozyten und  $96,5\% \pm 0,75\%$  Erythrozyten gezählt. Die relative Häufigkeit der Thrombozyten war 2 Tage nach Applikation von PBS signifikant höher, als am Tag 0, 5, 8 und 13.

Die Morphologie aller untersuchten Blutzellen entsprach dem in Lehrbüchern zur Fischbiologie und –pathologie und dem in Studien über die Hämatologie der Fische aufgezeigten physiologischen Aussehen (BONE et al. 1995, BÖTTCHER 1998, DOMBROWSKI 1953, ROBERTS 1989).

#### 4.7.2.2 KHV-Infektion

Gesamtergebnis:

Zehn Tage vor der KHV-Infektion wurden bei den Karpfen im zirkulierenden Blut im Mittel  $91,6\% \pm 3,7\%$  Lymphozyten,  $2,5\% \pm 0,8\%$  Monozyten und  $5,9\% \pm 3,7\%$  Neutrophile Granulozyten gezählt. Signifikante Unterschiede zum Ergebnis der Kontrollfische waren hierbei nicht zu verzeichnen. Bei Karpfen unter KHV-Infektion trat insgesamt eine relative Häufigkeit von  $23,0\% \pm 16,1\%$  Lymphozyten,  $38,0\% \pm 23,3\%$  Monozyten und  $41,7\% \pm 22,89\%$  Neutrophile Granulozyten auf. Beim Vergleich der Zellverteilungen vor und nach der KHV-Infektion wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Die Häufigkeit von Lymphozyten war nach der Infektion signifikant niedriger als zehn Tage vor der Infektion, Monozyten und Neutrophile Granulozyten waren signifikant häufiger als vor der Infektion (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Vor der Infektion wurden im Mittel  $4\% \pm 0,8\%$  Thrombozyten und  $96\% \pm 0,5\%$  Erythrozyten gezählt. Nach der KHV-Infektion wurden jedoch im Mittel nur  $2,7\% \pm 1,8\%$  Thrombozyten und  $97,3\% \pm 3,5\%$  Erythrozyten gezählt. Hierbei war die Häufigkeit von Thrombozyten nach der Infektion signifikant geringer als vor der Infektion (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Zehn Tage vor der Infektion waren unter den Erythrozyten Retikulozyten zu finden, während nach der Infektion keine Retikulozyten mehr beobachtet werden konnten.

Die untersuchten Blutzellen KHV-infizierter Karpfen wichen in ihrer Morphologie nicht pathologisch von der nicht infizierter Karpfen ab. Es waren jedoch erhöhte Anteile von jungen Granulozytenformen zu erkennen.

Diese Veränderungen im Differentialblutbild waren bereits **2 Tage** nach der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus ausgeprägt.

Der Anteil von Lymphozyten war auf  $22,8\% \pm 24,2\%$  gefallen und der Anteil an Monozyten auf  $37,8\% \pm 23,0\%$  sowie von Neutrophilen Granulozyten auf  $39,0\% \pm 20,8\%$  gestiegen. Diese Veränderungen waren signifikant im Vergleich zu der Zellverteilung im Blut der Fische vor der Infektion und im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (Tabelle 9 und Tabelle 10). Es wurden  $4,6\% \pm 2,1\%$  Thrombozyten und  $95,4\% \pm 4,0\%$  Erythrozyten gezählt. Dies war nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollfischen und dem Ausgangswert.

Retikulozyten waren nicht auffindbar.

Im weiteren Verlauf der Infektion, in den Blutproben vom **Tag 5, 8, 13** nach Inokulation des KHV, war die Häufigkeit der Zellpopulationen nicht von der am Tag 2 beobachteten Verteilung unterschiedlich. Hingegen war der Anteil von Thrombozyten ab Tag 5 *p.i.* signifikant erniedrigt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 und Tabelle 10 und den Abbildungen 13, 14 und 15 dargestellt.



Tabelle 9: Relative Häufigkeit von Zellpopulationen im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

Differenzial- blutbild	Nicht infizierte Karpfen		KHV-infizierte Karpfen					
	Ausgangswert 10 Tage vor der PBS-Infektion	Nach der PBS-Infektion	Ausgangswert 10 Tage vor der KHV-Infektion	gesamt	Tag 2 p.i.	Tag 5 p.i.	Tag 8 p.i.	Tag 13 p.i.
Anzahl untersuchter Karpfen [n]	12	12	48	48	12	12	12	12
Lymphozyten [%]	94 ± 4,9	93 ± 5,4	91,6 ± 3,7	23,0* ± 16,1	22,8* ± 24,2	13,6* ±6,4	21,8* ± 15,2	14,6* ± 15,6
Monozyten [%]	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,9	2,5 ± 0,8	38,0* ± 23,3	37,8* ± 23,0	35,0* ±20,1	42,9* ± 19,5	42,1* ± 35,3
Neutrophile Granulozyten [%]	4,6 ± 3,7	5,2 ± 5,3	5,9 ± 3,7	41,7* ± 22,89	39,0* ±20,8	51,4* ± 19,9	34,3* ± 19,9	43,3* ± 31,5
Thrombozyten [%]	3,4 ± 0,8	3,5 ± 0,9 (Tag2*)	4,0 ± 0,8	2,7* ± 1,8	4,6 ± 2,1	2,5* ± 1,75	1,4* ± 1,35	0,75* ± 0,59
Erythrozyten [%]	97,3 ± 0,9	96,5 ± 0,75	96,0 ± 0,5	97,3 ± 3,55	95,4 ± 4,0	97,5 ± 1,75	98,6 ± 4,2	99,25* ± 0,55
Retikulozyten	+	+	+	-	-	-	-	-

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

\*: Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ )

+: vorhanden

-: nicht vorhanden

*Tabelle 10: Relative Häufigkeit von Zellpopulationen im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus*

*Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen*

<b>Blutparameter</b>	<b>Nicht infizierte Karpfen</b>	<b>KHV-infizierte Karpfen</b>
Lymphozyten	n.s	K/ Tag 0 > Infizierte
Monozyten	n.s	K/ Tag 0 < Infizierte
Neutrophile Granulozyten	n.s	K/ 0 < Infizierte
Thrombozyten	Tag 2 > Tag 0/ 5/ 8/ 13	Tag 0 > Tag 5/ 8/ 13
Erythrozyten	Tag 2 < Tag 0/ 5/ 8/ 13	Tag 13 > Tag 0/ 2/ 5/ 8
Retikulozyten	+	-

n.s.: nicht signifikant

>/ <: signifikant erhöht/ erniedrigt

K: Gesamtergebnis nicht infizierter Kontrollkarpfen

Infizierte: Ergebnis aller KHV-infizierten Karpfen

Tag 0: Ausgangswert zehn Tage vor der Infektion

Tag 2/ 5/ 8/ 13: Proben tage nach der Infektion

+: vorhanden

-: nicht vorhanden

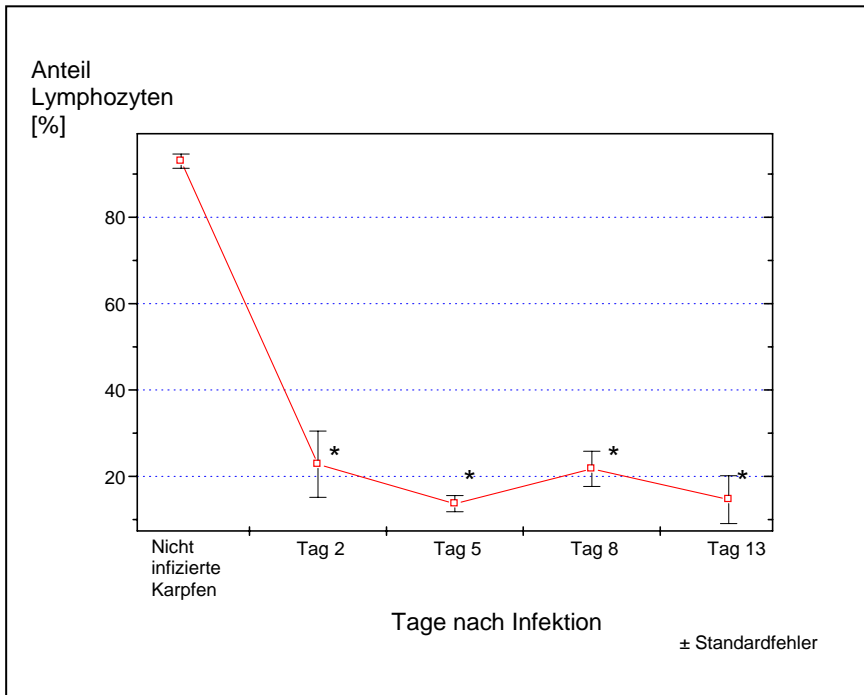


Abbildung 13: Relative Häufigkeit von Lymphozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

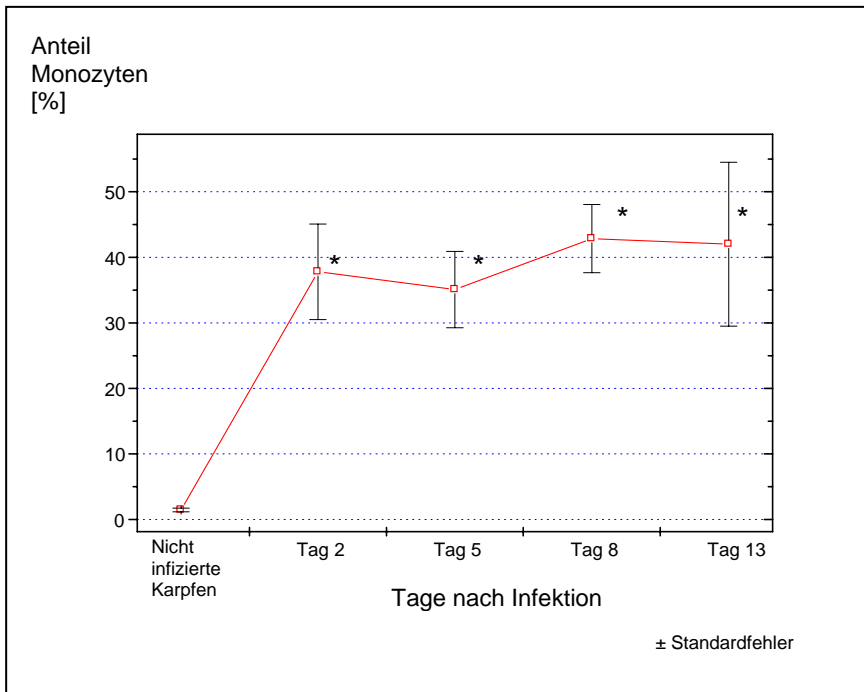


Abbildung 14: Relative Häufigkeit von Monozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

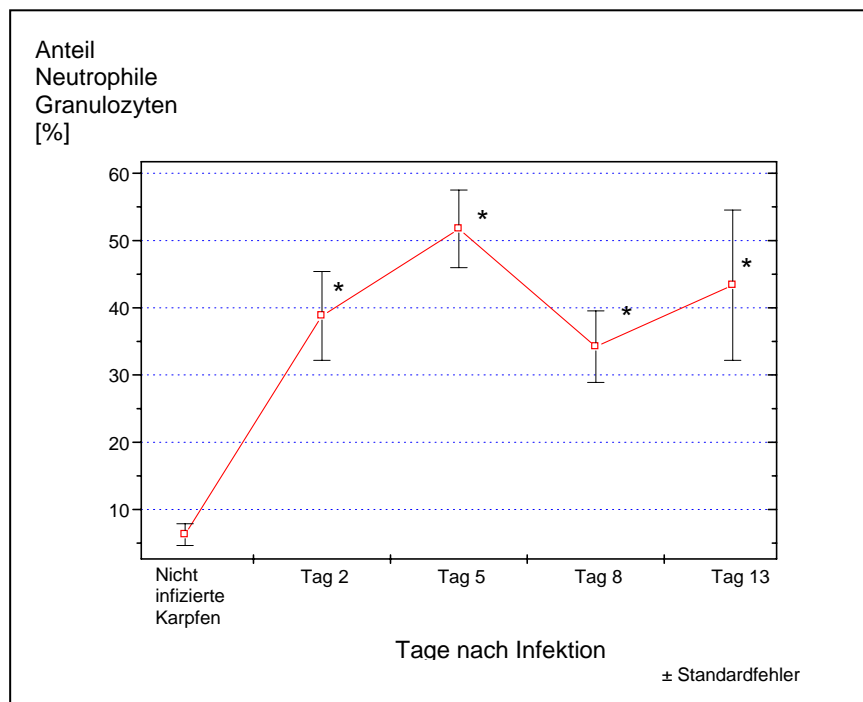


Abbildung 15: Relative Häufigkeit von Neutrophilen Granulozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

## 4.8 Klinisch-chemische Parameter in Plasma und Urin

### 4.8.1 Osmolarität in Plasma und Urin

Die nicht infizierten Kontrollkarpfen wiesen im Plasma eine konstante Osmolarität von im Mittel  $289 \pm 17,6$  mOsm/kg auf. Die Osmolarität im Urin lag im Mittel bei  $32 \pm 13,1$  mOsm/kg. Dies entsprach den physiologischen Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen (MEYER 2001). Es konnten sowohl bei der Plasma- als auch der Urinosmolarität keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messwerten vor und nach der Applikation von PBS beobachtet werden (Abbildung 16, 17).

Das Gesamtergebnis der KHV-infizierten Karpfen ergab eine Osmolarität im Plasma von im Mittel  $241,9 \pm 33,7$  mOsm/kg und eine Osmolarität im Urin von im Mittel  $132 \pm 85,6$  mOsm/kg. Dies zeigt eine leichte Abnahme der Osmolarität im Plasma und eine deutliche Zunahme der Elektrolytkonzentration im Urin. Diese Veränderungen waren im Vergleich zu den Messwerten vor der Infektion signifikant. Die Messwerte im Verlauf der KHV-Infektion sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt.

Am **Tag 2** nach der Infektion war die Osmolarität im Plasma im Vergleich zum Ausgangswert vor der Infektion durchschnittlich um 40,8 mOsm/kg auf im Mittel  $251,2 \pm 30,7$  mOsm/kg reduziert. Diese Differenz war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Osmolarität im Urin betrug an diesem Tag  $67,2 \pm 55,8$  mOsm/kg und war zu Messwerten von nicht infizierten Karpfen mit  $32 \pm 13,1$  mOsm/kg ebenfalls statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Auch am **Tag 5** nach der Infektion war die Osmolarität im Plasma mit  $252 \pm 30,4$  mOsm/kg nicht signifikant kleiner als vor der Infektion. Die Osmolarität im Urin betrug an diesem Tag  $158 \pm 76,5$  mOsm/kg und war im Vergleich zu Messwerten von nicht infizierten Karpfen mit 32 mOsm/kg signifikant erhöht.

Am **Tag 8** nach der Infektion war die Osmolarität im Plasma mit  $246,5 \pm 39,1$  mOsm/kg signifikant erniedrigt und die Osmolarität im Urin mit  $154 \pm 117$  mOsm/kg im Vergleich zu nicht infizierten Karpfen signifikant erhöht.

Am **Tag 13** nach der Infektion war die Osmolarität im Plasma auf im Mittel  $218 \pm 34,9$  mOsm/kg weiter signifikant abgesunken, während die Osmolarität im Urin mit  $151 \pm 93,1$  mOsm/kg weiterhin gegenüber nicht infizierter Karpfen signifikant erhöht war.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 dargestellt.

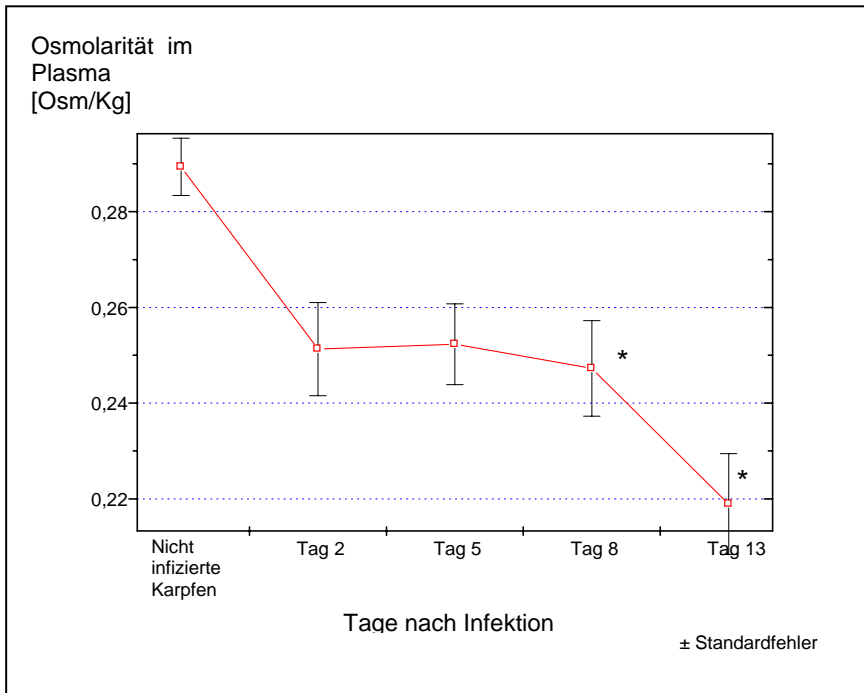


Abbildung 16: Osmolarität im Plasma von Karpfen unter Infektion mit KHV

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

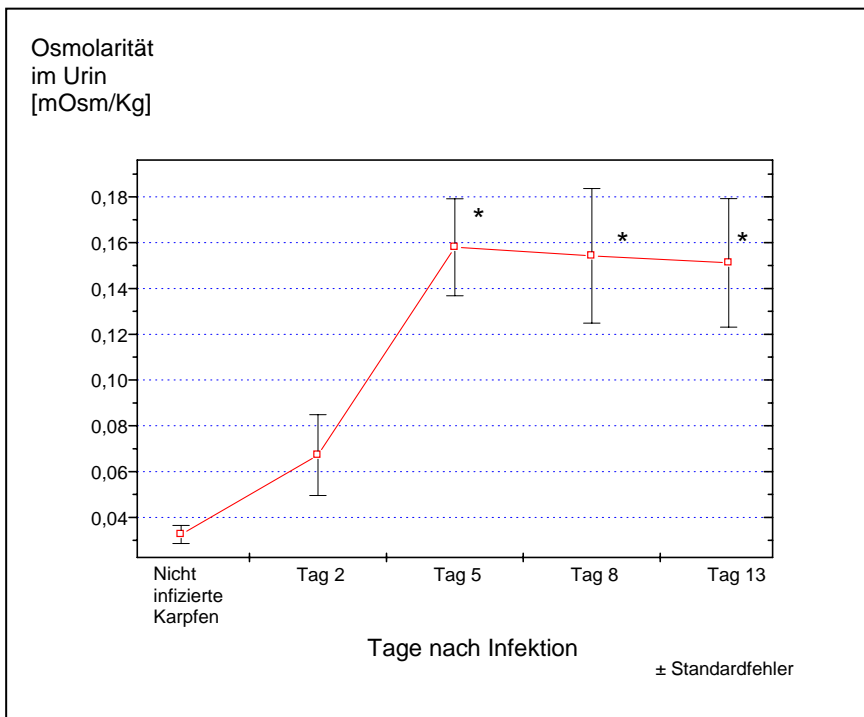


Abbildung 17: Osmolarität im Urin von Karpfen unter Infektion mit KHV

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

#### 4.8.2 Natrium in Plasma und Urin

Die Kontrollfische wiesen eine konstante Natriumkonzentration im Plasma von  $132,4 \pm 4,36$  mmol/l auf. Die Natriumkonzentration im Urin lag bei  $3,9 \pm 2,42$  mmol/l. Unter Infektion mit KHV wurde im Plasma ein Natriumgehalt von  $110,5 \pm 18,9$  mmol/l und im Urin von  $52,7 \pm 42,28$  mmol/l gemessen. Dies zeigt eine leichte Abnahme Natriumkonzentration im Plasma und eine deutliche Zunahme im Urin.

Die Veränderungen führten sowohl im Urin- als auch im Plasma zu statistisch signifikanten Unterschieden zu den Messwerten bei nicht infizierten Karpfen. Bereits am **Tag 2** waren Veränderungen in der Natriumkonzentration zu messen, die jedoch statistisch nicht von Messwerten bei nicht infizierten Karpfen verschieden waren (Abbildung 19).

Ab dem **5. Tag** nach der Infektion schieden Karpfen signifikant mehr Natrium mit dem Urin aus (Abbildung 19), und in den Proben von **Tag 5** und **Tag 13** nach Infektion wurden signifikant niedrigere Natriumspiegel im Plasma gemessen (Abbildung 18).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle Tabelle 11 bis Tabelle 14 aufgezeigt.

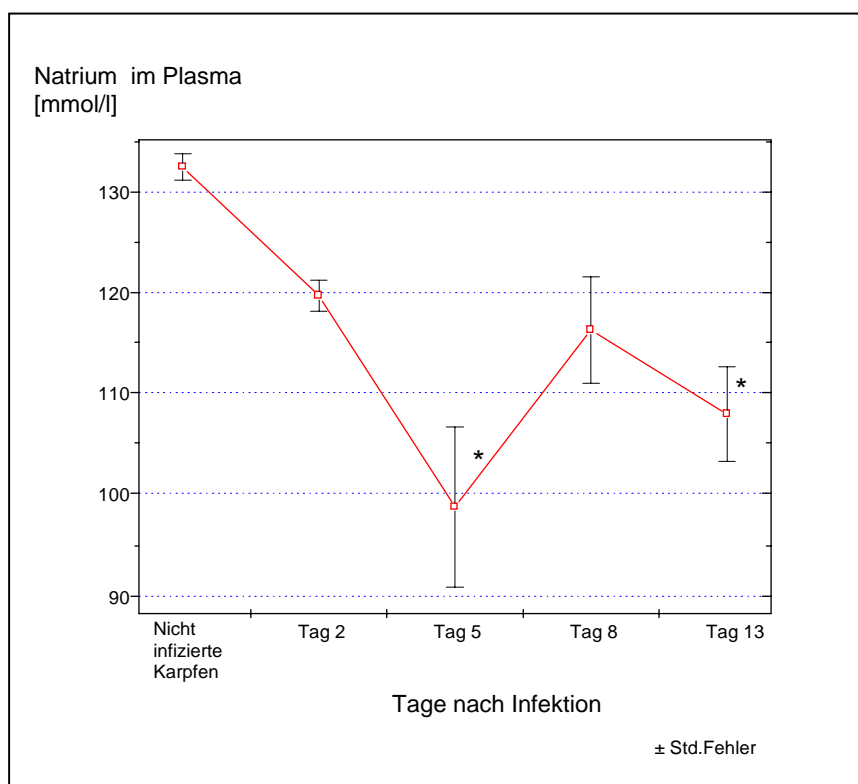


Abbildung 18: Natriumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

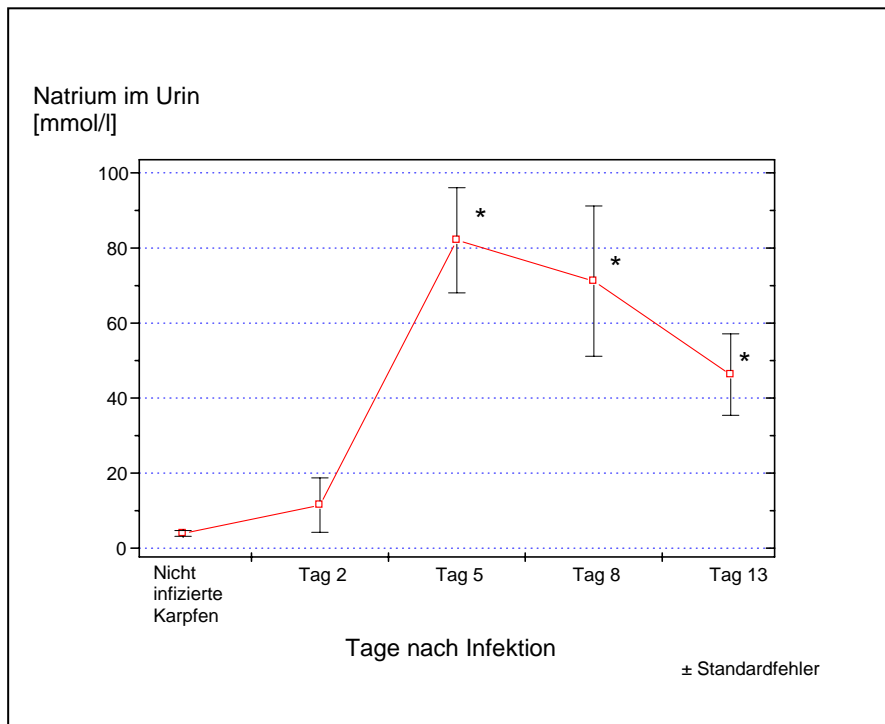


Abbildung 19: Natriumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

#### 4.8.3 Kalium in Plasma und Urin

Bei nicht infizierten Karpfen wurde eine konstante Kaliumkonzentration im Plasma von  $0,46 \pm 0,11$  mmol/l gemessen und im Urin von  $0,65 \pm 0,21$  mmol/l, die nach einer PBS-Applikation nicht verändert waren.

Bei mit KHV-infizierten Karpfen wurde eine Kaliumkonzentration im Plasma von  $2,10 \pm 0,85$  mmol/l und im Urin von  $2,15 \pm 2,20$  mmol/l ermittelt. Es zeigte sich hier eine deutliche Zunahme der Kaliumkonzentration sowohl im Plasma als auch im Urin. Die Erhöhung war im Plasma im Vergleich zu nicht infizierten Karpfen signifikant, im Urin nicht.

Bei allen infizierten Karpfen wurden starke Schwankungen des bei den nicht infizierten Karpfen eng regulierten Kaliumspiegels sowohl im Plasma als auch im Urin beobachtet (Abbildung 20 und Abbildung 22). Signifikant erhöht waren die Kaliumspiegel in Plasmaproben von **Tag 5** und **Tag 13** nach der Infektion.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 aufgezeigt.



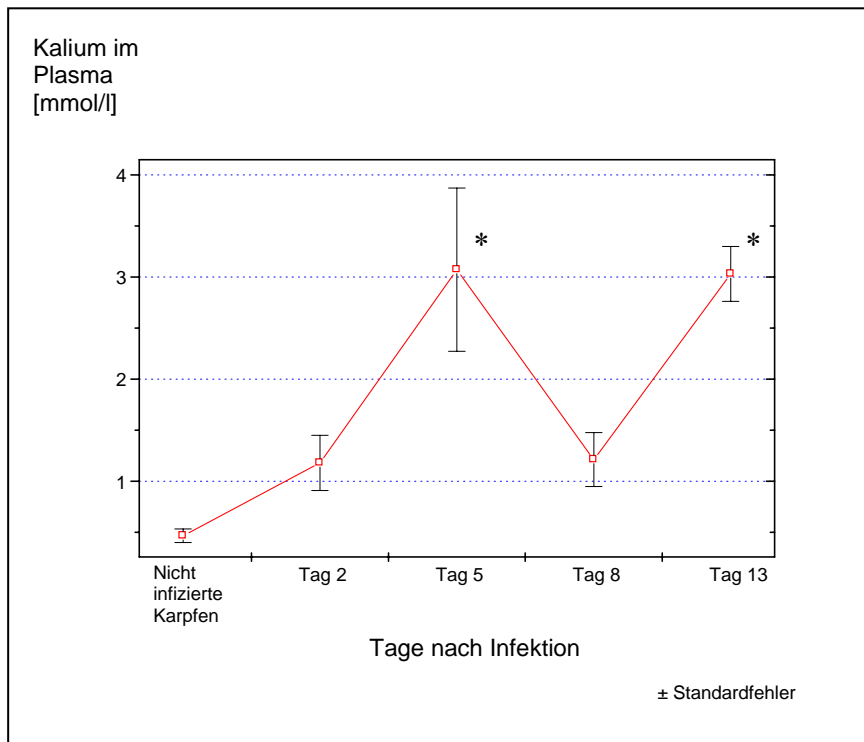


Abbildung 20: Kaliumkonzentration im Plasma der KHV-infizierten Karpfen und nicht infizierten Karpfen

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

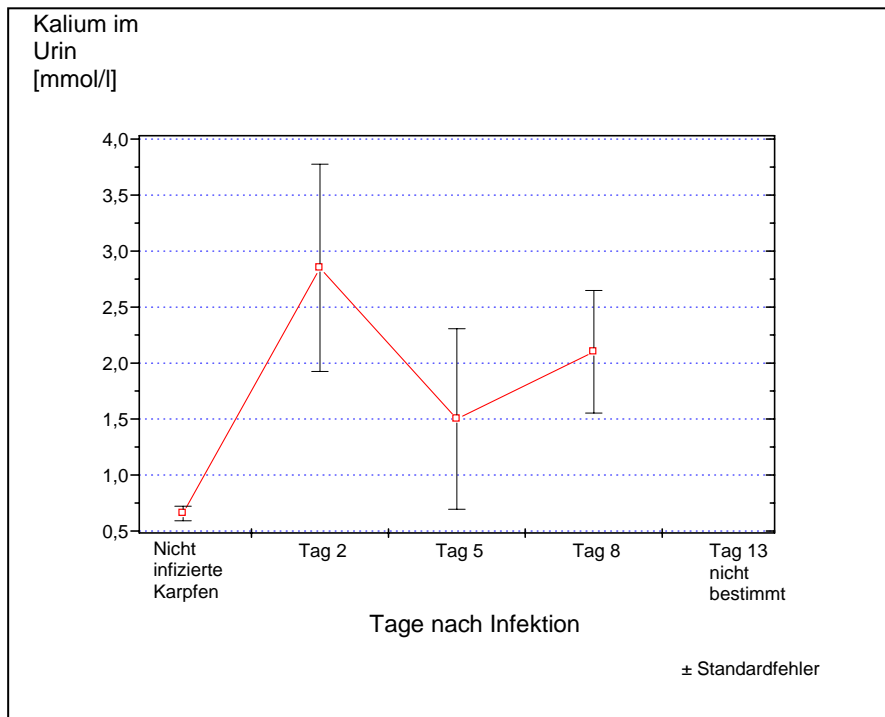


Abbildung 21: Kaliumkonzentration im Urin der KHV-infizierten Karpfen und nicht infizierten Karpfen

#### 4.8.4 Kalzium in Plasma und Urin

Die Kontrollfische wiesen im Plasma eine Kalziumkonzentration von  $2,00 \pm 0,33$  mmol/l mit hoher Streuung der Einzelwerte auf. Die Kalziumkonzentration im Urin lag bei  $0,93 \pm 0,59$  mmol/l. Auch hier war eine hohe Streuung der Einzelwerte zu beobachten. Trotzdem entsprach dies den physiologischen Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen (MEYER 2001). Unter KHV-Infektion wurde Kalzium im Plasma in einer Konzentration von  $1,81 \pm 0,35$  mmol/l und im Urin von  $0,76 \pm 0,59$  mmol/l. Dies zeigt eine leichte Abnahme der Kalziumkonzentration im Plasma und Urin, die jedoch nicht von den Messwerten bei nicht infizierten Karpfen signifikant verschieden waren (Abbildung 22 und Abbildung 23).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 dargestellt.

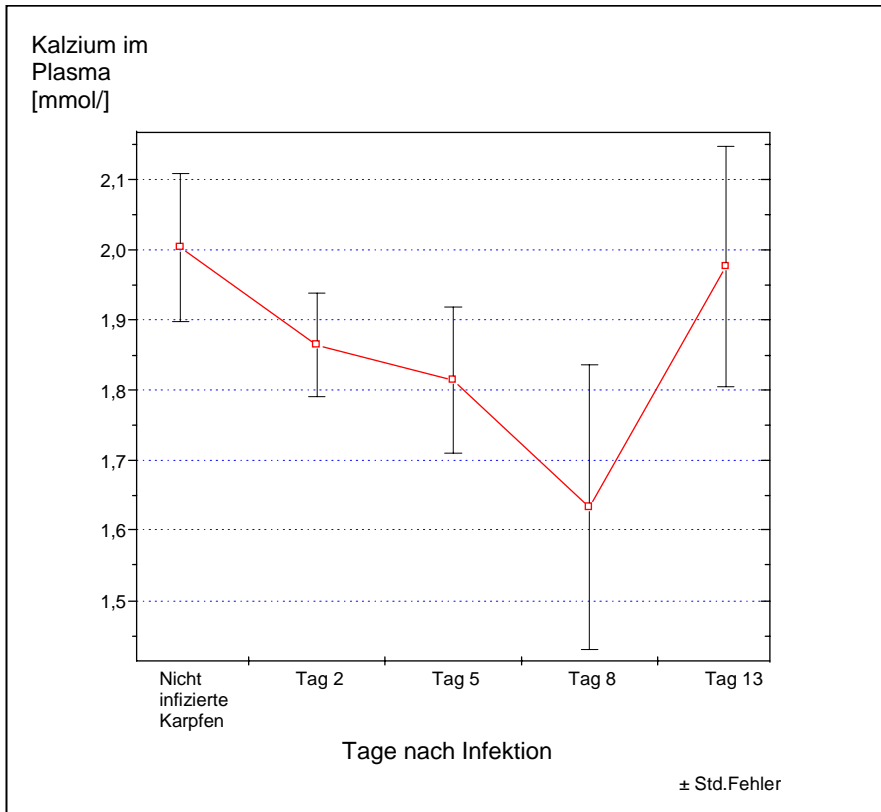


Abbildung 22: Kalziumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

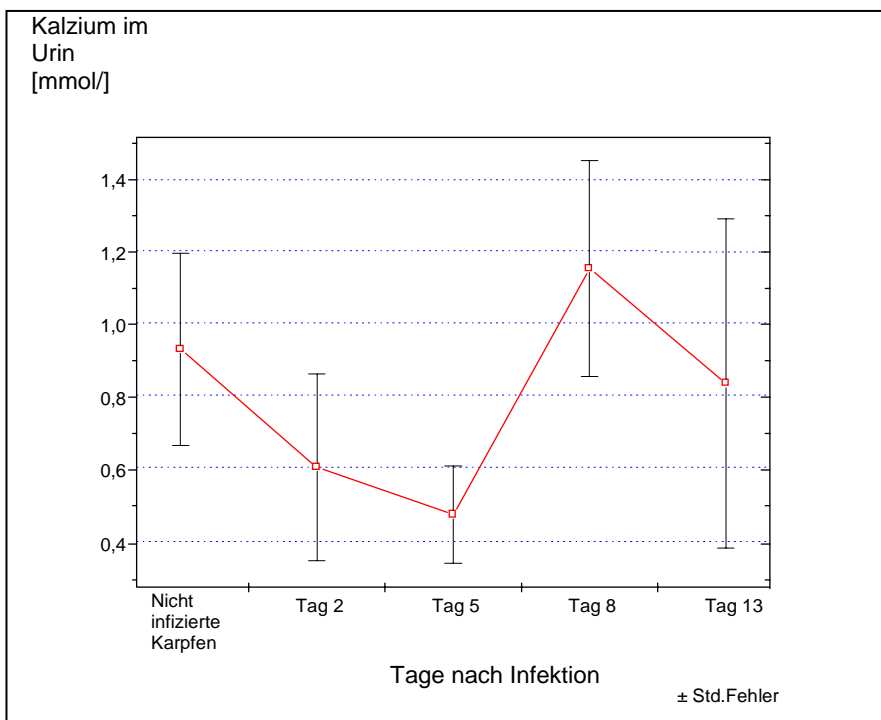


Abbildung 23: Kalziumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

#### 4.8.5 Phosphor in Plasma und Urin

Nicht infizierte Karpfen wiesen eine Phosphorkonzentration im Plasma von  $1,52 \pm 0,5$  mmol/l und im Urin von  $0,334 \pm 0,25$  mmol/l auf.

Unter KHV Infektion kam es zu einer leichten Zunahme des Phosphorspiegels im Plasma auf  $2,10 \pm 0,62$  mmol/l und zu einer deutlicheren Zunahme der Phosphorkonzentration im Urin auf  $2,50 \pm 2,60$  mmol/l. Zudem wurde eine große Streuung der Einzelwerte beobachtet. Die Veränderungen waren jedoch zu den nicht infizierten Kontrollkarpfen weder im Urin noch im Plasma signifikant (Abbildung 24, Abbildung 25).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 aufgezeigt.

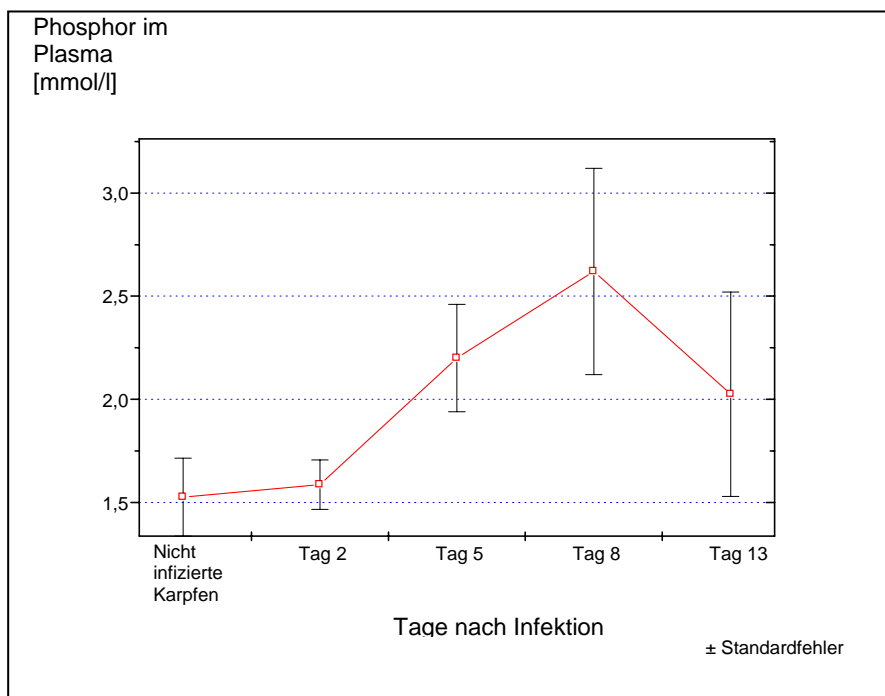


Abbildung 24: Phosphorkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

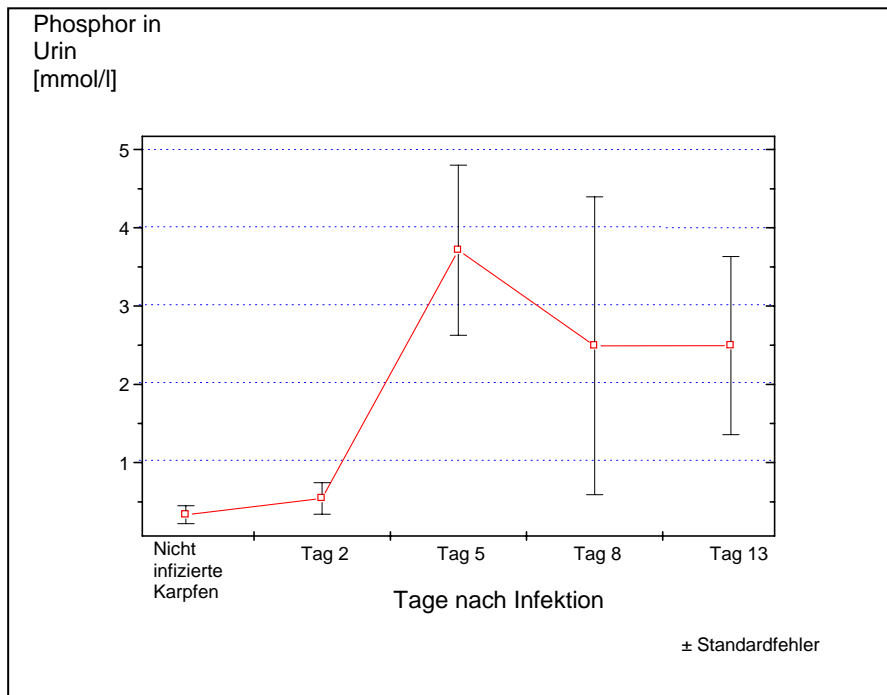


Abbildung 25: Phosphorkonzentration in Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

#### 4.8.6 Magnesium in Plasma und Urin

Nicht infizierte Karpfen wiesen eine Magnesiumkonzentration im Plasma von  $1,05 \pm 0,27$  mmol/l mit einer großen Streuung der Einzelwerte auf. Die Magnesiumkonzentration im Urin lag bei  $0,38 \pm 0,048$  mmol/l und war enger reguliert.

Unter KHV-Infektion kam es zu einer geringen Zunahme des Magnesiumspiegels im Plasma auf  $1,2 \pm 0,09$  mmol/l und im Urin auf  $0,44 \pm 0,48$  mmol/l. Diese Zunahme war statistisch nicht signifikant (Abbildung 26 und Abbildung 27).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 dargestellt.

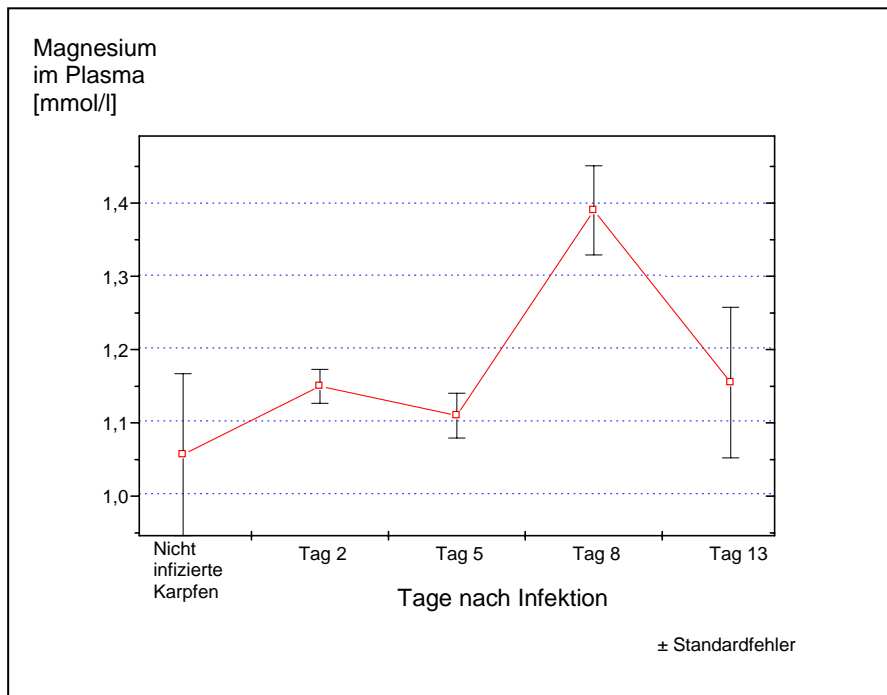


Abbildung 26: Magnesiumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

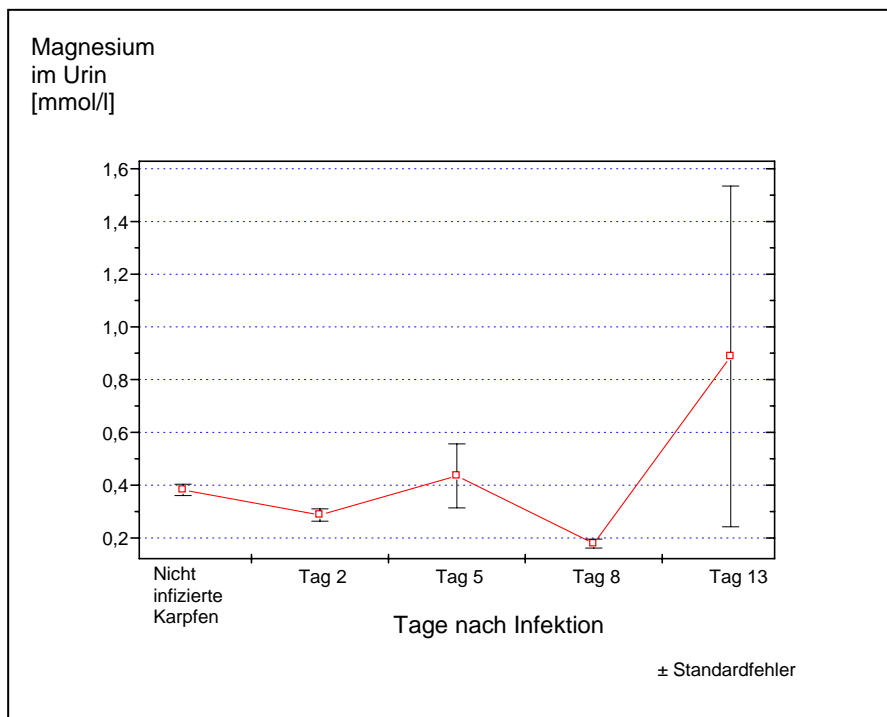


Abbildung 27: Magnesiumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

#### 4.8.7 Kreatinin in Plasma und Urin

Bei nicht infizierten Karpfen wurde eine konstante Kreatininkonzentration im Plasma von  $6,65 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$  gemessen und im Urin von  $9,31 \pm 3,19 \mu\text{mol/l}$ .

Bei KHV-infizierten Karpfen wurde ein Anstieg des Kreatininspiegels im Plasma auf  $23,17 \pm 30,2 \mu\text{mol/l}$  beobachtet. Meßwerte im Urin schwankten um  $9,0 \pm 6,1 \mu\text{mol/l}$ . Die Messwerte im **Plasma** waren mit  $54,5 \pm 84,68 \mu\text{mol/l}$ ,  $19,59 \pm 25,53 \mu\text{mol/l}$  und  $12,05 \pm 6,44 \mu\text{mol/l}$  in den Plasmaproben vom **5.**, **8.** und **13. Tag** nach der Infektion signifikant erhöht (Abbildung 28). Im **Urin** wurden **2, 5** und **8 Tage** nach der Infektion mit  $9,1 \pm 7,43 \mu\text{mol/l}$ ,  $5,3 \pm 2,7 \mu\text{mol/l}$  und  $7,49 \pm 3,93 \mu\text{mol/l}$  erniedrigte Spiegel gemessen. Diese Abnahme war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 29).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 aufgezeigt.

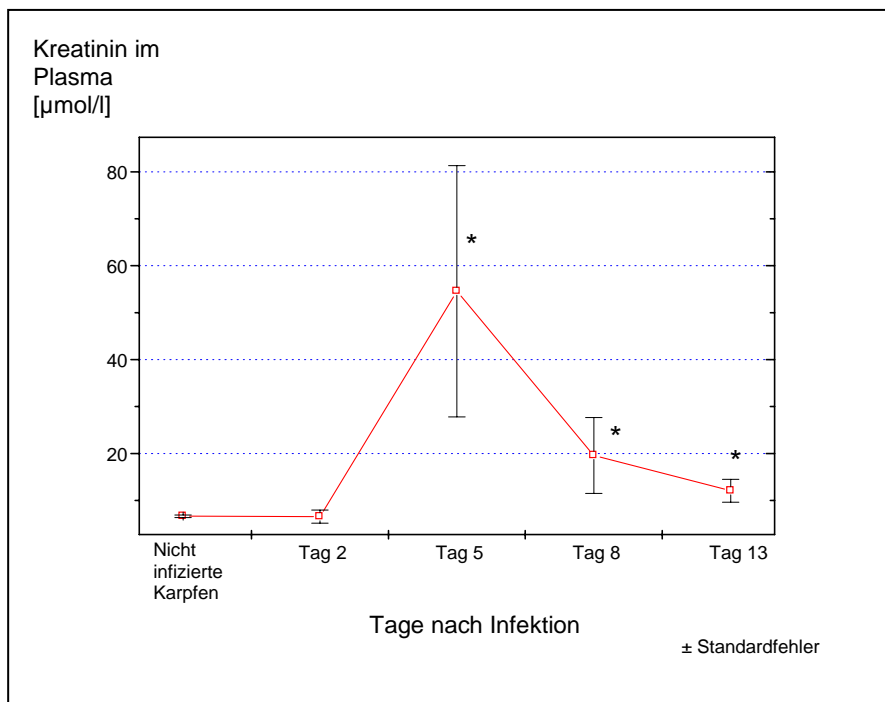


Abbildung 28: Kreatininkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikant erhöht im Vergleich zu nicht infizierten Karpfen

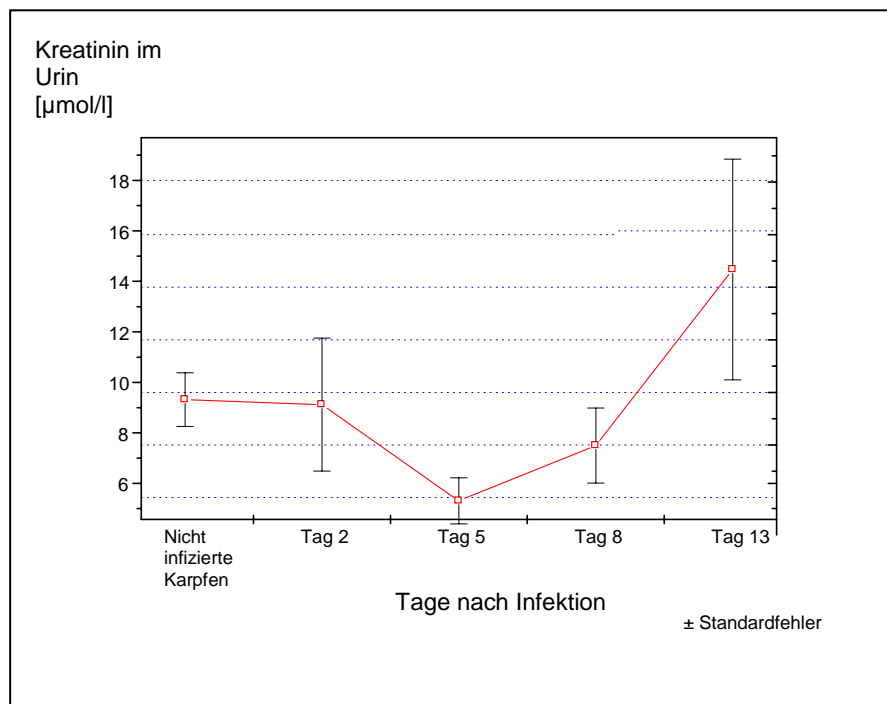


Abbildung 29: Kreatininkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

#### 4.8.8 Gesamtprotein im Plasma

Nicht infizierte Kontrollfische wiesen eine Gesamtproteinkonzentration im Plasma von  $32,87 \pm 3,63$  g/l auf. Bei KHV-infizierten Karpfen war eine leichte Abnahme der Gesamtproteinkonzentration auf  $29,4 \pm 4,6$  g/l zu verzeichnen. Es traten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Messwerten bei Kontrollfischen auf (Abbildung 30).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 und Tabelle 13 dargestellt.



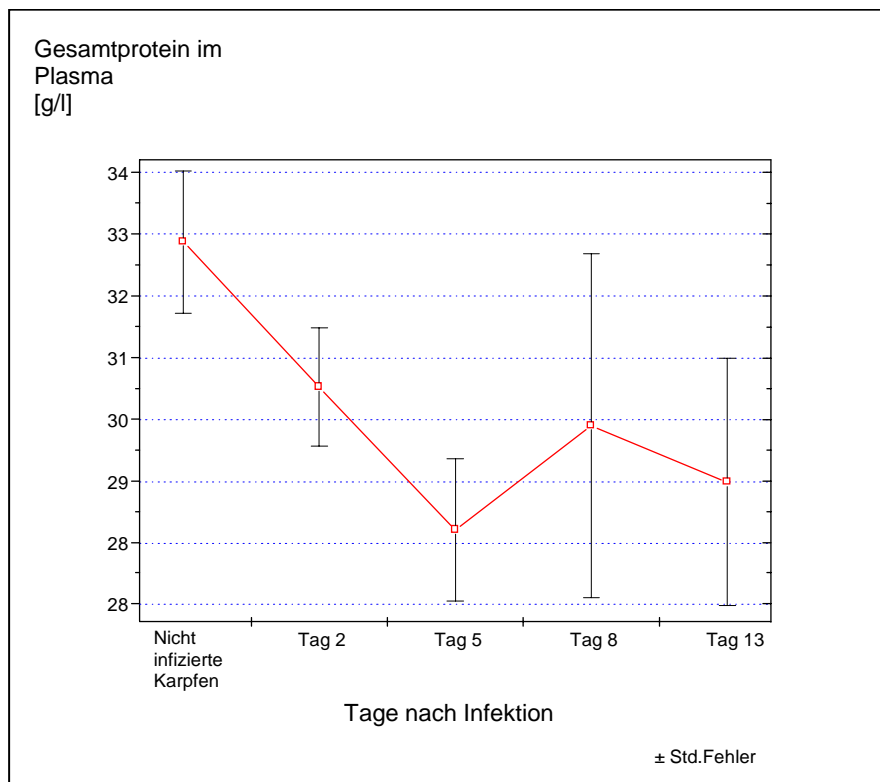


Abbildung 30: Gesamtprotein im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

#### 4.8.9 Alkalische Phosphatase in Plasma und Urin

Die Kontrollfische wiesen im Plasma eine konstante AP-Aktivität von  $46,9 \pm 21,08$  U/l und im Urin von  $4,7 \pm 2,2$  U/l auf.

Bei KHV-infizierten Karpfen wurden signifikant erhöhte AP-Aktivitäten im Plasma von  $121 \pm 63,69$  U/l und im Urin von  $51,6 \pm 71,4$  U/l gemessen. Bereits am **Tag 2** nach Infektion war die AP-Aktivität im Plasma mit  $128,7 \pm 37,5$  U/l im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollfischen signifikant erhöht, während im Urin nur eine leichte Steigerung auf  $5,33 \pm 1,86$  U/l zu messen war.

Am **Tag 5** nach der Infektion lag im Plasma ebenfalls eine signifikant erhöhte AP-Aktivität von  $130,9 \pm 45,49$  U/l vor, und auch im Urin war an diesem Tag die Aktivität mit  $93,86 \pm 118,35$  U/l im Vergleich zum Kontrollwert von nicht infizierten Karpfen signifikant erhöht. In den Plasma- und Urinproben vom **Tag 8** bzw. **13 p.i.** werden erhöhte AP-Aktivitäten gemessen, die hohen individuellen Variationen unterworfen waren. Signifikante Unterschiede zu infizierten Karpfen waren nur an **Tag 13 p.i.** im Urin erkennbar (Abbildung 31, Abbildung 32).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 bis Tabelle 14 aufgezeigt.

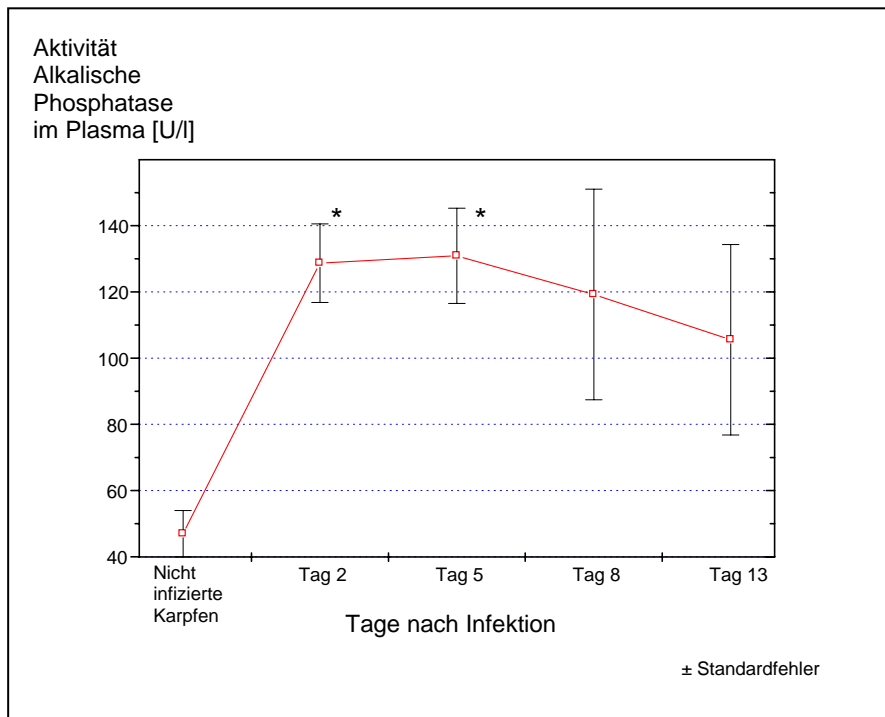


Abbildung 31: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

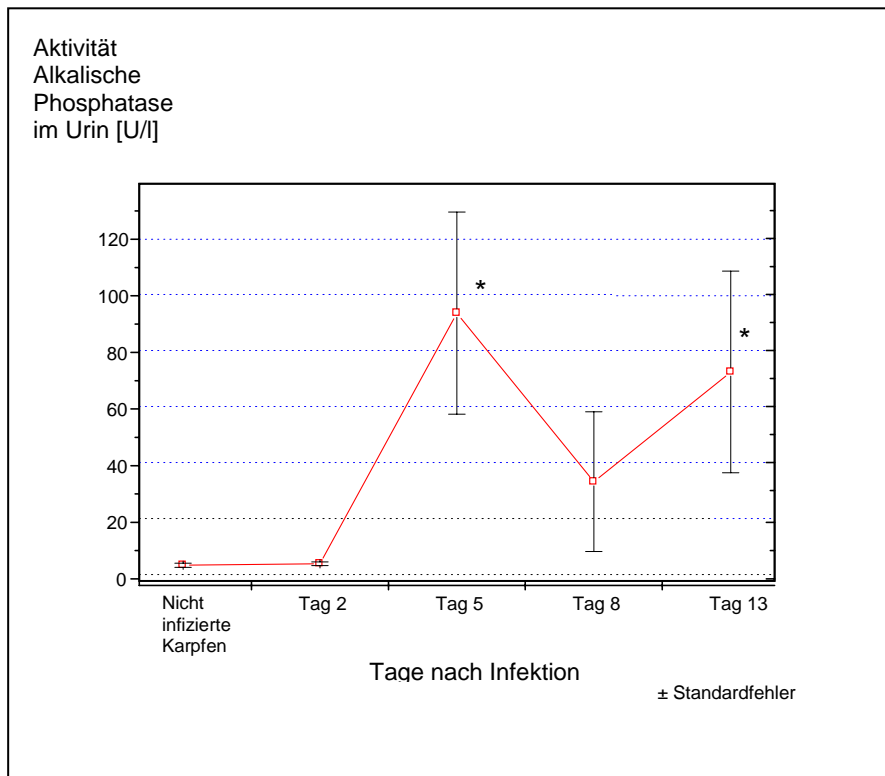


Abbildung 32: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

\*: signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen

#### 4.8.10 Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) im Urin

Bei nicht infizierten Kontrollkarpfen wurde eine konstante GGT-Aktivität im Urin von  $2,15 \pm 0,96$  U/l gemessen. Im Urin KHV-infizierter Karpfen wurde eine GGT-Aktivität von  $9,2 \pm 13,37$  U/l bestimmt. Dies zeigt eine leichte Erhöhung der GGT-Aktivität im Infektionsverlauf. Aufgrund der großen Streuung der Meßwerte waren keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollwerten erkennbar (Abbildung 33).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgezeigt.

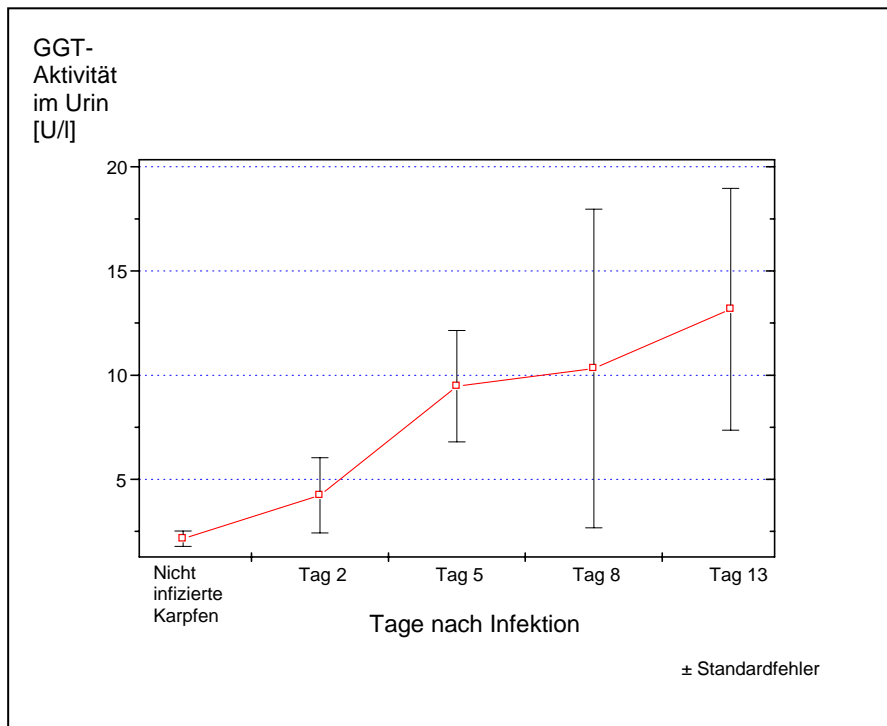


Abbildung 33: Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

Tabelle 11: Klinisch-chemische Parameter im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion

Parameter im Plasma	Nicht infizierte Karpfen		KHV-infizierte Karpfen				
	Vor PBS-Infektion gesamt	Nach PBS-Infektion gesamt	gesamt	Tag 2 <i>p.i.</i>	Tag 5 <i>p.i.</i>	Tag 8 <i>p.i.</i>	Tag 13 <i>p.i.</i>
Anzahl Karpfen (n)	12	12	48	12	12	12	12
Osmolarität: Ausgangswert 10 Tage vor Infektion	281 ± 3,9		304,5 ± 26,0	292 ± 11,0	293 ± 29,6	345 ± 35,1	288,3 ± 28,5
Osmolarität: nach Infektion [mOsm/kg]		289 ± 17,6	241,9 ± 33,7	251,2 ± 30,7	252 ± 30,4	246,5* ± 39,1	218* ± 34,9
Osmolarität: Differenz zum Ausgangswert [mOsm/kg]		-8 ± 21,5	62,65 ± 72,22	40,8 ± 28,7	41 ± 35,2	98,5* ± 116	70,3* ± 109
Natrium [mmol/l]	133,4 ± 3,26	132,4 ± 4,36	110,5 ± 18,9	119,6(*) ± ± 4,7	98,6*(*) ± ± 26,42	116,2 ± 14,9	107,8* ± ±13,3
Kalium [mmol/l]	0,41 ± 0,21	0,46 ± 0,11	2,1 ± 0,85	1,18(*) ± 0,66	3,07(*)* ± ± 1,78	1,21 ± 0,52	3,03* ± 0,46
Kalzium [mmol/l]	2,12 ± 0,43	2,00 ± 0,33	1,81 ± 0,35	1,86 ± 0,22	1,81 ± 0,31	1,6 ± 0,49	1,97 ± 0,38
Phosphor [mmol/l]	1,49 ± 0,6	1,52 ± 0,5	2,10 ± 0,62	1,58 ± 0,20	2,20 ± 0,45	2,62 ± 0,86	2,02 ± 0,99
Magnesium [mmol/l]	1,07 ± 0,21	1,05 ± 0,27	1,2 ± 0,09	1,15 ± 0,04	1,11 ± 0,05	1,39 ± 0,10	1,15 ± 0,20
Kreatinin [mmol/l]	6,11 ± 0,78	6,65 ± 0,90	23,17 ± 30,2	6,56 ± 4,16	54,5* ± 84,68	19,59* ± 25,53	12,05* ± 6,44
Gesamtprotein [g/l]	31,97 ± 3,51	32,87 ± 3,63	29,4 ± 4,6	30,52 ± 2,8	28,21 ± 3,6	29,9 ± 7,36	28,98 ± 4,9
Aktivität: Alkalische Phosphatase [U/l]	45,9 ± 22,77	46,9 ± 21,08	121,0 ± 63,69	128,7* ± 37,5	130,9* ± 45,49	119 ± 95,3	105,5 ± 76,04

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

\*: Signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen ( $p < 0,05$ )

(\*): Signifikante Unterschiede zum jeweiligen Probenstag ( $p < 0,05$ )

Tabelle 12: Klinisch-chemische Parameter im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion

Parameter im Urin	Nicht infizierte Karpfen	KHV-infizierte Karpfen				
		Nach PBS-Infektion gesamt	gesamt	Tag 2 p.i.	Tag 5 p.i.	Tag 8 p.i.
Anzahl Karpfen (n)	12	48	12	12	12	12
Urinmenge über 24 h/Karpfen (100g) [ml]	15,8 ± 2,3	8,52 ± 2,75	15,2 ± 2,1	10,6 ± 3,1	5,2 ± 3,7	3,1 ± 1,8
Urinfluss [ml/kg/h]	6,58 ± 0,95	3,4 ± 1,14	6,33 ± 0,87	4,41 ± 1,29	2,16 ± 1,54	1,29 ± 0,75
Osmolarität [mOsm/kg]	32 ± 13,1	132 ± 85,6	67,2 ± 55,8	158* ± 76,5	154* ± 117	151* ± 93,1
Natrium [mmol/l]	3,9 ± 2,42	52,7 ± 42,28	11,5 ± 20,52	82,08* ± 48,51	71,16* ± 69,43	46,25* ± 30,67
Kalium [mmol/l]	0,65 ± 0,21	2,15 ± 2,20	2,85(*) ± 2,92	1,5(*) ± 1,97	2,1 ± 1,72	n. b.
Kalzium [mmol/l]	0,93 ± 0,59	0,76 ± 0,59	0,60 ± 0,44	0,47 ± 0,35	1,15 ± 0,59	0,83 ± 1,01
Phosphor [mmol/l]	0,334 ± 0,25	2,50 ± 2,60	0,54 ± 0,34	3,71 ± 2,42	2,49 ± 3,80	2,49 ± 2,27
Magnesium [mmol/l]	0,38 ± 0,048	0,44 ± 0,48	0,28 ± 0,04	0,43 ± 0,29	0,178 ± 0,037	0,88 ± 1,58
Kreatinin [µmol/l]	9,31 ± 3,19	9,0 ± 6,1	9,11 ± 7,43	5,3(*) ± 2,7	7,49 ± 3,93	14,47(*) ± 10,7
Aktivität: Alkalische Phosphatase [U/l]	4,7 ± 2,2	51,6 ± 71,4	5,33 ± 1,86	93,86* ± 118,35	34,31 ± 78,18	73,11* ± 87,22
Aktivität: GGT [U/l]	2,15 ± 0,96	9,2 ± 13,37	4,22 ± 4,77	9,4 ± 9,2	10,32 ± 24,18	13,16 ± 15,34

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

\*: Signifikante Unterschiede zu nicht infizierten Karpfen ( $p < 0,05$ )

(\*): Signifikante Unterschiede zum jeweiligen Probestag ( $p < 0,05$ )

n. b.: nicht bestimmt aufgrund zu geringer Menge Probenmaterials

*Tabelle 13: Klinisch-chemische Parameter im Plasma von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus*

*Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen*

<b>Parameter im Plasma</b>	<b>Nicht infizierte Karpfen</b>	<b>KHV-infizierte Karpfen</b>
Osmolarität	n. s.	K/ Tag 0 > Tag 8, 13
Osmolarität: Differenz zum Ausgangswert 10 Tage vor Infektion	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 8, 13
Natrium	n. s.	K/ Tag 0 > Tag 5, 13 Tag 2 > Tag 5
Kalium	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 5, 13 Tag 2 < Tag 5
Kalzium	n. s.	n. s.
Phosphor	n. s.	n. s.
Magnesium	n. s.	n. s.
Kreatinin	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 5, 8, 13
Gesamtprotein	n. s.	n. s.
Aktivität: Alkalische Phosphatase	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 2, 5

n.s.: nicht signifikant

>/ <: signifikant erhöht/ erniedrigt

K: Gesamtergebnis nicht infizierter Kontrollkarpfen

Tag 0: Ausgangswert zehn Tage vor der Infektion

Tag 2/ 5/ 8/ 13: Probenahme nach der KHV-Infektion

*Tabelle 14: Klinisch-chemische Parameter im Urin von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus*

*Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen*

<b>Parameter im Urin</b>	<b>Nicht infizierte Karpfen</b>	<b>KHV-infizierte Karpfen</b>
Osmolarität	n. s.	K/ Tag 0, 2 < Tag 5, 8, 13
Natrium	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 5, 8, 13
Kalium	n. s.	Tag 2 > Tag 5
Kalzium	n. s.	n. s.
Phosphor	n. s.	n. s.
Magnesium	n. s.	n. s.
Kreatinin	n. s.	Tag 5 < Tag 13
Gesamtprotein	-	-
Aktivität: Alkalische Phosphatase	n. s.	K/ Tag 0 < Tag 5, 13
Aktivität: GGT	n. s.	n. s.

n.s.: nicht signifikant

>/ <: signifikant erhöht/ erniedrigt

K: Gesamtergebnis nicht infizierter Kontrollkarpfen

Tag 0: Ausgangswert zehn Tage vor der Infektion

Tag 2/ 5/ 8/ 13: Probenahme nach der Infektion

#### **4.8.11 Urin-Plasma-Verhältnisse der Elektrolyte**

Um Hinweise über Veränderungen in der Elektrolytausscheidung der Niere im Vergleich zu den im Plasma gemessenen Werten zu erhalten, wurden die Messwerte von Urin und Plasma an den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in Beziehung gesetzt und in folgender Tabelle dargestellt.



Tabelle 15: *Urin/Plasma-Quotient (U/P Ratio) von Osmolarität und Elektrolyten bei Karpfen unter KHV-Infektion*

Parameter	Nicht infizierte Karpfen	KHV-infizierte Karpfen				
		gesamt	Tag 2 <i>p.i.</i>	Tag 5 <i>p.i.</i>	Tag 8 <i>p.i.</i>	Tag 13 <i>p.i.</i>
	Nach PBS-Infektion gesamt					
Anzahl Karpfen (n)	12	48	12	12	12	12
Osmolarität	0,110	0,547	0,267	0,626	0,624	0,692
Natrium	0,029	0,476	0,476	0,832	0,612	0,429
Kalium	6,52	1,02	2,41	0,48	1,73	n.b.
Kalzium	0,465	0,419	0,332	0,259	0,718	0,421
Phosphor	0,219	1,19	0,341	1,686	0,950	1,23
Magnesium	0,361	0,366	0,243	0,387	0,128	0,765

n. b.: nicht bestimmt aufgrund zu geringer Menge Probenmaterials

#### 4.8.12 Wasserprobe

Zusätzlich wurde sowohl aus den Versuchsbecken der nicht infizierten Kontrollkarpfen als auch der KHV-infizierten Karpfen Wasserproben entnommen, um Vergleichsmöglichkeiten mit den Urinergebnissen zu erhalten.

Tabelle 16: *ausgewählte Wasserparameter in den Versuchsbecken während der Urinblasenkatheterisierung*

Hälterungswasser	Osmolarität [mOsmol/kg]	Kalzium [mmol/l]	Magnesium [mmol/l]	Natrium [mmol/l]
Nicht infizierte Karpfen	11,6-12,1	2,04-2,38	0,23-0,34	<b>0,70-0,94</b>
KHV-infizierte Karpfen	11,5-12,0	2,02-2,36	0,23-0,35	<b>0,71-0,94</b>

Angaben als Minima und Maxima der Meßwerte der Wasserparameter in den Versuchsbecken von Kontrollkarpfen und KHV-infizierten Karpfen

Hierbei konnte Natrium als eindeutiger Kontrollfaktor, ob es sich um Urin oder aufgefangenes Hälterungswasser handelt, genutzt werden. Im Hälterungswasser lag eine Natriumkonzentration von 0,7 - 0,94 mmol/l vor, während sie im Urin bei den nicht infizierten Kontrollkarpfen bei  $3,9 \pm 2,42$  mmol/l und bei KHV-infizierten Karpfen im Mittel im Urin bei  $52,7 \pm 42,28$  mmol/l lag. Trotz der großen Standardabweichung lagen die Werte außerhalb der Werte des Hälterungswassers.

---

## 5 DISKUSSION

---

KHV stellt heutzutage ein großes Problem für Aufzucht und Handel sowohl mit Speise- als auch Koi-Karpfen dar. Die Erkrankung geht mit hoher Morbidität und Mortalität einher. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachten. Nach Applikation des Virus traten Krankheitssymptome wie Kiemenschäden bis hin zu Nekrosen, „sandpapierartige Haut“, unkoordiniertes Umherschwimmen und Apathie auf. Diese Symptome und Verhaltensänderungen glichen denen aus vorangegangenen Studien (BRETZINGER et al. 1999, GILAD et al. 2004, PIKARSKY et al. 2004, MEYER 2007). Auch die histologischen Befunde dieser Arbeit unterstützen die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten (HEDRICK et al. 2000, PIKARSKY et al. 2004). Bereits am ersten Tag nach der Infektion wiesen Gilad und Mitarbeiter (2004) das Virus in allen Karpfengewebe nach. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das Virus sehr früh, bereits am Tag 2 nach der Infektion, in den Geweben infizierter Karpfen, sowie im Urin gefunden werden. Dieses unterstreicht die rasche Virusausbreitung im Karpfen nach der Infektion. Aufgrund des frühen Ausscheidens des Virus im Urin besteht demnach ein frühes Verbreitungsrisiko noch bevor Krankheitssymptome sichtbar werden.

Das in der vorliegenden Studie verwendete Infektionsmodell, bei dem in der Zellkultur vermehrtes Virus Karpfen in den Darm verabreicht wurde, führte in unterschiedlichen Versuchsdurchgängen zu einem weitgehend synchronisierten Krankheitsverlauf. Somit erwies es sich zur Untersuchung der patho-physiologischen Auswirkung der Erkrankung auf infizierte Karpfen als gut geeignet.

Ab etwa dem 13. Tag *p.i.* trat bei den experimentell infizierten Karpfen die Endphase der Erkrankung ein, in der es zwischen dem 14. und 18. Tag *p.i.* zu Todesfällen kam. Eine Blutentnahme, sowie das Anbringen eines Katheters zum Sammeln von Urin, war nach dem 13. Tag *p.i.*, aufgrund der Krankheitssymptome und der Empfindlichkeit von Karpfen gegenüber einer Narkose, nicht mehr durchführbar.

Die KHV-Erkrankung ging mit Veränderungen im Blutbild und Elektrolythaushalt einher.

Die hämatologischen Untersuchungen zeigten, dass eine KHV-Erkrankung bei Karpfen zu einer hypoplastischen Anämie führte. Die Anämie war normozytär, normochrom und

aregenerativ. Dies zeigten eine erniedrigte Erythrozytengesamtzahl, sinkende Hämatokrit- und Hämoglobinwerte sowie das Fehlen von Retikulozyten in den Blutaussstrichen.

Weiterhin wurde eine Leukozytose diagnostiziert. Diese kam aufgrund einer Monozytose und Granulozytose mit Linksverschiebung zustande. Die Linksverschiebung deutet auf junge, sich neubildende Granulozyten hin. Gleichzeitig wurde eine Lympho- und Thrombozytopenie beobachtet. Diese Veränderungen im Blutbild KHV-infizierter Karpfen ähneln einem akuten Entzündungsgeschehen bei Säugetieren. Hierbei reagieren Abwehrmechanismen des angeborenen, Antigen-unspezifischen Granulozytensystems schneller, als Antigen-spezifische Komponenten des Immunsystems, so dass häufig ein charakteristischer Ablauf von Blutspiegelveränderungen der Leukozytenklassen resultiert (BICKARDT, 1992). Es kommt im Blut zunächst zu einer Leukopenie mit relativ hohem Anteil an unreifen Granulozytenformen. In späteren Stadien zeigt sich eine Leukozytose mit Linksverschiebung, und im weiteren Verlauf wird die gesteigerte Granulozytenproduktion von einer gesteigerten Monozytenproduktion abgelöst. In Übereinstimmung mit der raschen Ausbreitung des Virus im Karpfen nach der Infektion (siehe GILAD et al. 2004, eigene Untersuchungen) manifestierten sich Anämie und Leukozytose bereits am 2. Tag nach der Infektion. Dies war über den gesamten Untersuchungszeitraum zu beobachten. Eine pathologische Veränderung in der Morphologie der Blutzellen war über den gesamten Infektionzeitraum nicht erkennbar.

In Studien von Hedrick und Mitarbeitern (2000) und Pikarsky und Mitarbeitern (2004) wurde bei an der Koi-Herpesvirose erkrankten Karpfen in der Niere eine massive Proliferation des hämatopoetischen, interstitiellen Gewebes, einhergehend mit Tubulusdegenerationen und – atrophien, in histologischen Schnitten beobachtet. Die Niere übernimmt bei Knochenfischen Aufgaben der Lymphopoese und wird von einigen Autoren (Übersicht bei ROWLEY und RATCLIFFE 1988, ZAPATA und COOPER 1990, ZAPATA und AMEMIYA 2000) als Knochenmark-Äquivalent angesehen. Eine starke Aktivierung des interstitiellen, hämatopoetischen Gewebes wurde auch im Zusammenhang mit anderen Infektionserkrankungen bei Fischen, wie bei Regenbogenforellen mit "Parasitic Kidney Disease" (CHILMONCZYK 2002), oder bei der Infektion von Karpfen mit dem Blutparasiten *Trypanoplasma (T.) borreli* (MEYER 2001) festgestellt. Bei diesen Erkrankungen entwickelten sich ebenfalls eine interstitielle Nephritis und eine Leukozytose. Ein ähnliches Bild liefert die Bakterielle Nierenerkrankung (Bacterial Kidney Disease, BKD) der Salmoniden. Sie führt bei Salmoniden ebenfalls zu einer Anämie und im hinteren

Nierenbereich zu Granulomen. Verantwortlich hierfür ist das *Renibacterium salmoninarum*. Auch die Infektiöse Lachsanämie (Infectious Salmon Anaemia, ISA) gleicht in Teilen dem Krankheitsgeschehen KHV-infizierter Karpfen. Hierbei leiden infizierte Lachse und Forellen an Lethargie, senkrechtem Stehen im Wasser und kurzfristiger Blutarmut. Auch das Nierengewebe ist betroffen. Es sind Nekrosen in den harnableitenden Tubuli der Niere zu beobachten (BAUR und RAPP 2003).

Neben der Hämatopoese erfüllt die Niere bei Knochenfischen wichtige Aufgaben bei der Regulation des Elektrolythaushalts (EVANS 1993). Der Urin nicht infizierter Karpfen enthielt nur noch 11% der Osmolarität des Plasmas. Dieser physiologisch stark hypotone Urin ermöglicht Süßwasserfischen, Salzverluste in ihrem hypotonen Lebensraum zu minimieren. Die durch eine Infektion mit dem Blutparasiten *T. borreli* hervorgerufene interstitielle Nephritis hatte deutliche Auswirkungen auf die Urinzusammensetzung, und somit auf den Elektrolythaushalt infizierter Karpfen (MEYER 2001). Auch bei den KHV-infizierten Karpfen aus der vorliegenden Studie hatte die interstitielle Nephritis zur Folge, dass der Anteil der osmotisch wirksamen Substanzen im Urin von 11% auf 55% der im Plasma enthaltenen Substanzen anstieg. Den infizierten Karpfen gingen während der KHV-Erkrankung sehr viel mehr osmotisch wirksame Substanzen über die Niere verloren, als den nicht infizierten Kontrollkarpfen. Dieser Elektrolytverlust war deutlich höher, als bei Karpfen unter *T. borreli*-Infektion. Hier stieg der Anteil osmotisch wirksamer Substanzen im Urin von 10% auf 25% der im Plasma enthaltenen Substanzen an (MEYER 2001).

Den Hauptteil der osmotisch wirksamen Substanzen im Plasma und Urin macht Natrium aus (BONE und MARSHALL 1985, EVANS 1993). Untersuchungen von Kakuta und Mitarbeitern (1986) zeigten, dass im Karpfenurin die Natriumkonzentration und Urinosmolarität signifikant korrelierten (KAKUTA et al. 1986). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Natrium die größten Verluste zu verzeichnen hatte. Die Exkretion von Natrium über die Niere stieg durch die Nephritis sehr stark an, wobei KHV-infizierte Karpfen im Mittel bis zu 48% des Natriums im Plasma über den Urin verloren; nicht infizierte Kontrollkarpfen verloren nur etwa 3%. Eine Korrelation zur Gesamtosmolarität im Urin war deutlich zu erkennen. Auch bei *T. borreli*-infizierten Karpfen ergab sich ein ähnliches Bild. Die Exkretion von Natrium über die Niere stieg durch die Nephritis im Maximum um mehr als das Sechsfache an (MEYER 2001). In nierenpathologischen Untersuchungen ließen sich bei *T. borreli*-infizierten Karpfen ab Tag 7 *p.i.* elektronenmikroskopisch

Mitochondrienschäden und Degenerationen der Epithelzellen des distalen Tubulus erkennen (RUDAT et al. 2000). Diese behinderten vermutlich die hier stattfindende energieintensive Natriumreabsorption stark und führten so zu gesteigerter Natriumausscheidung über den Urin (RUDAT et al. 2000). Vergleichbare Mechanismen können bei mit KHV infizierten Karpfen ebenfalls vermutet werden. Bei der KHV-Erkrankung zeigt sich ab Tag 5 *p.i.* eine signifikante Erhöhung der Natriumkonzentration im Urin. Es wird aufgrund der Untersuchungen von Rudat (2000) darauf geschlossen, dass es bei der KHV-Erkrankung ab Tag 5 *p.i.* zu Mitochondrienschäden im distalen Tubulus kommt. Die in dieser Arbeit beobachteten Degenerationen der Tubuli im histologischen Schnitt unterstützen diese Schlussfolgerung.

Interessant ist, dass der distale Tubulus bei allen im Süßwasser lebenden Fischen vorhanden ist, allerdings bei fast allen stenohyalinen Salzwasserfischen fehlt (ELGER et al. 2000). Der distale Tubulus ist für Wasser undurchlässig, und da hier gleichzeitig die Reabsorption von Natrium und Chlorid stattfindet, resultiert aus diesem Abschnitt ein stark verdünnter Urin. Hickmann und Trump (1969) schlossen daraus, dass der distale Tubulus und die Sammelrohre für die Urinverdünnung notwendig sind. Bei der Annahme, dass der distale Tubulus durch die KHV-Erkrankung in seiner Funktion beeinträchtigt und geschädigt wird, und somit eine vermehrte Natriumausscheidung resultiert, liegt die Vermutung nahe, dass auch Wasser ungehindert dem osmotischen Gradienten folgend zurück ins hypertone Plasma gelangt. Die Karpfen wären somit nicht in der Lage, aufgenommenes Wasser über den Urin auszuscheiden. Dies könnte neben dem gesteigerten Natriumverlust ein Grund für die mit fortschreitender Erkrankung signifikant erniedrigte Osmolarität und den signifikant erniedrigten Natriumspiegel im Plasma, sowie die Ödematisierung der Karpfenhaut sein. Die Veränderungen im Elektrolythaushalt korrelierten mit dem Grad der Zerstörung in der Niere, wie es bereits bei mit *T. borreli* infizierten Karpfen beschrieben wurde (MEYER 2001).

Bei beginnender Niereninsuffizienz ist bei Säugetieren häufig eine Polyurie zu beobachten (DAVID et al. 1995), die bei progressivem Verlauf, d.h. bei hochgradiger Niereninsuffizienz, in eine Oligo- bzw. Anurie überwechselt. Da Fische eine physiologische Polyurie aufweisen, ist eine beginnende Niereninsuffizienz anhand des Urinflusses nur schwer zu erkennen. Hingegen ist eine Oligo- bzw. Anurie bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz bei Fischen leicht zu erfassen und bedeutsam. Der zunehmend verminderte Urinfluss im Verlauf der KHV-Erkrankung in dieser Studie passt zu diesem Bild. Die ab Tag 5 *p.i.* beobachtete Oligurie kann auf eine Niereninsuffizienz hindeuten. Dagegen sprechen jedoch die weiterhin

untersuchten Elektrolytwerte wie Kalzium, Phosphor und Magnesium. Die Spiegel dieser Elektrolyte zeigten bei den KHV-infizierten Karpfen keine signifikanten Unterschiede zu den bei nicht infizierten Karpfen der Kontrollgruppe gemessenen Werte und den zehn Tage vor der Infektion ermittelten Ausgangswerte. Zweiwertige Ionen wie Kalzium und Magnesium werden im proximalen Tubulus gegen den Konzentrationsgradienten aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert, so dass ihre Konzentration im Urin sehr gering ist (EVANS 1993, ELGER et al. 2000). Auch Phosphor wird im Segment II des proximalen Tubulus reabsorbiert. Es kann aufgrund der nicht signifikant veränderten Spiegel dieser Elektrolyte vermutet werden, dass der proximale Tubulus bei einer KHV-Erkrankung noch intakt ist, welches gegen eine hochgradige Niereninsuffizienz spricht.

Magnesium- und Phosphorspiegel zeigten als einziger Parameter am Tag 13 *p.i.* eine Zunahme im Urin, die aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht als signifikant bezeichnet werden konnte. Es ist jedoch anzumerken, dass der Magnesiumhaushalt eng reguliert ist (HICKMAN and TRUMP 1969). Die erhöhten Magnesiumwerte könnten deshalb ein erstes Anzeichen dafür sein, dass auch ein Zerstörungsprozess am proximalen Tubulus beginnt. Erhöhte Magnesiumwerte wurden auch in vorangegangenen Untersuchungen bei *T. borreli*-Infektionen ab Tag 14 *p.i.* beobachtet, die zeitlich im Zusammenhang mit Schädigungen des proximalen Tubulusepithels standen (RUDAT et al. 2000, MEYER et al. 2002). Da in beiden Studien bei infizierten Karpfen eine Anämie festgestellt wurde, könnte Magnesium aus lysierten Erythrozyten freigesetzt worden sein, was schließlich zum Anstieg der Magnesiumkonzentration im Urin führte (KRAFT 1989). Dagegen spricht jedoch die hohe Standardabweichung der Magnesiumspiegel im Urin. Einige Karpfen zeigten physiologische Magnesiumkonzentrationen im Urin und litten trotzdem an einer Anämie.

Desweiteren wurde auch bei einer Hypoxie ein Anstieg der Magnesiumkonzentration im Karpfenplasma und nachfolgend eine erhöhte renale Ausscheidung dieses Ions beschrieben (KAKUTA et al. 1992). Im Zusammenhang mit den Kiemenepithelveränderungen und -nekrosen, die im Verlauf einer KHV-Erkrankung auftreten (PERELBERG et al. 2003, vorliegende Studie), ist eine Hypoxie bei infizierten Karpfen sehr wahrscheinlich. Die Hypoxie könnte somit ebenfalls zur erhöhten Magnesiumausscheidung beitragen.

Für Süßwasserfische wird als Kompensation der Elektrolytverluste, die über Niere und Kieme erfolgen, eine Aufnahme von Elektrolyten durch die Kiemen diskutiert (Übersicht bei

EVANS 1993). Bei Karpfen mit KHV-Infektion sind die Kiemen ebenfalls mit Nekrosen im Krankheitsgeschehen involviert, so dass vermutet werden kann, dass es für die an der Koi-Herpesvirose erkrankten Karpfen schwierig ist, Elektrolytverluste über die Kiemen zu kompensieren. Das schlechte Allgemeinbefinden der Karpfen unterstützt diese Hypothese.

Die im Urin der KHV-infizierten Karpfen aufgetretenen starken, renalen Verluste von osmotisch aktiven Substanzen, insbesondere von Natrium, führten dazu, dass diese Substanzen im Plasma der Fische fehlten, so dass eine Hyposmolarität und eine Hyponatriämie entstand.

Ab Tag 8 *p.i.* manifestierte sich eine signifikante Erniedrigung der Osmolarität im Plasma; und auch die Natriumkonzentration verringerte sich an Tag 5 *p.i.* und Tag 13 *p.i.* signifikant. Auffällig war hierbei, dass sich die Natriumkonzentration bereits an Tag 5 *p.i.* veränderte, die Gesamt-Osmolarität hingegen erst ab Tag 8 *p.i.*.

Im Fall der Hyponatriämie im Plasma könnte ebenfalls ein Zusammenhang mit der interstitiellen Nephritis bestehen, so dass sich die Schädigung distaler Tubuli in der Niere auch in den Natriumwerten im Plasma widerspiegelt. Inwieweit dieses zur Entgleisung des Ionenhaushaltes und zum Tod der Karpfen beiträgt, wird im Folgenden diskutiert. Interessant hierbei ist, dass bereits an Tag 2 *p.i.* die Natriumkonzentration im Plasma abnimmt und im Urin steigt, die Karpfen jedoch in ihrem Allgemeinbefinden noch nicht beeinträchtigt sind. Dies weist auf eine Regulierungsfähigkeit des Natriumhaushaltes hin. Fische können zur Kompensation von Salzverlusten, zusätzlich zur Retention in der Niere, auch Salze über Kiemen und Intestinaltrakt aufnehmen (EVANS 1993). Es kann somit vermutet werden, dass diese beiden Möglichkeiten, die durch Tubulidefekte verursachte herabgesetzte renale Osmoregulation der Fische, insbesondere ab Tag 5 *p.i.*, kompensieren können, und es nur zu einer leichten Abnahme der Natriumspiegels im Blut kommt. Bei Karpfen unter Infektion mit dem Blutparasiten *T. borreli* konnte ebenfalls ein deutlich ansteigender Natriumverlust über den Urin, jedoch weitgehend stabile Natriumspiegel im Plasma gemessen werden (MEYER et al. 2002). Bei den KHV-infizierten Karpfen der vorliegenden Studie kann jedoch vermutet werden, dass im Laufe der Erkrankung die Salzaufnahme durch die Kiemenschädigungen beeinträchtigt wird.

Bei Säugetieren sind die Nieren in der Lage, einen Verlust von *ca.* 50% der Nephrone ohne starke Einbußen in ihrer exkretorischen Funktion auszugleichen (DAVID et al. 1995). Vorangegangene Untersuchungen und die Versuche in dieser Studie lassen vermuten, dass



Fische ähnlich flexibel reagieren können, und so die osmoregulatorische Funktion der Niere über einen langen Zeitraum von den restlichen pathologisch nicht veränderten Nephronen aufrechterhalten wurde. Bei Fischen spielt der wechselnde Einsatz von Nephronen unter wechselnden Umweltbedingungen, wie die Wanderung von Süßwasser ins Meer bei euryhyalinen Arten, eine große Rolle. Messungen der GFR in einzelnen Forellennephronen zeigten, dass im Süßwasser 45% aller Nephronen filtern, im Meerwasser hingegen nur 5% (BONE und MARSHALL 1985). Diese Untersuchungen unterstreichen die enorme Flexibilität und Anpassungsfähigkeit von Fischnieren sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Sinne.

Unter KHV-Infektion scheint ab Tag 8 *p.i.* und schließlich ab Tag 13 *p.i.* die Regulation von Natrium zu entgleisen.

Auch Untersuchungen von Barham und Mitarbeitern (1980) zufolge litten Regenbogenforellen, deren Nieren durch Bakterien (*Aeromonas* spp. und *Streptococcus* spp.) angegriffen waren, an Hyponatriämie. Hierbei wurde ein Funktionsverlust der Niere diskutiert (BARHAM et al. 1980). Die weiter unten beschriebenen übrigen Elektrolytwerte sprechen bei Karpfen unter KHV-Infektion gegen eine **vollständige** Entgleisung des gesamten Elektrolythaushaltes.

Im Laufe der KHV-Infektion trat eine hypoplastische Anämie auf, die normozytär, normochrom und aregenerativ war, was eine Hämolyse vermuten läßt. Die starke Hämolyse kann für den Anstieg des Kaliumgehalts im Plasma ausschlaggebend sein, da Erythrozyten einen hohen Gehalt an Kalium aufweisen (MCDONALD und MILLIGAN 1992). Veränderungen in der Kiemenpermeabilität haben hingegen nur geringe Auswirkungen auf den Kaliumgehalt, da weniger als 2% des Gesamtkörperanteils an Kalium extrazellulär ist, und jeder Ein- oder Ausstrom durch Transfer von Kalium in oder aus dem intrazellulären Kompartiment aufgefangen wird (MCDONALD und MILLIGAN 1992). Auch die Freisetzung von Kalium aus Muskelzellen kann zu einem erhöhten Kaliumwert im Plasma führen (MCDONALD und MILLIGAN 1992). Auch bei *T. borreli*-infizierten Karpfen kam es zu einer starken Anämie und ab Tag 21 *p.i.* zu einer starken Hyperkaliämie (MEYER 2001), so dass hier vergleichbare Mechanismen vermutet werden können.

Die Spiegel der weiteren, untersuchten Elektrolyte wie Kalzium, Magnesium und Phosphor zeigten sowohl im Urin als auch im Plasma keine signifikanten Unterschiede zwischen KHV-infizierten und nicht infizierten Karpfen.

Selbst bei starkem Stress und unter Hypoxie stieg die Plasmakalziumkonzentration bei Karpfen nicht an (KAKUTA et al. 1992). Im Laufe einer Infektion von Karpfen mit dem Blutparasiten *T. borreli* ließ sich jedoch eine leichte Hyperkalzikämie beobachten (MEYER 2001).

Neben Veränderungen im Elektrolythaushalt können bei Säugetieren vor allem die Spiegel der Enzyme Alkalische Phosphatase (AP) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) sowie Kreatinin im Plasma und Urin auf Nephropathien hindeuten (BICKHARDT 1992, KRAFT und DÜRR 1999). Bei Säugetieren wird die AP bei pathologischem Zellstoffwechsel synthetisiert (BICKHARDT 1992). Bei Fischen wurden hohe AP-Aktivitäten in Karpfennieren (SCHEINERT und HOFFMANN 1987) gemessen, und die Ansiedlung des Enzyms vor allem im proximalen Bürstensaum festgestellt (HENTSCHEL und MEYER 1980). Bei Karpfen wurde die AP als Leitenzym der Niere eingestuft und erhöhte Aktivitäten im Urin bei Nierenschäden beschrieben (HACKERT-KORDE 1977, HENTSCHEL und MEYER 1980, SCHEINERT und HOFFMANN 1987). Auch in dieser Studie wurde eine Erhöhung der AP beobachtet, was die Annahme der Nierenschädigung unterstützt. Eine erhöhte AP-Aktivität ließ sich im Plasma an Tag 2 und 5 *p.i.* beobachten; im Urin stieg sie ab dem 5. Tag *p.i.* signifikant an. Dies steht im Einklang mit der fortschreitenden Schädigung der Tubuli, wie sie in der Histologie zu erkennen war. Allerdings wiesen die Meßwerte der AP im Urin und Plasma von Karpfen mit KHV-Infektion (vorliegende Studie) oder dem Blutparasiten *T. borreli* (MEYER 2001) eine sehr hohe Streuung auf, weshalb sich das Enzym zur Diagnostik von Nierenschäden bei Karpfen nicht so gut eignet wie bei Säugetieren.

Messungen der Aktivität von GGT eignen sich beim Säugetier als empfindlicher Indikator von Tubulusschäden. Die GGT ist physiologischerweise in Epithelzellen des proximalen Tubulus vorzufinden (GRAUER und LANE 1995). Bei Karpfen ließ sich eine 50%ige Erhöhung der GGT-Aktivität im Urin im Verlauf einer *T. borreli* induzierten interstitiellen Nephritis beobachten (MEYER 2001). Bei Karpfen mit einer KHV-Erkrankung war in der vorliegenden Studie auch eine Erhöhung der GGT-Aktivität im Urin zu erkennen, was die Annahme einer Tubulusdegeneration unterstützt. Aufgrund der hohen Streuung der Meßwerte waren sowohl in der vorliegenden Studie, als auch in der vorherigen Studie an Karpfen mit *T. borreli*-Infektionen (MEYER 2001), keine signifikanten Unterschiede zu den Meßwerten nicht infizierter Karpfen zu erkennen. Deshalb eignen sich Messungen der Aktivität auch

dieses Enzyms, ebenso wie die Alkalische Phosphatase, bei Fischen weniger gut zur Diagnostik von Nierenschäden als bei Säugetieren.

Der Kreatininspiegel im Plasma ist bei KHV-infizierten Karpfen bereits ab Tag 5 *p.i.* signifikant erhöht. Untersuchungen an Säugetieren zeigen, dass Kreatinin ein Produkt des endogenen Muskelstoffwechsels ist. Es wird aus Kreatin und Phosphokreatinin gebildet, hauptsächlich durch die Glomerula in den Urin filtiert und weder rückresorbiert noch metabolisiert. Der Spiegel im Plasma ist relativ konstant, nicht nahrungsabhängig und wird vom endogenen Proteinmetabolismus nicht beeinflusst. Prärenal steht ein erhöhter Kreatininwert unter anderem für Dehydratation und Elektrolytimbalance. Die Serumkonzentration steht in einer gewissen Beziehung zur Muskelmasse des Individuums (KRAFT und DÜRR 1999). Der erhöhte Kreatininspiegel im Blut KHV-infizierter Karpfen unterstreicht, dass bei diesen Karpfen der Elektrolythaushalt geschädigt ist, und dass vermutlich auch der Muskelstoffwechsel betroffen ist.

Kreatinin wird hauptsächlich durch die Glomerula in den Urin filtiert und ermöglicht deshalb, Aussagen über das Glomerulumsystem zu machen. Renal steht bei Säugetieren ein erhöhter Kreatininwert im Urin unter anderem für eine akute, generalisierte Nephropathie und Glomerulonephritis (KRAFT und DÜRR 1999). Die Kreatininspiegel in dieser Studie zeigen, dass das Glomerulumsystem bis einschließlich Tag 8 *p.i.* noch intakt ist. Erst am Tag 13 *p.i.* werden erhöhte Kreatininwerte im Urin gemessen, was für eine im Krankheitsverlauf sehr spät einsetzende Nephropathie spricht.

Der Proteingehalt im Plasma zeigte während der gesamten KHV-Erkrankung kaum Veränderungen. Die Plasmaproteine spielen bei Säugetieren bei der vasalen und extravasalen Verteilung der extrazellulären Flüssigkeit eine große Rolle, sind mitverantwortlich für den kolloidosmotischen Druck und dienen als Puffersubstanz (BICKARDT 1992). Ein Anstieg des Gesamtproteingehalts kann bei Fischen durch eine Verschiebung der extrazellulären Flüssigkeit in den Intrazellularraum begründet sein. Ein Abfall kommt durch eine Hydratation des Plasmas zustande (MCDONALD und MILLIGAN 1992). Da in dieser Studie keine Veränderungen im Gesamtproteingehalt bei einer KHV-Erkrankung beobachtet werden konnte, wird eine Hydratation des Plasmas ausgeschlossen, obwohl der Elektrolythaushalt dieser Fische stark belastet ist. Somit sind die beobachtete Hypoosmolarität und Hyponatriämie weniger durch einen Wassereinstrom, als durch vermutlich renale Elektrolytverluste bedingt.

---

---

## 6 SCHLUSSBETRACHTUNG

---

Die Veränderungen im Elektrolytspiegel im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion korrelieren mit denen im Urin. Alles deutet darauf hin, dass bei einer KHV-Erkrankung vor allem der renale, distale Tubulus in seiner Funktion beeinträchtigt ist, und insbesondere im späten Stadium der Erkrankung um den Tag 13 *p.i.*, der Natriumhaushalt der Karpfen zusammenbricht. Trotz der histopathologisch erkennbaren Nierenschädigung schienen bei der Mehrzahl der infizierten Karpfen eine Regulation der Sekretion und Reabsorption im proximalen Tubulus möglich zu sein. Die nicht signifikant veränderten Spiegel der weiteren, untersuchten Elektrolyte, insbesondere Kalzium, lassen auf intakte proximale, renale Tubuli schließen. Hingegen zeigt sich aufgrund der erhöhten Magnesium- und Phosphorspiegel bei KHV-infizierten Karpfen, dass im Endstadium der KHV-Erkrankung auch dieser Abschnitt des Tubulussystems vermutlich ebenfalls ins Krankheitsgeschehen involviert sein könnte.

Somit kann ein Zusammenhang zwischen den Verhaltensänderungen, der Organschädigung, dem veränderten Blutbild, dem Elektrolythaushalt und der hohen Mortalität der Karpfen im Verlauf einer KHV-Erkrankung gesehen werden.

Der Elektrolythaushalt ist vor allem bei morbidem und moribunden Karpfen schwer geschädigt. Diese Schädigung, in Verbindung mit der eintretenden Anämie und einem damit einhergehenden Sauerstoffmangel, könnte die Krankheits- und Todesursache darstellen. Dieses Krankheitsbild gleicht der „Amoebic Gill Disease“ bei Forellen. Die Forellen sterben hierbei an „Herzversagen“ (LEEF et al. 2005 und 2007).

Die Ausscheidung des Koi-Herpesvirus erfolgte über den Urin bereits zu einem Zeitpunkt, bevor Krankheitssymptome auftraten. Dies ist ein Hinweis auf ein hohes Infektionsrisiko bereits zu Beginn der Erkrankung. Somit besteht ein frühes Verbreitungsrisiko, bevor Krankheitssymptome sichtbar werden.

---

---

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

---

*Julia Negenborn*

### **Klinisch-chemische Parameter im Blut und Urin von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus**

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese einer KHV-Erkrankung bei Karpfen näher zu erforschen. Aufgrund vorangegangener Studien, in denen es vor allem zu starken Kiemen- und Nierenveränderungen im Verlauf einer KHV-Erkrankung kam, sollten insbesondere das Blutbild und der Elektrolythaushalt infizierter Karpfen untersucht werden (HEDRICK et al. 2000, PIKARSKY et al. 2004). Es galt zu untersuchen, ob Karpfen unter KHV-Infektion an einer Anämie leiden, und die Osmoregulation gestört ist. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob dies als Grund für das Sterben erkrankter Karpfen innerhalb von 14 Tagen nach der Infektion angesehen werden kann, und ein Zusammenhang zu den Verhaltensänderungen und Krankheitssymptomen der Karpfen besteht.

Hierzu wurden SPF-Karpfen mit im Labor vermehrten Koi-Herpesviren mit einem Titer von 2500 KID<sub>50</sub> oral infiziert. An den Probenentnahmetagen 2, 5, 8 und 13 *p.i.* wurde der Urin KHV-infizierter Karpfen und nicht infizierter Kontrollkarpfen über zuvor installierte Dauerblasenkatheter gesammelt. Alle Versuchskarpfen unterlagen sowohl einer Blutentnahme zehn Tage vor der Infektion, die als Vergleichsmöglichkeit herangezogen wurde, um individuelle Schwankungen einzelner Karpfen aufzudecken, als auch einer Blutentnahme nach der Infektion. Es wurden im Blut die Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozyten- und Leukozytengesamtzahl bestimmt und ein Differenzialblutbild erstellt. Im Plasma und Urin wurden neben der Osmolarität und den Elektrolyten Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und Phosphor, die AP- und GGT-Aktivität sowie die Kreatininkonzentration ermittelt. Im Plasma wurde zusätzlich der Proteingehalt gemessen. Ob eine Infektion der Karpfen nach Applikation des Virus erfolgte, wurde mittels PCR geprüft. Außerdem wurde der Urin mittels PCR auf vorhandene KHV-DNA untersucht. Letzteres diente der Aufklärung, ob eine Verbreitung des Virus über den Urin möglich ist.

Alle mit dem KHV infizierten Karpfen konnten positiv auf KHV getestet werden.

Eine PCR-Untersuchung des Urins wies bei 54% aller infizierten Karpfen die KHV-DNA nach.

Die KHV-Erkrankung lief bei allen infizierten Karpfen identisch ab. Der Verlauf war progressiv. In der Niere entwickelte sich eine **interstitielle Nephritis** mit hochgradigen Tubulusdegenerationen und -atrophien.

Aus der Hämatologie ergab sich eine **hypoplastische Anämie**, die normozytär, normochrom und aregenerativ war und eine **Leukozytose**. Letztere kam durch eine **Granulozytose mit Linksverschiebung** und einer **Monozytose** zustande. Zusätzlich entwickelte sich eine **Lymphozytopenie** und **Thrombozytopenie**. Es zeigte sich ein **akutes Entzündungsgeschehen mit Aktivierung unspezifischer Abwehrmechanismen des Granulozytensystems**.

Aus der Untersuchung des Elektrolythaushaltes ergab sich im Plasma eine **Hypoosmolarität**, **Hyponatriämie** und eine **Hyperkaliämie** ab Tag 5 *p.i.*. Im Urin stieg parallel dazu die Natriumkonzentration und dementsprechend die Gesamtosmolarität an.

Die Ergebnisse aus dem gesamten Elektrolythaushalt unterstützen die Annahme der interstitiellen Nephritis. Es kommt zu einer **Zerstörung des distalen Tubulus**. Im Endstadium der Erkrankung gibt es zusätzlich Anzeichen einer Involvierung des proximalen Tubulus ins Krankheitsgeschehen. Es kommt durch die KHV-Erkrankung zu einer **Entgleisung des Elektrolythaushaltes**.

Diese Studie ergab, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Verhaltensänderungen, den Krankheitssymptomen, dem veränderten Blutbild, dem Elektrolythaushalt und den hohen Mortalitäten der KHV-infizierten Karpfen gibt. Es zeigt sich, dass die morbid und moribund Karpfen der KHV-Erkrankung wahrscheinlich aufgrund der massiven Schädigung des Elektrolythaushaltes und der eintretenden Anämie und dem damit verbundenen Sauerstoffmangel erliegen.

Durch die in dieser Studie bewiesene Ausscheidung des Virus über den Urin bereits am Tag 2 nach der Infektion besteht ein hohes Infektionsrisiko bereits zu Beginn der Erkrankung und somit ein frühes Verbreitungsrisiko bevor Krankheitssymptome sichtbar werden.

---

## 8 SUMMARY

---

*Julia Negenborn*

### **Clinical and chemical parameters in carp blood and urine under infection with the Koi-Herpesvirus**

The aim of this study is to examine the pathogenesis of a koi herpes virus (KHV) -infection in carp. Based on previous studies, in which, most notably, increased gill and nephritic changes during the development of the KHV could be seen (HEDRICK et al. 2000, PIKARSKY et al. 2004), the blood cellcounts and electrolyte metabolism in the infected carp was examined. This study will examine whether KHV infected carp suffer from anemia and osmoregulation malfunctions. In this regard, it was additionally aimed to determine if this can be deemed as a cause of death in the diseased carp by 14 days after infection, and if a relation exists between the carps' changes in behavior and disease symptoms observed.

For this, SPF carp were orally infected with laboratory-cultured KHV with a titer of 2500 KID50. On sampling days 2, 5, 8 and 13 *p.i.* the urine of both the KHV-infected and non-infected carp was collected via a previously installed permanent bladder catheter. All carp underwent a blood sampling 10 days before infection, which was drawn upon for comparison and could detect individual variations in the carp, as well as blood sampling after infection. In the blood, the parameters for hematocrit, hemoglobin, total number of erythrocytes and leukocytes were determined and differential blood cellcounts were made. In plasma and urine, in addition to osmolarity the electrolytes sodium, potassium, calcium, magnesium and phosphor, the alkaline phosphatase and GGT activity, as well as the concentration of creatinin were measured. In the plasma, the concentration of protein was also measured. The successful infection of the carp was verified using PCR. Moreover, the urine was tested for any existing KHV-DNA using PCR. The latter served to clarify whether propagation of the virus is possible via urine.

All of the KHV infected carp were tested positive for KHV. During PCR examinations of urine samples KHV-DNA was found in 54% of all the infected carp. The KHV disease

proceeded identically in all of the infected carp. The development was progressive. **Interstitial nephritis** with renal tubular degeneration and atrophies developed in the kidneys.

The hematology yielded both **hypoplastic anemia**, which was normocytic, normochromic, and aregenerative, and **leukocytosis**. The latter came about by means of a **granulocytosis with a left shift** and **monocytosis**. Additionally, **lymphocytopenia** and **thrombocytopenia** developed. An **acute inflammation of the granulocyte system with unspecified defense mechanisms** arose.

The examination of the electrolyte metabolism resulted in the plasma **hypoosmolarity**, **hyponatremia**, and **hyperkalemia** from day 5 *p.i.* Parallel to this, the sodium concentration and correspondingly, the total osmolality, increased.

The results from the collective electrolyte metabolism facilitated the reception of interstitial nephritis. This resulted in the **deterioration of the tubulus distalis**. At the end stages of the disease there are additional indications for an involvement of the proximal tubule in the course of the disease. Due to the KHV disease there is a **lapse in electrolyte metabolism**.

This study showed that there is a clear relationship between changes in behavior, disease symptoms, changes in blood cellcounts, electrolyte metabolism and high mortality rates in the KHV-infected carp. It also shows that the morbid and moribund carp probably succumb due to the massive deterioration of electrolyte metabolism and anemia and its associated oxygen deficiency.

An excretion of virus via urine already by day 2 *p.i.* (which was shown in this study) means that there exists a high risk of infection at the beginning of the disease and therewith, an early risk for the spread of the disease before symptoms becomes visible.

---



---

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

---

- ADKISON, M. A., O. GILAD u. R. P. HEDRICK (2005):  
An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*.  
Fish Path. 40 (2), 53-62
- AMLACHER, E. (1992):  
Taschenbuch der Fischkrankheiten – Grundlagen der Fischpathologie, 6.Aufl..  
Verlag Gustav- Fischer, Jena Stuttgart
- ARIAV, R., S. TINMAN, I. PAPERNA, u. I. BEJERANO (1999):  
First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel.  
Proceedings of EAFP 9<sup>th</sup> International Conference.  
Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece
- BARHAM, W.T., G.L. SMIT u. H.J. SCHOONBEE (1980):  
The haematological assessment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri*  
Richardson.  
J, Fish. Biol. 1, 275-281
- BAUR, W. H. u. J. RAPP (2003):  
In: W. H. BAUR u. J. RAPP (Hrsg): Gesunde Fische-Praktische Anleitung zum Vorbeugen,  
Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten. 2. Auflage.  
Blackwell Verlag, Berlin, Wien
- BERGMANN, S. M., KADEN, V. and BIFFAR, M. (2004):  
Koi-Herpesvirus: Gegenwärtiger Kenntnisstand und wie weiter?  
Fischer & Teichwirt 7: 747-749.
- BERGMANN, S. M., KEMPER, J., SADOWSKI, J. and FICHTNER, D. (2006):  
First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp  
(*Cyprinus carpio* L.) in Poland.  
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 26(2): 97-104.
- BERGMANN, S. M. (2007):  
Der aktuelle Stand von KHV.  
Koi Kurier: 52.
- BERCOVIER, H., Y. FISHMAN, R. NAHARY, S. SINAI, A. ZLOTKIN, M. EYNGOR, O.  
GILAD, A. ELGAR u. P. HEDRICK (2005):  
Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a  
highly sensitive PCR based diagnosis.  
BMC Microbiology 5 (13), 1-9

- BICKHARDT, K. (1992):  
Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- BLACK, M.C. (2000):  
Collection of body fluids.  
In: G.K. OSTRANDER (ed.): The laboratory fish.  
Academic Press, London und San Diego, 513-527
- BLOOM, M. (1998):  
Koi immune system suppressing disease (KISS).  
Tagungsband der VII. Tagung der deutschen Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP), Schmollenberg-Grafschaft
- BLY, J. E. u. L. W. CLEM (1992):  
Temperature and teleost immune functions.  
Fish Shellfish Immunol. 2, 159-171
- BÖTTCHER, K. (1998):  
Untersuchungen zu klinisch-chemischen Parametern im Blutplasma von Karpfen (*Cyprinus carpio*).  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- BOND, C. E. (1979):  
Biology of fishes.  
Saunders College Publishing, Philadelphia
- BONE, Q. u. N. B. MARSHALL, übersetzt von M. NIEHAUS-OSTERLOH (1985):  
Biologie der Fische.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- BONE, Q., N. B. MARSHALL, J. H. S. BLAXTER (1995):  
Biology of fishes, second edition.  
Backie Academic u. Professional, Glasgow
- BONIN, O. (1973):  
Quantitativ-virologische Methodik  
Thieme-Verlag, Stuttgart
- BRETZINGER, A., T. FISCHER-SCHERL, M. OUMOUNA, R. HOFFMAN, u. U. TRUYEN (1999):  
Mass mortalities in koi, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease.  
Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 19 (5), 182-185
- CHILMONCZYK, S., D. MONGE, P. de KINKELIN (2002):  
Proliferative Kidney Disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection.  
Journal of Fish Diseases, Vol 25, Nr. 4, 217-226 (10)

DAVID, J. P., C. A. OSBORNE, J. W. BARTGES, K. M. JAMES, J. A. CHURCHILL (1995):

Chronic renal failure.

In: ETTIGER, S. J. u. E. C. FELDMAN: Textbook of veterinary internal medicine, 4<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1734-1759

DISHON, A., A. PERELBERG, J. BISHARA-SHIEBAN, M. ILOUZE, M. DAVIDOVICH, S. WERKER u. M. KOTLER (2005):

Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings.

Appl. Environ. Microbiol. 71 (11), 7285-7291

DOMBROWSKI, H. (1953):

Untersuchungen über das Blut des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) und einiger anderer Süßwasserfischarten.

Biol. Zentralbl. 72, 182-195

ELGER, B., M. NEUKIRCH u. H. HENTSCHEL (1986):

The kidney of rainbow trout, *Salmo gaidneri* Richardson, in the acute phase of viral haemorrhagic septicaemia: *in vivo* experiments on the renal excretion of fluid, electrolytes and protein.

J. Fish Dis. 9, 381-392

ELGER, M. u. H. HENTSCHEL (1981):

The glomerulus of a stenohaline fresh-water teleost, *Carassius auratus gibelio*, adapted to saline water.

Cell tissue Res. 220, 73-85

ELGER, M. u. H. HENTSCHEL (1986):

Cell junctions in the renal tubule of a fresh-water teleost, *Salmo gaidneri* Richardson

Cell Tissue Res. 244: 395-401

ELGER, M. u. H. HENTSCHEL, M. DAWSON u. J. L. RENFRO (2000):

Urinary tract.

In: G. K. OSTRANDER: The laboratory fish.

Academic Press, London

ELLIS, A. E. (1989):

The immunology of teleosts.

In: R. J. ROBERTS (Hrsg.): Fish Pathology, second edition.

Baillière Tindall, London, 135-154

EVANS, D.H. (1993):

Osmotic and ionic regulations.

In: EVANS, D.H. (ed.): The Physiology of Fishes.

CRC Press, Boca Raton, Florida, 315-341

- FRASER, W. W., W. C. LAWRENCE, Z. WROBLEWSKA, D. GILDEN u. H. KOPROWSKI (1981):  
Herpes simplex type 1 in human brain tissue.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 6461-6465
- FUCHS, D. A. u. C. ALBERS (1988):  
Effect of adrenaline and blood gas conditions on red cell volume and intraerythrocyte electrolytes in the carp, *Cyprinus carpio*.  
J. Ep. Biol. 137, 457-477
- GILAD, O., S. YUN, K. B. ANDREE, M. A. ADKINSON, A. ZLOTKIN, H. BERCOVIER, A. ELDAR, u. R. P. HEDRICK (2002):  
Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*.  
Dis. Aquat. Org. 48, 101-108
- GILAD, O., S. YUN, M. A. ADKINSON, K. WAY, N. H. WILLITS, H. BERCOVIER, u. R. P. HEDRICK (2003):  
Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi.  
J. Gen. Virol. 84, 2661-2668
- GILAD, O., S. YUN, F. J. ZAGMUTT-VERGARA, C. M. LEUTENEGGER, H. BERCOVIER, R. HEDRICK (2004):  
Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR.  
Dis. Aquat. Org. 60, 179-187
- GRAUER, G. F. u. I. F. LANE (1995):  
Acute renal failure.  
In: ETTINGER, S. J. u. E. C. FELDMAN: Textbook of veterinary internal medicine, 4th ed.  
W. B Saunders Company, Philadelphia 1720- 1733
- GRAY, W. L., L. MULLIS, S. E. LA PATRA, J. M. GROFF, u. A. GOODWIN (2002):  
Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish.  
J. Fish Dis. 25, 171-178
- GUNIMALADEVI, I., M. N. VENUGOPAL u. M. SAKAI (2004):  
Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification.  
J. Fish Dis. 27, 583-589
- HACKERT-KORDE, K. (1977):  
Histochemische Untersuchungen an der Fischniere.  
Anat. Anz. 142, 86-89
- HAENEN, O. L. M., K. WAY, S. M. BERGMANN u. E. ARIEL (2004):  
The emergence of koi herpesvirus and its significance to european aquaculture.  
Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 24 (6), 293-307

- HAENEN, O. u. R. HEDRICK (2006):  
Koi herpesvirus workshop.  
Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 26 (1), 26-37
- HAMERS, R. (1994):  
Untersuchungen zur Hämatologie und Immunologie des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) bei Infektionen durch Blutflagellaten.  
Bochum, Fakultät für Biologie, Diss
- HEDRICK, R. P. u. T. SANO (1989):  
Herpesviruses of fishes.  
In: W. AHNE u. E. KURSTAK (Hrsg): Viruses of Lower Vertebrates.  
Springer-Verlag, Berlin, S. 161-170
- HEDRICK, R. P., J. M. GROFF, M. S. OKIHIRO, u. T. S. McDOWELL (1990):  
Herpesviruses detected in papillomatous skin growths of koi carp (*Cyprinus carpio*).  
J. Wildlife Dis. 26, 578-581
- HEDRICK, R. P., T. S. MC DOWELL, J. M. GROFF, S. YUN u. W. H. WINGFIELD (1991):  
Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon *Acipenser transmontanus*.  
Dis. Aquat. Org. 11, 49-56
- HEDRICK, R. P., O. GILAD, S. YUN, J. SPANGENBERG, G. MARTY, R. NORDHAUSEN, M. KEBUS, H. BERCOVIER, u. A. ELDAR (2000):  
A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp.  
J. Aquat. Animal Health 12, 44-55
- HEDRICK, R. P., O. GILAD, S. C. YUN, T. S. MC DOWELL, T. B. WALTZEK, G. O. KELLEY u. M. A. ADKISON (2005):  
Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp.  
Bull. Fish Res. Agency 2, 1-7
- HEDRICK, R. P., T. B. WALTZEK u. T. S. MC DOWELL (2006):  
Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish x common carp hybrids to *cyprinid herpesvirus-2* and *herpesvirus-3*.  
J. Aquat. Animal Health 18, 26-34
- HENTSCHEL, H., C. JANNKE, R. KAUNE, M. ELGER (1978):  
Untersuchungen über Mucosubstanzen im Harnapparat des Giebels in Verbindung mit Experimenten zur renalen Osmo- und Ionenregulation.  
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 71, 283
- HENTSCHEL, H. u. R. KAUNE (1977):  
Die Niere des Giebels, *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782), Transport der Tubuli in vitro.  
Zool. Jb. Physiol. 81, 407-421

- HENTSCHEL, H. u. M. ELGER (1987):  
The distal nephron in the kidney of fishes.  
Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology Vol. 108  
Springer Verlag, Berlin
- HENTSCHEL, H. u. W. MEYER (1980):  
Phosphatasen und oxydative Enzyme in der Niere des Giebels (*Carassius auratus gibelio Bloch*), mit besonderer Berücksichtigung der Adaptation an Brackwasser.  
Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig 94, 217-240
- HICKMAN, C.P. u. B. F. TRUMP (1969):  
The kidney.  
In: HOAR, W. S. u. D. J. RANDALL (ed.): Fish physiology.  
Academic Press, New York, Vol.1, 91-239
- HILGE, V. (1980):  
Longterm observation on blood parameters of adult mirror carp (*Cyprinus carpio L.*) held in a close warm water system.  
Arch. Fischereiwiss. 31, 41-50
- HIRANO, T., D. W. JOHNSON, H. A. BERN u. S. UTIDA (1973):  
Studies on water and ion movements in the isolated urinary bladder of selected freshwater, marine and euryhaline teleosts.  
Comp. Biochem. Physiol. 45 A, 529-540
- HOFFMANN, R., M. EL-MATBOULI, S. ESSBAUER u. TH. FISCHER-SCHERL (2000):  
Ausbruch der „Koi-Seuche“ bei Teichkarpfen.  
8. Tagung der Deutschen Sektion der EAFP, Potsdam
- HOFFMANN, R. (2001).  
Herpesviren bei Koi.  
KLAN Koi-Magazin 2, 61-65
- KAKUTA, I., K. NANBA, K. UEMATSU u. K. MURACHI (1986):  
Diurnal variation of urine properties of carp *Cyprinus carpio*.  
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 53, 2079-2089
- KAKUTA, I., K. NANBA, K. UEMATSU u. K. MURACHI (1992):  
Effects of hypoxia on renal function in carp, *Cyprinus carpio*.  
Comp. Biochem. Physiol. 101A, 769-774
- KASAI, H., Y. MUTO u. M. YOSHIMIZU (2005):  
Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV).  
Fish Path. 40 (3), 137-138

- KAUNE, R. (1980):  
Untersuchungen zur Nierenfunktion und deren Beeinflussung durch Phlorizin, Etacrynsäure und Acetazolamid an einem stenohalinen Süßwasserteleosteer (*Carassius auratus gibelio* Bloch) mit Hilfe von Clearancetechniken.  
Hannover, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Universität, Diss.
- KÄRBER, G.(1931):  
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.  
Now-Nyn Schmiedebergsarchiv Exp. Path. und Pharmak. 162, 380
- KRAFT, W. u. U. M. DÜRR (1999):  
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 5. Auflage.  
Verlag Schattauer, Stuttgart - New York
- LEEF, M. J., J. O. HARRIS, J. HILL, M. D. POWELL (2005):  
Cardiovascular responses of three salmonid species affected with amoebic gill disease (AGD)  
J. Comp. Physiol. B. 175, 523-532
- LEEF, M. J., J. O. HARRIS, J. HILL, M. D. POWELL (2007):  
Increased systemic vascular resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease  
Journal of Fish Diseases 30, 601-613
- LEHMANN, J. (1991):  
Der Körperbau der wichtigsten mitteleuropäischen Süßwasserfische - Ein Leitfaden 2. Auflage.  
Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen, Kirchhudem-Albaum
- MC DONALD, D. G. u. C. L. MILLIGAN (1992):  
Chemical properties of the blood.  
In: HOAR, W. S., D. J. RANDALL u. A. P. FARRELL (Hrsg.):  
Fish physiology, Part B, The cardiovascular system.  
Academic Press, San Diego, USA
- MEYER, C. (2001):  
Auswirkungen einer parasitär bedingten Nephritis auf klinisch-chemische Parameter in Urin und Blut von Karpfen.  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- MEYER, C., GANTER, M., KÖRTING, W., STEINHAGEN, D. 2002:  
Effects of a parasite-induced nephritis on osmoregulation in common carp *Cyprinus carpio*.  
Diseases of Aquatic Organisms, 50: 127-135
- MEYER, K. (2007):  
Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirus-Infektionen durch symptomlose Carrierfische.  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

MINSON, A. C., A. DAVISON, R. EBERLE, R. C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, D. J. MC GEOCH, P. E. PELLET, B. ROIZMANN u. M. J. STUDDERT (2000):

Family Herpesviridae.

In: Virus taxonomy: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, Academic Press, San Diego, S. 203-225

NEUHAUS, H., K. MEYER (2005):

Die Koi-Herpesvirus-Infektion des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) – Stand der Wissenschaft und momentane Rechtslage.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Abt. Fischkrankheiten und Fischhaltung

NEUKIRCH, M., K. BOETTCHER, u. S. BUNNAJIRAKUL (1999):

Isolation of a virus from koi with altered gills.

Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 19 (5), 221-224

NEUKIRCH, M. (2001):

Virusinfektionen bei Koi.

KLAN Koi-Magazin 9 (3), 47-53

NEUKIRCH, M. (2003a):

Untersuchungen zur Stabilität von Koi-Virusisolaten.

1. Mitteilung: Einfluß der Temperatur auf die Vermehrungsfähigkeit.

KLAN Koi-Magazin 11 (1), 41-47

NEUKIRCH, M. (2003b):

Untersuchungen zur Stabilität von Koi-Virusisolaten.

2. Mitteilung: Einfluß verschiedener pH-Werte auf die Vermehrungsfähigkeit.

KLAN Koi-Magazin 11 (2), 59-62

NEUKIRCH, M. (2003c):

Herpesvirus bedingte Koi-Seuche.

KLAN Koi-Magazin 11 (4), 49-57

NEUKIRCH, M., O. L. M. HAENEN (2004):

Susceptibility of CCB cell line to different fish viruses.

Scientific Commons, Wageningen University and Researchcenter Publications, Netherlands

OESTERREICH, B. (1996):

Goussia carpelli- Kokzidiose des Karpfens – Hämatologische Untersuchungen.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

PERELBERG, A., M. SMIRNOV, M. HUTORAN, A. DIAMANT, Y. BEJERANO, u. M. KOTLER (2003):

Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel.

Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh 55 (1), 5-12



- PERELBERG, A., A. RONEN, M. HUTORAN, Y. SMITH und M. KOTLER (2005):  
Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine.  
Vaccine 23, 3396-3403
- PIKARSKY, E., A. RONEN, J. ABRAMOWITZ, B. LEVAVI-SIVAN, M. HUTORAN, Y. SHAPIRA, M. STEINITZ, A. PERELBERG, D. SOFFER, u. M. KOTLER (2004):  
The pathogenesis of the acute viral disease in fish induced by the carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV).  
J. Virol. 78, 9544-51
- REICHLER, G. (1959):  
Die makroskopische und mikroskopische Anatomie der Niere des Karpfens (*Cyprinus carpio*).  
Zeitschr. für Fischerei u. deren Hilfswissenschaften 8, 295-350
- ROBERTS, R. J. (1989):  
Fish Pathology. 2. Auflage  
Bailliere Tindall, London
- ROBERTS, R. J. u. H. J. SCHLOTTFELDT (1985):  
Grundlagen der Fischpathologie.  
Verlag Parey, Berlin, Hamburg
- ROMEIS (1989)  
Mikroskopische Technik, Stain for the panoptic staining according to Pappenheim,  
Urban & Schwarzenberg, München, S. 645
- RONEN, A., A. PERELBERG, J. ABRAMOWITZ, M. HUTORAN, S. TINMAN, I. BEJERANO, M. STEINITZ, u. M. KOTLER (2003):  
Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*.  
Vaccine 21, 4677-4684
- ROWLEY, A.F., RATCLIFFE, N.A (1988):  
Vertebrate Blood Cells.  
Cambridge University Press, Cambridge UK, 444p
- RUDAT, S., STEINHAGEN, D., HETZEL, U., DROMMER, W., KÖRTING, W. (2000):  
Cytopathological observations on renal tubule epithelium cells in common carp, *Cyprinus carpio* under *Trypanoplasma borreli* (Protozoa: Kinetoplastida) infection.  
Diseases of Aquatic Organisms 40: 203-209
- SAKAI, T. (1985):  
The structure of the kidney from the freshwater teleost *Carassius auratus*.  
Anat. Embryol. 171, 31-39
- SCHEINERT, P. u. R. HOFFMANN (1987):  
Qualitative und quantitative Verteilung von sieben Enzymen in Organen der Regenbogenforelle (*Salmo gaidneri* R.) und des Karpfens (*Cyprinus carpio*).

ST-HILAIRE, S., N. BEEVERS, K. WAY, R. M. LE DEUFF, P. MARTIN u. C. JOINER (2005):

Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*.

Dis. Aquat. Org. 67, 15-23

STOSKOPF, M. K. (1993):

Fish Medicine.

WB. Saunders Comp., Philadelphia, London

SUTER, P. F. (1994):

Harnapparat

In: NIEMAND, H. G. u. P. S. SUTER (Hrsg.):

Praktikum der Hundeklinik, 4. Aufl..

Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 569-598

WALSTER, C. I. (1999):

Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease.

Fish Vet. J. 3, 54-58

WALSTER, C. I. (2000):

Koi carp mortality syndrom: an update.

Fish Vet. J. 5, 72-75

WALSTER, C. (2003):

A note on koi herpesvirus (KHV): current situation and issues arising.

Fish Vet. J. 7, 77-81

WALTZEK, T. B., G. O. KELLEY, D. M. STONE, K. WAY, L. HANSON, H. FUKUDA, I. HIRONO, T., AOKI, A. J. DAVISON u. R. P. HEDRICK (2005):

Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family

*Herpesviridae*.

J. Gen. Virol. 86, 1659-1667

ZAPATA, A., AMEMIYA, C.T. 2000:

Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures.

In: DuPasquier L, Litman G.W. (eds): Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System.

Springer, Berlin, pp.67-107

ZAPATA, A.G., COOPER, E.L. (1990):

The Immune System: Comparative Histophysiology.

Wiley, Chichester, UK, 335 p

---

## 10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1: Versuchsaufbau zum Sammeln von Urinproben mittels Dauerkatheter.....	30
Abbildung 2: Katheterisierter Karpfen.....	33
Abbildung 3: Karpfen: Sitz des Katheters mit dazugehörigen Knopfheften .....	34
Abbildung 4: Blutabnahme beim Karpfen .....	35
Abbildung 5: Agarosegel nach Auftrennung von PCR-Produkten aus Proben experimentell mit KHV infizierten Karpfen.....	44
Abbildung 6: Unkoordiniert im Aquarium treibende Karpfen 13 Tage nach der Infektion mit 2500 KID <sub>50</sub> KHV I. ....	45
Abbildung 7ab: Lichtmikroskopische Aufnahme des Kiemengewebes nicht infizierter Karpfen (HE-Färbung). a) Kiemengewebe ohne Zellfüllung im Kiemensekundärlamellenzwischenraum, s. Pfeil (x100) b) Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 7a, Epithelzellen flach und anliegend, s. Pfeil (x1000).....	47
Abbildung 8a-d: Kiemengewebe von Karpfen 13 Tage nach Infektion mit dem Koi-Herpesvirus (HE-Färbung). a) Übersicht zeigt eine komplette Auffüllung des Zwischenraums zwischen Sekundärlamellen und Verklebungen der Lamellen, s. Pfeil (x100) .....	49
Abbildung 9ab: Lichtmikroskopische Aufnahme vom Nierengewebe eines Kontrollkarpfens (HE-Färbung). ....	50
Abbildung 10ab: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Karpfens Tag 13 nach Infektion.....	51
Abbildung 11: Erythrozytenzahl im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus.....	57
Abbildung 12: Leukozytenzahl im Blut von Karpfen unter der Infektion mit dem Koi-Herpesvirus.....	58
Abbildung 13: Relative Häufigkeit von Lymphozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion .....	63
Abbildung 14: Relative Häufigkeit von Monozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion .....	63
Abbildung 15: Relative Häufigkeit von Neutrophilen Granulozyten im Blut von Karpfen unter KHV-Infektion .....	64
Abbildung 16: Osmolarität im Plasma von Karpfen unter Infektion mit KHV .....	66
Abbildung 17: Osmolarität im Urin von Karpfen unter Infektion mit KHV .....	66
Abbildung 18: Natriumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion.....	67

---

Abbildung 19: Natriumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion.....	68
Abbildung 20: Kaliumkonzentration im Plasma der KHV-infizierten Karpfen und nicht infizierten Karpfen.....	69
Abbildung 21: Kaliumkonzentration im Urin der KHV-infizierten Karpfen und nicht infizierten Karpfen.....	70
Abbildung 22: Kalziumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion .....	71
Abbildung 23: Kalziumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	71
Abbildung 24: Phosphorkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion.....	72
Abbildung 25: Phosphorkonzentration in Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	73
Abbildung 26: Magnesiumkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion.....	74
Abbildung 27: Magnesiumkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	74
Abbildung 28: Kreatininkonzentration im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion.....	75
Abbildung 29: Kreatininkonzentration im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion.....	76
Abbildung 30: Gesamtprotein im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion .....	77
Abbildung 31: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion .....	78
Abbildung 32: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	79
Abbildung 33: Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	80

---

---

## 11 TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1: Osmolarität und Elektrolytkonzentrationen im Urin von Cypriniden.....	17
Tabelle 2: Osmolarität und Elektrolytkonzentrationen im Plasma von Karpfen .....	17
Tabelle 3: Gesamtprotein und Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) im Blut von Karpfen .....	18
Tabelle 4: Hämatologische Parameter gesunder Karpfen .....	21
Tabelle 5: Nachweis der Koi-Herpesvirus-DNA im Urin von Karpfen nach experimenteller Infektion .....	43
Tabelle 6: Anteil degenerierter Nierentubuli in der Niere von Karpfen im Verlauf einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus.....	51
Tabelle 7: Hämatologische Parameter im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus, Fortsetzung auf der nächsten Seite.....	55
Tabelle 8: Übersicht zur statistischen Auswertung der Hämatologie-Messdaten/Übersichtstabelle der signifikanten Unterschiede: .....	56
Tabelle 9: Relative Häufigkeit von Zellpopulationen im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus.....	61
Tabelle 10: Relative Häufigkeit von Zellpopulationen im Blut von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen .....	62
Tabelle 11: Klinisch-chemische Parameter im Plasma von Karpfen unter KHV-Infektion ....	81
Tabelle 12: Klinisch-chemische Parameter im Urin von Karpfen unter KHV-Infektion .....	82
Tabelle 13: Klinisch-chemische Parameter im Plasma von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen .....	83
Tabelle 14: Klinisch-chemische Parameter im Urin von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus Übersicht über statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen .....	84
Tabelle 15: Urin/Plasma-Quotient (U/P Ratio) von Osmolarität und Elektrolyten bei Karpfen unter KHV-Infektion .....	85
Tabelle 16: ausgewählte Wasserparameter in den Versuchsbecken während der Urinblasenkatheterisierung.....	85

---

---

## 12 CURRICULUM VITAE

---

**Persönliche Angaben:**

*Vor- und Zuname:* Julia Valerie Negenborn  
*Geburtsdatum:* 03. November 1980  
*Geburtsort:* Rendsburg  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch  
*Eltern:* Dr. med. Ingo Negenborn, Gynäkologe  
Dipl. troph. Susanne Negenborn, Diplomthrophologin  
*Geschwister:* Dipl. Ing. Lukas Negenborn, Architekt

**Schulischer Werdegang**

*Grundschule 1987 – 1991:* Grundschule Groß Wittensee  
*Gymnasium 1991 – 2000:* Jungmannschule Eckernförde  
Neusprachliches und Mathematisch-Naturwissenschaftliches  
Gymnasium für Jungen und Mädchen  
*Juni 2000* Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (*Note 1,4*)

**Beruflicher Werdegang**

*Studium 2000 – 2006:* Veterinärmedizin  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und  
Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich  
*2001* Tierärztliches Vorphysikum: Hannover (*Note: 2,0*)  
*2002* Tierärztliches Physikum: Hannover (*Note: 1,2*)  
*02.09.2002* Tierärztliche Vorprüfung: Hannover (*Gesamtnote: 1,6*)  
*2004* 1. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung:  
Hannover (*Note: 3,0*) und Wien (*Note: 1,5*)  
*2005* 2. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung:  
Hannover (*Note: 2,75*) und Wien (*Note: 2,6*)

- 2006 3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung:  
Hannover (*Note: 2,0*) und Wien (*Note: 2,3*)  
(*Gesamtnote Hannover: 2,54*)  
(*Gesamtnote Hannover und Wien: 2.35*)
31. Mai 2006 Tag der Approbation, Tierärztliche Hochschule Hannover  
*Promotionsstudium*
- 2006 – 2009: *Thema:* Klinisch-chemische Parameter im Blut und Urin von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus  
Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung des Zentrums für Infektionsmedizin und Klinik für Kleine Klautiere und Forensische Medizin, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Praxiserfahrung  
in der Fischheilkunde*
- 2006 – 2008: Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung des Zentrums für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Derzeitige Tätigkeit**
- Arbeitsverhältnis*
- seit November 2008: Kleintierklinik Kotzian, Alsterdorfer. Str. 255a, 22297 Hamburg
- Ehrenamtliche Tätigkeit:* Bund gegen Missbrauch der Tiere e.V., Franziskustierheim, Lokstedter Grenzstraße 7, 22527 Hamburg
- Auslandsaufenthalte**
- 2003 – 2004 Erasmus-Auslandsjahr an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich, mit Absolvierung der Prüfungen: Parasitologie, Tierernährung, Pharmakologie und Toxikologie, Lebensmittelkunde einschließlich Querschnittsfach „Lebensmittel“, Milchkunde, Fleisch- und Geflügelfleischhygiene
- Sommer 2000 – 2008 Praxiserfahrung in einer Clinica Veterinaria, Balearen
- Groß Wittensee, den 5. März 2009 Julia Negenborn

## 13 DANKSAGUNG

---

Am Ende möchte ich allen danken, die mich wissenschaftlich und intellektuell mit ihrem Wissen, ihren Fachkenntnissen und ihrem Know-how unterstützt haben, die mir physisch, durch ihre Hilfsbereitschaft, ihre handfertige Tätigkeit, ihre Tipps und Tricks geholfen haben und schließlich denen, die mich psychisch während der gesamten Zeit der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. D. Steinhagen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, die außerordentlich kompetente und geduldige Betreuung mit stets wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und die stets zu jeder Zeit gewährten Hilfe danken.

Herrn Prof. Dr. M. Ganter danke ich sehr für die Ermöglichung der klinisch-chemischen Analysen in der Klinik für kleine Klautiere.

Dr. Henner Neuhaus, Dr. Kirsten Meyer, Dr. Verena Schroers, Dr. Uta Reimers, Marian van der Marel, Arne Hübner, Christian, Andreas, Melissa, Harry und Adam haben mich stets unterstützt und sorgten unter anderem für das einzigartige Arbeitsklima, für das ich ihnen sehr dankbar bin.

Bei Birgit Luckardt möchte ich mich herzlich für die stetige Hilfe im Labor und Einarbeitung in die Virusanzucht- und Nachweismethoden bedanken.

Danken möchte ich außerdem meinem Bruder, Lukas, Matthias Arp und Herrn Riebmann.

Und zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir das Studium und die Promotion, ohne jemals gezögert zu haben, ermöglichten und immer hinter mir standen.

Dankeschön!



