Tierärztliche Hochschule Hannover

Die Eignung verschiedener Zelllinien aus Karpfen zur Replikation und Re-Isolation von karpfenpathogenen Viren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von

Martin Felten

Windhuk

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Mikolaj Adamek
Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung des Zentrums für Infektionsmedizin

Apl. Prof. Dr. Dieter Steinhagen
Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung des Zentrums für Infektionsmedizin

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Dieter Steinhagen

2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Martin Runge

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2019

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 4

2.1 CyHV-3 4

2.1.1 Ätiologie 4

2.1.2 Vorkommen und Verbreitung 6

2.1.3 Wirtsspektrum und Übertragung 7

2.1.4 Klinik 10

2.1.5 Pathogenese 12

2.1.6 Histologie 13

2.1.7 Diagnostik 15

2.1.8 Differentialdiagnosen 17

2.1.9 Bekämpfung und Tenazität 18

2.1.10 Kontrolle, Therapie und Prophylaxe 18

2.1.11 Rechtliche Rahmenbedingungen 20

2.2 Carp Edema Virus 21

2.2.1 Ätiologie 21

2.2.2 Vorkommen und Verbreitung 23

2.2.3 Wirtsspektrum und Übertragung 24

2.2.4 Klinik 26

2.2.5 Histologie 28

2.2.6 Diagnostik 31

2.2.7 Differentialdiagnosen 34

2.2.8 Bekämpfung, Behandlung, Kontrolle, Prophylaxe und rechtliche Rahmenbedingungen 34

2.3 Karpfenpathogenes Paramyxovirus 36

2.4 Zelllinien aus Fischen 37

2.4.1 Verwendung und Charakterisierung von Zelllinien 37

2.4.2 Kontaminationen und Passage Effekte 39

2.4.3 Verwendete Ursprungsgewebe 40

3 Material und Methoden 49

3.1 Virusherkunft 49

3.1.1 Cyprinides-Herpesvirus 3 49

3.1.2 Carp Edema Virus 50

3.1.3 Karpfenpathogenes Paramyxovirus 51
3.2 Zellkultur 51
3.2.1 Primärzellkultur 51
3.2.2 Zelllinien und Kulturen 52
3.3 Virustitration 54
3.4 Molekularbiologische Methoden 55
3.4.1 DNA-Extraktion aus Gewebe- und Mediumproben 55
3.4.2 DNA-Extraktion aus Leukozytenproben 56
3.4.3 RNA-Extraktion aus Zellkulturproben und Gewebe 56
3.4.4 Spektrophotometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes 57
3.4.6 Real-time PCR 59
3.4.7 Erstellung des externen Standards 64
3.5 Durchführung der Zellkulturversuche 65
3.5.1 Primärkulturen von Kiemen- und Flossengewebe 65
3.5.2 Zelllinien 66
3.6 Reaktivierungsversuche von CyHV-3 aus latent infizierten Fischen 68
3.7 *Statistische Auswertung* 70
4 Ergebnisse 72
4.1 Infektionsversuche von Zellkulturen mit karpfenpathogenen Viren 72
4.1.1 Infektionsversuche von Zellkulturen mit CyHV-3 73
4.1.2 Infektionsversuche von Zellkulturen mit CEV 78
4.1.3 Infektionsversuche von Zellen mit einem karpfenpathogenen Paramyxovirus 80
4.1.4 Infektionsversuche von Explantatkulturen von Kiemengewebe mit CEV .. 88
4.2 Zelllinientypisierung mittels der Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin 88
4.2.1 Typisierung der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB 88
4.2.2 Typisierung von CCB- Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335 94
4.2.3 Typisierung von CCG-Zellen und von Primärkulturen aus Kiemen 102
4.3 Zelluläre Immunantwort: Expression des Gens Interferon a2 in infizierten Zelllinien 106
4.4 Diagnostische Eignung der Zelllinien CCB, ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin 116
4.4.1 Reaktivierungsversuche von CyHV-3 aus latent infizierten Fischen durch Mitogen vermittelte Stimulation von Leukozyten 116

4.4.2 Eignung der Zelllinien zum Nachweis des CyHV-3 aus Organproben erkrankter Karpfen 118

5 Diskussion 121

6 Zusammenfassung.....137

7 Summary 139

8 Literaturverzeichnis 141

9 Danksagung.....164

Abkürzungsverzeichnis

%	*Prozent*
°C	*Grad Celsius*
µl	*Mikroliter*
µm	*Mikrometer*
Abb.	*Abbildung*
aqua dest.	*Aqua destillatum*
Au	*Goldfischflossenzelllinie*
BB	*Barramundi Brain Zelllinie*
BF-2	*Bluegill Fry-2 Zelllinie*
BG/F	*Blue Gill/Fin Zelllinie*
bzw.	*beziehungsweise*
CaF-2	Carp Fin 2
ccAbre	*Cyprinus Carpio Brain*
ccAcar	*Cyprinus Carpio Cardia Zelllinie*
ccAgill	*Cyprinus Carpio Gill Zelllinie*
ccApin	*Cyprinus carpio Fin Zelllinie*
CCB	*Cyprinus Carpio Brain Zelllinie*
CCF	*Cyprinus carpio Fin Zelllinie*
CCG	*Cyprinus Carpio Gill*
CDH1	*Cadherin1*
cDNA	*complementary DNA*
Cefas	*Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*
CEV	*Carp Edema Virus*
CF	*Caudal fin* Zelllinie
CFC	*Carp Fin Cells*
CHH-1	*Chum salmon Heart-1 Zelllinie*
CHSE-214	*Chinook Salmon Embryo-214 Zelllinie*
CK15	*Cytokeratin 15*

CLC	*Carp Leucocyte Culture*
cm	*Zentimeter*
cm²	*Quadratzentimeter*
CNGV	*Carp Interstitial nephritis and gill necrosis virus*
CPE	*Cytopathischer Effekt*
CT	*Cytotoxischer Effekt*, *Cycle Treshold*
CyHV-1	*Cyprinides Herpesvirus 1*
CyHV-2	*Cyprinides Herpesvirus 2*
CyHV-3	*Cyprinides Herpesvirus-3*
DNA	*desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)*
dNTP	*Desoxyribonukleotidtriphosphat*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	*Ethylendiamintetraacetat*
EG	*Europäische Gemeinschaft*
EK-1	*Eel Kidney-1 Zelllinie*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*
EMV	*extracellular mature virion*
EO-2	*Eel Ovary-2 Zelllinie*
EPC	*Epithelioma papulosum cyprini*
et al.	*und andere, et alii (m)*
EU	*Europäische Union*
FHM	*Fathead minnow-Zelllinie*
FKS	*Fetales Kälberserum*
FRET	*fluorescence resonance energy transfer*
g	*Erdbeschleunigung*
GCF-5	Grass Carp Fin 5 Zelllinie
GEM 81	*Goldfish Erythrophoroma-81*

GFM	*Gold Fish Muscle Zelllinie*
GFSB	*Gold Fish Swim Bladder* Zelllinie
GnRH	*Gonadotropin Releasing Hormone*
h	*Stunde*
hsp70	*Heat Shock Protein 70*
Hz	*Hertz*
IE	*Internationale Einheit*
IFAT	*Immunofluorescent Antibody Test*
IHNV	*Infectious Hematopoietic Necrosis Virus*
IMV	*intracellular mature virion*
IPNV	*Infectious Pancreatic Necrosis Virus*
k.V	*keine Veränderung*
kb	Kilobasen
KF-1	*Koi Fin-1 Zelllinie*, *Koi Fin 1*
KF-101	*Koi Fin Zelllinie*
KFC	*Koi Fin Cells Zelllinie*
KFC-1	*Koi Fin Cell Zelllinie*
KHV-I	*Koi Herpes Virus Israel*
KHV-J	*Koi Herpesvirus Japan*
KHV-T	*Koi Herpesvirus Taiwan*
KHV-U	*Koi Herpesvirus USA*
KID_{50}	*Zellkultur-infektiöse Dosis 50*
KSD	*Koi Sleepy Disease*
l	*Liter*
LAMP	*Loop-mediated isothermal amplification*
MAF	*Makrophagen-Aktivierungsfaktor*
mg	*Milligramm*

min.	*Minute*
ml	*Milliliter*
mm	*Millimeter*
mRNA	*messenger-Ribonucleic-Acid*
Na	*Natrium*
ng	*Nanogramm*
nm	*Nanometer*
OLHE-131	*Oryzias Latipes Hepatoma-131*
ORF	*Open Reading Frame*
p.i.	*post infectionem*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase-Chain-Reaction*
PF	*Poecilia Fry Zelllinie*
PG	*Pike Gonad (Zelllinie aus Esox lucius)*
qPCR	*quantitative Polymerase-Chain-Reaction*
RBCF-1	*Radiation Biology Center Fish-1 Zelllinie*
RTG-2	*Rainbow Trout Gonad-2*
RTH-149	*Rainbow Trout Hepatoma-149*
RTL-4	*Rainbow Trout Liver-4*
RT-qPCR	*Reverse Transcription quantitative Polymerase-Chain-Reaction*
SBES	*Sea Bass Embryonic Stem-like*
SISE	*Sahul India Seabass Embryonic Zelllinie*
sp	*species*
SP-2	*Silver Perch-2 Zelllinie*
SSE-5	*Sockeye Salmon Embryo-5 Zelllinie*
STE-137	*Steelhead Trout Embryo-137 Zelllinie*
SVC	*Spring Viremia of Carp (Frühlingsvirämie der Karpfen)*

$TCID_{50}$	*Tissue Culture Infection Dose 50*
TK-1	*Tilapia Kidney-1 Zelllinie*
TO-2	*Tilapia Ovary-2 Zelllinie*
Tol/FL	*Silberkarpfenflossenzelllinie*
U	*Umdrehungen*
u.	*und*
UV	*Ultraviolett*
YEL-13	Yamame Embryonal Liver-13 Zelllinie
YTF	*Yellow Tail Fin Zelllinie*
z.B.	*zum Besipiel*
ZNS	*Zentralnervensystem*

1 Einleitung

Der Koi, eine Farbvariante des Karpfens (*Cyprinus carpio*), ist weltweit verbreitet und genießt insbesondere in Asien aber auch in Europa, den USA und Israel eine hohe Beliebtheit als Zierfisch vor allem in der Hobbyhaltung. Der weltweite Handel mit Koikarpfen, sowie die Ausstellung von besonderen Exemplaren und der Import von Fischen aus der ganzen Welt sind in vielen Ländern keine Seltenheit mehr. Neben der Zierform Koi wird der Karpfen auch als Speisefisch gezüchtet. Die Karpfenzucht ist weltweit verbreitet und der Karpfen gehört zu den am häufigsten in Aquakultur gehaltenen Fischarten. So erreichte die Aquakulturproduktion von Karpfen im Jahr 2014 weltweit 4 159 117 Tonnen, wobei die Produktionsmengen stetig weiter wachsen (STERNIŠA et al. 2017). Im Zusammenhang mit der weiten Verbreitung von Karpfen und Koi auf nahezu allen Kontinenten kam es auch zu einer fortschreitenden Verbreitung unterschiedlicher Viruserkrankungen des Karpfens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Cyprinide Herpes-Virus 3 (CyHV-3)*, das auch als *Koi Herpes Virus* bezeichnet wird, das *Carp Edema Virus (CEV)* und ein noch nicht näher klassifiziertes karpfenpathogenes Paramyxovirus betrachtet.

Das *CyHV-3* führte zu massenhaften Verlusten in Beständen von Karpfen und Koi in Israel und den USA (HEDRICK et al. 2000), aber auch in anderen Ländern und Kontinenten wie Japan, Europa und Afrika (MIYAZAKI et al. 2008). Die Infektion mit dem *CyHV-3*, die Koi Herpesvirus-Infektion (KHV-I) gilt daher als eine der bedeutendsten Viruserkrankungen der Karpfen und Koi (BRÄUER 2010).

Weiterhin wurde das *Carp Edema Virus* in die Untersuchungen mit eingebunden. Bei diesem Virus handelt es sich um ein Pockenvirus, dass zum ersten Mal 1974 bei Koi in Japan nachgewiesen wurde. Wie *CyHV-3* kann auch *CEV* zu hohen Mortalitätsraten zwischen 75 % und 100 %, insbesondere in Beständen junger Koi führen (WAY et al. 2017a). Bislang ist es nicht gelungen *CEV* auf Zellkultur zu replizieren.

Als weiteres Karpfenvirus wurde ein karpfenpathogenes Paramyxovirus in die Arbeit aufgenommen, über das bislang relativ wenig bekannt ist. Es wurde im Zusammenhang mit dem Auftreten von pathologischen Veränderungen wie Verfärbungen und Nekrosen in den Kiemen von Karpfen und Koi isoliert (NEUKIRCH u. KUNZ 2001). Weiterführende Versuche zeigten, dass dieses Virus in Zelllinien aus Karpfengeweben gut repliziert und somit diese Zelllinien gut zur Anzucht des Virus verwendet werden können.

Die Anzucht eines Virus in Zellkulturen ermöglicht den Nachweis vermehrungsfähiger Viren in Proben sowie weitergehende Untersuchungen zum Beispiel im Hinblick auf die Pathogenese des Virus oder dem Schutz von Tieren vor einer durch dieses Virus verursachten Erkrankung. Deshalb kommt der Etablierung von Zelllinien, die die

Replikation von neu entdeckten Viren ermöglichen und die Arbeiten mit bereits bekannten Viren verbessern, eine große Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien, die aus verschiedenen Organen von Karpfen neu angezüchtet worden waren, auf ihre Eignung für *in vitro* Arbeiten mit den oben genannten Viren untersucht. Die Replikationsfähigkeit dieser Viren auf unterschiedlichen Zelllinien aus Karpfen, die auftretenden Zelltypen in den Zelllinien und ihre Veränderung unter Infektion sowie die Immunantwort der infizierten Zellen sind insbesondere für die neuentwickelten Zelllinien noch nicht geklärt. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Zelllinien aus Flosse, Herz, Kieme und Gehirn von Karpfen, die in der Fraunhofer Einrichtung für marine Biotechnologie und Zelltechnik, Lübeck, neu entwickelt worden waren, die Replikation der betrachteten Viren ermöglichen und ob - in Abhängigkeit von Gewebetyp und Virus – diese Zellen zur Re-Isolierung des CyHV-3 aus Proben infizierter Fische eingesetzt werden können.

Im Vergleich dazu wird die etablierte Gehirnzelllinie CCB als Referenz für die neuentwickelten Zelllinien genutzt. Zum anderen dient diese Zelllinie als Modell zur Untersuchung von Passageeffekten in Bezug auf die Replikationseigenschaften der untersuchten Viren, die Zusammensetzung der Zellpopulation hinsichtlich Zelltypen und in Bezug auf die Immunantwort der Zellen auf eine Virusinfektion. Anhand von Primärkulturen aus Karpfenkiemen und von Zelllinien aus Kiemen und Flossen von Karpfen und Koi soll eine geeignete Zelllinie bzw. ein geeigneter Zelltyp zur Replikation des *CEV* ermittelt werden. Die Eignung von Zelllinien hat sich in der Diagnostik des *CyHV-3* als problematisch erwiesen, da immer wieder Virusvarianten auftreten, die nicht in der Lage sind Zellkulturen zu infizieren und deshalb mittels Anzucht in der Zellkultur nicht nachgewiesen werden können. Die Infektion mit *CyHV-3* führt bei Karpfen und Koi, die die Infektion überleben, zu lebenslanger Persistenz des Virus in Neuronen und Leukozyten. Im Rahmen dieser Studie soll überprüft werden, wie gut sich die neu entwickelten Zelllinien zum Nachweis von *CyHV-3* aus Organproben klinisch erkrankter Karpfen und zur Detektion dieses Virus aus Blutleukozyten von Trägern einer latenten Infektion eignet.

In dieser Studie sollen die folgenden Fragen untersucht und geklärt werden:

- Sind aus Karpfengewebe neu entwickelte Zelllinien für das *CyHV-3*, das *CEV* und ein karpfenpathogenes Paramyxovirus empfänglich? Welche Zelllinie unterstützt die Replikation am besten?
- Was ist der prägende Zelltyp in den unterschiedlichen Zelllinien und Primärkulturen aus Karpfen und wie verändert sich dieser unter Infektion? Wie groß ist die Ähnlichkeit zwischen den neu etablierten Zelllinien und ihrem

Ausgangsgewebe? Gibt es Passage-abhängige Veränderungen der Zelltypzusammensetzung in der etablierten CCB-Zelllinie?

- Wie reagieren die Zelllinien auf die Infektion mit den drei Viren? Gibt es Unterschiede in der interferonvermittelten Immunantwort zwischen den Zellen und Infektion mit den unterschiedlichen Viren?
- Welche der neu entwickelten Zelllinien eignet sich am besten zum Einsatz in der Diagnostik des *CyHV-3*? Besteht die Möglichkeit mittels Mitogenstimulation *CyHV-3* aus Blutleukozyten latent infizierter Karpfen zu reaktivieren und das reaktivierte Virus mit Hilfe der neu entwickelten Zelllinien zu detektieren?

2 Literaturübersicht

2.1 CyHV-3

2.1.1 Ätiologie

Das Koi-Herpes-Virus oder *CyHV-3* gehört zur Familie der *Alloherpesviridae* und ist eines von zehn Herpesviren, das Fische infiziert (WAY u. DIXON 2017b). Es erhielt diese Bezeichnung aufgrund seines Erstnachweises in Koi in Israel und den USA (HEDRICK et al. 2000). Es infiziert ausschließlich Karpfen (*Cyprinus carpio carpio)* und deren Farbvariante Koi und führte in Japan, USA, Israel, Europa, Asien und Afrika zu massenhaften Verlusten in Beständen dieser Fische (MIYAZAKI et al. 2008).

Die *Herpesviridae* gehören zu den größten Viren und zeichnen sich durch eine charakteristische Struktur aus. So sind die Virionen der Herpesviren zwischen 120 nm und 200 nm groß, bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid mit einer T=16 Symmetrie und einem Durchmesser von 100 nm -110 nm (MICHEL et al. 2010). Dieses Nukleokapsid enthält die doppelsträngige virale DNA und ist von dem Matrixraum mit dem proteinhaltigen Tegument umgeben. Das Tegument besteht aus über 30 Proteinen, die sowohl strukturell als auch im Rahmen der Virusreplikation beim Viruseintritt in den Nukleus von Bedeutung sind. Die äußerste Schicht des infektiösen Virions wird von einer lipidhaltigen Hülle gebildet, in die Membranproteine der Wirtszelle eingelagert sind und die eine entscheidende Rolle für den Viruseintritt in die Zelle spielt (TRUYEN et al. 2015).

Zur Replikation müssen Herpesviren ihr Genom in den Zellkern der Wirtszelle übertragen. Dazu lagern sich die Viren über Zelloberflächenrezeptoren an die Wirtszelle an und dringen durch Fusion mit der Wirtszellmembran in das Zytoplasma ein. Auf dem Weg zum Zellkern entlang der Mikrotubuli streifen sie einen Teil des Teguments ab und injizieren dann durch eine Kernpore die virale DNA in den Zellkern. Dort kann sie umgehend mit der Expression viraler Gene beginnen oder in die latente Phase wechseln. Nach dem die virale DNA erfolgreich repliziert und das Nukleokapsid intranukleär zusammengesetzt wurde, findet schrittweise die Bildung von Tegument und Virushülle statt. Im letzten Schritt werden die nun infektiösen Virionen zur Zelloberfläche transportiert und dort freigesetzt (TRUYEN et al. 2015).

Das *CyHV-3* gehört zur Familie der *Alloherpesviridae,* die wiederum zur neu eingeführten Ordnung der Herpesvirales gehören (TRUYEN et al. 2015). *Alloherpesviridae* infizieren Fische und Amphibien, wobei eine Analyse spezifischer Gene ergab, dass es innerhalb der *Alloherpesviridae* zum Genus Cyprinivirus gehört, das anguillide Herpesviren und die cypriniden Herpesviren 1,2 und 3 umfasst. Diese verfügen mit 245 - 295 kb über die größten Genome in der Ordnung der *Herpesvirales*. Während die zweite Gruppe ictaluride, salmonide, acipenseride und

ranide Herpesviren zusammenfasst, deren DNA-Genome kleiner sind (134 - 235 kb) (MICHEL et al. 2010).

Dabei folgt das *CyHV-3* der Nomenklatur der anderen cypriniden Herpesviren, mit denen es sehr eng verwandt ist (WALTZEK et al. 2005). So weisen das *CyHV-1*, das Virus der Karpfenpocken und das *CyHV-2*, das die hämatopoetische Nekrose der Goldfische auslöst, mehrere homologe Genomabschnitte mit dem *CyHV-3* auf (WALTZEK et al. 2009). Auf Grund der von *CyHV-3* ausgelösten klinischen Symptome wird es auch als „Carp Interstitial nephritis and gill necrosis virus“ (CNGV) bezeichnet (RONEN et al. 2003).

Bei dem Genom des Cypriniden Herpesvirus 3 handelt es sich um ein 295-kb langes, doppelsträngiges DNA-Molekül, das aus einem langen Mittelabschnitt und zwei 22-kb langen Wiederholungsregionen besteht. Diese werden auch als linke und rechte Wiederholung bezeichnet. Es codiert für 156 Protein-codierende Gene, wobei 40 Proteine als Strukturproteine unter anderem an Kapsid- und Tegumentaufbau beteiligt sind (SANO et al. 2011). Der Durchmesser des gesamten Koiherpesvirus-Partikels beträgt 170-200 nm (MICHEL et al. 2010).

Das Koi-Herpes-Virus wurde in verschiedensten Zelllinien erfolgreich kultiviert. So wurden Zellen aus Flossen von Koi, *C. carpio* Karpfen Gehirn und *C. carpio* Karpfen Kieme verwendet und ein cytopathischer Effekt unter anderem in *C. carpio* brain (CCB) (NEUKIRCH u. KUNZ 2001), C. carpio gill (CCG) (NEUKIRCH u. KUNZ 2001), Koi fin (KFC, KF-1) (HEDRICK et al. 2000), Carp fin (CFC, CaF-2) (NEUKIRCH u. KUNZ 2001), Goldfish fin (Au) (DAVIDOVICH et al. 2007) und Silver carp fin (Tol/FL) (DAVIDOVICH et al. 2007) festgestellt. Das Temperaturoptimum für *CyHV-3* auf Zellkultur liegt demnach zwischen 15 °C und 25 °C (MICHEL et al. 2010). Bei 30 °C wird die Virusvermehrung eingestellt (DISHON et al. 2007). Werden die Zellen nach einem Monat Kultivierung bei 30 °C wieder in einen für *CyHV-3* geeigneten Temperaturbereich verbracht, kommt es erneut zur Replikation von Virus (DISHON et al. 2007). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass es bei *CyHV-3*, ähnlich wie bei anderen Herpesviren, zu einer lebenslangen Latenz im Wirtsorganismus kommen könnte. Dies wird durch Erkenntnisse von Eide et al. (2011) bestätigt, die beschrieben, dass das *CyHV-3* in der Latenz einen Tropismus zu Leukozyten und dabei vor allem zu B-Zellen aufweist. Weiterhin konnten Miwa et al. (2015) noch 372 Tage nach Virusexposition bis zu 10^4 Kopien des *CyHV-3* mit Hilfe der qPCR in verschiedenen Bereichen des ZNS, wie dem Cerebellum und der Medulla oblongata nachweisen. Daraus folgerten sie, dass Neuronen vom *CyHV-3* sehr wahrscheinlich zur Ausbildung einer Latenz befallen werden. Es ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob es sich um eine echte Latenz oder um eine persistierende chronische Infektion handelt (MIWA et al. 2015).

In vivo zeigen diese latent infizierten Fische keine klinische Symptomatik. Es kann jedoch immer wieder zu Phasen der Virusausscheidung kommen, gefolgt von unauffälligen Perioden, wobei diese in großem zeitlichem Abstand von mehreren Monaten oder Jahren zueinander liegen können. Mögliche Auslöser einer erneuten Virusausscheidung können Stress oder veränderte Umgebungstemperaturen in dem für *CyHV-3* optimalen Bereich von 18°C - 28°C darstellen. Allerdings führen diese äußeren Einflüsse nicht zwangsläufig zu einer Reaktivierung des Virus. Dies ist besonders problematisch, da sich das *CyHV-3* in der Latenzphase nicht sicher nachweisen lässt und somit latente Virusträger schlecht zu diagnostizieren sind (BRÄUER 2010).

2.1.2 Vorkommen und Verbreitung

Das Koi-Herpes-Virus wurde zum ersten Mal 1998 bei Massensterben von Karpfen in Israel und bei Koi und Karpfen in den USA und Israel nachgewiesen. Die Untersuchung der bei diesen Ausbrüchen gewonnenen Isolate KHV-I und KHV-U ergab, dass beide Isolate identisch waren (GILAD et al. 2002). Daraus folgerten Gilad et al. (2002), dass die weltweite Verbreitung des *CyHV-3* auf einem einzigen Isolat basierte (GILAD et al. 2002). AOKI et al. (2007) beschrieben dagegen drei genetische Typen des *CyHV-3* mit unterschiedlicher genetischer Übereinstimmung zueinander. Dabei zeigten sie, dass vermutlich die japanisch/ asiatische Linie (KHV-J) und die europäisch/ nordamerikanische Linie KHV-I/U aus dem gleichen Vorläufer-Stamm hervorgingen. Später erfolgte eine weitere Differenzierung in eine nordamerikanische (KHV-U) und eine europäische Linie (KHV-I) (AOKI et al. 2007).

Das *CyHV-3* gilt als nahezu weltweit verbreitet und wurde in mindestens 26 Ländern nachgewiesen. In Europa trat es unter anderem in Österreich, Belgien, Tschechien, Dänemark, Frankreich, Deutschland, Irland, den Niederlanden, Polen, Schweiz und Großbritannien auf. Weiterhin erfolgten positive Virusnachweise in verschiedenen asiatischen Ländern (u.a. China, Japan, Indonesien, Korea, Malaysia, Thailand, Singapur) den USA, Israel und Südafrika (SANO et al. 2011).

Darüber hinaus steht in einigen Ländern noch ein positiver Nachweis des *CyHV-3* aus, insbesondere in verschiedenen osteuropäischen und afrikanischen Ländern. Da es jedoch beträchtliche Unterschiede in der Beprobungsdichte und den angewendeten Nachweisverfahren gibt, ist es fraglich, ob diese Länder als frei von *CyHV-3* angesehen werden können. Australien hingegen gilt diesbezüglich als gesichert frei von *CyHV-3* (BRÄUER 2010).

Dabei gelten als Hauptgründe für die weite Verbreitung des *CyHV-3* der weltweite Handel mit Fischen und die Präsentation von Koi auf internationalen Ausstellungen (MICHEL et al. 2010). Des Weiteren spielte eine erhebliche Rolle, dass es über die

Fähigkeit verfügt eine lebenslange Latenz im Wirtsorganismus auszubilden. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass viele Koi- und Karpfenzüchter Fische durch Kohabitation mit Carriertieren bei einer Temperatur von weniger als 16 °C oder mehr als 28 °C infizierten, um damit eine „natürliche Immunität“ zu erreichen. Durch die Einstellung der für das *CyHV-3* suboptimalen Temperaturbereiche wird verhindert, dass es zu einem akuten Ausbruch mit hohen Mortalitäten kommt. Die zugesetzten Fische wurden allerdings ebenfalls zu latent infizierten Virusträgern. Der internationale Handel mit diesen symptomlosen Virusträgern unterstützte eine starke Verbreitung des *CyHV-3* (ST-HILAIRE et al. 2005).

2.1.3 Wirtsspektrum und Übertragung

Herpesviren haben ein sehr enges Wirtsspektrum und sind in den meisten Fällen sehr gut an ihren Wirt angepasst. Dies zeigt sich auch in einer niedrigen Pathogenität der meisten Herpesviren gegenüber ihrem Zielorganismus. Fälle in denen Herpesviren eine hohe Pathogenität entwickeln, beruhen auf einem Ungleichgewicht zwischen Wirt und Virus, das durch menschliches Eingreifen verursacht wurde (DAVISON 2002).

KHV-Infektionen sind natürlicherweise ausschließlich bei *Cyprinus carpio* und seinen Varianten wie der bunten Zuchtform Koi beschrieben (SANO et al. 2011). Dabei sind alle Altersgruppen von *Cyprinus carpio* anfällig, wobei bei Ausbrüchen von Karpfen in Netzgehegen beobachtet wurde, dass die Verluste bei größeren Karpfen höher waren als bei einjährigen Tieren (TAKASHIMA et al. 2005). In Infektionsversuchen wurde jedoch beobachtet, dass Karpfen bis zu einem Jahr mit Verlusten von 80 % bis 90% anfälliger waren als Tiere, die älter als ein Jahr waren (PERELBERG et al. 2005). Karpfenlarven bis zu einem Alter von drei Tagen können von *CyHV-3* nicht infiziert werden. Allerdings zeigten entsprechende Versuche, dass dieselben Karpfenlarven 13 Tage nachdem Schlupf bei einer Infektion mit dem *CyHV-3* eine Mortalität von 100% aufwiesen. Dies legt nahe, dass die Infektion nicht durch das Immunsystem der Larven verhindert wurde, sondern das *CyHV-3* nicht in der Lage ist, die Zellen der Karpfenlarven zu infizieren (ITO et al. 2007). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Karpfen in allen Stadien für das *CyHV-3* empfänglich sind. Allerdings scheint der Mukus früher Entwicklungsstadien das *CyHV-3* besser am Eindringen zu hindern, womit diese eine geringere Empfänglichkeit gegenüber dem Virus aufweisen. Dies könnte an einer besseren mechanischen Barriereleistung oder einer höhreren Konzentration von Immunglobulinen im Schleim dieser Stadien liegen (RONSMANS et al. 2014).

Weiterhin sind unterschiedliche Karpfenlinien unterschiedlich anfällig gegenüber Infektionen mit dem *CyHV-3*. Diesbezüglich durchgeführte Versuche zeigen, dass

Kreuzungen, in denen Wildformen des Karpfens wie z.B. Amur und Duna (DIXON et al. 2009) eingesetzt wurden, deutlich widerstandsfähiger sind als domestizierte Linien. Dies bestätigten vorausgegangene Versuche in denen die Linie Sassan, welche ebenfalls aus dem Amurgebiet kommt, mit israelischen Zuchtlinien gekreuzt wurde. Die Hybriden wiesen in Infektionsversuchen niedrigere Mortalitäten auf, als die domestizierten Linien (SHAPIRA et al. 2005). Dies wurde ebenfalls von Piackova et al. (2013) bestätigt, die Infektionsversuche mit Amurkarpfen, Ropsha Schuppenkarpfen, Tata-Hybriden, ungarischen Spiegelkarpfen, Marianske Lazne Schuppenkarpfen, Trebon und Prerov Schuppenkarpfen sowie Hybriden aus diesen Linien durchführten. Dabei zeigte sich, dass Hybriden aus Ropsha und Tata die geringsten Mortalitäten aufwiesen. Das größte Potential zur Etablierung einer resistenten Zuchtlinie zeigte die Kreuzung aus Ropsha und Tata sowie die Varianten Vodnany und Pohorelice des Amur Spiegelkarpfens (PIACKOVA et al. 2013).

Kreuzungsversuche zwischen männlichen Goldfischen und weiblichen Karpfen zeigten ebenfalls eine Empfänglichkeit dieser Hybriden für das *CyHV-3* (BERGMANN et al. 2010; SANO et al. 2011). Auch Hybriden aus Koi und Karausche konnten experimentell erfolgreich mit dem *CyHV-3* infiziert werden (MICHEL et al. 2010).

In einem Ausbruch des *CyHV-3* im Kasumigaura-See wurden keine Todesfälle oder klinischen Anzeichen bei getüpfeltem Gabelwels (*Ictalurus punctatus*), Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*) und Goldfisch (*Carassius auratus*) festgestellt, obwohl diese in unmittelbarer Nähe zu den infizierten Karpfen gehalten wurden. Anschließend durchgeführte Untersuchungen mittels PCR zeigten negative Ergebnisse für Wakasagi (*Hypomesus nipponensis*), Eisfisch (*Slangichthys microdon*) und Großarmgarnele (*Macrobrachium nipponense*) (TAKASHIMA et al. 2005). In weiteren Kohabitationsversuchen wurden Tilapia (*Oreochromis sp.*), Silberbarsch (*Bidyanus bidyanus*), Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*), Goldfisch (*Carassius auratus*) und Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) mit infizierten Karpfen zusammen gehalten. Dabei zeigte keine der angesprochenen Arten klinische Symptome (RONEN et al. 2003) und weitere Versuche, in denen verschiedene resistente Fischarten zunächst mit infizierten Karpfen kohabitiert wurden und danach zu naiven Tieren gesetzt wurden, zeigten keine Übertragung des *CyHV-3* auf die naiven Karpfen (HAENEN et al. 2004). Dies wurde in Versuchen von FABIAN et al. (2016) bestätigt, die Gründlinge (*Gobio gobio),* Goldfisch *(Carassius auratus),* Aland *(Leuciscus idus)* und Schleie *(Tinca tinca)* mit KHV-I behandelten und im Anschluss virale DNA und mRNA in den Geweben untersuchten. Dabei wiesen sie sehr geringe Mengen viraler DNA und keine virale mRNA in den Geweben nach. Zudem fanden sie bei Sentinelkarpfen nach Kohabitation mit den genannten Arten nur sehr geringe Mengen viraler DNA des *CyHV-3*. Dies lässt den

Schluss zu, dass diese Arten keine große Bedeutung für die Verbreitung des *CyHV-3* haben (FABIAN et al. 2016).

Allerdings stellte Meyer (2007) fest, dass Silberkarpfen, Schleien, Goldfische oder Graskarpfen nach Kohabitation mit infizierten Karpfen und anschließendem Zusammensetzen mit naiven Karpfen zu einem positiven Virusnachweis von *CyHV-3* bei diesen Tieren führte (MEYER 2007). Diese Ergebnisse wurden von SADLER et al. (2008) bestätigt, die DNA des *CyHV-3* aus Geweben von Goldfischen nach Exposition dieser Tiere mit für das *CyHV-3* positiven Karpfen feststellten (SADLER et al. 2008). Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass mittels RT-qPCR keine virale mRNA des *CyHV-3* aus Goldfischen nachgewiesen werden konnte, selbst wenn virale DNA des *CyHV-3* in den Geweben nachweisbar war. Somit konnte keine Virusreplikation des *CyHV-3* in Goldfischen (*Carassius auratus*) detektiert werden (SANO et al. 2011). Diese Befunde wurden mit einer weiter entwickelten RT-qPCR von (YUASA et al. 2012) bestätigt. Allerdings konnten andere Autoren die Replikation von *CyHV-3* in Goldfischen nachweisen. So detektierten El-Matbouli u. Soliman (2011) geringe Mengen viraler mRNA des *CyHV-3* in Goldfischen, wobei die betroffenen Tiere weder Mortalitäten noch klinische Symptome einer Infektion zeigten. Sie folgerten daraus, dass Goldfische als echte Carrier für das Virus fungieren könnten (EL-MATBOULI u. SOLIMAN 2011).

Zu Fällen von *CyHV-3* als Zoonose finden sich in der Literatur keinerlei Angaben. Dies ist im Übrigen auch als sehr unwahrscheinlich zu bewerten, da sowohl die hohe Wirtsspezifität von Herpesviren als auch die Körpertemperatur des Menschen von ca. 37°C, die deutlich über der Temperatur liegt, bei der es nach bisherigen Untersuchungen zu einer Virusreplikation von *CyHV-3* kommt, dem entgegenstehen.

Nach aktuellem Kenntnisstand erfolgt die Übertragung des *CyHV-3* nur horizontal von Fisch zu Fisch und wird dabei über das Wasser, Gerätschaften etc. übertragen (BRÄUER 2010). Allerdings kann eine vertikale Übertragung über die Eier nicht ausgeschlossen werden (SANO et al. 2011). Dabei spielen mit Fischschleim verunreinigte Gerätschaften, insbesondere Netze, eine besondere Rolle, da der Schleim die Tenazität des Virus erheblich erhöht und während der gesamten klinischen Infektion hohe Viruskonzentrationen auf der äußeren Haut nachweisbar sind (BRÄUER 2010). Darüber hinaus tragen Prädatoren wie Fischotter, Kormoran etc. zu einer Verbreitung bei, indem sie tote Fische und Fischteile auf angrenzende Gewässer verschleppen. Dies erfolgt Bräuer (2010) zufolge jedoch nur über kürzere Distanzen. Die Bedeutung der Karpfenlaus *Argulus sp.* bei der Übertragung des *CyHV-3* wird noch diskutiert (WALSTER 1999). Des Weiteren wurde beobachtet, dass das *CyHV-3* über die fließende Welle in Gewässern bis zu einem Kilometer weiter transportiert werden kann (BRÄUER 2010). Dabei bleibt es in belastetem Wasser für mindesten 4 h infektiös (PERELBERG et al. 2003). Zudem wurden von

Minamoto et al. (2012) in 90 % der Wasserproben aus japanischen Flüssen DNA des *CyHV-3* nachgewiesen. Dabei bedeutet der Nachweis viraler DNA nicht zwangsläufig, dass infektiöses Virus vorliegt oder ein Ausbruch erfolgt, da davon auszugehen ist, dass neben der Viruspräsenz weitere Umweltfaktoren Einfluss auf die Infektion von Karpfenbeständen mit dem *CyHV-3* nehmen (MINAMOTO et al. 2012; MINAMOTO et al. 2014). Baumer et al. (2013) fanden *CyHV-3* DNA-Sequenzen in 7 von 19 Wasserproben aus Karpfenteichwirtschaften in Sachsen mit latent infizierten Karpfen. Dabei zeigte sich, dass es vor allem im Zusammenhang mit dem Umsetzen der Fische im Frühjahr und Herbst zu einer Reaktivierung des Virus in latenten Trägern kommt, die das Virus in großen Mengen ins Wasser abgeben, dass damit zur Übertragung des Virus auf naive Tiere führen kann (BAUMER et al. 2013).

Eine andere mögliche Übertragungsquelle ist Personenverkehr an betroffenen Gewässern. So können neben Gerätschaften auch Schuhe und Kleidung, die mit kontaminiertem Wasser in Berührung gekommen sind, als potentieller Überträger von Virus zu anderen Gewässern fungieren. Daher findet die Begrenzung des Personenverkehrs entsprechende Berücksichtigung in den Bekämpfungsvorgaben.

2.1.4 Klinik

Das *CyHV-3* führt in der Regel zwischen 18°C und 28°C (15°C – 28 °C (WALSTER 1999)) zu klinisch manifesten Infektionen, wobei das Virus auch schon bei 12°C nachgewiesen wurde (BRÄUER 2010). Dies wird durch Untersuchungen von Baumer et al. (2013) bestätigt, die die Übertragung des *CyHV-3* auf naive Karpfen mittels bei 12 °C genommenen Wasserproben beschrieben. Die Inkubationszeit ist sehr stark von der Temperatur abhängig. So beschreibt Walster (1999), dass typischerweise erste Symptome nach zwei bis drei Wochen auftreten. Er weist jedoch darauf hin, dass Karpfen, die in einen Bestand mit einer andauernden Infektion eingesetzt werden, bereits nach drei Tagen erste Symptome zeigen können. Dies wird von Michel et al. (2010) bestätigt, die bereits 2-3 Tage nach erfolgter Infektion klinische Veränderungen feststellten.

Dabei sind häufig erste Symptome Lethargie, Anorexie und verstärkte Atembewegungen. Weiterhin treten plötzlich hochgradige Verluste, apathische Fische, die sich im Bereich des Zulaufs aufhalten oder regungslos an der Oberfläche stehen, auf. Des Weiteren schwimmen in manchen Fällen einzelne Fische ziellos umher und zeigen einen Verlust der Koordinationsfähigkeit (WALSTER 1999; BRÄUER 2010). Bei näherer Untersuchung fallen besonders die starken Kiemennekrosen auf, wobei einzelne Fische auch nur kleine, lokale Veränderungen der Kiemen aufweisen können (WALSTER 1999). Insgesamt können mögliche

Kiemenbefunde von einer leichten Kiemenblässe über Kiemenschwellungen bis hin zu den bereits angesprochenen Nekrosen reichen (BRÄUER 2010). Die bei einer Infektion immer betroffenen Kiemen führen zu einer Dyspnoe, die den betroffenen Fisch zu starken Atembewegungen und dem Aufsuchen sauerstoffreicherer Gewässerbereiche wie dem Zulauf oder der Wasseroberfläche, veranlasst.

Außerdem steigt die Schleimproduktion auf der Haut und den Kiemen zunächst deutlich an, wobei insbesondere der Schleim auf den Kiemen sehr dick und bräunlich verfärbt sein kann (WALSTER 1999). Wenn die betroffenen Fische dieses Stadium der Infektion überleben, kommt es zu großflächigen Schleimhautverlusten, insbesondere im Bereich von Kopf und Rücken. Bei Spiegelkarpfen sind diese Schleimhautverluste oftmals oberflächlich und in Bezug auf die Form eher rundlich (BRÄUER 2010). Der fortscheitende Schleimhautverlust wird durch eine Abnahme der Schleimproduktion unter der Infektion verursacht und führt dazu, dass sich die Haut rau bzw. sandpapierartig anfühlt (WALSTER 1999).

Weitere klinische Anzeichen, die bei einer Infektion auftreten können, sind beidseits auftretender Enophthalmus, ausgefranste Flossen und Blutungen der Haut, insbesondere im Bereich der Flossenansätze (SANO et al. 2011).

Pathologisch-anatomische Veränderungen der inneren Organe sind eine vergrößerte Niere, eine geschwollenen Milz im Anfangsstadium der Erkrankung und ein gesprenkeltes Herz (HAENEN et al. 2004). Gelegentlich lassen sich petechiale Blutungen auf Leber und Niere finden und es kann zu einer Ansammlung von Flüssigkeit im Bauchraum kommen (WALSTER 1999). Allerdings müssen diese Veränderungen nicht auftreten und nicht vollständig sein.

Außerdem lässt sich bei erkrankten Fischen oft ein Befall mit unspezifischen Ektoparasiten wie *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodaktylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. und Infektionen mit ubiquitären Bakterien wie *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Shewanella putrefaciens* sowie *Flavobakterium columnare* beobachten (PERELBERG et al. 2003; HAENEN et al. 2004; SANO et al. 2011). Zudem kommt es häufiger zu Pilzbefall mit *Saprolegnia sp.* (WALSTER 1999).

Die Angaben in der Literatur über beobachtete Morbidität und Mortalität weichen teilweise deutlich voneinander ab. So gibt Walster (1999) Morbiditäten von 80% - 100% und Mortalitäten im Bereich von 70% - 80% an. Bräuer (2010) fasst den Bereich möglicher Mortalitätsraten mit 10% - 100% relativ weit. Haenen et al. (2004) beschreiben Morbiditätsraten von bis zu 100% und Mortalitäten von über 90%, die bei wärmeren Temperaturen auch noch höher liegen können, da die Virusvermehrung zunimmt (SANO et al. 2011).

2.1.5 Pathogenese

Die Haupteintrittspforte für das *CyHV-3* in den Fischkörper ist die Epidermis der Haut (COSTES et al. 2009) und das Kiemengewebe (MIYAZAKI et al. 2008). Die höchsten Konzentrationen viraler DNA finden sich in Kieme, Leber, Darm, Niere und Milz mit 10^9 bis 10^{11} Viruskopien. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die Einschränkung der Fähigkeit zur Osmoregulation von Kieme, Niere und Darm unter Infektion dazu beiträgt, dass der erkrankte Fisch bei einer akuten Infektion verendet (GILAD et al. 2004). Dies wird durch Untersuchungen von Negenborn et al. (2015) bestätigt, die neben einer generalisierten Anämie und einer akuten Entzündung auch eine Dysregulation im Wasser- bzw. Mineralhaushalt der infizierten Karpfen auf Basis von Elektrolytmessungen in Serum und Urin nachwiesen. Diese werden sehr wahrscheinlich durch infektionsbedingte Schäden in osmoregulatorisch wichtigem Gewebe bedingt. Dazu gehören Degeneration und Atrophie der Nierentubuli sowie Nekrosen und Verschmelzung von Sekundärlamellen in den Kiemen (NEGENBORN et al. 2015). Untersuchungen von Miyazaki und Kollegen (2008) zeigten, dass das *CyHV-3* in die Kiemenkapillaren eindringt und dort Makrophagen infiziert, um mittels dieser durch das Blut eine Verteilung im ganzen Körper zu erreichen (MIYAZAKI et al. 2008).

Zu Beginn und während der gesamten Infektion kommen große Mengen viraler DNA im Schleim insbesondere auf der Haut vor. So lassen sich in infizierten Karpfen bereits 12 Stunden nach Virusexposition virale mRNA des *CyHV-3* in Hautproben nachweisen. Während der Infektion nimmt der Gehalt an Virus in der Haut erheblich zu, dies führt zu einer Epidermishyperplasie und in der Folge zu Hautläsionen (ADAMEK et al. 2013). Die Virusreplikation in der Haut bzw. in den Becherzellen würde die starke Schleimsekretion zu Beginn der Infektion und das Entstehen der sandpapierartigen Haut im Verlauf der Infektion erklären (GILAD et al. 2004). Adamek und Kollegen untersuchten in diesem Zusammenhang, wie sich die Expression unterschiedlicher Gene, die u.a. für verschiedene Muzine, beta-Defensine und Tight-Junctions-Proteine kodieren, unter Infektion mit dem *CyHV-3* verändert. Dabei fanden sie heraus, dass das *CyHV-3* jene Gene, die für essentielle Bestandteile des Mukus kodieren, gezielt herab reguliert. Das gleiche konnte bei den Tight-Junction-Proteinen Claudin 23 und 30 beobachtet werden. Damit scheint das *CyHV-3* gezielt schützende Eigenschaften des Schleims zu reduzieren und die Durchlässigkeit der Haut zu erhöhen (ADAMEK et al. 2012).

Neben Schleim von Haut und Kiemen kann *CyHV-3* auch über Kot und Urin verbreitet werden. Negenborn et al. (2015) wiesen infektiöses *CyHV-3* im Urin bereits 2 Tage *p.i.* nach. Weiterhin zeigten Dishon et al. (2005), dass es 5 bis 7 Tage *p.i.* zur Abgabe infektiösem Virus über die Exkremente kommt (DISHON et al. 2005). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass infizierte Karpfen das *CyHV-3* innerhalb von

24h auf naive Karpfen übertragen können. Im Temperaturbereich zwischen 16°C und 28°C konnte eine kontinuierliche Ausscheidung des Virus und Mortalitäten zwischen 50% und 70% festgestellt werden (YUASA et al. 2008). Außerhalb dieses Temperaturbereiches lassen sich keine Mortalitäten beobachten. St. Hilaire et al. (2005) geben an, dass bei 12°C gehaltene Karpfen, die mit dem *CyHV-3* infiziert worden waren, 125 Tage nach der erfolgten Infektion bei einer Erwärmung des Wassers auf 23°C wieder Mortalitäten zeigten. Damit belegten sie, dass mit dem *CyHV-3* infizierte Karpfen in Abhängigkeit von der Temperatur eine persistierende Infektion entwickeln können. Gilad und Kollegen (2004) ermittelten, dass in experimentell infizierten Fischen 62 - 64 Tage nach *CyHV-3*-Exposition bei den überlebenden Tieren virale DNA in Kieme, Niere oder Gehirn gefunden wurde. Allerdings in wesentlich niedrigeren Konzentrationen als im Verlauf der akuten Infektion. Die geringe Anzahl nachgewiesener Viruskopien lässt den Schluss zu, dass die Virusreplikation aufhörte oder zumindest stark vermindert wurde, wobei die Autoren anmerken, dass nur auf Basis nachgewiesener Virus-DNA keine Möglichkeit besteht eine persistierende von einer latenten Infektion zu unterscheiden (GILAD et al. 2004).

Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich bei überlebenden Fischen einer Infektion sehr wahrscheinlich um latente Träger des Virus handelt, da Virus-DNA aus Leukozyten isoliert werden konnte, allerdings weder infektiöses Virus noch virale mRNA (ADAMEK et al. 2013). Eide und Mitarbeiter (2011) stellten fest, dass es neben Leukozyten auch zur Ausbildung einer Latenz in verschiedenen Organen wie Gehirn, Auge, Herz, Milz, Kieme, Darm und Niere kommt. Eine Reaktivierung des Virus kann durch Temperaturveränderung, Stress oder Infektion mit Blutflagellaten *Trypanoplasma borreli* erfolgen (MEYER 2007; EIDE et al. 2011; ADAMEK et al. 2013).

2.1.6 Histologie

Bei einer Infektion mit dem *CyHV-3* treten, neben den bereits angesprochenen makroskopischen Veränderungen, verschiedene histologische Veränderungen in den inneren Organen, Haut und Kiemen der infizierten Karpfen auf. Diese variieren in Abhängigkeit vom Verlauf und der Dauer der Infektion. Die auffälligsten Veränderungen traten in Kieme und Niere auf (PERELBERG et al. 2003), wobei in der Kieme bereits zwei Tage nach Infektion erste histologische Veränderungen festzustellen sind (PIKARSKY et al. 2004; MICHEL et al. 2010).

So war zu beobachten, dass die meisten epithelialen Zellen der Kiemen geschwollen sind oder Vakuolen enthalten (HEDRICK et al. 2000). Weiterhin waren verschiedene Veränderungen an den Zellkernen, wie Karyorrhexis und intranukleäre

Einschlusskörperchen festzustellen (MIYAZAKI et al. 2008). Außerdem kam es zu Verschmelzungen von Epithelzellen der Kiemenlamellen und teilweise zu Verschmelzungen der Sekundärlamellen (HEDRICK et al. 2000). Des Weiteren befanden sich häufig Nekrosen des Kiemengewebes, insbesondere im Spitzenbereich der verschmolzenen Kiemenlamellen. Dabei ließen sich in den nekrotischen Zellen weder Viruspartikel noch Organellen erkennen. Diese wurden in den betroffenen Kiemenbereichen durch amöboid geformte Zellen ersetzt (MIYAZAKI et al. 2008). Zudem wanderten zahlreiche Lymphozyten und eosinophile Granulozyten in das infizierte Kiemengewebe ein (BRETZINGER et al. 1999). Pikarsky und Kollegen (2004) beobachteten in diesem Zusammenhang ab dem 6. Tag nach der Infektion eine weitgehende Auflösung der Kiemenstruktur und Entzündungen in nahezu allen Filamenten. Weiterhin kam es in den Kiemenkapillaren teilweise zu Blutstau und Einblutungen und in den Wänden sämtlicher Blutgefäße war die Einwanderung von Entzündungszellen zu beobachten (SANO et al. 2004). Im Herz betroffener Fische zeigten zahlreiche Zellen des Myokards Kerndegenerationen. Außerdem erweiterten sich die Myofibrillen in den Muskelzellen, wobei ein Verschwinden der Querstreifung der Muskelzellen zu beobachten war. Im fortgeschrittenen Stadium der Infektion war in moribunden Karpfen ein massives Einwandern von Lymphozyten und Makrophagen in das Myokardium zu beobachten (MIYAZAKI et al. 2008).

In der Niere waren hauptsächlich hämatopoetische Zellen betroffen (HEDRICK et al. 2000). Zudem stellten Pikarsky und Kollegen (2004) zwei Tage nach der Infektion eine beginnende Einwanderung von Entzündungszellen in den Bereich der Tubuli fest. Dies äußerte sich in Nekrosen und pyknotischen Zellkernen dieser Zellen. Die Zellen des Tubulusepithels erschienen getrübt (MIYAZAKI et al. 2008). Sano und Mitarbeiter (2004) wiesen darüber hinaus Ödeme und Zellinfiltrate in den Ausführungsgängen der Niere nach. Am 8. Tag nach Infektionsbeginn war eine weiter zunehmende Infiltration von Entzündungszellen, begleitet von degenerativen Veränderungen des Tubulusepithels in zahlreichen Nephronen, zu beobachten (PIKARSKY et al. 2004). In schweren Fällen lagen in der Milz zahlreiche nekrotische Leukozyten vor, die zusammen mit Einblutungen in der Milzpulpa auftraten. Weiterhin konnten zahlreiche nekrotische Zellen mit einem azidophilen Zytoplasma nachgewiesen werden (MIYAZAKI et al. 2008). Bei diesen konnten Miyazaki und Mitarbeiter (2008) allerdings nicht sicher feststellen, ob es sich um Leukozyten aus der Milz oder um eingewanderte Makrophagen handelte. In der Leber traten sowohl einzeln liegende als auch in Zusammenschlüssen organisierte Zellnekrosen auf (PERELBERG et al. 2003) und Bretzinger und Kollegen (1999) wiesen weitere Ansammlungen nekrotischer Zellen in der Mukosa des Darms nach. Diese wurden begleitet von lymphozytären Zellinfiltraten in Leber und Pankreas (BRETZINGER et

al. 1999). Miyazaki und Kollegen (2008) beschrieben die Erscheinung infizierter Hepatozyten als getrübt.

Im Gehirn von Fischen, die ein gestörtes Schwimmverhalten zeigten, konnten gestaute kleine Venen und Kapillaren gefunden werden. Allerdings wiesen die gestauten Gefäße keine endothelialen Veränderungen auf. Es wurde lediglich eine Perivaskulitis begleitet von Zellinfiltration an einigen Gefäßen beobachtet (MIYAZAKI et al. 2008). Histologische Untersuchungen der Muskulatur ergaben keinerlei Hinweise auf infektionsbedingte Schädigungen. Allerdings zeigte die Haut deutliche Veränderungen. So löste sich die Epidermis von darunter liegenden Schichten und spezialisierte Zellen wie Becherzellen degenerierten (BRETZINGER et al. 1999).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Bretzinger und Kollegen (1999) zeigten, dass in Kiemengewebe infizierter Karpfen für Herpesviren typische eosinophile Einschlusskörperchen zu finden sind. Darüber hinaus konnten Virionen des *CyHV-3* außer in Kiemengewebe auch in Darm und Leber nachgewiesen werden (HEDRICK et al. 2000).

2.1.7 Diagnostik

Zunächst geben klinische Symptome, die bereits unter „Klinik“ dargestellt wurden, erste Hinweise auf eine Infektion mit dem *CyHV-3*. Dieser Verdacht einer Infektion muss mit weiteren Methoden bestätigt bzw. abgesichert werden, da es keine für das *CyHV-3* pathognomonische Symptomatik gibt. Für den Nachweis von *CyHV-3* in Karpfen ist die Entnahme von Organmaterial aus frisch toten Tieren notwendig. Dabei eignen sich auf Grund hoher Viruskonzentrationen Kiemengewebe, Niere und Milz (HEDRICK et al. 2005). Allerdings sind auch andere Gewebe wie Darm, Haut und Leber betroffen (GILAD et al. 2004; HEDRICK et al. 2005). Im Zusammenhang mit dem Nachweis von symptomlosen Carriern wird ebenfalls das Gehirn beprobt, da sich Herpesviren im latenten Stadium der Infektion in Neuronen „zurückziehen“ (TRUYEN et al. 2015).

Nur in Ausnahmefällen und bei deutlicher Klinik können Blutleukozyten oder Kiemenbioptate zum Nachweis genutzt werden (BRÄUER 2010), da abhängig vom Stadium der Infektion ein falsch negativer Befund erfolgen kann. So stellten Pikarsky und Mitarbeiter (2004) fest, dass in Infektionsversuchen bereits drei Tage nach Beginn der experimentellen Infektion *CyHV-3* in der Niere nachgewiesen werden konnte. In Leukozyten allerdings erst sieben Tage nach erfolgter Infektion (PIKARSKY et al. 2004). Auf Grund der sich daraus ergebenden Unsicherheit findet dieses Vorgehen nur besonders bei wertvollen Einzeltieren in der Zierfischhaltung von Koi seine Anwendung (BRÄUER 2010), wenn eine letale Beprobung unbedingt vermieden werden soll.

Ein weiterer Ansatz zur Ermittlung des Infektionsstatus mit dem *CyHV-3* kostbarer Einzeltiere besteht im Zusetzen weniger wertvoller, in der Regel kleinerer Koi oder Speisekarpfen als Sentinelfische für eine Erkrankung mit dem *CyHV-3*. Dabei werden die für die Beprobung vorgesehenen Fische mit den Zieltieren über mehrere Tage in dem für das *CyHV-3* geeigneten Temperaturbereich von 18°C - 28°C zusammen gehalten. Anschließend erfolgt eine letale Beprobung der Sentinelfische. Dies findet insbesondere im Zierfischgroßhandel seine Anwendung, da es sich um eine kostensparende Methode handelt.

Es gibt zum einen direkte Methoden zum Nachweis des *CyHV-3*, wie Zellkultur und elektronenmikroskopische Untersuchung histologischer Proben und zum anderen indirekte Methoden wie IFAT, LAMP, ELISA und PCR, bei denen Antikörper gegen das *CyHV-3* oder virale DNA nachgewiesen werden (SHAPIRA et al. 2005; ST-HILAIRE et al. 2005; SANO et al. 2011).

Durch den Einsatz verschiedener Zelllinien aus Karpfen lässt sich das *CyHV-3* nachweisen. Dazu eignen sich KF-1- (Koi Fin-1) (HEDRICK et al. 2000) und CCB- (Common Carp Brain) Zellen (NEUKIRCH et al. 1999; NEUKIRCH u. KUNZ 2001). Dabei induziert isoliertes Virus aus Organproben einen cytopathischen Effekt. Dieser ist in KF-1 Zellen 7-10 Tage nach der Infektion der Zellen zu sehen und durch eine umfangreiche Vakuolenbildung in den Zellen gekennzeichnet (HEDRICK et al. 2000). Allerdings ist der Nachweis des *CyHV-3* auf Basis von Zellkultur schwierig und die Bestimmung der Viruslast ungenau, besonders wenn die Fische zum Zeitpunkt der Probennahme bereits mehrere Stunden tot und eingefroren worden waren (HEDRICK et al. 2005). Daher eignen sich CCB- und KF-1- Zellen zwar zur Replikation des Virus aber sind keine ausreichend sensitive Methode zum Nachweis des *CyHV-3* in Verdachtsfällen (YUASA u. SANO 2009).

Eine weitere direkte Nachweismethode besteht in der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Organmaterial. Allerdings ist diese Methode relativ teuer und es sind für einen gesicherten Nachweis hohe Viruslasten nötig. Daher findet sie keinen Einsatz in der Routinediagnostik.

Als Standardmethode in der Routinediagnostik des *CyHV-3* wird die qPCR verwendet (SANO et al. 2011), wobei die verwendete PCR-Methode und die eingesetzten Primer die Sensitivität der jeweiligen PCR bestimmen. So konnte die von Gray und Kollegen (2002) entwickelte Endpunkt-PCR 600 DNA-Kopien des *CyHV-3* nachweisen (GRAY et al. 2002). Die TaqMan qPCR von Gilad et al. (2004) ist allerdings in der Lage bis zu einer unteren Grenze von 10 Viruskopien das *CyHV-3* zu detektieren und zeigt eine hohe Spezifität bei der Unterscheidung von *CyHV-3* mit anderen nahe verwandten Herpesviren (*CyHV-1, CyHV-2*) (GILAD et al. 2004). Da die PCR auf dem Nachweis spezifischer Gen-Sequenzen basiert, besteht bei der

Auswertung der Ergebnisse dieser Methode generell das Problem, keine Auskunft über die Vermehrungsfähigkeit des nachgewiesenen Virus geben zu können.

Bei der Loop-mediated isothermal amplification of DNA handelt es sich um eine sehr sensible Methode, die in der Lage ist bereits wenige DNA-Kopien nachzuweisen. Ähnlich der PCR amplifiziert sie ausgewählte DNA-Abschnitte. Allerdings erfolgt dies hier als Einschritt-Assay mit einer konstanten Temperatur zwischen 60°C und 65°C und einer Dauer von 30 bis 60 min. Die Spezifität wird bei diesem Verfahren durch 4 Primer mit 6 Zielsequenzen außerordentlich erhöht. Allerdings muss dieses Verfahren erst durch weiteren Einsatz erprobt werden, bevor es in der Routinediagnostikeingesetzt werden kann (NOTOMI et al. 2000).

So funktioniert die Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) auf Basis einer durch Fluoreszenz sichtbar gemachten Antigen-Antikörperreaktion. Dazu wird Serum des zu untersuchenden Tieres mit dem als Antigen fungierenden Virus in Kontakt gebracht. Wenn sich der Fisch im Vorfeld mit dem *CyHV-3* infiziert hatte, enthielt sein Blut Antikörper, die mit dem angebotenen Virus agglutinierten. Durch anschließenden Zusatz einer fluoreszierenden Substanz wird die Reaktion sichtbar gemacht und kann mikroskopisch unter UV-Licht ausgewertet werden (SANO et al. 2011).

Mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) lassen sich ebenfalls auf Basis einer Antigen-Antikörper-Agglutinationsreaktion Antikörper gegen das *CyHV-3* aus Serum nachweisen (ST-HILAIRE et al. 2005; SANO et al. 2011). Dabei kann in überlebenden Fischen eines Ausbruchs des *CyHV-3* noch nach einem Jahr mittels ELISA Antikörper gegen *CyHV-3* nachgewiesen werden. Allerdings kann es zu Kreuzreaktionen mit dem Serum von Karpfen kommen, die schwach mit *CyHV-1* infiziert sind, wobei sich diese Kreuzreaktionen durch stärkere Verdünnung der eingesetzten Viruslösung weitgehend vermeiden lassen (ADKISON et al. 2005; SANO et al. 2011).

2.1.8 Differentialdiagnosen

Da es beim *CyHV-3* einige nicht sehr spezifische Symptome gibt, müssen eine Reihe verschiedener möglicher Differenzialdiagnosen berücksichtigt werden. So kann auch eine mangelhafte Wasserqualität mit hohen Ammoniak- und Nitritwerten zu einer akut erhöhten Sterblichkeit führen, insbesondere wenn Futter mit sehr hohem Eiweißgehalt eingesetzt werden. Der durch die Fütterung in größerem Umfang anfallende Stickstoff kann gegen den Ammoniakgradienten nicht mehr ohne weiteres ins Wasser abgegeben werden. Die Folge ist eine Ammoniak Selbstvergiftung. Die begleitenden Symptome sind Schleimsekretion auf den Kiemen und Anschwellen der Kiemenlamellen (BAUR u. RAPP 2003). In extremen Fällen kann es zur Entstehung

von Kiemennekrosen kommen, die von Kiemenveränderungen durch das *CyHV-3* makroskopisch nicht ohne weiteres zu unterscheiden sind.

Weiterhin können auch andere Viruserkrankungen eine vergleichbare Symptomatik hervorrufen. So kann das Carp Edema Virus (CEV), wie auch das *CyHV-3*, zu akutem Fischsterben, Enophthalmus und deutlichen Kiemenveränderungen führen (MIYAZAKI et al. 2005). Als weitere differentialdiagnostisch relevante Viruserkrankung spielt die Frühlingsvirämie der Karpfen eine Rolle. Auch hier treten Kiemenveränderungen und akute Todesfälle auf. Allerdings bricht sie bei Temperaturen von 7-17°C aus und damit in einem deutlich niedrigeren Temperaturbereich als die KHV-Infektion (BRÄUER 2010).

Außerdem können Ektoparasiten (z.B. *Ichthyobodo necator*) wie auch bakterielle und mykotische Infektionen zu Kiemenveränderungen, starker Schleimbildung und akuten Todesfällen führen.

2.1.9 Bekämpfung und Tenazität

Bei Herpesviren handelt es sich um behüllte Viren, die daher relativ wenig widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse sind (SELBITZ et al. 2015). So reicht eine Temperatureinwirkung von über 50 °C um das *CyHV-3* innerhalb weniger Minuten zu deaktivieren (BRÄUER 2010) und eine Temperatur von 35°C tötet das Virus bereits nach zwei Tagen erfolgreich ab (POKOROVA et al. 2005). Bei kühleren Temperaturen steigt die Widerstandsfähigkeit des Virions erheblich an und -80°C eignen sich zur Konservierung des Virus für mehr als 50 Tage (BRÄUER 2010).

Weiterhin wird das Virus bei pH-Werten über 11 und unter 3 nach 2 Stunden zerstört. Zur Desinfektion kontaminierter Gerätschaften eignen sich verschieden Iodophore, Natriumhypochloride und Benzalkoniumchloride in entsprechenden Konzentrationen. Allerdings ist beim Einsatz von Chemikalien, z.B. Halogenen, zu beachten, dass ihre desinfizierende Wirkung durch organisches Material erheblich herabgesetzt wird (KASAI et al. 2005). Daher sollte vor dem Einsatz eines Desinfektionsmittels zunächst eine ausführliche Reinigung erfolgen. Danach kann z.B. mit Chlor bei einer Konzentration von 3 mg/l eine vollständige Inaktivierung des *CyHV-3* erreicht werden (KASAI et al. 2005).

2.1.10 Kontrolle, Therapie und Prophylaxe

In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche Ansätze zur Bekämpfung und Eindämmung des *CyHV-3* untersucht und erprobt. Eine Möglichkeit besteht in der Züchtung resistenter Karpfenlinien. So wurden unterschiedliche Karpfenlinien in

Bezug auf ihre Widerstandsfähigkeit untersucht. Dabei ermittelten Shapira und Kollegen (2005) die Karpfenlinie Sassan und ihre Kreuzungen mit domestizierten Karpfen als deutlich weniger empfänglich gegenüber dem *CyHV-3* als konventionelle Karpfenlinien (Siehe auch Wirtsspektrum und Übertragung) (SHAPIRA et al. 2005; DIXON et al. 2009). Sie weisen dabei jedoch auch daraufhin, dass diese Hybriden deutlich schwieriger in der Handhabung sind. Zudem verfügen alle Kreuzungen über ein vollständiges Schuppenkleid, dass ihre Akzeptanz beim Verbraucher senkt (SHAPIRA et al. 2005).

Ein anderer Weg zur Senkung der Mortalität bei einem *CyHV-3*-Ausbruch besteht in der Aufheizung des Wassers auf über 28°C. Dies senkt die Verluste auf ca. 40 %. Allerdings handelt es sich um eine relativ teure Methode und die überlebenden Fische werden zu symptomlosen Trägern des Virus. Dies kann zum einen dazu führen, dass es bei den betroffenen Karpfen zu einem erneuten Krankheitsausbruch kommt sobald sich die Wassertemperatur wieder in den für das *CyHV-3* geeigneten Bereich verschiebt. Zum anderen können diese Carriertiere andere naive Karpfen infizieren und tragen somit zu einer weiteren Verbreitung des Virus bei (RONEN et al. 2003). Weiterhin ist die rechtliche Seite zu bedenken, da für Fische, die mit dem *CyHV-3* infiziert sind, ein Verbringungsverbot besteht. Dies verursacht für Teichwirte erhebliche wirtschaftliche Probleme und schränkt die Hobbyhaltung ebenfalls ein.

Der Einsatz einer Impfung zur Bekämpfung des Virus findet ausschließlich in Israel Anwendung. Dazu wird ein attenuiertes Virus verwendet (RONEN et al. 2003; PERELBERG et al. 2005, 2008). Dabei wurde beobachtet, dass bis zu 280 Tage nach der Impfung höhere Antikörpertiter gegen das *CyHV-3* nachgewiesen werden konnten, die das geimpfte Tier schützten. Perelberg und Kollegen (2008) empfehlen die geimpften Fische zunächst im für *CyHV-3* geeigneten Temperaturbereich (24°C) zu halten und dann die Haltungstemperatur deutlich zu erhöhen (31°C). Dies steigert deutlich die Bildung von Antikörpern gegen das Virus (PERELBERG et al. 2008; SANO et al. 2011).

Allerdings ist bei einer Impfung problematisch, dass kein Marker-Impfstoff zur Verfügung steht, der ermöglichen würde, geimpfte von kranken Tieren zu unterscheiden. Zudem ist nicht abschließend geklärt, wie lange der Impfschutz besteht und wann gegebenenfalls nachgeimpft werden muss.

Ein weiterer Ansatz für eine Impfung bestand in der Entwicklung eines oralen Vakzins, bei dem Formalin-inaktiviertes *CyHV-3* in Liposomen eingeschlossen wurde und im hinteren Darm aufgenommen werden sollte. In den durchgeführten Laborversuchen erzeugte das Vakzin eine reproduzierbare und belastbare Immunität gegen das *CyHV-3*. Zudem hat es gegenüber dem attenuierten Lebendimpfstoff aus

Israel den Vorteil (RONEN et al. 2003), dass kein Risiko besteht, dass es durch Mutation zur Ausbildung einer Virulenz kommt (YASUMOTO et al. 2006).

Weiterhin entwickelten Zhou et al. (2014) ein DNA-Vakzin bei dem sie das ORF81 Genfragment in den Vektor pIRES-neo einfügten und anschließend Karpfen in unterschiedlichen Dosierungen per intramuskulärer Injektion impften. Danach bestimmten sie mittels indirektem ELISA die Zunahme der Antikörpertiter. In anschließend durchgeführten Infektionsversuchen zeigte sich, dass die Mortalitäten in den geimpften Gruppen in Abhängigkeit von der verwendeten Impfstoffmenge zwischen 20 % und 12,5 % lagen, während die Kontrollgruppe Mortalitäten von 85 % erreichten. Damit führte die DNA-Vakzine zu einem Schutz geimpfter Fische vor Infektion mit dem *CyHV-3* (ZHOU et al. 2014).

Boutier et al. (2015) entwickelten eine attenuierte Vakzine, indem sie rekombinantes *CyHV-3* durch Deletion des ORF 56 und ORF 57 erzeugten. Die Autoren beschrieben, dass der attenuierte Impfstoff effektiv *in vitro* auf Zellkulturen repliziert werden kann und zu einer effektiven Stimulation der Immunantwort der Schleimhaut führt, die das *CyHV-3* am Eindringen in die geimpften Tiere hindern soll. Weiterhin ist das attenuierte *CyHV-3* nicht in der Lage von geimpften Fischen auf nicht geimpfte Tiere übertragen zu werden. Zudem erfolgt die Impfung der Fische mittels Badbehandlung und eignet sich damit auch zur Immunisierung großer Tierzahlen. Dieses attenuierte Vakzin wurde bislang nicht im Feld getestet, zeigt jedoch vielversprechende Ergebnisse in Laborversuchen (BOUTIER et al. 2015).

Nach aktuellem Forschungsstand gibt es im Moment keine Möglichkeit gegen das *CyHV-3* medikamentös zu behandeln (SANO et al. 2011).

Damit stehen bei der Bekämpfung des *CyHV-3* in Ermangelung von Alternativen prophylaktische Maßnahmen im Vordergrund. So sollten keine Karpfen aus potentiell geimpften oder über Haltung bei nicht geeigneten Temperaturen natürlich „immunisierten“ Beständen erworben werden. Zudem ist es empfehlenswert, bei Fischen aus nicht *CyHV-3*-frei zertifizierten Betrieben, eine mehrwöchige Quarantänezeit mit Haltungstemperaturen zwischen 16°C und 28°C einzuhalten und dabei eine ausreichend große Stichprobenanzahl von Karpfen zu beproben. Diese Proben sollten mittels TaqMan qPCR untersucht werden (siehe Diagnostik von *CyHV-3*).

2.1.11 Rechtliche Rahmenbedingungen

Zum Umgang mit dem *CyHV-3* gibt es mehrere rechtliche Vorgaben auf nationaler und auf EU-Ebene. Zudem ist das *CyHV-3* im Dezember 2005 in die Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen aufgenommen worden. Dazu benennt das Friedrich-

Loeffler-Institut als zuständiges Bundesinstitut und Referenzlabor für KHV-I auf EU-Ebene den Durchführungsbeschluss (EU) 2015/1554 der Kommission mit Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich Anforderungen an die Überwachung und die Diagnosemethoden. Weiterhin sind dort die angesprochene Richtlinie 2006/88/EG des Rates, die sich auf Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und auf Aquakulturerzeugnisse bezieht, sowie die Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten erläutert. Auf nationaler Ebene regelt die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, die Fischseuchenverordnung und das Tiergesundheitsgesetz das Vorgehen gegen das *CyHV-3* in Deutschland (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT).

Insbesondere die Fischseuchenverordnung benennt dabei Vorgaben und Auflagen für den Halter, Schutzmaßregeln bei Verdacht oder amtlicher Feststellung eines Ausbruches und Eckpunkte für den Einsatz eines Vakzins (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ). Diese Vorgaben müssen in Zusammenarbeit mit der zuständigen Behörde und den Veterinärämtern umgesetzt werden.

2.2 Carp Edema Virus

2.2.1 Ätiologie

Das Carp Edema Virus gehört zur Familie der *Poxviridae* (ONO et al. 1986; HEDRICK et al. 1997; OYAMATSU et al. 1997) und wurde zum ersten Mal 1974 in Koi in Japan beschrieben (ONO et al. 1986; HESAMI et al. 2015). Zur Einordnung des Virus und zur näheren Charakterisierung wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen einzelner Virionen durchgeführt. Dazu wurden hypertrophe epitheliale Zellen aus Sekundärlamellen der Kiemen untersucht. Ono und Kollegen (1986) beschrieben die CEV-Virionen als behüllt, kernhaltig und im Durchmesser 250 nm bis 280 nm groß. Als charakteristisch für das äußere Erscheinungsbild benannten sie ein maulbeerartiges Profil (ONO et al.1986). Hedrick et al. (1997) charakterisierten die Viruspartikel als eiförmig in ihrer äußeren Erscheinung, mit einem Durchmesser von 360 nm und einer ebenen Oberfläche. Die runden Bereiche der Virionen wiesen verschiedene Kapsomere auf, die in symmetrischer Anordnung um einen nierenförmigen Kern lagen (HEDRICK et al. 1997).

Oyamatsu et al. (1997) fanden reife und unreife Viruspartikel im Zytoplasma epithelialer Zellen. Sie charakterisierten die Umrisse der gefundenen Partikel als oval und 335 nm x 265 nm groß mit Lateralkörpern und einem Kern. Unreife Partikel waren kugelförmig und wiesen eine geringere Elektronendichte auf. Zudem besaßen sie eine begrenzende Membran. Diese Eigenschaften lassen den Schluss zu, dass CEV zur Familie der *Poxviridae* gehört (OYAMATSU et al. 1997).

Das virale Genom von CEV ist bisher noch nicht weiter entschlüsselt. Allerdings ermöglicht die Untersuchung des für ein Kernprotein codierenden Gens P4a, Rückschlüsse auf die genetische Diversität von CEV in der Koi- und Karpfenpopulation zu ziehen. So ergaben erste Untersuchungen dieser Sequenz, dass es zwei verschiedene CEV Linien gibt, wobei die erste in Koi aus Israel und Japan und die zweite Linie in Karpfen aus England nachgewiesen wurde (WAY u. STONE 2013). Spätere Untersuchungen in polnischen Aquakulturen und die Analyse eines 375 Basenpaar langen Segmentes des p4a-Gens ergaben, das sich die zweite Genogruppe noch in IIa und IIb unterteilen lässt, wobei ihre genetische Übereinstimmung bei 97,5-98,6% liegt. Eine Zuordnung unterschiedlicher Isolate zu Karpfen und Koi zeigte, dass I bei Karpfen, IIa bei Karpfen, vor allem aber bei Koi und IIb ebenfalls vor allem bei Karpfen gefunden wurde (MATRAS et al. 2017).

Die Familie der *Poxviridae* ist in die Unterfamilien *Entomopoxvirinae,* die Insekten infiziert und *Chordopoxvirinae,* die bei Vertebraten auftreten, unterteilt (Haller et al. 2014). Es handelt es sich um doppelsträngige, behüllte DNA-Viren, deren Virionen mit einer Größe von ca. 350 nm x 200 nm x 200 nm über die größten bei Vertebraten bekannten Viruspartikel verfügen. Diese zeichnen sich durch eine ovale, pleomorphe oder ziegelsteinartige Form und eine deutlich strukturierte Oberfläche aus. Jedes Viruspartikel ist aus einem Core, Lateralkörpern und einer oder mehreren Hüllen aufgebaut. Dies ändert sich während der Infektion in Abhängigkeit vom Aufenthaltsort des Virions. So gibt es ein intracellular mature virion (IMV) und ein extracellular mature virion (EMV), wobei das EMV gegenüber dem IMV über eine weitere Hülle verfügt. Des Weiteren codiert das Doppelstrang-DNA-Genom, das zwischen 130000 und 375000 Basenpaare enthält für ca. 40 Struktur- und eine große Anzahl Nichtstrukturproteine. Es weist an den kovalent geschlossenen Enden spezifische Haarnadelstrukturen auf, welche durch identische Sequenzen, die inverted terminal repeats auf den DNA-Strängen gebildet werden (SELBITZ et al. 2015).

Es gibt zentral auf dem Genom und terminal liegende DNA-Abschnitte, wobei zentral liegende Genabschnitte für essentielle Funktionen, wie für die DNA-Replikation benötigte Proteine kodieren. Die terminalen Genomabschnitte stehen dagegen eher mit Immunmodulation und Wirtsspezifität in Zusammenhang und zeichnen sich durch eine höhere Variabilität aus (SELBITZ et al. 2015).

Darüber hinaus replizieren sie ihr Genom mittels viruseigener Enzyme im Zytoplasma der Wirtszellen ohne Mitwirkung des Zellkernes, wobei dieses Vorgehen für DNA-Viren eher untypisch ist (HALLER et al. 2014). Dazu müssen sie zunächst in die Zelle eindringen. Dies erfolgt bei behüllten Viren in der Regel durch Fusion mit der Zellmembran der Zielzelle (MOSS 2006). Ist das Virion erfolgreich in die Zelle eingedrungen, muss es in verschiedenen Bereichen die Kontrolle über die Wirtszelle

erlangen, um eine erfolgreiche Infektion etablieren zu können. Dazu gehört der Zellzyklus, die Differenzierung der Zelle, Wirtsfaktoren, die das Pockenvirus zur Vervollständigung seiner Replikation benötigt und diverse Signaltransduktionskaskaden innerhalb der infizierten Zelle, die die einsetzende Immunantwort koordinieren (MCFADDEN 2005). Hierbei ist besonders die Manipulation der Apoptose über den Transkriptionsfaktor NF-κB durch Pockenviren zu nennen (SELBITZ et al. 2015). Dabei spielt die Überwindung, insbesondere einer Entzündungsreaktion (angeborene Immunantwort) eine wichtige Rolle, die die Einwanderung von Leukozyten anregt und damit die Virusvermehrung bis zum Einsetzen der spezifischen Immunantwort zu verhindern versucht (SELBITZ et al. 2015). In diesem Zusammenhang wurden bereits 15 Gene in verschiedenen Pockenviren identifiziert, die Mechanismen des Wirtes kontrollieren (HALLER et al. 2014).

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Familie *Chordopoxvirinae* ist ihr äußerst breites Wirtsspektrum, das einem Virusisolat die Infektion mehrerer verwandter Arten ermöglicht. So können zum Beispiel Kuh- und Affenpocken zahlreiche andere Säugetiere infizieren (MCFADDEN, 2005). Zudem verfügen die meisten Pockenviren über die Fähigkeit, diverse unterschiedliche Zelltypen zu befallen, das ihnen auf Grund ihrer Unabhängigkeit von speziesspezifischen Rezeptoren gelingt (MOSS, 2006). Die geringe Wirtsspezifität der *Poxviridae* führt zudem dazu, dass bei Haustieren auftretende Pockenviren ein erhebliches zoonotisches Potential aufweisen (MCFADDEN, 2005). So verursachen Kuhpockenviren Infektionen bei verschiedenen Haus- und Großkatzen sowie bei als Haustieren gehaltenen Nagern und können ebenfalls zu einer Infektion beim Menschen führen (SELBITZ et al. 2015). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass es keinerlei Hinweis auf ein zoonotisches Potential des Carp Edema Virus gibt (HESAMI et al. 2015; NARDY u. BERGMANN 2016).

2.2.2 Vorkommen und Verbreitung

Die ersten beschriebenen Ausbrüche des Carp Edema Virus traten in der Region Niigata in Japan 1974 auf (WAY et al. 2017a). Zudem wurde es in den darauf folgenden Jahren in anderen Teilen Japans wie Hiroshima und Saitama nachgewiesen (WAY et al. 2017a). Des Weiteren wurden Ausbrüche mit Verdacht auf eine Pockenvirusinfektion bei Karpfen 1996 in Kalifornien festgestellt (HEDRICK et al. 1997). Danach trat CEV in 5 weiteren Bundesstaaten der USA auf. So konnte es 2005 in Washington, North Carolina und Georgia, 2010 erneut in Kalifornien und Georgia und 2014 in Florida nachgewiesen werden (HESAMI et al. 2015). Der erste Nachweis von CEV auf der Südhalbkugel erfolgte in Koifarmen in Brasilien (HESAMI

et al. 2015). Die aktuellsten Erstnachweise erfolgten in Koifarmen in China, Indien und Südkorea (SWAMINATHAN et al. 2016; KIM et al. 2017; ZHANG et al. 2017).

Der Erstnachweis von CEV in Europa in Karpfen gelang 2004 in Großbritannien (HAENEN et al. 2016b), wobei Untersuchungen älterer archivierter Proben zeigten, dass CEV bereits 1998 in Großbritannien auftrat (WAY et al. 2017a). Die erste Beschreibung von CEV im Zusammenhang mit klinischen Symptomen der Koi Sleepy Disease bei den betroffenen Fischen gelang 2009 bei einem aus Israel nach Belgien importierten Koi. Der entsprechende Nachweis mittels PCR wurde vom Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (Cefas) in Großbritannien durchgeführt (WAY et al. 2017a). Ebenfalls 2009 wurde CEV erstmals in Deutschland bei aus Japan importierten Koi nachgewiesen. Auch hier wurde vom nachweisenden Labor, Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems, eine PCR durchgeführt. Im Folgenden wurden in Großbritannien (2011), Frankreich (2013) Österreich (2014), Tschechien (2014), Niederlanden (2014), Italien (2015), Polen (2015) und Schweiz (2016) Carp Edema Virus mit Hilfe der PCR erfolgreich detektiert (LEWISCH et al. 2015; BIGARRÉ et al. 2016; HAENEN et al. 2016a; WAY et al. 2017a).

Darüber hinaus stehen in einigen Ländern noch entsprechende Nachweise für das Carp Edema Virus aus. So kann aber, ähnlich wie beim *CyHV-3*, aus einem ausstehenden Krankheitsnachweis nicht auf eine Virusfreiheit des entsprechenden Landes oder Kontinentes geschlossen werden. Dies liegt, wie auch beim *CyHV-3* an der angewendeten Methode und der Beprobungsdichte.

Als Ursache für die unbemerkte und weite Verbreitung von CEV in Europa und weltweit werden ähnliche Gründe gesehen, wie 20 Jahre zuvor bei der Verbreitung des *CyHV-3* (HAENEN et al. 2016a). So spielten auch bei der Verbreitung von CEV der internationale Handel mit Koi und Karpfen sowie die Präsentation von Koi auf internationalen Ausstellungen ohne Untersuchungspflicht für virologische Erkrankungen eine Rolle (WAY et al. 2017a). Zudem könnte von Bedeutung sein, dass das Virus nach aktuellem Forschungsstand nicht auf Zellkultur kultivierbar ist und bisher nicht im Rahmen der Routinediagnostik erfasst wurde. Weiterhin verursacht CEV nicht zwangsläufig hohe Mortalitäten in den betroffenen Beständen und blieb dadurch möglicherweise unentdeckt. Auch besteht die Möglichkeit, dass CEV bei Verläufen mit hohen Mortalitäten ohne eindeutigen Nachweis mittels PCR als Infektion mit dem *CyHV-3* fehldiagnostiziert wurde (ADAMEK et al. 2016).

2.2.3 Wirtsspektrum und Übertragung

Pockenviren weisen, wie bereits im Kapitel „Ätiologie“ beschrieben, grundsätzlich keine enge Adaption an ihren Wirt auf, womit die Möglichkeit einer Infektion anderer

mit *Cyprinus carpio* nah verwandten Arten in Betracht zu ziehen ist. Dies wurde durch Untersuchungen von Nardy und Bergmann (2016) bestätigt, die CEV auch bei anderen Fischarten ermittelten. So beschrieben die Autoren einen Fall, in dem ein Goldfisch (*Carassius auratus*), zusammen gehalten mit einem erkrankten Koi, positiv auf CEV untersucht wurde. Darüber hinaus wiesen sie in einem weiteren Fall CEV in einer Karausche (*Carassius carassius*) nach (NARDY u. BERGMANN 2016). Jung-Schroers und Kollegen (2015) konnten keine Infektion von Goldfischen und Stören beobachten, selbst wenn diese gemeinsam mit infizierten Karpfen gehalten wurden. Weitere Ergebnisse, wonach ausschließlich *Cyprinus carpio* und seine durch Zucht bedingten Varianten an CEV erkranken, wurden von Hesami et al. (2015) und Novakov et al. (2016) bestätigt.

Obwohl CEV zuerst im Frühjahr und Herbst bei jungen Koi und Karpfen beim Umsetzen von Erdteichen in zementierte Teiche beschrieben wurde (MIYAZAKI et al. 2005), ergaben weitere Fallberichte keine besondere Anfälligkeit dieser Altersgruppe für das Virus. So wurde CEV regelmäßig auch in adulten Karpfen und Koi nachgewiesen (LEWISCH et al. 2015).

Kohabitationsversuche mit klinisch an CEV erkrankten Koi und Goldfischen zeigten keine Todesfälle bei den Goldfischen und vereinzelte Todesfälle bei den Koi. Weitere PCR basierte Auswertungen ergaben positive Virusnachweise für Koi und Goldfische. Allerdings mit sehr hohen CT-Werten (36-37) für die CEV-Virusgehalte im Gewebe der Goldfische. Mit Hilfe eines anderen Versuchsdesigns wurde die Relevanz von Goldfischen als Vektor für die Übertragung von CEV auf gesunde Koi untersucht. Die dabei erhobenen Daten zeigten keinerlei Todesfälle von Koi, die mit Goldfischen kohabitiert wurden, die zuvor mit klinisch an CEV erkrankten Koi gehalten wurden. Die durchgeführte Studie legt daher nahe, dass Goldfische von untergeordneter Bedeutung als Vektor bei der Übertragung von CEV sind (HAENEN et al. 2016b). Es müssen jedoch weitere Versuche durchgeführt werden, um das Wirtsspektrum des Carp Edema Virus abschließend zu klären (HESAMI et al. 2015).

Die Virusübertragung erfolgt sehr wahrscheinlich über kontaminiertes Wasser. Dazu geben infizierte Tiere über Schleim bzw. Haut- und Kiemenläsionen Viruspartikel ins Wasser ab, die dann von anderen Fischen über die Kiemen aufgenommen werden (WAY et al. 2017a). Es ist in diesem Zusammenhang noch nicht bekannt, ob und möglicherweise inwieweit es zu einer vertikalen Infektion von z.B. Eiern kommt. Ebenfalls ist bislang nicht näher untersucht, ob erkrankte Fische nach dem Abklingen der Symptome das Virus vollständig eliminieren oder ob sie zu symptomlosen Carriern werden. Dazu durchgeführte Untersuchungen von Adamek und Kollegen (2017a) ergaben jedoch keinerlei Anhaltspunkt für die Ausbildung einer Latenz. Zudem gibt es keinerlei Untersuchungen zur Tenazität von CEV in der Umwelt, insbesondere im Wasser (NOVAKOV et al. 2016). Allerdings scheint sich zumindest

virale DNA im Schleim auf der Haut von Karpfen zu halten. So konnten Haenen und Kollegen (2016) bei Koi noch 4 Monate nach Kohabitation mit erkrankten Tieren virale DNA des CEV auf der Haut mittels PCR nachweisen. Aus den Ergebnissen lässt sich jedoch keine Aussage über den Gehalt infektiösen Virus ableiten.

2.2.4 Klinik

Durch CEV verursachte klinische KSD tritt normalerweise zwischen 15°C und 25°C auf (MIYAZAKI et al. 2005), wobei klinische Infektionen auch bei 9°C beobachtet wurden (HAENEN et al. 2016b). Haenen und Kollegen (2016b) geben für das Auftreten von CEV bei Karpfen 6°C - 10°C als den üblichen Temperaturbereich an (WAY et al. 2017a; HESAMI et al. 2015). Die Inkubationszeit ist, wie bei anderen Viruserkrankungen in Fischen, sehr stark von der Temperatur abhängig.

In Infektionsversuchen wurde gezeigt, dass bereits 6h Kohabitation naiver Karpfen und Koi mit infizierten Tieren zu einer erfolgreichen Infektion mit CEV führen (HAENEN et al. 2016a). Bei einer Haltungstemperatur von 22°C – 24°C zeigen erkrankte Fische am dritten Tag nach der Infektion zum ersten Mal die klassischen Symptome der Schlafkrankheit, wie Lethargie und Ablegen auf den Grund. Ab dem vierten Tag kann diese Symptomatik bei den meisten Fischen sehr ausgeprägt beobachtet werden, wobei mechanische Stimulation mit einem Stock zeigt, dass die betroffenen Tiere zu diesem Zeitpunkt noch zu koordinierten Schwimmbewegungen in der Lage sind. Ab dem sechsten Tag beginnen Verluste, wobei die betroffenen Tiere zu diesem Zeitpunkt keine Reaktion mehr auf mechanische Stimuli zeigen. Zwischen dem 7. und dem 10. Tag kommt es zu Massensterben, wobei es zu einer Kumulation an Tag 8 kommt. In dem beschriebenen Versuch konnten Miyazaki und Mitarbeiter (2005) Verluste bis Tag 17 feststellen. Die verbliebenen Tiere überlebten bis zum Ende des Versuches (MIYAZAKI et al. 2005). Bei höheren Temperaturen (25°C - 26°C) sterben die erkrankten Tiere innerhalb von 2-3 Tagen nach dem Auftreten charakteristischer Verhaltensauffälligkeiten (WAY et al. 2017a).

Die klassischen Symptome einer CEV-Infektion sind die bereits angesprochenen Verhaltensauffälligkeiten, wie Lethargie und das Ablegen auf den Grund. Die infizierten Fische legen sich dabei oft auf eine Seite und zeigen nur auf deutliche äußere Reize, wie Berührung, für kurze Zeit Schwimmbewegungen, bevor sie sich zurück auf den Grund sinken lassen (WAY et al. 2017; MIYAZAKI et al. 2005; HESAMI et al. 2015; LEWISCH et al. 2015). Weitere Symptome, die insbesondere bei jungen Koi auftreten, beinhalten starke Erosionen und Hämorrhagien der Haut mit Ödemen in den darunter liegenden Gewebeschichten (MIYAZAKI et al. 2005). Darüber hinaus kommt es oft zu einer Überproduktion von Schleim auf Haut und Kiemen (ZHANG et al. 2017; LEWISCH et al. 2015). Des Weiteren treten besonders

bei älteren Karpfen und Koi Enophthalmus, Appetitlosigkeit, Ulzerationen im Bereich des Mauls und an den Flossenansätzen sowie blasse und geschwollene Kiemen auf (MIYAZAKI et al. 2005; SWAMINATHAN et al. 2016; ZHANG et al. 2017). Zudem konnten bei einigen Tieren ulzerative Entzündungen des Anus beobachtet werden (JUNG-SCHROERS et al. 2015).

Über pathologisch-anatomische Veränderungen der inneren Organe während einer CEV-Infektion ist wenig bekannt. Lewisch und Mitarbeiter (2015) beschrieben Leber und Pankreas als brüchig, blass und fleckig mit einer schwammigen Konsistenz. Weiterhin kann es zu einer Vergrößerung des Herzens mit auftretender Blässe und einer weich-schwammigen Konsistenz des Myokards kommen. Der Magen-Darm-Trakt enthält oft keinerlei Nahrung, kann jedoch stattdessen mit gelblichem Schleim gefüllt sein und ebenfalls eine spröde Konsistenz aufweisen (LEWISCH et al. 2015; ZHANG et al. 2017). Zudem lässt sich bei moribunden Tieren nach 6-7 Tagen eine bräunliche Verfärbung des Blutes feststellen, die durch hohe Gehalte an Methämoglobin erzeugt wird (MIYAZAKI et al. 2005).

Weiterhin weisen erkrankte Fische oft einen erheblichen Befall mit Parasiten, Bakterien und anderen viralen Infektionserregern auf (LEWISCH et al. 2015; SWAMINATHAN et al. 2016). So berichten Way und Mitarbeiter (2017) vom Nachweis der Frühlingsvirämie der Karpfen bei positiv auf CEV getesteten Tieren. Außerdem konnten sie eine Reihe von Parasiten wie *Trichodina* sp.*, Gyrodaktylus* sp.*, Ichthyobodo necator, Dactylogyrus* sp.*, Ichthyophthirius multifilis, Bothriocephalus* sp.*, Capillaria* sp. und *Argulus foliaceous* nachweisen (WAY et al. 2017a; LEWISCH et al. 2015; HAENEN et al. 2016a). Eine bakteriologische Untersuchung von Kiementupfern infizierter Fische ergab, dass auf den Kiemen Auflagerungen mit *A. sobria, Klebsiella pneumoniae, Proteus penneri, Shewanella decolorationis* und *Escherichia coli* gefunden werden können (JUNG-SCHROERS et al. 2015; SWAMINATHAN et al. 2016). Lewisch und Kollegen (2015) fanden in weiteren mikrobiologischen Untersuchungen der inneren Organe in Niere und Kopfniere *A. hydrophila* und *A. sobria.* Sie verwiesen in diesem Zusammenhang darauf, dass insbesondere *A. hydrophila* regelmäßig im Zusammenhang mit heterogenen Infektionen in Fischen gefunden wird (LEWISCH et al. 2015). Dabei wird angenommen, dass CEV zu einer Immunsuppression des infizierten Fisches führt und damit die Infektion mit Sekundärerregern begünstigt (WAY et al. 2017a; LEWISCH et al. 2015). Allerdings wurden auch diverse CEV-Fälle beobachtet, bei denen es zu keinen Sekundärinfektionen mit Bakterien oder Parasiten kam (JUNG-SCHROERS et al. 2015). Dies lässt den Schluss zu, dass das Auftreten von Sekundärinfektionen bei CEV von weiteren Faktoren, wie zum Beispiel der Wasserqualität und der individuellen Kondition des betroffenen Fisches abhängt (WAY et al. 2017a).

Es gibt unterschiedliche Angaben in der Literatur zu Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit CEV-Infektionen. So scheint diese in hohem Maße von der Temperatur, dem Alter und der Zuchtlinie des betroffenen Fisches abhängig zu sein. Bei Krankheitsausbrüchen von CEV bei Karpfen zwischen 6°C und 10°C und bei adulten Tieren sind die Mortalitäten nicht explizit erhöht (LEWISCH et al. 2015). Zhang und Kollegen (2017) beobachteten in einem Infektionsversuch Mortalitäten von 100 % bei Karpfen bei 24°C, während Miyazaki et al. (2005) Mortalitätsraten von 76 % bei Koi mit einer Wassertemperatur von 22°C – 24°C beobachteten. Way und Mitarbeiter (2017) postulierten für junge Koi bei 15°C - 25°C Mortalitäten von 75% bis 100% im Rahmen einer CEV-Infektion. Dies bestätigt Untersuchungen von Oyamatsu und Kollegen (1997), die Mortalitätsraten von über 80% beobachteten.

Nähere Angaben zur Morbidität sind nicht bekannt. Aus den Mortalitätsraten zwischen 75 % und 100 % sowie der benötigten Kohabitationsdauer von 6h für eine erfolgreiche Infektion (HAENEN et al 2016a) lässt sich jedoch auf hohe Morbiditätsraten in infizierten Beständen schließen.

Es ist nicht geklärt, ob CEV subklinisch in infizierten Koi nach Ende einer Infektion weiter persistiert. Allerdings weisen einige importierte Koi hohe Gehalte an CEV-DNA in den Kiemen auf ohne Symptome einer klinischen Infektion zu zeigen. Dabei könnte es sich um Träger einer persistierenden CEV-Infektion handeln, die stressassoziiert wieder ausbricht (ADAMEK et al. 2016).

Der Infektionsweg während einer CEV-Infektion ist noch nicht näher untersucht. Es wurden jedoch verschiedene Studien durchgeführt, in denen die Verteilung des CEV-Virus in den Organen betroffener Koi und Karpfen unter Infektion untersucht wurden. Dabei beobachteten Oyamatsu et al. (1997) das Auftreten von CEV-Virionen am häufigsten in den Kiemen, sehr selten in der Haut und niemals in Milz, Niere oder Darm (OYAMATSU et al 1997; SWAMINATHAN et al. 2016). Diese Befunde wurden grundsätzlich von Amita et al. (2002) und Adamek et al. (2016) bestätigt, die in infizierten Koi das CEV nur gelegentlich in Haut, Leber und Milz nachwiesen.

2.2.5 Histologie

Eine Infektion mit CEV führt neben den bereits beschriebenen makroskopischen und klinischen Befunden zu unterschiedlichen histologischen Veränderungen in den inneren Organen und insbesondere in den Kiemen infizierter Fische. Diese zeigen ein spezifisches Bild in Abhängigkeit von Stadium und Verlauf der Infektion (MIYAZAKI et al. 2005). Die deutlichsten Veränderungen treten in der Kieme auf, wobei sich die Befunde in der Anfangsphase der Infektion (6. – 7. Tag) von denen nach dem Höhepunkt in den Verlusten ab dem 8. – 17. Tag deutlich unterscheiden

(MIYAZAKI et al. 2005). Die Kiemenveränderungen beginnen bei einer CEV-Infektion an den Spitzen der einzelnen Lamellen und entwickeln sich nach unten über die gesamten Kiemenlamellen (ONO et al. 1986). Zudem scheint es neben einem viralen Tropismus zum Kiemenepithel auch eine Affinität des Virus gegenüber Chlorid Zellen in den Kiemen zu geben. Dies würde in Kombination mit einer eingeschränkten Nierenfunktion die erheblichen Einschränkungen in der osmotischen Regulation erkrankter Fische und damit unter anderem auch die ausgeprägte Ödembildung erklären (LEWISCH et al. 2015). Allerdings besteht in diesem Bereich weiterer Forschungsbedarf.

So zeigten Untersuchungen, sowohl spontan als auch experimentell infizierter moribunder Fische in den ersten 6 - 7 Tagen der Infektion, in den Kiemenlamellen zahlreiche hypertrophe Zellen im Kiemenepithel (MIYAZAKI et al. 2005; OYAMATSU et al. 1997). Zudem kam es zu Ödembildung in Kiemenepithelzellen sowie zu einer Verschmelzung von Sekundärlamellen (MIYAZAKI et al. 2005; WAY u. STONE 2013; JUNG-SCHROERS et al. 2015). Dies wurde besonders bei spontan infizierten Tieren beobachtet (OYAMATSU et al. 1997). Die verdickten, zwischen den Lamellen gelegenen Epithelien enthielten in der äußersten Zellschicht einige vergrößerte Zellen.

Weiterhin waren in diese Zellbereiche zahlreiche eosinophile Granulozyten eingewandert (SWAMINATHAN et al. 2016; ZHANG et al. 2017; ADAMEK et al. 2018). Die meisten der vergrößerten Zellen zeigten randständige Chromatose des Kerns und waren teilweise nekrotisch (SWAMINATHAN et al. 2016; MIYAZAKI et al. 2005). Elektronenmikroskopische Untersuchungen vergrößerter Zellen im respiratorischen Epithel offenbarten zahlreiche unreife Viruspartikel im Zytoplasma. Zudem konnte innerhalb der infizierten Zellen eine deutlich erhöhte Anzahl von Mitochondrien, Ribosomen und Golgi-Apparaten ermittelt werden, wobei der Golgi-Apparat in nicht infizierten Zellen nur selten genauer differenziert werden kann. Weiterhin konnte eine „raue Oberfläche“ am endoplasmatische Retikulum beobachtet werden, die als ein Hinweis auf eine erhöhte Aktivität der Zelle hindeutet (ONO et al. 1986). Zudem beobachteten Miyazaki und Kollegen (2005), dass sich die Gewebestruktur unter Infektion veränderte. So bilden infizierte Zellen feine Desmosomen, die die Trennung von den Nachbarzellen verhindern. Dadurch bleiben die Zellen innerhalb des Gewebeverbandes bis die neu gebildeten Virionen infektiös sind (MIYAZAKI et al. 2005).

Kiemenuntersuchungen moribunder Tiere, die die kumulierenden Verluste, die sich oft um den 8. Tag der Infektion einstellen, überlebt haben, zeigen Hyperplasie der Epithelzellen und Verschmelzungen einzelner Sekundärlamellen. Des Weiteren finden sich zahlreiche vergrößerte Zellen an den Spitzen der Kiemenfilamente,

während die oberste Schicht des hyperplastischen Epithels durch abgeflachte Zellen ersetzt wurde (MIYAZAKI et al. 2005).

In den epithelialen Bereichen zwischen den einzelnen Lamellen kommt es auch hier zur Einwanderung zahlreicher eosinophiler Granulozyten. Zudem gibt es Hinweise auf eine massive, chronische Kiemenentzündung (LEWISCH et al. 2015). Die Kapillaren in den einzelnen Filamenten weisen keinerlei Schädigungen oder Veränderungen, wie z.B. Hämorrhagien auf (MIYAZAKI et al. 2005). Allerdings beschrieben Ono und Kollegen (1986) eine deutliche Atrophie der Kapillaren in den Sekundärlamellen und eine erhebliche Kompression der einzelnen Blutgefäße durch die Hyperplasie des Kiemenepithels. Diese wird ausgelöst durch die Einwanderung von Entzündungszellen wie eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Die Folge ist eine zusätzliche Schwächung der physiologischen Funktion der Kiemen (ONO et al. 1986).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nach einer längeren Infektionsdauer betroffene Zellen zahlreiche reife Viruspartikel im Zytoplasma enthalten (MIYAZAKI et al. 2005; SWAMINATHAN et al. 2016). Die Organellen dieser Zellen sind teilweise intakt und weisen partiell Veränderungen auf. So sind einige Mitochondrien degeneriert. Zudem können pleomorphe Einschlusskörperchen und vergrößerte Zellkerne gefunden werden. Darüber hinaus kommt es im Zytoplasma einiger hypertrophierter Zellen zu hochgradiger Vakuolenbildung und Zellkerndegeneration (MIYAZAKI et al. 2005).

In den ersten Tagen der Infektion sind in der Leber moribunder Fische zahlreiche wolkig-geschwollene Hepatozyten zu finden. Nähere Betrachtung dieser Zellen mittels Elektronenmikroskopie offenbart zahlreiche geschwollene und abgerundete Mitochondrien. Die Blutgefäße enthalten bräunliche Erythrozyten auf Grund der Methämoglobinbildung. In Leberproben, die ab dem 8. Tag der Infektion genommen wurden, zeigen zahlreiche Hepatozyten hyaline Degeneration und Vakuolisation. Hier lässt sich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchung eine große Anzahl elektronendichter Körper nachweisen, die aus zerstörten Mitochondrien freigesetzt wurden (MIYAZAKI et al. 2005).

Die Epithelzellen der Nierentubuli zeigen ebenfalls wolkige Schwellung und hyaline Degeneration, insbesondere bei weiter fortgeschrittenem Infektionsverlauf (SWAMINATHAN et al. 2016; MIYAZAKI et al. 2005). Zudem kommt es zur Einwanderung mononukleärer Zellen und zur Bildung multifokaler, nekrotischer Veränderungen assoziiert mit der Entstehung multipler Makrophagenreaktionszentren (LEWISCH et al. 2015; ZHANG et al. 2017). Eine elektronenmikroskopische Betrachtung dieser Zellen offenbart zahlreiche pleomorphe und elektronendichte Einschlusskörperchen. Zudem sind auch die

Erythrozyten in der Niere und im dort befindlichen hämatopoetischen Gewebe bereits bräunlich und werden von endothelialen Zellen phagozytiert (MIYAZAKI et al. 2005).

In der Milz ist die Pulpa atrophisch und zahlreiche durch Methämoglobinbildung bräunlich gefärbte Erythrozyten werden dort von mononukleären Zellen und Makrophagen phagozytiert (MIYAZAKI et al. 2005; OYAMATSU et al. 1997).

Insbesondere wenn die Augen der Fische bereits eingesunken sind, kann eine Verringerung des Abstandes zwischen Retina und Sklera auf Grund der Abnahme von Gewebeflüssigkeit beobachtet werden (MIYAZAKI et al. 2005).

In den ulzerativen Veränderungen der Haut kommt es zur Zerstörung und Bildung intrazellulärer Ödeme in der Epidermis (OYAMATSU et al. 1997). Im Bereich der Muskulatur sind Schwellungen der Muskelfasern zu beobachten. Die elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Muskelzellen zeigt degenerierte Mitochondrien und Sarkoplasma mit Vakuolenbildung sowie eine verringerte Menge Glykogen gegenüber nicht infizierten Zellen. Die Myofibrillen waren teilweise beschädigt (MIYAZAKI et al. 2005).

Insbesondere nach dem 8. Tag der Infektion zeigen Herzmuskelzellen moribunder Tiere deutlich wolkige Schwellungen (MIYAZAKI et al. 2005). Außerdem konnte eine Myokarditis mit multifokaler Leukozyteneinwanderung zwischen nekrotisch gewordenen Herzmuskelfasern nachgewiesen werden (LEWISCH et al. 2015).

Im Magen-Darm-Trakt betroffener Fische gab es im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchung keine Anzeichen für pathologische Veränderungen (MIYAZAKI et al. 2005). Allerdings beobachteten Oyamatsu und Mitarbeiter (1997) degenerierte, eosinophile Zellen in hinteren Darmabschnitten experimentell infizierter Fische. Diese Befunde wurden von Lewisch und Kollegen (2015) bestätigt, die eine diffuse Enteritis bei betroffenen Tieren feststellten.

2.2.6 Diagnostik

Einen ersten Hinweis auf eine Infektion mit CEV gibt der charakteristische Symptomkomplex der Koi Sleepy Disease, der oft im Zusammenhang mit einer CEV-Infektion steht und bereits unter „Klinik“ zusammengestellt wurde. Allerdings sind diese Symptome nur als hinweisend zu bewerten, sodass eine Absicherung bzw. Bestätigung des bestehenden Verdachtes mittels weiterer diagnostischer Maßnahmen durchgeführt werden muss. Dazu eignet sich auf Grund hoher Virustiter von bis zu 504000 Kopien pro 250 ng Gewebe in Karpfen besonders Kiemengewebe (ADAMEK et al. 2017a). In Abhängigkeit vom Infektionsstatus ist CEV in der Kieme zudem deutlich häufiger nachzuweisen als in der Haut, Leber oder Milz (ADAMEK et

al. 2016). Es ist noch nicht geklärt, ob CEV in einem subklinischen Stadium in infizierten Fischen weiter persistiert. Adamek et al. (2017a) konnten jedoch keine CEV-DNA in Kiemenbiopsien von Karpfen einen Monat nach Abklingen der Symptome nachweisen (ADAMEK et al. 2017a). Diese Befunde schwächen die Hypothese, dass es zu einer subklinischen Persistenz nach der Infektion kommt. Demgegenüber stehen Untersuchungen von Adamek und Mitarbeitern (2016), die in den Kiemen aus Japan importierter Koi teilweise erhebliche Mengen CEV-DNA nachwiesen. Diese Tiere zeigten jedoch keine klinischen Symptome einer Infektion. Auch konnte in Infektionsversuchen mit Koi gezeigt werden, dass in symptomfreien Koi, die zusammen mit klinisch erkrankten Tieren gehalten worden waren, kein Virus nachgewiesen werden konnte (ADAMEK et al. 2016).

Diese Befunde zeigen verschiedene Unklarheiten im Bereich der Pathogenese auf, die weiterer Forschung bedürfen und im Moment zusätzliche Herausforderungen für die eingesetzten diagnostischen Methoden bedeuten. Dabei gibt es mögliche direkte Methoden des Virus-Nachweises: Zellkultur und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Gewebeproben. Weiterhin wird als indirekte Methode die PCR verwendet, bei der virale DNA in der Probe nachgewiesen wird. Sie ist in unterschiedlichen Ausführungen zum Nachweis von CEV im Einsatz (HESAMI et al. 2015)

Es wurden in Bezug auf ihre diagnostische Eignung zahlreiche Zelllinien auf ihre Fähigkeit zur Reisolation und Replikation von CEV erprobt. Bislang konnte CEV noch nicht in etablierten Zelllinien repliziert werden. Zudem wurde bislang noch kein cytopathischer Effekt nach Inokulation verschiedener etablierter Zelllinien mit CEV beobachtet (OYAMATSU et al. 1997; WAY et al. 2017). Dabei testeten Ono und Kollegen (1986) RTG-2, FHM und EPC Zellen, indem sie homogenisiertes Material aus infizierten Fischen auf die Zellkulturen aufbrachten. Später untersuchten Oyamatsu und Mitarbeiter (1997) zahlreiche Zelllinien auf ihre Eignung zur Infektion mit CEV. So erprobten sie mehrere cyprinide Zelllinien (FHM, EPC, CLC, CF, GCF-5, CCF), salmonide (RTG-2, CHSE-214, STE-137, SSE-5, CHH-1,) anguilide (EK-1, EO-2) und einige weitere Zelllinien aus Teleostei (BF-2, BB, PG, TK-1, TO-2, PF, YTF). Weitere Versuche aus indischen Laboren an neu entwickelten Zelllinien, unter anderem aus Goldfisch- und Karpfenflossen bestätigten diese Ergebnisse (SWAMINATHAN et al. 2016). Adamek et al. (2017a) gelang in Primärkulturen aus Kiemen über 2 Tage eine erfolgreiche CEV-Replikation. Allerdings nicht in Primärkulturen aus Flossen oder Zelllinien aus anderen Geweben, wie Flossen oder Gehirn (ADAMEK et al. 2017a). Die Entwicklung einer Zelllinie aus Karpfenkiemenepithelzellen könnte der beste Ansatz zur Entwicklung einer Zelllinie

zur Replikation von CEV *in vitro* und langfristig zur zellkulturbasierten Diagnostik von CEV sein (WAY et al. 2017a).

Als weitere direkte Nachweismethode findet die elektronenmikroskopische Untersuchung von Kiemengewebe Anwendung, mittels derer einzelne CEV-Virionen dargestellt werden können (HESAMI et al. 2015). Diese Methode ist jedoch relativ teuer und es sind für einen gesicherten Nachweis hohe Viruslasten in dem untersuchten Gewebe nötig. Daher findet sie keinen Einsatz in der Routinediagnostik.

Als Standardmethode in der Diagnostik von CEV wurde die PCR etabliert. Dabei gibt es unterschiedliche PCR-Protokolle für Endpunkt- und qPCR von denen Adamek und Mitarbeiter (2017b) mehrere in Bezug auf ihre Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen. Alle Protokolle basieren auf dem Nachweis eines 375 bp Fragmentes des P4a Kernproteins. Die Untersuchungen zeigten, dass die hohe genetische Variabilität dieses Proteins den PCR gestützten Nachweis erschwert (ADAMEK et al. 2017b).

Das Oyamatsus Endpunkt-PCR Protokoll (OYAMATSU et al. 1997) eignet sich zum Nachweis von CEV der Genogruppe IIa und IIb. Es zeigte jedoch keine eindeutige Bande bei positiven Proben der genetischen Linie I, wodurch die Auswertung der Ergebnisse erschwert wurde. Die diagnostische Verwendbarkeit des TiHo qPCR-Protokolls ist auf die Gengruppen IIa und IIb begrenzt, während das TiHo SYBR Green qPCR-Protokoll erfolgreich alle drei genetischen Linien nachweist. Es hat jedoch den Nachteil, dass die untere Nachweisgrenze höher liegt und damit positive Proben mit einem geringen Virusgehalt möglicherweise nicht identifiziert. Die Erprobung einer nested Endpunkt-PCR ergab, dass sie trotz ihrer relativ hohen Sensitivität mehrere falsch negative Befunde angab. Zudem benötigt ein Durchgang 3-mal mehr Zeit als die Durchführung einer geeigneten qPCR (ADAMEK et al. 2016).

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass das CEFAS PCR-Protokoll (MATRAS et al. 2017) die höchste Sensitivität aller getesteten PCR-Verfahren aufweist und den sichersten Nachweis aller genetischen Linien ermöglicht (ADAMEK et al. 2017b).

Andere Nachweisverfahren wie Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) und Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT), die bei anderen Viruserkrankungen wie *CyHV-3* bereits in Anwendung sind, haben das Potential auch bei CEV in Zukunft eingesetzt zu werden. Dazu ist jedoch zunächst weitere Forschung im Zusammenhang mit der Immunantwort des Wirtes auf eine CEV-Infektion sowie die Entwicklung einer geeigneten Zellkultur zur Virusreplikation und damit zur Antigenproduktion notwendig.

2.2.7 Differentialdiagnosen

Bei CEV kommen, auf Grund einer relativ unspezifischen Symptomatik, mehrere mögliche Differentialdiagnosen in Frage. So kann eine unzureichende Wasserqualität mit hoher organischer Belastung und entsprechend erhöhten Ammonium- und Nitritwerten zu entsprechender Symptomatik führen. Bei einer chronischen Ammoniumintoxikation zeigen die betroffenen Fische Hyperplasie und Hypertrophie sowie verstärkte Schleimbildung und Ödeme im Kiemengewebe (BAUR u. RAPP 2003; NOGA 2010). Diese Symptomatik wird weiter verschärft, wenn eiweißreiches Futter eingesetzt wird, da die Fische die größere Menge aufgenommenen Stickstoffs gegen einen erhöhten Gradienten ins Wasser abgeben müssen. In Folge dessen kommt es zu einer Intoxikation des betroffenen Tieres mit Ammonium. Zu beobachtende Symptome können neben den angesprochenen Kiemenveränderungen auch Lethargie und die Verweigerung der Nahrungsaufnahme sein, wie auch bei einer Infektion mit CEV.

Weiterhin führen neben einer nicht optimalen Wasserqualität verschiedene Viruserkrankungen zu KSD-äquivalenten Symptomen. So kann es auch in Folge einer Infektion mit dem Cypriniden Herpesvirus 3 zu deutlichen Kiemenveränderungen, Enophthalmus und Verlusten kommen (BRÄUER 2010). Darüber hinaus sind Erkrankungen mit der Frühlingsvirämie der Karpfen differentialdiagnostisch zu beachten, da es auch hier zu Kiemenveränderungen und Verlusten kommt. Zudem ist der für SVC permissive Temperaturbereich zwischen 7°C und 17°C (BAUR et al. 2010) ebenfalls für Infektionen mit CEV geeignet, insbesondere in Karpfen (siehe dazu auch „Klinik CEV“). Dies wird von Berichten von Lewisch und Mitarbeitern (2015) bestätigt, die Koinfektionen beider Erkrankungen in Karpfen beobachteten.

Wie bereits unter „Differentialdiagnosen“ unter *CyHV-3* erwähnt, können auch Ektoparasiten (z.B. *Ichthyobodo necator*) sowie bakterielle und mykotische Infektionen zu Kiemenveränderungen, starker Schleimbildung und lethargischem Verhalten führen.

2.2.8 Bekämpfung, Behandlung, Kontrolle, Prophylaxe und rechtliche **Rahmenbedingungen**

Pockenviren zeichnen sich in der Umwelt durch eine relativ hohe Widerstandsfähigkeit aus, wenn sie zellgebunden oder von Krusten, Schleim etc. umgeben sind. In diesem Zustand überdauern sie, in Abhängigkeit von der Temperatur, mehrere Wochen bis Jahre ohne Verlust ihrer Infektiosität. Ihre Hülle macht Pockenviren allerdings anfällig gegen extreme pH-Werte (unter 6 und über 9), Reinigungsmittel und fettlösende Substanzen (SELBITZ et al. 2015). Es ist davon

auszugehen, dass sich diese Angaben in gewissem Maße auch auf CEV übertragen lassen. Gesonderte Untersuchungen zur Tenazität von CEV stehen jedoch noch aus.

Es ist davon auszugehen, dass eine Infektion mit CEV zu osmotischen Imbalancen im Blutkreislauf des betroffenen Fisches führt, da den von der Erkrankung stark betroffenen Kiemen eine erhebliche Bedeutung bei der Steuerung des Wasser-Ionen-Gleichgewichts im Fischkörper zukommt (ADAMEK et al. 2017a). Dabei zeigten Blutuntersuchungen betroffener Tiere, dass es unter Infektion zu einer Zunahme des Hämatokritwertes und zu einer Abnahme der Plasmaosmolalität kommt (SENO et al. 2003). Daher wird bereits seit langem bei Koi in Japan eine 0,5 % Salzbehandlung, teilweise kombiniert mit einer Erhöhung der Temperatur auf mindestens 28°C, bei betroffenen Fischen für mindestens 4 Wochen durchgeführt (SENO et al. 2003; WAY et al. 2017; ADAMEK et al. 2017a; MIYAZAKI et al. 2005; ZHANG et al. 2017). Seno und Mitarbeiter (2003) zeigten, dass diese Behandlung die Mortalitäten in betroffenen Beständen erheblich reduziert und Hämatokrit und Plasmaosmolalität stabilisiert. Zudem senkt Salz die Toxizität von Nitrit und wirkt damit der Methämoglobinbildung im Blut entgegen (WAY et al. 2017; MIYAZAKI et al. 2005).

Eine Salzbehandlung ist somit eine geeignete Methode die Symptome erkrankter Fische zu lindern und die Mortalitäten in betroffenen Beständen zu senken. Allerdings besteht ein Nachteil dieser Methode, bei einer Behandlung vor dem Export, in der Erzeugung von symptomlosen Trägern des Virus, da eine Salzbehandlung zwar die Symptome bessert aber keine Viruselimination bewirkt (ADAMEK et al. 2017a). Adamek und Mitarbeiter (2017a) konnten erst einen Monat nach Abklingen der letzten Symptome keine Virus-DNA mehr in betroffenen Fischen mittels qPCR nachweisen.

Bei der Bekämpfung von CEV werden seit seiner zunehmenden Verbreitung verschiedene Ansätze verfolgt. So gilt für CEV, wie auch für das *CyHV-3*, dass neu erworbene Tiere zunächst in Quarantäne gehalten werden sollten, bevor sie in einen bestehenden Bestand gelangen. Dazu empfehlen Hesami und Kollegen (2015) als wirkungsvolle Prophylaxe gegen CEV eine Quarantänezeit von mindesten 30 Tagen bei einer Wassertemperatur von 15°C bis 25°C.

Eine weitere Möglichkeit zur Eindämmung und Bekämpfung von CEV besteht in der Züchtung resistenter Karpfenlinien. So testeten Adamek und Kollegen (2017a) unterschiedliche Karpfenlinien und Koi auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Infektion mit CEV. Dabei zeigten Amur Karpfen die stärkste Resistenz gegen CEV und entwickelten keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung an der Koi Sleepy Disease. Demgegenüber wiesen Karpfen der Linie Ropsha deutliche morphologische Veränderungen während der Infektion auf, zeigten jedoch kaum klinische Symptome.

In Prerov Schuppenkarpfen und Koi konnten hohe Viruslasten nachgewiesen werden und betroffene Tiere zeigten in erheblichem Umfang klinische Symptome (ADAMEK et al. 2017a). Inwieweit sich die als relativ widerstandsfähig gezeigten Amurkarpfen für Zuchtprojekte eignen, muss in weiteren Kreuzungsversuchen untersucht werden.

CEV ist in Deutschland weder melde- noch anzeigepflichtig. Es existieren keine weiterführenden rechtlichen Vorgaben zur Bekämpfung oder Eradikation der Erkrankung.

2.3 Karpfenpathogenes Paramyxovirus

Über das als karpfenpathogenes Paramyxovirus beschriebene Virus ist bislang relativ wenig bekannt. Die erste Entdeckung und Beschreibung erfolgte durch Neukirch und Kunz (2001) in Isolaten aus Karpfen, die Kiemennekrosen aufwiesen und in deren Beständen Verluste aufgetreten waren. Zudem waren oftmals 2 bis 4 Wochen vor Auftreten der Symptome neue Fische in eine bestehende Fischgruppe eingesetzt worden. Erkrankte Fische zeigten unspezifische Symptome wie Lethargie, Orientierungslosigkeit, verstärkte Atmung und Anorexie. Zudem traten in den meisten Fällen erhöhte Mortalitäten auf. Als die häufigsten pathologischen Veränderungen wurden Verfärbungen und Nekrosen der Kiemen festgestellt (NEUKIRCH u. KUNZ 2001).

Die Infektion unterschiedlicher Karpfenzelllinien mit dem von Neukirch und Kunz (2001) unter den Nummern 1551 und 1609 geführten Isolaten ergaben einen positiven CPE in den Zelllinien Ca F-2, CCB, CCG und EPC. Dieser war durch Synzytienbildung in allen Zelllinien nach 5 bis 10 Tagen nach erfolgter Infektion gekennzeichnet. Weiterhin wurden die Isolate mittels Chloroform behandelt, womit gezeigt werden konnte, dass sie über ein RNA-Genom verfügen (NEUKIRCH und KUNZ 2001). Granzow und Kollegen (2013) beobachteten, dass eine Behandlung mit Chloroform die Infektiosität des Virus erheblich reduziert und schlossen auf ein behülltes RNA-Virus. Body und Kollegen (2000) beobachteten bei einer Kulturtemperatur von 21°C nach 14 bzw. 21 Tagen einen ebenfalls durch Synzytienbildung charakterisierten CPE. Allerdings führte lediglich die Inokulation von Kiemenproben zu entsprechenden Veränderungen der Zellkultur, während Versuche an Milz und Niere erkrankter Karpfen negativ verliefen (BODY et al. 2000). Auch zeigte die Verwendung unterschiedlicher Kulturtemperaturen von 14°C, 21°C und 28°C, dass bei 21°C die besten *in vitro* Replikationsergebnisse für dieses Virus erzielt werden konnten (BODY et al. 2000).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass reife Viruspartikel eine Größe von 150 bis 200 nm (300 nm) aufwiesen und von stachelartigen Fortsätzen umgeben waren (BODY et al. 2000; GRANZOW et al. 2014), welche ca. 12 bis 16 nm lang sind (GRANZOW et al. 2013). Neukirch und Kunz (2001) fanden behüllte RNA-haltige Virionen im Zytoplasma und in Vakuolen infizierter CCB-Zellen und beschrieben deren Morphologie als kugelförmig bzw. in Einzelfällen auch als filamentös. In infizierten Zellen waren zahlreiche Knospungen an der Zelloberfläche zu beobachten (GRANZOW et al. 2013). Insgesamt ergaben die Analysen dieses neuen RNA-Virus Ähnlichkeiten mit *Arena*-, *Ortho*- und *Paramyxoviridae.* Es konnte allerdings keine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Gruppen nachgewiesen werden. Für eine nähere Klassifizierung dieses Virus sind weitere molekularbiologische und biochemische Untersuchungen notwendig (GRANZOW et al. 2013).

2.4 Zelllinien aus Fischen[1]

Zellkulturen können aus zahlreichen Geweben und Organen im Prinzip aller Fischspezies entwickelt werden (FRYER u. LANNAN 1994). So gibt es etablierte Zelllinien unterschiedlicher Organsysteme aus allen kommerziell gehaltenen Fischarten und solchen, die als Modelltiere in der Forschung Anwendung finden, wie dem Zebrabärbling (*Danio rerio*). In der Datenbank „ExPASy“ (SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS) des Schweizer Instituts für Bioinformatik lassen sich unter dem Stichwort „fish“ mehrere hundert Zelllinien aus unterschiedlichen Fischspezies finden.

Dabei können zwei Kulturtypen voneinander unterschieden werden. Zum einen die Primärkulturen, die auf Zellen basieren, die direkt aus Fischen entnommen wurden und *in vitro* weiter kultiviert werden und zum anderen Zelllinien, die durch wiederholtes subkultivieren von Primärkulturen erzeugt werden (GANASSIN et al. 2000). Dabei liegt der Vorteil der Primärkulturen im Erhalt ihrer differenzierten Gewebefunktionen (BOLS u. LEE 1991).

2.4.1 Verwendung und Charakterisierung von Zelllinien

Es gibt unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten von Fischzelllinien, die sich aber im Wesentlichen in einige Kernbereiche zusammenfassen lassen. Eine Hauptanwendung ist die Untersuchung von Infektionskrankheiten bei Fischen,

[1]Dieses Kapitel orientiert sich teilweise an der Struktur der Publikation „Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish“ (BOLS u. LEE 1991).

insbesondere Viruserkrankungen und die artspezifische Reaktion unterschiedlicher Fischspezies auf die Infektion (FRYER u. LANNAN 1994; GANASSIN et al. 2000; LAKRA et al. 2010). Zudem zeigen die meisten Viren einen mehr oder weniger deutlichen Tropismus zu bestimmten Zelltypen, Geweben und Organen. Dies macht die Entwicklung geeigneter Zelllinien für die erfolgreiche Virusreplikation und -reisolation unabdingbar (LAKRA et al. 2010). Darüber hinaus spielen Zelllinien eine wichtige Rolle bei der Beschreibung neuer Viren. So gaben Neukirch und Kunz (2001) 7 verschiedene Virusisolate aus erkrankten Karpfen auf 4 Karpfenzelllinien (Ca F-2, CCB, CCG, EPC) und beobachteten, ob es zu einem Cytopathischen Effekt in den infizierten Zellen kam. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur näheren Quantifizierung der Replikationsrate einer Zelllinie für ein bestimmtes Virus sowie die Menge an Viruspartikeln aus dem Mediumüberstand bzw. den Gehalt viraler mRNA aus der Zellkultur mittels PCR-Analyse zu bestimmen (RAKERS et al. 2018). Diese Verfahren eignen sich auch zum Vergleich unterschiedlicher Zelllinien in Bezug auf ihre Replikationsfähigkeit eines bestimmten Virus.

Weiterhin spielt bei der Entwicklung neuer Zelllinien die Charakterisierung des Zellltyps eine entscheidende Rolle. Dies kann unter anderem durch mikroskopische bzw. elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie erfolgen (KU u. CHEN 1992). In diesem Zusammenhang werden auch die Verbindungen zu Nachbarzellen und das Auftreten von Zellkontakthemmung ausgewertet (LIN et al. 2013). Des Weiteren kann die Charakterisierung mit Hilfe der Immunzytochemie erfolgen, bei der Antikörper gegen gewebespezifische Proteine verwendet werden, um diese mittels einer Antigen-Antikörperagglutinationsreaktion sichtbar zu machen. So charakterisierten Lin und Kollegen (2013) die KF-101-Zellen mittels Antikörpern gegen die epithelialen Marker Keratin, Cx43 und Occludin als epithelial. Die negativ verlaufende Untersuchung auf den mesenchymalen Marker Vimentin unterstützte diese Ergebnisse.

Um die ccApin Zelllinie aus Flossenzellen von Karpfen zu charakterisieren, nutzten Rakers und Kollegen (2018) Antikörper gegen ein Tight-Junctions Protein (ZO-1), gegen ein Tumorprotein (tp63) und gegen Cytokeratin 7 (krt7). Somit besteht die Möglichkeit mittels gewebe- bzw. zelltypspezifischer Antikörpern gegen die gesuchten Marker eine Zelltypcharakterisierung durchzuführen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit mittels einer Reversen-Transkription qPCR oder einer Endpunkt-PCR die Genexpression verschiedener Markergene quantitativ auszuwerten und somit Rückschlüsse auf die in der Kultur vorhandenen Zelltypen zu ziehen. Als Beispiele geeigneter epithelialer Marker sind hier Keratin (krt8) und Cadherin (cdh1) sowie als mesenchymale Marker Fibronektin (fn1a) und Kollagen (cola1a1) zu nennen (RAKERS et al. 2018).

Weiterhin eignen sich Zelllinien zur Betrachtung der Biochemie und Zellbiologie von Fischgeweben (BOLS u. LEE 1994). So führten Bols und Kollegen (1992) unterschiedliche Versuche zur Temperaturverträglichkeit von Fischgeweben an RTG-2 Zellen durch (BOLS et al. 1992). Darüber hinaus kann man an Zelllinien molekularbiologische und genetische Aspekte, sowie die Differenzierung von Geweben und einzelnen Zellen untersuchen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Ganassin und Bols (1996) zu nennen, die die Differenzierung von Blutzellen in Kultur untersuchten (GANASSIN u. BOLS 1996). Für unterschiedliche Anwendungen im Bereich der Grundlagenforschung, wie Neurobiologie oder Kiemenphysiologie eignen sich in besonderer Weise Primärkulturen (GANASSIN et al. 2000). Als Beispiele sind Leukozytenkulturen für Immunologie, Hepatozytenkulturen für Toxikologie und Hypophysenzellen für endokrinologische Untersuchungen zu erwähnen (BOLS u. LEE 1991). Für toxikologische und umwelttoxikologische Untersuchungen können sowohl Zelllinien als auch Primärkulturen verwendet werden (GANASSIN et al. 2000). Es gibt unterschiedliche Vorteile von Zelllinien gegenüber Primärkulturen: So erlangen Zelllinien durch das wiederholte Subkultivieren eine zunehmend homogene Zusammensetzung, wodurch die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse steigt. Demgegenüber ist die erneute Herstellung einer identischen Primärkultur aus einem Organ schwierig (BOLS u. LEE 1991). Des Weiteren befinden sich Primärkulturen während des Versuchs oft in der Erholungsphase von dem durch die Bearbeitung entstandenen Trauma. Auch besteht bei der Verwendung von Primärkulturen immer das Risiko einer Kontamination der Gewebe mit Pathogenen (BOLS u. LEE 1991). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Entscheidung welche Zellen verwendet werden an den Zielen der jeweiligen Studie orientieren sollte (BOLS u. LEE 1991).

2.4.2 Kontaminationen und Passage-Effekte

Die geringen Anforderungen von Fischzelllinien an die Kulturbedingungen machen unter anderem Kreuzkontaminationen mit anderen Zellen zu einem regelmäßigen Problem in der Kultur (LAKRA et al. 2010). Infolge von Intra- und Interspezies-Kontaminationen können entsprechende Ergebnisse nicht mehr reproduziert werden. Neben den angesprochenen Kontaminationen kann allerdings auch die über lange Zeit durchgeführte Subkultivierung die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen senken.

So beschreiben Yu und Kollegen (1997) Beobachtungen nach denen mit zunehmender Passage Caco-2 Zellen geringere morphologische Vielfalt, ein höherer transepithelialer elektrischer Widerstand, höhere transzellulare Diffusion, niedrigere parazellulare Diffusion und einen geringeren carrier-vermittelten Transport sowie eine geringere Aktivität der alkalischen Phosphatase aufweisen. Diese Ergebnisse

lassen den Schluss zu, dass die untersuchten Zellen durch die Subkultivierung ihre biologischen Charakteristika und Transporteigenschaften deutlich verändern. Dies liegt an einer reduzierten Expression verschiedener Transportproteine, die sich mit zunehmender Passage einstellt. Die Autoren gehen als Ursache davon aus, dass das wiederholte Subkultivieren zu einer Selektion schnell wachsender Zelltypen in der zunächst heterogenen Caco-2-Zellkultur führt (YU et al. 1997). Diese verdrängen dann nach und nach langsam wachsende Zellen (LAKRA et al. 2010). Zudem führt dies oft zu einem Verlust der Charakteristiken des Ausgangsgewebes (MCKEE u. CHAUDHRY 2017).

2.4.3 Verwendete Ursprungsgewebe

Embryonen

Zellen aus Fischembryonen oder Larven zeichnen sich durch eine einfache Kultivierbarkeit aus. Es wurden mehrere Stammzelllinien aus Fischembryonen etabliert, wobei besonders Zellen aus Modellfischen wie Zebrabärbling (*Danio rerio*) und Reiskärpfling (*Oryzias latipes*) verwendet wurden. Zudem wurde aus Embryonen des Blastulastadiums von *Lateolabrax japonicus* die pluripotente Zelllinie LJESI entwickelt, die sich nach Tretinoin-Gabe in unterschiedliche Zellen differenziert (CHEN et al. 2003). Eine kontinuierliche Zelllinie (SISE) im Blastulastadium sowie eine pluripotente Stammzelllinie SBES wurde aus Embryonen des Barramundi (*Lates calcarifer*) entwickelt (PARAMESWARAN et al. 2007). Des Weiteren gelang die Entwicklung einer pluripotenten Stammzelllinie aus Embryonen von Welsen (*Heteropneustes fossilis*) (LAKRA et al. 2010).

Gonaden

Ein weiterer *in vitro* einfach zu kultivierender Gewebetyp sind die Gonaden. So wurde bereits 1962 aus gepoolten und unreifen Gonaden von Regenbogenforellenjährlingen die RTG-2 Zelllinie entwickelt. Die verwendeten Gonaden wurden makroskopisch als unreife Ovarien identifiziert. Allerdings schlossen die Autoren auch den Eintrag von testikulärem Gewebe nicht aus. In Bezug auf ihren Zelltyp sind RTG-2 Zellen den Fibroblasten zuzuordnen. Dies zeigt auch die spindelförmige Morphologie der RTG-2 Zellkörper. Eine Analyse des Vimentingehalts, das ein charakteristisches Protein in Intermediärfilamenten mesenchymaler Zellen darstellt, bestätigte den Zelltyp (BOLS u. LEE 1991).

Weitere Zelllinien, die auf Zellen aus Gonaden basieren, wurden aus Zellen von Froschwels (*Clarias batrachus*), Hecht (*Esox lucius*) und Koi (*Cyprinus carpio*) entwickelt (BOLS u. LEE 1991). Weiterhin gibt es mehrere Zelllinien aus Ovarzellen z.B. des getüpfelten Gabelwelses (*Ictalurus punctatus*), der Schleie (*Tinca tinca*) und des Atlantischen Laches (*Salmo salar*), sowie eine Zelllinie aus Hodengewebe des Seehasen *(Cyclopteridae)* (WOLF u. MANN 1980). Die genannten Zelllinien werden vor allem in der Virologie eingesetzt.

Hypophyse

Ein weiterer genutzter Zelltyp sind die Zellen der Hypophyse. Dabei wurden bislang Zellen von Goldfisch-, Regenbogenforelle-, und Karpfenhypophysen im Rahmen von Primärkulturen betrachtet. Chang und Mitarbeiter (1984) untersuchten unter anderem Hypophysenzellen von Goldfischen auf 24-Well-Platten, um die Regulation von Gonadotropin zu erforschen. Dabei betrachteten sie die Regulationsfaktoren Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), Dopamin, Norepinephrin und Calcium (CHANG et al. 1984). Weitere Untersuchungen an Primärkulturen aus Hypophysenzellen dienten ebenfalls dazu, spezifische Regulationsmechanismen der Hypophyse zu betrachten (BOLS u. LEE 1991).

Pankreas

Darüber hinaus werden Primärzellkulturen aus Inselzellen des Pankreas von Armflossern (*Lophiiformes*) verwendet, um die Effekte von Glukose und Arginin auf die Biosynthese der Inselzellen zu untersuchen (BAUER u. NOE 1985).

Leber

Aus Lebergewebe wurden die meisten existierenden Primärkulturen hergestellt. Diese wurden zum einen für physiologische und biochemische Forschungen am Leberstoffwechsel und zum anderen für toxikologische Studien verwendet (BOLS et al. 2005). Des Weiteren sind mehrere Leberzelllinien entwickelt worden: YEL-13 aus embryonaler Leber des Masou-Lachses (*Oncorhynchus masou masou*) und RTL-4 aus Lebern von Forellensetzlingen. Weiterhin wurde die Leberzelllinie R1 aus Regenbogenforellen beschrieben (KROVACEK et al. 1987). Darüber hinaus wurde eine Barschleber-Zelllinie mit einer fibroblastenartigen Morphologie etabliert. Ein weiterer Bereich von Zelllinien aus Lebergewebe sind jene, die aus einem Leberzellkarzinom angelegt wurden. So gelang die Induktion eines solchen

Karzinoms in einem Inzuchtstamm des Reiskärpflings (*Oryzias latipes*) mittels Methylazoxymethylacetat. Aus den daraus gewonnenen und auf Kultur gebrachten Zellen entstand die Zelllinie OLHE-131. Die Leberkarzinomzelllinie RTH-149 basierte auf einem Aflatoxin induzierten Karzinom in adulten Regenbogenforellen und wurde dazu verwendet, Interferonaktivität der Zellen zu testen (GRAHAM u. SECOMBES 1990) sowie das Enzym CMP Neu Ac: Laktosylceramid alpha 2-3 Sialytransferase der Glykolipidsynthese zu charakterisieren (OSTRANDER u. HOLMES 1991). Darüber hinaus wird die Zelllinie RTH-149 zum Nachweis direkt wirksamer Toxine wie z.B. Anthracen eingesetzt (BOLS u. LEE 1991). Des Weiteren synthetisiert sie das HitzeschockProtein 70 (hsp70) in Reaktion auf Zinkzugabe oder einen Hitzeschock und Metallothioneine als Reaktion auf die Zugabe von Cadmium oder Zink (MISRA et al. 1989). Somit lassen sich mit dieser Leberkarzinomzelllinie zum einen unterschiedliche Stoffwechselvorgänge in verändertem Lebergewebe und zum anderen verschiedene Toxine und physikalische Einwirkungen auf Zellen untersuchen.

Niere

Die Niere lässt sich bei Fischen in Kopf- und Rumpfniere unterteilen. Dabei dient die Kopfniere hauptsächlich der Blutbildung und wird als Ausgangsgewebe für Primärkulturen aus Lymphozyten und Makrophagen verwendet. Die Rumpfniere, die Glomerula und Nephrone enthält, wird als Quelle für Primärkulturen aus Nierenzellen verwendet. Zur Entwicklung einer Zellkultur wird normalerweise das gesamte Nierengewebe eingesetzt (BOLS u. LEE 1991). Die Gewinnung der Leukozyten für die Kultur wird durch mechanische Zerkleinerung der Kopfniere durch Zerreiben in einem Stahlsieb erreicht (BRAUN-NESJE et al. 1981), wobei auch andere Zerkleinerungsmethoden wie Nylon genutzt werden können. Zur Auftrennung der Leukozyten wurden für mehrere Fischspezies Methoden auf Grundlage der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Blutbestandteile entwickelt (BOLS u. LEE 1991).

Weiterhin besteht die Möglichkeit mittels mitogen wirksamer Substanzen Leukozyten zur Proliferation anzuregen. Dies wurde erfolgreich bei Leukozyten der Kopfniere mit Hilfe von Lektinen und anderen antigen-wirksamen Substanzen unter anderem bei Regenbogenforellen (ETLINGER et al. 1976) und Karpfen (GHANMI et al. 1988) durchgeführt. Dabei beobachteten Ghanmi und Kollegen (1989), dass Zink und Mangan eine mitogene Wirkung auf Karpfenlymphozyten entfalteten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des Mitogens Concanavalin A bei Regenbogenforellenleukozyten zur Freisetzung des Makrophagen-Aktivierungsfaktor (MAF) und zu Interferonaktivität führt (GRAHAM u. SECOMBES, 1990). Faisal und

Ahne (1990) untersuchten an der Zelllinie CLC aus Karpfenleukozyten die mitogene Wirkung von Lipopolysacchariden aus *Escherichia coli*, Concanavalin A, Phytohemagglutinin und *Staphylococcus-aureus*-Zellsuspension, sowie die proliferative Wirkung von Tumornekrosefaktor und Interleukin-2 auf Karpfenleukozyten. Dabei beobachteten die Autoren einen signifikanten Anstieg der Zellteilung nach Zugabe des Tumornekrosefaktors und des Interleukin-2. Bei den verwendeten Mitogenen führten Lipopolysaccharide und Concanavalin A zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation der behandelten Leukozyten während die Verwendung von Phytohemagglutinin und *Staphylococcus-aureus*-Zellsuspension zu keiner signifikanten Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe führte (FAISAL u. AHNE 1990).

Makrophagenkulturen auf Basis von Makrophagen aus der Kopfniere werden in der bereits beschriebenen Weise vorbereitet: Durch mechanische Zerkleinerung von Gewebefragmenten aus der Kopfniere werden zunächst die Makrophagen freigesetzt, um dann durch Zentrifugation eine Auftrennung der einzelnen Zellen auf Basis ihres spezifischen Gewichts zu erreichen. Mit Hilfe dieser Technik wurden mehrere Zellkulturen aus Makrophagen für Regenbogenforelle (BRAUN-NESJE et al. 1981), atlantischen Lachs (BRAUN-NESJE et al. 1981) und Karpfen (BAYN 1986) vorbereitet. In der Regel werden Makrophagenkulturen in Suspensionskulturen zur Bestimmung von Phagozytose, Chemotaxis und Pinozytose gepflegt. Da Makrophagen in der Lage sind sich am Boden eines geeigneten Glas- oder Plastikgefäßes anzuhaften, besteht eine weitere Möglichkeit der Kultivierung in entsprechenden Gefäßen mit FKS-haltigem Medium (BRAUN-NESJE et al. 1981).

Darüber hinaus gibt es auch Primärkulturen aus Zellen des Nierentubulus der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*). Diese werden verwendet, um epitheliale Transportmechanismen näher zu untersuchen (HIGHTOWER u. RENFRO 1988). Zudem lassen sich verschiedene Eigenschaften der intakten Tubuluszellen wie Hexose-Re-Absorption und Sulfatsekretion an diesem Zellmodell untersuchen (BOLS u. LEE 1991).

Es gibt weiterhin verschiedene Zelllinien aus den Nieren unterschiedlicher Fischarten mit Epithel- oder Fibroblastenartiger Morphologie. Dazu gehören unter anderem folgende Spezies: Froschwels (*Clarias batrachus*), Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Aal (*Anguilla anguilla*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Schlangenkopffisch (*Channidae*) und Zackenbarsch (*Epinephelus awoara*). Zudem gibt es eine Zelllinie aus dem Nierenzellkarzinom einer Regenbogenforelle. Insgesamt werden die hier aufgezählten Zelllinien hauptsächlich zur Untersuchung und Isolation unterschiedlicher Viren verwendet und dienen erst in zweiter Linie der Erforschung von Nierenstoffwechsel und –gewebe (BOLS u. LEE 1991).

Stannius

Die Stannius-Körperchen sind endokrine Organe, die an der Niere aller Teleostei sitzen und Teleocalcin sezernieren. Dabei handelt es sich um ein hormonell wirksames Glycoprotein, das den Transport von Calcium über die Kiemen hemmt. Zur näheren Betrachtung der Steuerungsfaktoren der Teleocalcinsekretion erstellten Gellersen und Kollegen (1988) Primärkulturen aus Stannius-Körperchen aus Regenbogenforellen (GELLERSEN et al. 1988). Es gibt allerding keinerlei Berichte über eine etablierte Zelllinie aus Stannius-Körperchen (BOLS u. LEE 1991).

Milz

Die Milz enthält, wie auch die Kopfniere, zahlreiche Leukozyten, die als Basis für Leukozytenkulturen genutzt werden. Für *in-vitro*-Stimulationsversuche mit Lektinen und verschiedenen Antigenen wurden unter anderem Milzzellen folgender Fischspezies verwendet: Regenbogenforellen (ETLINGER et al. 1976), Blauer Sonnenbarsch (*Lepomis macrochirus*) (CUCHENS u. CLEM 1977) und Silber- sowie Königslachs (YUI u. KAATTARI 1987). Eine häufige Anwendung von Milzzellen in Kultur ist ihre Verwendung in einem passiven Plaque-Assay zum Nachweis Antikörper-produzierender-Zellen in Fischen (KAATTARI et al. 1986). Makrophagen aus der Milz von Karpfen bilden Riesenzellen, sodass Zellsuspensionen aus Milzzellen dazu verwendet werden können, Effekte von Pestiziden auf die Phagozytose zu untersuchen (COSSARINI-DUNIER 1987). Es gibt vergleichsweise wenige Zelllinien aus Milzzellen, wobei ein Beispiel die SP-2 Zelllinie aus dem australischen Grunzbarsch *Bidyanus bidyanus* mit einer Fibroblast-artigen Morphologie darstellt (BOLS u. LEE 1991).

Thymus

Aus dem Thymus einiger Fischspezies werden trotz seiner teilweise geringen Größe Primärzellkulturen angelegt. Im Thymusgewebe vorherrschende Zelltypen sind Thymozyten, Lymphozyten und Makrophagen, die sich durch Zentrifugieren aus einer Zellsuspension gewinnen lassen. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich bei den Thymi von Regenbogenforelle (ETLINGER et al. 1976), Blauem Sonnenbarsch (CUCHENS u.CLEM, 1977) und getüpfeltem Gabelwels (ELLSAESSER et al. 1988) angewendet. Dazu durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass sich bereits die Zellen im Thymus erfolgreich mit Mitogenen wie Concanavalin A stimulieren lassen (BOLS u. LEE 1991).

Blut

Neben der Isolation von Leukozyten und Makrophagen aus Milz, Thymus, Peritoneum und Niere besteht auch die Möglichkeit diese aus peripherem Blut zu isolieren. Auch hier wurde die Reaktion der Leukozyten auf verschiedene Mitogene untersucht, wobei unter anderem folgende Fischarten verwendet wurden: Regenbogenforelle (ETLINGER et al. 1976), Karpfen (CASPI u. AVTALION 1984) und Blauer Sonnenbarsch (CUCHENS u. CLEM 1977). Dabei wurden Concanavalin A, Lipopolysaccharide, Phytohemagglutinin und Pokeweed Mitogen verwendet, um die isolierten Leukozyten zu stimulieren. So wurden mehrere Primärkulturen aus Makrophagen angefertigt, um ihre Rolle in der Lymphozyten-vermittelten Antwort auf die Stimulation durch Mitogene zu untersuchen. Es gibt bislang wenige Zelllinien aus Zellen des peripheren Blutes. Als ein Beispiel ist die CLC-Zelllinie (FAISAL u. AHNE 1990) aus Karpfenleukozyten zu nennen, die Charakteristiken von Monozyten bzw. Makrophagen, wie Anheften an geeignete Oberflächen und Phagozytose zeigt (BOLS u. LEE 1991). Zudem weist sie eine epitheloide Morphologie auf (FAISAL u. AHNE 1990).

Herz

Es gibt sowohl Zelllinien als auch Primärkulturen aus Herzzellen verschiedener Fische. Dazu wurden unter anderem Cardiozyten aus Atrium und Ventrikel von *Gila atraria* in Primärkulturen kultiviert, um die Sekretion des atrialen natriuretischen Peptids zu untersuchen (BARANOWSKI u. WESTENFELDER 1988). Darüber hinaus gibt es Zelllinien aus dem Herz von Barsch (*Lateolabrax japonicus*) (NICHOLSON et al. 1987), Atlantischem Lachs (WOLF u. MANN 1980) und Ketalachs (*Oncorhynchus keta*) (LANNAN et al. 1984). Diese werden im Wesentlichen für virologische Untersuchungen verwendet.

Schwimmblase

Die Schwimmblase wird als ein geeignetes Gewebe für die Gewinnung von sehr sauberen Gewebeexplantaten beschrieben (BOLS u. LEE 1991). Es gibt eine Zelllinie aus der Schwimmblase des *Bairdiella chrysoura* (WHARTON et al. 1977). Weiterhin wurde von Luc Rougée und Kollegen (2007) die fibroblastenartige Zelllinie GFSB aus Schwimmblasenzellen von *Carassius auratus* entwickelt, die empfänglich für IPNV und IHNV ist und für Untersuchungen an diesen Viren genutzt wird (ROUGEE et al. 2007).

Muskulatur

Darüber hinaus gibt es Primärkulturen aus Sattellitenzellen der Skelettmuskulatur von Regenbogenforellen (POWELL et al. 1989) und Karpfen (KOUMANS et al. 1990), die zur Untersuchung der Zellphysiologie im Wachstum des Fischmuskels genutzt werden. Des Weiteren wurden Zelllinien aus der Stammmuskulatur von Fischen entwickelt (WOLF u. MANN 1980). Eine weitere Zelllinie aus Muskelzellen ist die GFM-Zelllinie aus Zellen des Goldfischs (*Carassius auratus*). Sie zeichnet sich durch eine epitheliale Morphologie und Sensibilität gegenüber IPNV und IHNV aus (ROUGEE et al. 2007).

Nervengewebe

Zudem gibt es Primärzellkulturen aus verschiedenen neuronalen Geweben. Dazu wurden Primärkulturen aus Oligodendrozyten aus dem Gehirn von Regenbogenforellen angelegt, um Regeneration und Remyelisation von Nervenzellen zu betrachten (JESERICH u. RAUEN 1990). Darüber hinaus enthält das Gehirn von Fischen relativ viel Docosahexaensäure (BOLS u. LEE 1991). Um die Bedeutung dieser Fettsäure im neuronalen Gewebe von Fischen besser zu verstehen, wurden Primärkulturen von Astrozyten aus dem Gehirn von Regenbogenforellen angelegt (TOCHER u. WILSON 1990). Die Charakterisierung der Kultur erfolgte über den Nachweis von saurem Gliafaserprotein in den Intermediärfilamenten. Die untersuchten Zellen konnten damit den Astrozyten zugeordnet werden (BOLS u. LEE 1991). Weiterhin werden Gehirnzelllinien auch zur Replikation und Reisolation von Viren verwendet. In diesem Zusammenhang ist die CCB-Zelllinie aus dem Gehirn von Karpfen (*Cyprinus carpio*) zu nennen, die insbesondere für Untersuchungen an *CyHV-3* verwendet wird (NEUKIRCH et al. 1999).

Kiemen

Es gibt Kiemenzellkulturen aus Kiemenzellen des Froschwelses (*Clarias batrachus*) (WOLF u. MANN 1980) und des Kois (BOLS u. LEE 1991), wobei physiologische Funktionen der Kiemen, vor allem an Primärkulturen untersucht werden. Zu diesem Zweck kultivierten Naito und Ishikawa (1980) über ein bis zwei Wochen Zellsuspensionen aus Kiemenzellen von Aalen (*Anguilla japonica*) (NAITO u. ISHIKAWA 1980). Zudem findet die Kiemenzelllinie BG/G aus *Lepomis macrochirus* in der Toxikologie als Bioindikator für verschiedene Selen und Arsenverbindungen Anwendung. Sie wurde als Fibroblastenzelllinie charakterisiert (BABICH et al. 1989).

Integument

Des Weiteren gibt es verschiedene Zelllinien und Primärzellkulturen aus unterschiedlichen Zellarten des Integuments der Fische. So werden Pigmentzellen aus isolierten Schuppen zur Untersuchung von Organellenbewegung verwendet. Dazu wurden unter anderem Primärkulturen aus Melanophoren, Erythrophoren und Xanthophoren von Goldfischen genutzt (MASADA et al. 1990). Auch konnten bei den Arbeiten unter anderem Enzyme für die Pteridinsynthese in Erythrophoren- und Melanophorenzellkulturen aus Goldfischen nachgewiesen werden (MASADA et al. 1990). Darüber hinaus wurden aus Melanophoren des Reiskärpflings (*Oryzias latipes*) Primärkulturen hergestellt, an denen der Einfluss von Collagen und Fibronektin auf die Wanderbewegung der Melanophoren untersucht wurde. Neben den bereits angesprochenen Primärkulturen gibt es auch mehrere etablierte Zelllinien aus Pigmentzellen, wie die Goldfischerythrophorom-Zelllinie GEM 81, die auf tumorös veränderten Erythrophoren des Goldfischs basiert (MATSUMOTO et al. 1980). Darüber hinaus gibt es eine weitere Zelllinie aus *Xiphophorus* sp.-Melanomzellen (LAKRA et al. 2011).

Flossen

Ein weiteres Gewebe aus Fischen, welches in der Zellkultur Anwendung findet, sind die Flossen. Diese wurden besonders für Versuche im Zusammenhang mit dem Effekt von UV-Strahlung auf Zellen genutzt. Regan und Cook (1967) führten entsprechende Versuche mit einer Zelllinie aus Fibroblasten des Blaustreifen-Grunzerfischs (*Haemulon sciurus*) durch (REGAN u. COOK 1967). Weitere Zelllinien aus Fibroblasten, die in diesem Kontext Anwendung fanden, sind die CAF-MM1 Zelllinie (BOLS u. LEE 1991) und die RBCF-1 Zelllinie (SHIMA et al. 1980), die beide auf Zellen aus der Schwanzflosse des Goldfischs basieren. Dabei finden Zelllinien aus Flossen im Wesentlichen Anwendung im Bereich der virologischen Forschung. Daneben werden Flossenzelllinien auch in der Toxikologie verwendet. So wird die Epithelzelllinie BG/F aus Flossengewebe von *Lepomis macrochirus* als Bioindikator für unterschiedliche Selen- und Arsenverbindungen genutzt (BABICH et al. 1989). Weiterhin gibt es einige Zelllinien mit einer epithelialen Morphologie, die aus Flossen von Karpfen, Koi, ostasiatischem Schlammpeitzger (*Misgurnus anguillicaudatus*) und gebändertem Zackenbarsch (*Epinephelus awoara*) entwickelt wurden (BOLS u. LEE 1991). Zudem gibt es Fibroblastenzelllinien aus Flossen des Reiskärpflings (*Oryzias latipes*) (BOLS u. LEE 1991) und des Graskarpfens (*Ctenopharyngodon idella*) (LU et al. 1990). Darüber hinaus wurden mehrere permanente Zelllinien aus der Schwanzflosse von Karpfen bzw. Koi (*Cyprinus carpio*) etabliert, die besonders in der Virusdiagnostik des *CyHV-3* Anwendung finden. Dazu gehören die KF-1 (HEDRICK

et al. 2000), KFC (PIKARSKY et al. 2004), KFC-1 (DONG et al. 2011), KF-101 (LIN et al. 2013) und CCF-K104 –Zelllinie (IMAJOH et al. 2015).

3 Material und Methoden

3.1 Virusherkunft

3.1.1 Cyprinides-Herpesvirus 3

Für alle Infektionsversuche mit dem *CyHV-3* wurde das Virusisolat KHV-T verwendet. Das Isolat wurde vom Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems bezogen. Das *CyHV-3* wurde in Zellkultur vermehrt, durch Einfrieren einer infizierten Zellkultur aus infizierten Zellen freigesetzt und die Virussuspension bei -80 °C für weitere Versuche gelagert.

Für die Infektionsversuche der neu entwickelten Zelllinien mit *CyHV-3* aus Feldinfektionen wurde Virus aus unterschiedlichen Geweben klinisch erkrankter Fische isoliert. Dazu wurden hochgradig an einer KHV-Infektion erkrankte Fische getötet und Organproben aus Darm, Gehirn, Kieme, Leber, Milz und Niere gewonnen. Diese wurden zunächst gewogen und anschließend mit Mörser und Stößel unter Verwendung von Sand fein zerrieben, um eine optimale Freisetzung des Virus aus den Zellen zu erreichen. Danach wurde dem zerkleinerten Gewebe in Abhängigkeit von seinem zuvor bestimmten Gewicht mittels einer 10 ml Pipette (Corning Incorporated, NY) Medium hinzugefügt. Dabei handelte es sich um DMEM-Isolationsmedium, welches auf Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium basiert, dass mit 10% Fetalem Kälberserum, 6 ml Gentamicin und 5 ml Penicillin/Streptomycin angereichert ist. Es befanden sich in der Ausgangslösung 5000 Einheiten Penicillin und 5 mg Streptomycin pro Milliliter. Das Medium und alle Zusätze wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Proben wurden im Anschluss um den Faktor 10, 20 oder 30, in Abhängigkeit von der bestimmten Viruskonzentration in dem entsprechenden Gewebe, verdünnt. Danach wurden sie aus dem Mörser in 15 ml Zentrifugengefäße (Sarstedt, Nümbrecht) umgefüllt und für 2 Stunden bei 4 °C gekühlt gelagert. Im Anschluss wurden alle Proben bei 3219 x g für 30 Minuten bei 8° C zentrifugiert. Danach erfolgte eine Steril-Filtration des virushaltigen Überstandes. Dieser wurde dazu mittels einer 3 ml Einwegspritze durch einen Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit einer Maschenweite von 0,45 µm gepresst, um Kontaminationen durch Bakterien und Pilze zu entfernen. Der gereinigte Überstand wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gefüllt. Zudem wurden 50 µl getrennt abgefüllt, um eine Isolation der Virus-DNA durchzuführen und die genaue Menge des eingesetzten Virus mittels real-time q-PCR zu bestimmen. Die gewonnenen Virusisolate wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.2 Carp Edema Virus

Die Infektionsversuche von Zellkulturen mit dem *Carp Edema Virus* wurden mit unterschiedlichen Isolaten aus erkrankten Karpfen und Koi durchgeführt. Diese wurden im Rahmen der Probennahmen in der Routinediagnostik der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der Tierärztlichen Hochschule Hannover genommen. Zunächst wurden zu diesem Zweck 50 ml Zentrifugengefäße (Corning Incorporated, NY) mit 20 ml Phosphate Buffered Saline (PBS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vorbereitet, wobei das PBS mit 5 ml Penicillin / Streptomycin Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro 500 ml PBS angereichert worden war. Dabei befanden sich in der Ausgangslösung 5000 Einheiten Penicillin und 5 mg Streptomycin pro Milliliter.

Im Anschluss daran wurde ein infizierter Fisch mit deutlicher Symptomatik der Schlafkrankheit der Koi (KSD) zur Virusisolation ausgewählt und nach Betäubung durch Kopfschlag mit einem Nackenschnitt getötet. Den frischtoten Tieren wurden nun mittels Schere und Pinzette die Kiemenbögen mit den Kiemenlamellen auf beiden Seiten heraus genommen und danach zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Puffer verworfen und 20 ml Kulturmediumedium 199 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt, das nach den Angaben in Tabelle 2 angereichert worden war. Das Kiemengewebe wurde nun zusammen mit dem Medium in eine Petrischale gegeben, wo die Kiemenbögen mittels einer Skalpellklinge von den Primärlamellen getrennt wurden.

Im Anschluss daran wurden die separierten Lamellen mit dem Medium zurück in das Zentrifugengefäß übertragen und bei 612 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Mediumüberstand abgegossen, das nach unten zentrifugierte Kiemengewebe gewogen und durch erneute Zugabe von Medium in einem Verhältnis von 1:10 von Gewebe zu Medium verdünnt. Anschließend wurden Kiemenfragmente und Medium in einen Homogenisator (Omnilab, Bremen) überführt, in dem sie bis zur völligen Auflösung der Gewebestruktur gemörsert wurden. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, wobei 3219 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewählt wurden. Der virushaltige Überstand wurde danach mittels einer 5 ml Einwegspritze durch einen Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit einer Maschenweite von 0,45 µm gepresst, um Kontaminationen, insbesondere durch Bakterien, zu entfernen. Der gereinigte Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gefüllt. Im Anschluss erfolgte mittels real-time q-PCR eine Bestätigung der Infektion und eine Isolation der Virus-DNA. Die gewonnenen Virusisolate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.3 Karpfenpathogenes Paramyxovirus

Das verwendete Paramyxovirus-Isolat mit der Laborbezeichnung 1551 wurde von Neukirch und Mitarbeitern aus Koi gewonnen, die aus Beständen mit hohen Mortalitäten und Kiemennekrosen stammten. Dabei handelte es sich um Einsendungen sowohl von privaten Haltern als auch von Großhändlern. Zur Isolation des Virus wurden Leber, Niere, Milz, Haut und Kieme beprobt (Neukirch et al. 2001). Das Virusisolat lag als Kulturüberstand einer infizierten Zellkultur vor und wurde zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2 Zellkultur

Im Rahmen des Projektes wurde zum einen mit Primärzellkulturen und zum anderen mit verschiedenen Zelllinien gearbeitet, die in Abhängigkeit von ihrem Ausgangsgewebe unterschiedlich erzeugt und gepflegt wurden.

3.2.1 Primärzellkultur

Die Primärzellkulturen wurden zum einen als Explantatkulturen aus Flossen und Kiemen erzeugt und zum anderen aus zerkleinerten und durch ein Sieb gestrichenen Kiemenstücken erstellt.

Bei der Erzeugung der Explantatkulturen wurden spezifisch-pathogenfreie Karpfen *Cyprinus carpio* aus der Haltung der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover als Spendertiere verwendet. Dazu wurden zunächst jeweils 3 Fische pro Ansatz mit einem Kopfschlag betäubt und durch einen Nackenschnitt euthanasiert. Den frischtoten Tieren wurden nun mittels Schere und Pinzette die Kiemenbögen mit den Kiemenlamellen auf beiden Seiten entfernt. Zusätzlich wurden die Brust- und Schwanzflossen abgesetzt, um diese später ebenfalls zu kultivieren. Die gewonnenen Gewebestücke wurden in 50 ml Gefäßen (Corning Incorporated, NY) mit 20 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) auf Eis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die dabei verwendete Pufferlösung war mit 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro 500 ml PBS angereichert worden, wobei die Ausgangslösung 5000 Einheiten Penicillin und 5 mg Streptomycin pro Milliliter enthielt.

Zur weiteren Bearbeitung wurde der Puffer verworfen und 10 ml L15 Kulturmedium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt, dessen Zusätze in Tabelle 2 dargestellt sind. Anschließend wurde das Kiemen- oder Flossengewebe mit dem Medium in eine Petrischale überführt, in der dann mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells die Kiemenlamellen von den Kiemenbögen entfernt und die Primärlamellen mechanisch zerkleinert wurden. Bei den Flossenstücken erfolgte eine Entfernung des ersten

Flossenstrahls und eine Zerkleinerung der Gewebestücke auf eine Größe von ca. 3 mm x 3 mm. Nun wurde das Gewebe mit dem Medium mittels einer 10 ml Pipette (Corning Incorporated, NY) und eines Peleusballs in das 50 ml Gefäß zurück übertragen, wo das gesamte Volumen 20-mal in die Pipette aufgezogen und wieder abgelassen wurde, um einen höheren Anteil freier Zellen im Medium zu erreichen.

Im Unterschied dazu wurden bei den Primärzellkulturen aus Kiemenzellen die zerkleinerten Primärlamellen auf ein Sieb mit 100 µm Maschenweite aufgebracht und mit dem Kolben einer 5 ml Einwegspritze durch das Sieb gestrichen. Danach wurde das Sieb mit Medium gespült, wobei bei diesem Verfahren Medium 199 Kulturmedium (Zusätze siehe Tabelle 2) verwendet wurde.

Anschließend wurden die Explantate mit dem entsprechenden Kulturmedium auf Kulturplatten (Nunclon™, Thermo Fisher) mit 24 Vertiefungen aufgebracht, wobei in jede Vertiefung 1 ml gegeben wurde. Die beimpften Platten wurden in Kunststoffboxen bei 20°C und ohne Zusatz von CO_2 für 14 bis 21 Tage kultiviert, bevor sie mit den oben genannten Viren infiziert wurden. Die Primärzellkulturen aus Kiemenzellen wurden bei 20°C und 2 % CO_2 inkubiert. Auf dem Boden der Inkubationsboxen wurden mit 1%-iger Kupfersulfatlösung behandelte Zellstofftücher eingebracht, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern und der Schimmelbildung auf den Kulturen entgegen zu wirken. Es erfolgte eine tägliche Begutachtung der Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Konfluenz des Zellrasens im Bereich der Explantate, dem Anteil abgestorbener Zellen und der Schimmelbildung im Medium.

3.2.2 Zelllinien und Kulturen

Für die Untersuchungen wurden folgende Zelllinien aus Karpfengewebe verwendet: ccAcar (Cyprinus Carpio Cardia), ccAbre (Cyprinus Carpio Brain), ccAgill (Cyprinus Carpio Gill), ccApin (Cyprinus carpio Fin), CCG (Cyprinus Carpio Gill) und KFC (Koi Fin Cells) sowie die etablierte Zelllinie CCB (Cyprinus Carpio Brain) (NEUKIRCH et al. 1999) wurden für die Infektionsversuche mit *CyHV-3*, CEV und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus verwendet. Die neu etablierten Zelllinien ccAcar, ccAbre, ccAgill und ccApin wurden von der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) etabliert und von dieser Institution bezogen. Bei den KFC-Zellen handelt es sich um Zellen aus Taiwan, während die CCG-Zellen aus dem Veterinär-Institut in Budapest erworben wurden. Die etablierte CCB-Zelllinie, die als Referenzzelllinie genutzt wurde, stammte aus dem Bestand der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Eine Übersicht über die verwendeten Medien und Zusätze gibt Tabelle 1. Die Kultur der Zelllinien erfolgte bei

26°C und ohne CO_2 in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunclon™ Easy Flask™, Thermo Fisher), lediglich die CCG-Zellen wurden bei 20°C inkubiert.

Tabelle 1: Verwendete Medien für die Zellkulturen

	Zelllinien				Primärzellkulturen	
	CCB	**ccAcar/ccAbre/ccAgill/ccApin**	**CCG**	**KFC**	**Explantatkulturen**	**Kiemenzellen**
verwendetes Medium	Minimum Essential Medium mit Eagle-Salzen*	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium low glucose*	Minimum Essential Medium mit Eagle-Salzen*	Minimum Essential Medium mit Eagle-Salzen*	L15 Kultur-medium	Medium 199 Kultur-medium
verwendete Zusätze pro 500 ml Medium	10% Fetales Kälber-serum*	15% Fetales Kälberserum*	10% Fetales Kälber-serum*	10% Fetales Kälber-serum*	15% Fetales Kälber-serum*	15% Fetales Kälber-serum*
	5 ml Penicillin/ Strepto-mycin*	5 ml Penicillin/ Streptomycin*	5 ml Penicillin/ Strepto-mycin*	5 ml Penicillin/ Strepto-mycin*	5 ml Penicillin/ Strepto-mycin*	5 ml Penicillin/ Strepto-mycin*
	17,5 ml D-(+)-Glucose* (100g/l)	Karpfen-serum**: 1,25 ml auf 500 ml (0,25%)	12,5 ml 1 mol Hepes* (pH 7,0-7,6)	12,5 ml 1 mol Hepes* (pH 7,0-7,6)	6 ml Ampho-tericin*	6 ml Ampho-tericin*
			5ml Non Essential Amino Acids*		6 ml Genta-micin*	6 ml Genta-micin*
			5,5 ml Sodium-Pyruvat*			

*Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Alle 5-7 Tage wurden alle Zelllinien subkultiviert bzw. das Kulturmedium gewechselt. Dafür wurde zunächst das vorhandene Medium abgegossen und die Zellen mit 3,5 ml PBS gespült, um verbliebenes Medium von den Zellen zu waschen. Der eingesetzte Puffer wurde dabei vorsichtig mit einer 10 ml Pipette auf den Zellrasen aufgetragen, da es sonst zum vorzeitigen Ablösen der Zellen kommen konnte. Anschließend wurden die konfluenten Monolayer mit 3 ml einer 5 % Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) enthaltenen PBS-Lösung vom Boden der 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunclon™ Easy Flask™, Thermo Fisher) gewaschen, wobei eine Einwirkzeit von 10 Minuten nicht überschritten werden sollte, da es sonst zu Zellschäden kommen kann. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst hatten, wurde das Trypsin durch Zugabe des zellspezifischen Mediums im Verhältnis 1:1 neutralisiert. Im Anschluss daran wurden 13,5 ml des jeweiligen Mediums vorgelegt und mit 1,5 ml Zellsuspension versetzt. Nun wurden die gewonnenen Zellen im Verhältnis 1:2 in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunclon™, Thermo Fisher) übertragen oder zur Durchführung von Infektionsversuchen auf Zellkulturplatten (Nunclon™, Thermo Fisher) mit 24 Vertiefungen aufgebracht.

3.3 Virustitration

Um die Infektiosität des reisolierten Virus der drei untersuchten Virusarten *CyHV-3*, CEV und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus zu untersuchen, wurde auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen eine logarithmische Endpunktverdünnung durchgeführt. Dazu wurden zunächst Mikrotiterplatten (Corning Incorporated, NY) mit Zellen der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und der Referenzzellinie CCB beimpft und für 24 Stunden inkubiert. Sobald es zur Bildung eines konfluenten Monolayers kam, wurde das entsprechende Kulturmedium entfernt und durch 0,05 ml Viruslösung mit den Verdünnungsstufen 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ersetzt, wobei jede Verdünnungsstufe im Doppelansatz zugegeben wurde. Als Kontrollen fungierten pro Re-Isolat zwei nicht infizierte Vertiefungen in denen die 0,1 ml des Kulturmediums verblieben. Anschließend wurden die Zellen bei 20 °C mit 2 % CO_2 für 18 Tage kultiviert und täglich mikroskopisch begutachtet. Dabei wurde besonders auf Anzeichen eines cytopathischen Effektes wie Riesenzellbildung, Ablösen der Zellen und Löcher im Zellrasen geachtet. Mit einem cytopathischen Effekt von 100 % betroffene Vertiefungen wurden für die Titerbestimmung markiert. Die anschließende Kalkulation des Virustiters erfolgte nach der Methode von Reed und Muench (REED, MUENCH 1938) mit Hilfe der Formel:

((50%- (cytopathischer Effekt an der nächst geringeren Verdünnung)) / ((nächst höhere Verdünnung) – (nächst geringere Verdünnung))= Proportionale Entfernung

Die dabei ermittelten Werte gaben an, wie viele infektiöse Viruspartikel in den re-isolierten Mediumproben vorhanden waren. In einem weiteren Versuch wurde Viruslösung gleicher Konzentration in derselben Weise titriert. Die dabei ermittelten Werte ermöglichten einen Rückschluss auf die Empfänglichkeit der eingesetzten Zelllinien.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNA-Extraktion aus Gewebe- und Mediumproben

Zur Untersuchung von Zellkultur- und Flossenproben auf Infektion mit *CyHV-3* und von Mediumproben auf CEV wurden mit Hilfe des kommerziellen QiAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) DNA aus den jeweiligen Probenmaterialien extrahiert. Bei der Extraktion wurde auf eine räumliche Trennung von anderen Arbeitsplätzen geachtet und nach jeder Extraktion die Arbeitsflächen mit Kohrsolin 1,5 % (Dr. Schumacher, Malsfeld) gereinigt. Außerdem wurde bei jedem Extraktionsdurchgang Gewebe von nicht-infizierten Fischen als Negativkontrolle mitgeführt.

Bei der Untersuchung von Flossenproben von Karpfen auf *CyHV-3* wurde zunächst ein 2 ml Reaktionsgefäß (Roth, Karlsruhe) vorbereitet und ein ca. 0,5 cm x 0,5 cm großes Gewebestück der Flossenprobe zugegeben. Des Weiteren wurde dem Ansatz 180 µl ATL Puffer (Qiagen, Hilden), 20 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) und eine Edelstahlkugel zugefügt, um dann in einem Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden) bei 20 Hz für 2 Minuten gerüttelt zu werden.

Bei der Bearbeitung von Proben aus dem Mediumüberstand von mit CEV und *CyHV-3* infizierten Zellen wurden 20 µl Medium mit 180 µl ATL-Puffer (Qiagen, Hilden) und 20 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) versetzt. Die mechanische Zerkleinerung mit Hilfe einer Edelstahlkugel und unter Verwendung des Tissue Lysers entfiel bei der Bearbeitung der Mediumproben. Ansonsten war das Vorgehen bei beiden Probentypen identisch.

Danach erfolgte die Inkubation der Proben bei 56°C und 900 Hz Schüttelfrequenz für 60 Minuten in einem Thermomixer (HLC BioTech, Bovenden) bis zur vollständigen Lyse des Gewebes. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben und bei 70°C für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugieren für 10 Sekunden bei 21100 x g wurde den Proben 200 µl Ethanol zugesetzt, um die DNA auszufällen. Im nächsten Schritt wurden 600 µl der Probe auf eine Silikagel-Säule (EconoSpin™, Fort Bend County US) übertragen und bei 21100 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde nach dem Zentrifugieren auf ein neues Reaktionsgefäß (Roth, Karlsruhe) gesetzt und mit 500 µl Waschpuffer AW1 (Qiagen, Hilden) befüllt und danach erneut bei 21100 x g für 2 Minuten

zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Waschpuffer AW2 (Qiagen, Hilden) in gleicher Weise wiederholt. Im Anschluss wurden die Säulen ein weiteres Mal zentrifugiert, um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die aus der Probe isolierte DNA mittels 150 µl doppelt destilliertem Wasser (Thermo Fisher) aus der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gewaschen, indem sie mit 21100 x g für 2 Minuten zentrifugiert wurde. Damit wurde die gesamte genomische DNA der Probe einschließlich der viralen DNA von *CyHV-3* bzw. CEV extrahiert. Zur weiteren Analyse wurde sie in 0,2 ml Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei +4°C gelagert.

3.4.2 DNA-Extraktion aus Leukozytenproben

Die DNA-Extration aus Leukozytenproben erfolgte nach den gleichen Grundsätzen wie die DNA-Extraktion aus Geweben.

Zunächst wurden 20 µl Proteinase K, 100 µl PBS und 100 µl Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurden 200 µl AL Puffer zugegeben und bei 56 °C für 10 Minuten in einem Thermomixer (HLC BioTech, Bovenden) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Probe für 10 Sekunden bei 21100 x g in einer Heraeus Pico 21 Zentrifuge (Thermo Fisher) abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl 100 % Alkohol zugegeben, erneut gemischt und für 10 Sekunden bei 21100 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 600 µl der Probe auf eine Silikagel-Säule übertragen und bei 6000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde nach dem Zentrifugieren auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 500 µl Waschpuffer AW1 befüllt und danach erneut bei 6000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Waschpuffer AW2 wiederholt. Allerdings wurde hier bei 21100 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Säule in einem weiteren 2 ml Gefäß noch einmal abzentrifugiert, um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die aus der Probe isolierte DNA mittels 150 µl doppelt destilliertem Wasser aus der Säule in ein 1,5 ml Gefäß überführt, indem sie nach einer Inkubation für 1 Minute mit 6000 x g für 1 Minute zentrifugiert wurde. Zur weiteren Bearbeitung wurde sie in 0,2 ml Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei +4°C gelagert.

3.4.3 RNA-Extraktion aus Zellkulturproben und Gewebe

Die Extraktion von zellulärer und viraler mRNA aus infizierten Zellkulturen erfolgte mit Hilfe von TriReagent® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Zunächst wurde dazu das in den Vertiefungen der Zellkulturplatte vorhandene Medium verworfen, um danach mit 900 µl TriReagent® die 1,9 cm² Vertiefungen der 24 Well Zellkulturplatten zu waschen und damit die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Platte zu gewinnen. Ein anderer Einsatzbereich war die Isolation viraler RNA aus

Mediumproben unterschiedlicher Zellkulturen, die mit einem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert worden waren. Dazu wurden pro Probe 250 µl Zellkulturmedium in 1,5 ml Gefäße (Eppendorf, Hamburg) gesammelt und mit 900 µl TriReagent® versetzt. Danach wurden alle Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Neben der Extraktion aus Zellkulturproben wurde auch zelluläre mRNA aus unterschiedlichen Geweben von Karpfen isoliert. Dazu wurden die in RNA-Later genommenen Organproben zunächst mit einer Schere zerkleinert und in 900 µl TriReagent® gegeben. Anschließend wurde eine Edelstahlkugel hinzugefügt und die gesamte Probe in einem Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden) bei 20 Hz für 2 Minuten gerüttelt.

Nach dem Auftauen wurden die Proben zunächst für 5 Minuten stehen gelassen, um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu erreichen. Anschließend wurden 100 µl 1-Brom-3-chlorpropan-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugegeben, die Proben zwischen zwei Ständern eingeklemmt und für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt. Danach wurden die Proben erneut für 5 Minuten ruhen gelassen, um sie im Anschluss mit 17000 x g für 10 Minuten zu zentrifugieren. Die hierbei verwendete Zentrifuge (Thermo Fisher) kühlte die Proben, wie auch bei allen weiteren Zentrifugationsschritten, auf +4°C. Nach dem Zentrifugieren hatten sich in den Proben drei Phasen gebildet: Die unterste rote Phase, welche Proteine enthielt, eine mittlere Phase mit DNA und als Überstand eine farblose, wässrige Phase, in der sich die RNA befand. Von dieser wässrigen RNA-haltigen Phase wurden 300 µl abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Dazu wurden 300 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gegeben und beide Teile kräftig gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 17000 x g, 20 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nun zweimal mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen und nach dem zweiten Waschschritt vorsichtig mit Hilfe einer Mikroliterpipette (Eppendorf, Hamburg) von Ethanolresten befreit. Damit keinerlei Ethanol im Pellet zurück bleibt, wurden die Reaktionsgefäße für 10 Minuten geöffnet, bevor das gewonnene Pellet in 20 µl RNAse-freiem Wasser durch Mischen gelöst wurde. Die Lagerung der gewonnenen RNA erfolgte bei -80°C.

3.4.4 Spektrophotometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

Nachdem die RNA extrahiert worden war, wurde der RNA-Gehalt der Probe spektroskopisch bestimmt, um die Verdünnung auf 100 ng/µl im Rahmen der Reversen Transkription durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurde die optische Dichte der Probe mit einem Spektrophotometer (PEQLAB, Erlangen) bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Kalibrierung des Spektrophotometers mit 2 µl doppelt destilliertem Wasser durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die 2 µl RNA-

Lösung auf den Messpunkt des Spektrophotometers aufgetragen und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein OD-Wert von 1 entsprach dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

3.4.5 Reverse Transkription viraler und zellulärer mRNA

Die Weiterbearbeitung zellulärer und viraler RNA erfolgte unter Verwendung des Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Bei der gesamten Bearbeitung wurden alle Proben und Lösungen auf gekühlten Ständern gelagert.
Zunächst wurden die RNA-Proben in 0,2 ml Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung von ultra-reinem Wasser auf 100 ng/µl verdünnt. Anschließend wurden 6,75 µl der auf 100 ng/µl eingestellten RNA-Lösung mit 3,25 µl der Reaktionslösung (Tabelle 2) versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Dies erfolgte, wie auch alle anderen Inkubationsschritte, in einem Heizblock (Mastercycler gradient, Thermo Fisher). Die dabei zugesetzte DNAse diente dazu Verunreinigungen durch genomische DNA zu entfernen.

Tabelle 2: Reaktionskomponenten der Reversen Transkription

Reaktionsmix 1	
Komponenten	**Menge**
DNAse Puffer	1 µl
Ribolock	0,25 µl
DNAse	2 µl
Gesamtvolumen	3,25 µl
Reaktionsmix 2	
Komponenten	**Menge**
Oligo dT	0,25 µl
Randomprimer	0,25 µl
dNTP	1 µl
Ultra-reines Wasser	8,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl
Reaktionsmix 3	
Komponenten	**Menge**
5xRT-Puffer	4µl
Ribolock	0,5 µl
Maxima	0,5 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Im Anschluss daran wurde jeder Probe 1 µl EDTA (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und es folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 65°C. Der zweite Reaktionsansatz (Tabelle 2) wurde zusammen mit 5 µl RNA für weitere 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nachdem der dritte Reaktionsmix (Tabelle 2) hinzugefügt worden war, wurde die Reverse Transkription gestartet. Dazu erfolgte zunächst eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C, anschließend für 25 Minuten bei 50°C und eine Endphase von 5 Minuten mit einer Erhitzung auf 85°C, die dazu diente, die Reverse Transkription zu stoppen. Die erzeugte komplementäre DNA (cDNA) wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) mit doppelt destilliertem Wasser 1:20 verdünnt und bei +4°C zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.4.6 Real-time PCR

Die Untersuchung der Transkriptionsrate von zellulären und viralen Genen sowie der Gehalt von viraler DNA in den Proben wurde mittels einer real-time quantitativen PCR gemacht. Bei der real-time PCR handelt es sich um eine enzymvermittelte Methode zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Dazu wird, neben der zu vervielfältigenden DNA, eine geeignete Polymerase und entsprechende Primer benötigt. Bei den Primern handelt es sich um 20-30 Basen lange, spezifische Nukleotidsequenzen, die zwischen 100 bis 1000 Basen weit voneinander entfernt an dem zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang mittels Wasserstoffbrückenbindungen binden und damit als Startpunkt der jeweils eingesetzten Polymerase dienen und so die Amplifikation des spezifischen DNA-Fragmentes ermöglichen. Die Besonderheit der real-time PCR besteht in der Möglichkeit, die Amplifikation des gewünschten DNA-Segmentes in Echtzeit zu verfolgen. Dazu gibt es unterschiedliche Verfahren, wobei hier zum einen SYBR Green I und zum anderen TaqMan-Sonden als Nachweisverfahren verwendet wurden.

Bei SYBR-Green I handelt es sich um einen Farbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und so zu einer Zunahme der Fluoreszenz der Probe mit Zunahme an doppelsträngiger DNA führt. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei annähernd proportional zur Zunahme an PCR-Produkt, sodass sich anhand der gemessenen Fluoreszenz auf die Menge an erzeugter doppelsträngiger DNA rückschließen lässt. Dies eröffnet ein sehr breites Anwendungsgebiet für diese Technik, birgt allerdings den Nachteil einer geringen Spezifität, da nicht zwischen Zielsequenz und Artefakt unterschieden werden kann (MÜLHARDT 2002). Eine Weiterentwicklung dieser Technik nutzt den Resonanz-Energie-Transfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET) (CARDULLO et al. 1988). Diese Technik basiert auf dem Effekt, dass ein Fluoreszenzfarbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnimmt (Anregungsspektrum) und in Form einer anderen Wellenlänge wieder abgibt. Bringt man nun zwei Fluoreszenzfarbstoffe (bezeichnet als Reporter und Quencher) nah

genug zusammen und entspricht das Anregungsspektrum des einen Fluorochroms dem Emissionsspektrum des anderen, kann man durch Messen des emittierten Spektrums des ersten Fluoreszenzfarbstoffs die Entfernung der beiden Fluorochrome voneinander abschätzen. Beim Taq-Man Prinzip sitzen Reporter und Quencher auf demselben Oligonukleotid, das an die zu amplifizierende DNA-Sequenz bindet. Dieses wird bei der Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts von der Polymerase entfernt und dabei zerlegt. Dabei entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und die emittierte Wellenlänge des Reporters steigt an. Bei der fortschreitenden Synthese von DNA werden immer mehr Oligonukleotide abgebaut und damit nimmt das gemessene Signal zu (MÜLHARDT 2002). Auf diese Weise lässt sich aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal auch hier auf die Menge synthetisierter DNA rückschließen.

Virusnachweis von CEV und CyHV-3 mittels quantitativer TaqMan real-time PCR

Der Nachweis von viraler DNA bzw. von cDNA, die über Reverse Transkription aus viraler mRNA gewonnen worden war, erfolgte unter Verwendung einer TaqMan-PCR mit Hilfe eines real-time PCR Systems (Thermo Fisher). Zunächst wurde dazu unter Verwendung der geeigneten Primer (Tabelle 5) ein Mastermix (Tabelle 6) erstellt und auf eine PCR-Platte (Biozym, Oldendorf) mit 96 Vertiefungen aufgebracht, wobei 15 µl Aliquote in jede Vertiefung pipettiert wurden. Der gesamte Ansatz wurde dabei doppelt aufgetragen. Zudem wurde bei jedem Durchgang eine negative Template Kontrolle, die nur Mastermix enthielt und eine logarithmisch verdünnte Positivkontrolle als Standard mitgeführt. Diese wurde seriell von einer Ausgangskonzentration mit 10^8 bis 10^1 verdünnt und von 10^7 bis 10^1 in jeweils zwei Vertiefungen pro Verdünnungsstufe auf die PCR-Platte aufgetragen, wobei pro Vertiefung 5 µl verwendet wurden. Im nächsten Schritt wurden 5 µl der zu untersuchenden Proben ebenfalls im Doppelansatz auf die Platte (Biozym, Oldendorf) pipettiert. Damit war in jedem Reaktionsansatz eine Gesamtmenge von 20 µl aus Probe und Reaktionskomponenten vorhanden. Diese wurden dann nach dem in Tabelle 7 dargestellten Temperaturprofil in einem real-time PCR-Automat (Thermo Fisher) weiter bearbeitet.

Tabelle 3: Verwendete Primer zur Untersuchung von Proben auf virale DNA

Virus	**Referenz**	**Primer**	**Sequenz (5´→ 3`)**
CyHV-3	GILAD et al. 2004	KHV-86f	GACGCCGGAGACCTTGTG
		KHV-163r	CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT
CEV	MATRAS et al. 2017	CEVqFor1	AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTCC
		CEVqRev1	GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA
		CEVqProbe1 (Sonde)	[FAM] AGAGTTTGTTTCTTGCCATACAAACT [BHQ1]
karpfen-pathogenes Paramyxovirus	ADAMEK et al.	Carp_Para_qF1	TGGTTGGGATACTGGAGTGG
		Carp_Para_qR1	TCCTCTTCCTACGGGGCTTT

Tabelle 4: Reaktionsansatz für TaqMan real-time PCR

Reaktionskomponenten	**Volumen**
Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher)	10 µl
Primergemisch (800 nM für jeden Primer)	1,6 µl
A. dest.	3,4 µl
ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X) (Volumen unabhängig von der Probenanzahl)	10 µl
Gesamtvolumen	15 µl + ROX
Probe	5 µl

Tabelle 5: Temperaturprofil für TaqMan real-time PCR

Reaktionsschritt	**Zeitdauer**	**Temperatur**	**Zyklen**
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	30 sek	95 °C	40
Annealing/Elongation	30 sek	60 °C	

Einsatz der SYBR Green real-time PCR zum Nachweis des karpfenpathogenen Paramyxovirus und zur Analyse von Zellmarkergenen und der zellulären Immunantwort

Der Nachweis der viralen RNA des karpfenpathogenen Paramyxovirus aus Zellkulturproben, die Analyse der Genexpression der Zellmarker Cadherin, Cytokeratin, Occludin und Vimentin sowie die Analyse der zellulären Immunantwort anhand der Betrachtung des Interferon a2 erfolgte zunächst durch Umschreiben der RNA in cDNA mittels reverser Transkription. Danach wurde zur Bestimmung des Virusgehaltes eine SYBR-Green basierte real-time PCR durchgeführt. Dazu wurde das Maxima SYBR Green qPCR Master Mix Kit (Thermo Fisher) zur Herstellung des Mastermixes (Tabelle 6) mit spezifischen Primern (Tabelle 3 und Tabelle 8) verwendet. Anschließend wurden der Mastermix und die Proben-DNA im Doppelansatz auf eine PCR-Platte mit 96 Vertiefungen aufgebracht, wobei jeweils 15 µl Mastermix und 5 µl Probe in jede Vertiefung gegeben wurde. Bei jedem PCR-Durchlauf wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, die nur die Reaktionskomponenten des Mastermix enthielt. Die Inkubation erfolgte nach dem Temperaturprofil in Tabelle 7.

Als Ergebnis wurden bei der Untersuchung der Viruslast in Mediumproben Ct-Werte zusammengefasst. Die virale mRNA aus Zellen wurde mit der ΔΔCt-Methode ausgewertet. Zu diesem Zweck wurde die Amplifikation eines Genfragmentes des 40S ribososmalen Proteins S11 als Haushaltsgen zur relativen Quantifizierung des PCR-Produkts verwendet. Dazu wurden die Ct-Werte des viralen Zielgens und die Ct-Werte des 40S-Referenzgens mit folgender mathematischer Formel (SCHMITTGEN u. LIVAK 2008) zueinander in Beziehung gesetzt:

$$2^{-\Delta\Delta CT}=[(Ct_{Zielgen} – Ct_{Referenzgen})\ \text{Probe A} – (Ct_{Zielgen} – Ct_{Referenzgen})\ \text{Probe B}]$$

Auf diese Weise konnten durch den Einsatz des 40S Referenzgens die Ct-Werte des karpfenpathogenen Paramyxovirus normalisiert werden.

Für die Zellmarkergene und das Interferon stand ein externer Standard zur absoluten Quantifizierung als Positivkontrolle zur Verfügung. Dieser wurde seriell mit einer Ausgangskonzentration von 10^8 bis 10^1 verdünnt und von 10^7 bis 10^1 in jeweils zwei Vertiefungen pro Verdünnungsstufe auf die Platte (Biozym, Oldendorf) aufgetragen, wobei pro Vertiefung 5 µl verwendet wurden. Aus der daraus erstellten Standardkurve wurde die absolute Anzahl an Kopien des jeweiligen Genfragments bestimmt. Im Anschluss daran wurde diese Anzahl mittels des 40S Ribosomal

Protein S11 Haushaltsgens normalisiert, wobei sich dieses Gen durch seine geringe Variabilität in der Expression in unterschiedlichen Geweben und unter unterschiedlichen Infektionen in Karpfen auszeichnet. Daher eignet es sich in besonderer Weise als Referenzgen. Die Normalisierung erfolgte nach folgender Formel (ADAMEK et al. 2017c):

Normalisierte Kopienanzahl = (mRNA Kopien pro PCR für das Zielgen) / (mRNA Kopien pro PCR für das Referenzgen/10^5)

Tabelle 6: Reaktionsgemisch für SYBR Green real-time PCR

Reaktionskomponenten	**Volumen**
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher)	10 µl
Primer Forward (0,2 µM)	0,4 µl
Primer Reverse (0,2 µM)	0,4 µl
A. dest.	4,2 µl
ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X) (Volumen unabhängig von der Pobenanzahl)	10 µl
Gesamtvolumen	15 µl + ROX
Probe	5 µl

Tabelle 7: Temperaturprofil für SYBR Green real time PCR modifiziert nach ADAMEK et al. (2012)

Temperaturprofil für SYBR Green real time PCR modifiziert nach ADAMEK et al. 2012			
Reaktionsschritt	Zeitdauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	15 sek	95 °C	40
Annealing	30 sek	60 °C	
Elongation	30 sek	72 °C	
Schmelzkurve	Zunahme der Temperatur von 60°C in 0,3°C Schritten auf 95°C		1

Tabelle 8: Zusammenstellung der verwendeten Primer Sequenzen

Zellkontaktprotein	**Gen**	**Designer**	**Primer**	**Sequenz (5´→ 3`)**
Occludin	Ocln	Adamek et al.	Cyca_Ocln_A_qF2	GGCTATGGAATGGGTGGAG
			Cyca_Ocln_A_qR2	CGAGCAGAATGATGAAGGTG
Vimentin	Vim	Adamek et al.	CycaVim_qF2	TCTGGACCTGGAGAGAAAGG
			CycaVim_qR2	TTTAAGGGCAGCGGTGAG
Cytokeratin	CK 15	Adamek et al.	CycaCK15_qF2	CCTCCAAGTGTCCAAGACTG
			CycaCK15_qR2	GCAAGAGTTCCCTCAAGACC
Cadherin	CDH1	Adamek et al.	CycaCDH_1_qF4	TCAGGACAGCTCCATTCAAG
			CycaCDH_1_qR4	AACAGCAGAGCCAAGATTCC
Interferon	Interferon a2	Adamek et al. (2012)	IFN_I2_gsp_qF2	GATGAAGGTGCCATTTCCAAG
			IFN_I2_gsp_qR3	CACTGTCGTTAGGTTCCATTGCTC
Referenzgen	40S ribosomal protein S11	Huising et al. 2004	q40S.FW1	CCGTGGGTGACATCGTTACA
			q40S.RV1	TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT

3.4.7 Erstellung des externen Standards

Zur absoluten Quantifizierung des PCR-Produktes wurde mittels *E. coli* das verwendete Zielgen für die unterschiedlichen real-time PCRs kloniert. Dazu wurde das entsprechende Gen in einen Vektor ligiert und in die *E. coli*-Zellen transformiert. Diese wurden dann auf Agarplatten kultiviert und vermehrt. Anschließend wurde das Plasmid isoliert und für die Quantifizierung der verschiedenen real-time PCRs verwendet. Dazu wurde es in einer Verdünnungsreihe von 10^7 nach 10^1 im Doppelansatz auf die PCR-Platte aufgebracht, sodass die daraus resultierende Standardkurve zur Quantifizierung des jeweils verwendeten Gens eingesetzt werden konnte.

3.5 Durchführung der Zellkulturversuche

3.5.1 Primärkulturen von Kiemen- und Flossengewebe

Aus Kiemen und Flossengewebe von Karpfen wurden Primärkulturen angelegt, die anschließend auf ihre Eignung für die Anzucht von CEV, *CyHV-3* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus untersucht wurden. Um festzustellen, ob sich mit unterschiedlichen Bearbeitungstechniken bei der Vorbereitung von Primärkulturen aus Kiemen Unterschiede in der Eignung der Primärkulturen zur Virusreplikation der oben genannten Viren ergeben, wurden unterschiedliche Techniken zur Vereinzelung von Kiemenzellen verwendet, die erhaltenen Zellen mit den oben genannten Viren infiziert und die Ergebnisse der Virusreplikation in diesen Zellen untereinander verglichen. Dies wurde insbesondere mit dem Ziel durchgeführt, eine Zellkultur zu etablieren, die sich zur Replikation des Carp Edema Virus eignet. Dazu wurden in der bereits beschriebenen Weise (Kapitel-3.2.1) die Kiemen aus drei Karpfen entnommen, wobei das Gewebe der Kiemen von der linken Körperseite jedes Fisches nach Zerkleinerung mit der Schere weiter mit Hilfe einer Pipette vereinzelt wurde, während die Zellen der rechten Kieme durch ein Sieb mit 100 µm Maschenweite gestrichen wurden. Somit wurden Kiemenstücke aus allen Karpfen mit beiden Techniken bearbeitet. Die auf diese Weise erhaltenen Zellen wurden pro Fisch in zwei Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Nunclon™, Thermo Fisher) pipettiert, wobei für jede Präparationsweise eine Platte angelegt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit CEV infiziert. Zusätzlich wurde eine nicht infizierte Kontrolle mit geführt. Die auf diese Weise hergestellten Zellkulturen aus Kiemen wurden bei Raumatmosphäre und Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Dabei wurden die Zellen regelmäßig auf die Entwicklung eines zytopathischen Effektes, wie Löcher im Zellrasen oder Riesenzellbildung, kontrolliert. Da im gesamten Versuchsverlauf jedoch keine zytopathischen Effekte festgestellt werden konnten, wurde vom Sammeln von Medium zur Isolierung viraler DNA und Zellen zur Isolierung von viraler mRNA abgesehen.

Als ein weiterer Versuchsansatz zur Etablierung einer geeigneten Zellkultur für CEV wurden Explantatkulturen aus Kiemen und Flossen verwendet. Dazu wurden ebenfalls Kiemen und Flossen von 3 Karpfen entnommen, mittels Schere zerkleinert und ebenfalls auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen aufgebracht. Allerdings erfolgte hier die Infektion mit Virus 14 Tage nach der Herstellung der Kultur, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, aus den Explantaten adhärent auf dem Boden der Zellkulturplatte anzuwachsen. Auch bei den Explantatkulturen wurden die Zellen nach erfolgter Infektion regelmäßig auf die Entstehung eines zytopathischen Effektes kontrolliert. Da es auch hier nicht zur Ausbildung eines zytopathischen Effektes kam, wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen.

Um im nächsten Schritt den bereits angesprochenen Vergleich zwischen den Replikationsraten der unterschiedlichen Viren zu untersuchen, wurde eine Primärzellkultur aus Kiemenzellen von Koi angefertigt. Dazu wurden wie oben beschrieben (Siehe Kapitel 3.2.1) Kiemen von 3 Koi gewonnen. Aus dem Kiemengewebe erfolgte die Vereinzelung der Zellen unter Verwendung eines Siebes mit 100 µm Maschenweite, wie unter 3.2.1 beschrieben. Danach wurden die Zellen in einem Milliliter 199 Kulturmedium (Zusätze siehe Tabelle 1) auf 3 Zellkulturplatten (eine pro Fisch) mit 24 Vertiefungen aufgebracht, wobei jeweils 6 Vertiefungen pro Virus und 6 Vertiefungen für nicht infizierte Kontrollen verwendet wurden. Im Anschluss erfolgte die Infektion der Zellkultur, wobei 200 µl CEV-haltige Viruslösung und jeweils 50 µl *CyHV-3* und 50 µl des karpfenpathogenen Paramyxovirus zugegeben wurden.

Die verwendete CEV-Viruslösung bestand aus einer Mischung aus 2 Isolaten, wobei das eine aus Karpfen und das andere aus Koi gewonnen worden war. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Versuchsergebnisse nicht durch die Verwendung von Virus eines bestimmten CEV Genotypus verfälscht wurden. Nach 24 h und 48 h wurden 50 µl Kulturmedium von allen infizierten Kulturen und den nicht infizierten Kontrollen abgenommen. Nach 48 h wurden die adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturplatten gewaschen, um sowohl den Umfang der Virusreplikation in den Zellen, als auch eine Zelltypisierung anhand der Expression der 4 Zellmarker Cadherin, Cytokeratin, Occludin und Vimentin durchzuführen. Anschließend wurde der Gehalt viraler DNA in den gesammelten Mediumproben mittels real-time qPCR bestimmt, um die Menge der freigesetzten Viruspartikel zu bestimmen.

3.5.2 Zelllinien

Die zu untersuchenden Zelllinien ccAcar, ccAcer, ccAgill, ccApin, CCG und KFC, sowie die etablierte Zelllinie CCB (NEUKIRCH et al. 1999) waren aus Flossen-, Gehirn-, Haut-, Herz- und Kiemengewebe aus Karpfen angezüchtet worden und lagen in unterschiedlichen Passagen vor. In den durchgeführten Versuchen wurden sie auf ihre Eignung zur Replikation und Re-Isolation von *CyHV-3*, CEV und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus untersucht.

In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls geklärt werden, ob und wie gut sich die neu entwickelten Zelllinien für die Diagnostik des *Cypriniden Herpesvirus 3* eignen. Dazu wurden in Fällen von Infektionen mit dem *CyHV-3* bei Koi Organproben gewonnen, daraus das Virus isoliert und auf die neu entwickelten Zelllinien bzw. die Referenzzelllinie CCB aufgebracht, wobei dies in einer Verdünnung von 1:20 und 1:200 relativ zur Viruskonzentration im Ausgangsgewebe erfolgte. Dazu wurden Zellrasen mit Zellen der jeweiligen Zelllinien in den Vertiefungen einer Kulturschale

mit 24 Vertiefungen angezüchtet. In einem Versuch wurden 100 µl des virushaltigen Mediums in die 1,9 cm^2 großen Vertiefungen gegeben und für eine Stunde bei 20°C inkubiert, um die Aufnahme des Virus in die Zellen zu erleichtern. Im Anschluss wurde jede Vertiefung mit DMEM-Isolationsmedium (Zusätze siehe Tabelle 1) auf einen Milliliter aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von einer Woche bei 20°C inkubiert und täglich auf die Ausbildung eines zytopathischen bzw. zytotoxischen Effektes hin kontrolliert. Zusätzlich wurden jeweils zwei Vertiefungen für eine Positiv- und eine Negativkontrolle als Referenz eingesetzt.

In einer weiteren Versuchsreihe zur diagnostischen Eignung der neu etablierten Zelllinien und der CCB-Zellen wurde neben Diagnostikproben auch Gewebeproben von Karpfen, die mit Viruslösung angereichert waren, um sicher zu gehen, dass zu Beginn der Virusisolation in den Proben infektiöses *CyHV-3* vorlag. Dazu wurden Proben von Leber, Niere und Milz aus Karpfen gewonnen und mit Zellkultur-Überstand mit KHV-T in einer Konzentration von 10^6, 10^3 und 10^1 KID_{50}/ ml supplementiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde aus den so behandelten Organproben *CyHV-3* nach dem unter 3.1.1 beschriebenen Protokoll isoliert.

Um die neu etablierten Zelllinien zu typisieren und damit eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Fähigkeit der untersuchten Viren zur Replikation in den Zellen der Zelllinie und dem Zelltyp zu erkennen, wurde die Expression der epithelialen Zellmarker Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und dem Marker Vimentin für Fibroblasten an diesen Zelllinien untersucht. Außerdem sollte durch diese Untersuchung eine mögliche Veränderung in der Zusammensetzung der Zelltypen in den Zellkulturen unter Infektion mit den untersuchten Viren ermittelt werden. Dazu wurde das Expressionsmuster der Zellmarker für die einzelnen Zelllinien bestimmt und zum einen die Zelllinien untereinander verglichen und zum anderen die Veränderung des Expressionsmusters unter Infektion mit den drei Viren analysiert.

Weiterhin wurde die Immunantwort der Zelllinien auf die Infektion mit den drei Viren durch PCR-gestützten Nachweis der Transkription des Interferon a2- kodierenden Gens analysiert. Bei allen Infektionsversuchen mit den neu entwickelten Zelllinien wurde die bereits etablierte Zelllinie CCB aus den Beständen der Tierärztlichen Hochschule Hannover als Referenzzelllinie mit infiziert und die Ergebnisse entsprechend ausgewertet. Des Weiteren wurden in den Infektionsversuchen neben den unterschiedlichen Zelllinien auch die Eigenschaften von unterschiedlichen Passagen der Referenzzelllinie CCB miteinander verglichen. Dazu wurden vom Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335 bezogen und im Hinblick auf Virusreplikation, Expressionsmuster von Zellmarkern und Immunantwort untersucht.

Zur Durchführung der für diese Untersuchungen notwendigen Infektionsversuche wurden die Zelllinien subkultiviert und auf Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen unter Verwendung des entsprechenden Mediums (Tabelle 1) aufgebracht, sodass in jeder Vertiefung 1 Milliliter Medium die Zellen bedeckte. Dabei wurden jeweils drei Zellkulturplatten pro Zelllinie vorbereitet und jeweils drei Vertiefungen pro Platte mit den drei verwendeten Virusarten infiziert und drei Vertiefungen mit nicht infizierten Zellen pro Platte als Kontrollen verwendet. Die Zellen wurden während des gesamten Versuches bei 20 °C und 2 % CO_2 kultiviert. Direkt nach der Infektion der Zellen mit 50 µl *CyHV-3*- und Paramyxovirus-Viruslösung sowie mit 200 µl CEV-haltiger Viruslösung wurden jeweils 50 µl Medium von allen Vertiefungen abgenommen, um darin die Virusmenge in jeder einzelnen Vertiefung zu Beginn der Infektion zu bestimmen und damit über einen Referenzwert zur weiteren Beurteilung zu verfügen. Auch in diesem Versuch wurden CEV-Isolate aus Karpfen und Koi kombiniert, um eine Verwendung von CEV aus nur einer Genogruppe zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und es erfolgte eine Sammlung von 50 µl Medium von allen Zelllinien am 2., 4. und 7. Tag nach der Infektion. Zudem wurde zu diesen Zeitpunkten pro Zellkultur aus jeweils 3 Vertiefungen mit einer Fläche von jeweils 3,8 cm^2 die adhärent am Boden der Platte gewachsenen Zellen gewonnen. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und danach jede Vertiefung mit 900 µl TriReagent® gewaschen, bis sich die Zellen vom Boden der Platte ablösten. Während der gesamten Versuche wurden täglich alle Zelllinien begutachtet und die Entwicklung zytopathischer Effekte in den einzelnen Vertiefungen dokumentiert. Alle Zell- und Mediumproben wurden in 1,5 ml Probengefäßen bei -80 °C zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.6 Reaktivierungsversuche von CyHV-3 aus latent infizierten Fischen

Für Untersuchungen zur Reaktivierung von *CyHV-3* aus Geweben von latent mit dem Virus infizierten Fischen wurden Blut- und Flossenproben aus latent mit *CyHV-3* infizierten Karpfen entnommen und sowohl Leukozyten als auch Makrophagen aus den Blutproben isoliert. Die latent mit *CyHV-3* infizierten Karpfen, die in diesem Versuch beprobt wurden, wurden im Friedrich-Loeffler-Institut für Tiergesundheit (FLI), Insel Riems gehalten. In den vorliegenden Untersuchungen wurden *in vitro*-Untersuchungen von im FLI entnommenen Proben vorgenommen.

Die Flossenproben wurden dabei von den gleichen Fischen wie die Blutproben gewonnen, um zu überprüfen, ob sich das *CyHV-3* während einer latenten Infektion in Flossenepithelien nachweisen lässt.

Die Isolation der Makrophagen erfolgte über adhärente Anlagerung an den Boden der Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen. Anschließend wurde der Überstand

verworfen und die isolierten Makrophagen konnten zur weiteren Untersuchung auf *CyHV-3* mittels qPCR genutzt werden, wobei dies nach dem Protokoll in Kapitel 3.4.6 erfolgte.

Dazu wurde zunächst 2-3 ml Blut aus der Schwanzvene mehrerer Karpfen genommen, wobei in die dafür verwendete Spritze zuvor 2 ml RPMI 1640 mit 10% aqua dest. und 100 IE/ ml Na-Heparinlösung aufgezogen worden war, um eine Koagulation des Bluts zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurden Leukozyten aus dem peripheren Blut der Karpfen zur Stimulation isoliert. Dazu wurde das Vollblut mit Heparin mit 0,25 ml RPMI 1640 mit 10% aqua dest und 100 IE / ml Na-Heparin (Blutentnahmemedium) pro 2 ml Blut in einem Zentrifugenglas gemischt und anschließend für 10 min bei 700 U / min. und 15-20°C zentrifugiert. Danach wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenglas 2-3 ml Lymphozytentrennmedium (Lymphoprep, Nycomed, Asker, Norwegen) eingefüllt. Im Anschluss wurden der Überstand des zentrifugierten Blutes, die weiße Leukozytenschicht und die oberste Schicht der Erythrozyten vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und über das Lymphoprep geschichtet. Dabei ist zu beachten, dass nicht zu viele Zellen in ein steriles Zentrifugenglas gelangen, da es sonst zu einer schlechten Auftrennung der Zellen kommt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Abzentrifugation dieser Probe für 30 min. bei 2000 Umdrehungen pro min. und 15-20°C. Anschließend wurde die Leukozytenbande von der Interphase zwischen Lymphoprep und Plasma mit einer Pasteurpipette abgesammelt und in ein neues Zentrifugenglas übertragen. Nun wurde reichlich Waschmedium (RPMI 1640 mit 10% aqua dest und 10 IE/ ml Na-Heparin) zugesetzt und nach gründlichem Schütteln für 10 min. bei 1700 U / min. bei 15-20°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpippettiert, das Zellpellet aufgerüttelt und mit 2-5 ml Waschmedium versetzt. Diese Suspension wurde bei 1500 U / min. für 10 min bei 15-20 °C zentrifugiert. Der dabei erneut entstandene Überstand wurde abgegossen, das Pellet resuspendiert, gewaschen und bei 1500 U / min. für 10 min. zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand abgegossen, das Pellet aufgerüttelt und in 0,5 bis 1 ml Waschlösung resuspendiert. Abschließend wurde die Zellzahl ermittelt.

Dazu wurde die Zellsuspension aufgerüttelt, 50 µl entnommen und mit 50 µl 0,2 % Trypan-Blau-Lösung vermischt. Anschließend wurde auch von dieser Suspension 50 µl genommen und in eine Zählkammer nach Neubauer eingebracht bis deren Plateau gefüllt war. Diesen Zellen wurde nun ca. 1 min. zur Sedimentation gegeben, bevor sie gezählt und anschließend auf eine Konzentration von 2 x 10^6 Zellen / ml eingestellt wurden.

Die Leukozyten wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen / Vertiefung auf eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurden diese mit

künstlich hergestellter rechtsgängiger B-DNA: poly (dA:dT), Z-DNA: poly (dG:dC) und Poly I:C, ein synthetisches Analog von doppelsträngiger RNA (InvivoGen, San Diego, USA), stimuliert, wobei jeweils eine Konzentration von 1 µg / ml von jeder Stimulanz eingesetzt wurde. Mit Concanavalin A, Lipopolysaccharide aus *Escherichia coli* und Pokeweed Mitogen wurden Leukozyten in Zellkulturplatten mit 96-Vertiefungen stimuliert, wobei die eingesetzte Konzentration des Lipopolysaccharids 100 µg / ml, von Concanavalin A 10 µg / ml und von Pokeweed Mitogen von 1 µg / ml betrug. Die Stimulation erfolgte über zwei Tage bei 20 °C und 2 % CO_2.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde Medium von stimulierten Leukozyten und nicht stimulierten Kontrollen von Zellkulturplatten gesammelt und nach DNA-Extraktion in einer Real-Time qPCR, wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben auf *CyHV-3*-DNA untersucht. Eine Untersuchung mittels qPCR auf *CyHV-3* erfolgte ebenfalls mit den gesammelten Flossen- und Makrophagenproben. In einem späteren Versuchsdurchgang wurde eine weitere Gruppe von latent infizierten Karpfen hinzugenommen, die vor der Blutentnahme im FLI Stress ausgesetzt wurden. Dazu wurden die Tiere einmal für eine Minute mittels eines Netzes getrieben. Die Blutentnahme erfolgte 3 Tage später in der bereits beschriebenen Weise. In diesem Versuchsdurchgang wurden Karpfen, die vor der Blutentnahme gestresst worden waren, mit nicht gestressten Tieren verglichen.

Danach wurden, wie oben beschrieben, Leukozyten aus dem Blut isoliert, in Kultur gebracht und anschließend mit einem Gemisch aus B-DNA, Z-DNA und Poly I:C, sowie Concanavalin A, Lipopolysacchariden und Pokeweed Mitogen in den bereits erwähnten Konzentrationen über einen Zeitraum von zwei Tagen inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und mittels qPCR auf *CyHV-3* untersucht, wie im Kapitel 3.4.6 beschrieben.

3.7 *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mittels „SigmaPlot® 11.2“ (Systat Software Inc., Kalifornien).

Dabei wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung überprüft. Im Anschluss erfolgte eine Signifikanzanalyse der Ergebnisse der Expression der Zellmarker, der Infektionsversuche und der Immunantwort mittels einer 3-Weg-Anova und einem Holm-Sidak Test als post hoc-Analyse. In dieser Analyse wurden sowohl die Zelllinien, die unterschiedlichen Probenzeitpunkte und die unterschiedlichen Viren gegeneinander und gegen eine Kontrollgruppe auf signifikante Unterschiede überprüft. Im Anschluss erfolgte eine Analyse der untersuchten Daten auf gleiche Varianz. Bei den Zelllinien wurde dazu als Referenz die CCB-Zelllinie verwendet. Im Rahmen der Infektionsversuche wurde eine nicht infizierte Kontrolle bzw. der

Virusgehalt am Tag 0 als Vergleichswert zu Grunde gelegt. Für sämtliche erhobenen Ergebnisse wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Zur Beurteilung von Differenzen zwischen den Gruppen wurde ein p-Wert von unter 0,05 als signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Infektionsversuche von Zellkulturen mit karpfenpathogenen Viren

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden die vom Fraunhofer EMB neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und die etablierte Zelllinie CCB mit dem *CyHV-3*, CEV und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert, um ihre Eignung zur Replikation und Re-Isolation dieser Viren auf den unterschiedlichen Zelllinien zu vergleichen. Zusätzlich wurden die Passagen 70, 146 und 335 der Referenzzelllinie CCB in diesen Versuchen betrachtet. Darüber hinaus wurden zur Ermittlung einer zur CEV-Replikation geeigneten Zellkultur Infektionsversuche mit CCG-Zellen und Primärkulturen aus Karpfenkiemen durchgeführt. Wie bereits im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurde an Tag 0, 2, 4 und 7 von allen Zellkulturen Mediumüberstand gewonnen und darin der Gehalt an viraler DNA bestimmt. Weiterhin wurde der Virusgehalt im Mediumüberstand auf CCB-Zellen titriert, um die Infektiosität der re-isolierten Viruspartikel zu überprüfen. Zudem wurde virale mRNA aus den infizierten Zellkulturen isoliert, um die Virusreplikationsrate zu bestimmen. Abschließend wurde eine vergleichende Titration aller Viren auf allen Zelllinien durchgeführt. Alle Versuchsansätze sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

4.1.1 Infektionsversuche von Zellkulturen mit CyHV-3

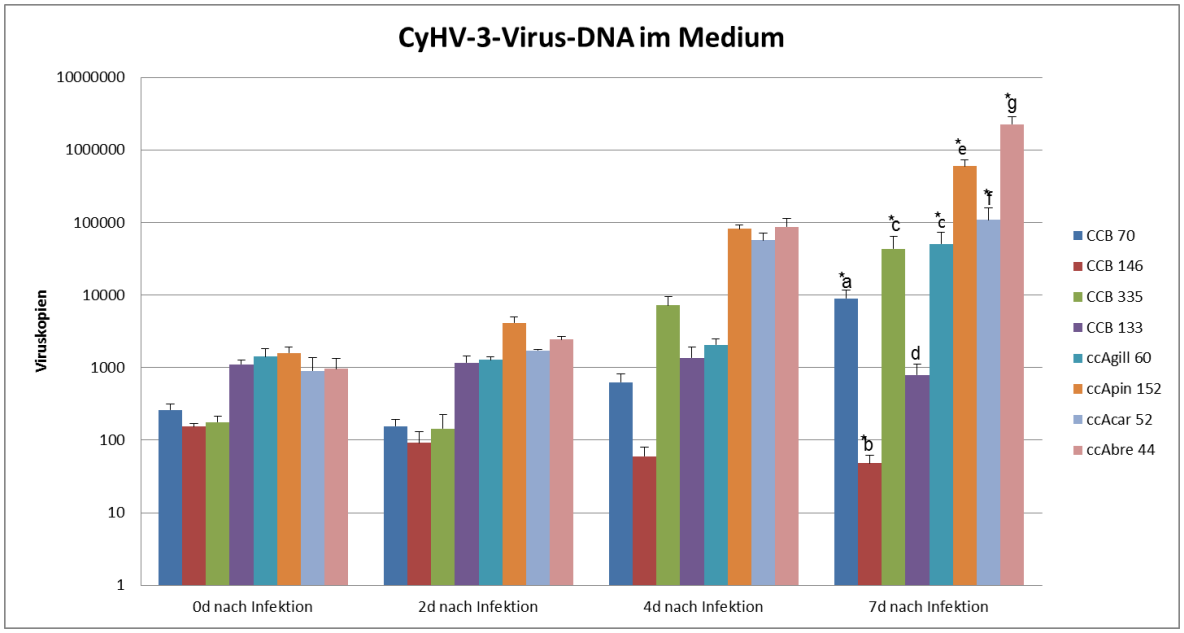

Abb. 1: Viruslast im Medium von Kulturen unterschiedlicher Zelllinien nach Infektion mit *CyHV-3.* Untersucht wurden die Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin sowie CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335. Angegeben ist die Anzahl Kopien virusspezifischer DNA in 1 µl Zellkulturmedium.
*signifikante Unterschiede relativ zu 0. Tag *p.i.*
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Es zeigte sich, dass bereits 2 Tage *p.i.* eine größere Menge viraler DNA im Medium von Kulturen der ccApin Zellen der Passage 152 und der ccAbre Zellen der Passage 44 zu finden war als im Medium der anderen untersuchten Zelllinien und der verwendeten CCB-Passagen (Abb. 1). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Menge viraler DNA an Tag 0 in den unterschiedlichen Zellen eine deutliche Streuung aufwies und damit abweichende Ausgangsmengen von Viruspartikeln zur Verfügung standen. Im weiteren Verlauf des Experiments manifestierten sich die zu Beginn gemachten Beobachtungen. So ergab die Auswertung an Tag 7 *p.i.* den höchsten Gehalt viraler DNA im Medium der ccAbre 44-Zellen mit 2,27 x 10^6 Kopien. Danach folgten sowohl zueinander als auch zur ccAbre 44-Zelllinie signifikant niedrigere Virusgehalte im Medium von ccApin 152, ccAcar 52 und ccAgill 60 Zellen. Daran schlossen sich die unterschiedlichen CCB Passagen an, wobei es an Tag 7 *p.i.* keinen signifikanten Unterschied zwischen den Virusgehalten im Medium von CCB-335 und den ccAgill Zellen gab. Innerhalb der CCB-Passagen erreichte das Medium von CCB-335 den signifikant höchsten Wert mit 4,3 x 10^4 Kopien gefolgt von Passage 70, 133 und 146. Dabei fällt auf, dass es im Vergleich zum Inokulum keine

signifikante Viruszunahme im Medium der CCB 133-Zelllinie und sogar zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl an *CyHV-3*-Genomkopien in der CCB Passage 146 bis Tag 7 *p.i.* kam.

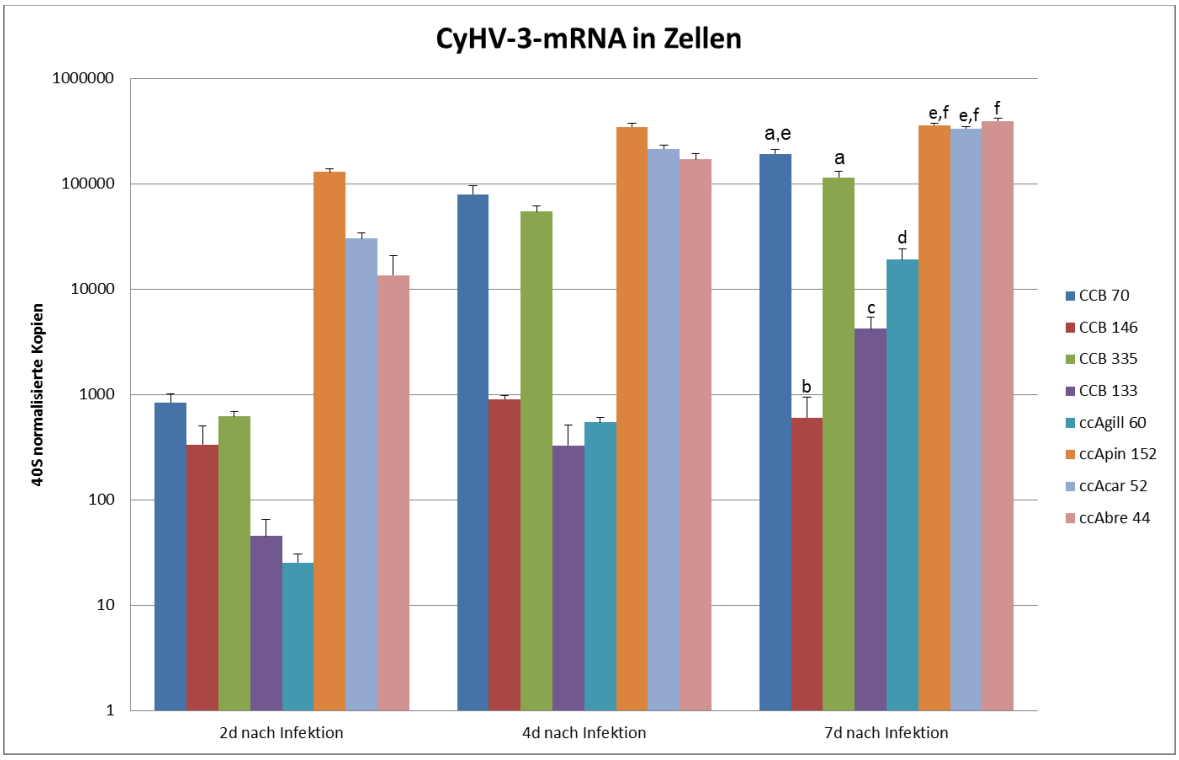

Abb. 2: Replikation von *CyHV-3* in Zellen aus unterschiedlichen Zelllinien. Als Indikator für die Replikation von *CyHV-3* wurde die Transkriptionsrate viraler DNA (GILAD et al. 2014) im Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens, das das 40S ribosomal Protein S11 des Karpfens kodiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Weiterhin wurden adhärente Zellen vom Boden der Kulturgefäße gewonnen, um die Menge viraler mRNA in diesen Zellen zu bestimmen und damit die Virusreplikationsrate in diesen Zellen ermitteln zu können (Abb. 2). Es wurden Zellen am 2., 4. und 7. Tag *p.i.* beprobt. Dabei zeigte sich, dass bereits am 2. Tag erhebliche Unterschiede in der Replikation des *CyHV-3* bestanden. So konnten an diesem Tag die höchsten Gehalte an viraler mRNA in der Zelllinie ccApin 152 gefolgt von ccAcar 52 und ccAbre 44 nachgewiesen werden. Dabei bestanden jeweils signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien. Am Tag 2 *p.i.* fiel auf, dass in Kulturen von ccApin 152 bereits 1,3 x 10^5 Kopien viraler RNA normalisiert zur

Expression von 10^5 Kopien der RNA des 40S ribosomalen Proteins S11 vorlagen. Mit einer deutlich geringeren Virusreplikation von 8,47 x 10^2 normalisierten Viruskopien zeigten CCB 70 Zellen signifikant geringere mRNA-Gehalte als die ccAbre 44-Zellen, wobei die anderen untersuchten CCB-Passagen noch signifikant niedrigere Replikationsraten aufwiesen. Die geringste Virusreplikation wurde am 2. Tag *p.i.* in ccAgill 60-Zellen mit 2,5 x 10^1 normalisierten Viruskopien beobachtet.

Bis zu Tag 7 *p.i.* nahm die Replikation viraler RNA in allen Zelllinien zu, wobei in der ccAcar 52 Zelllinie keine signifikante Zunahme zwischen dem 4. und 7. Tag gemessen wurde. Darüber hinaus wurde zu diesem Zeitpunkt in den Zellen der Linie ccAbre 44 mit 3,97 x 10^5 normalisierten Kopien die höchste Virusreplikation ermittelt. Dahinter folgte die Replikation in ccApin 152 und ccAcar 52 mit signifikant geringeren Werten. Zu einer erheblichen Steigerung der Replikationsrate über den beobachteten Zeitraum kam es bei der CCB-Zelllinie in Passage 70 und 335 und den ccAgill-Zellen. Allerdings war die Replikationsleistung in diesen Zellen weiterhin signifikant niedriger als in der ccApin-Zelllinie. Bei der CCB 146 war zwischen dem 4. und 7. Tag *p.i.* eine signifikante Abnahme der Virusreplikation zu beobachten. Insgesamt bestätigen die Gehalte an nachgewiesener viraler mRNA in den Zellen die erhobenen Daten zur Menge an viraler DNA im Überstand.

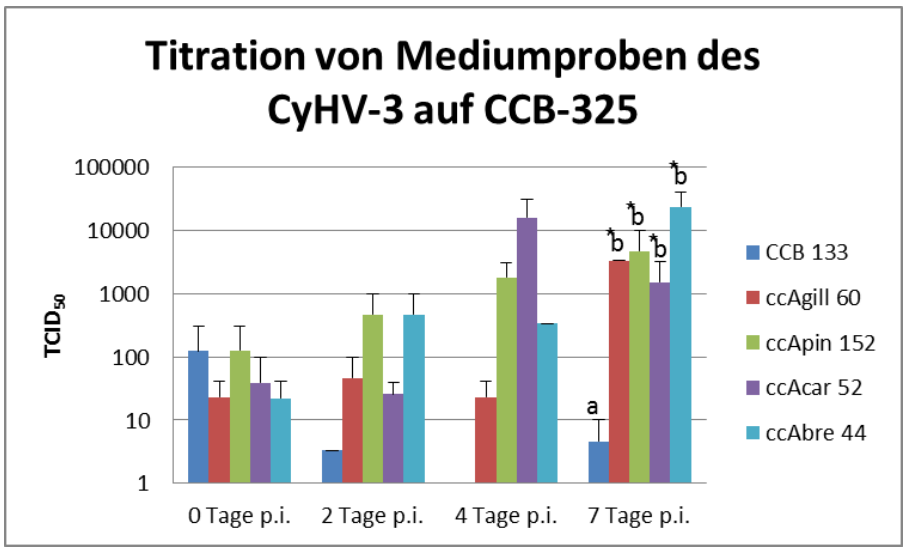

Abb. 3: Titer von *CyHV-3* in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen unterschiedlicher Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
*signifikante Unterschiede relativ zum 0. Tag *p.i.*
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Zum Nachweis infektionsfähiger Viruspartikel im Kulturüberstand wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, unterschiedliche Verdünnungen von Mediumproben in Monolayerkulturen von CCB-Zellen der Passage 325 inokuliert und die Virusgehalte als $TCID_{50}$ Werte ermittelt (Abb. 3). Dabei zeigte sich, dass die höchsten Gehalte an *CyHV-3* mit einem $TCID_{50}$ von im Durchschnitt 17.303 infektiösen Viruspartikeln / Milliliter im Zellkulturmedium von ccAbre-Zellen auftraten. Infizierte Zelllinien ccApin 152 und ccAgill 60 produzierten signifikant weniger Viruspartikel mit einem $TCID_{50}$ von 4721 und 3330 infektiösen Viruspartikeln pro ml. Die geringste Replikationsleistung für das *CyHV-3* wies die Zelllinie CCB 133 mit im Mittel 4 infektiösen Viruspartikeln pro Milliliter auf.

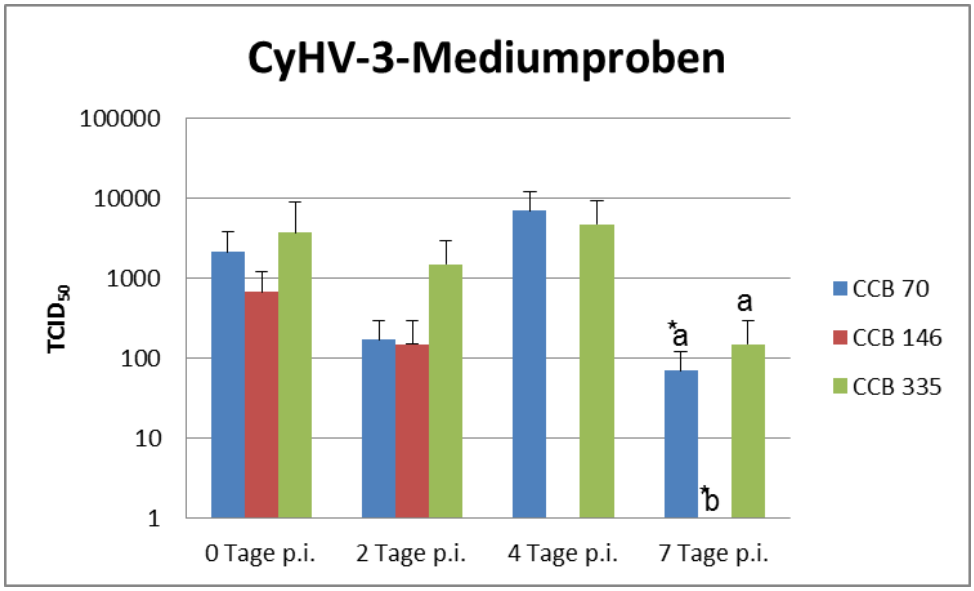

Abb. 4: Titer von *CyHV-3* in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen von CCB Zellen unterschiedlicher Passagezahl. Angegeben ist die Viruskonzentration im Zellkulturmedium als $TCID_{50}$ / ml. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
*signifikante Unterschiede innerhalb der Zelllinie relativ zum 0. Tag *p.i.*
Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts.

Um zu prüfen, ob Zellen aus unterschiedlichen Passagen eine unterschiedliche Empfänglichkeit für *CyHV-3* aufwiesen, wurden neben den bereits beschriebenen Versuchen auch Infektionsversuche mit CCB-Zellen aus unterschiedlichen Zell-Passagen durchgeführt. Dazu wurden die CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335 infiziert und der Virusgehalt im Medium-Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt (Abb. 4). Dabei zeigte sich, dass die

Replikationsleistung von CCB-Zellen aus den Passagen 70 und 335 nicht signifikant voneinander abwichen und signifikant höher lagen als Zellen aus der Passage 146. Medium, das am Tag 4 *p.i.* und am Tag 7 *p.i.* von diesen Zellen abgesammelt wurde, löste in dem durchgeführten Versuch keinen cytopathischen Effekt aus nachdem es in Kulturen von CCB-Zellen der Passage 72 inokuliert worden war. Den höchsten Gehalt an infektiösem Virus pro Milliliter Medium erreichte die Zelllinie CCB 70 an Tag 4 *p.i.* mit 7000 Viruspartikeln.

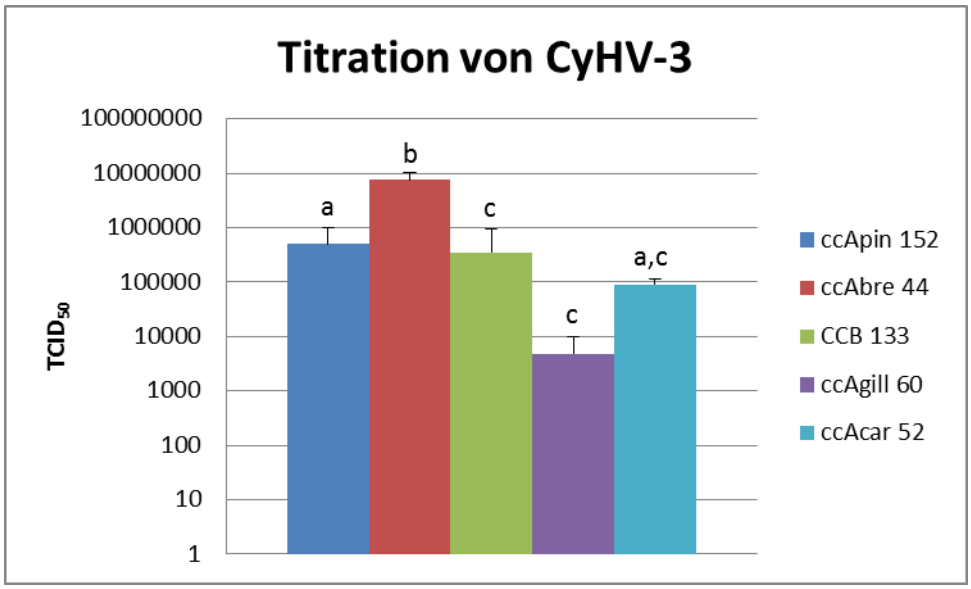

Abb. 5: Titer von *CyHV-3* in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen von den Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB Zellen. Angegeben ist die Viruskonzentration im Zellkulturmedium als $TCID_{50}$ / ml. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien.

Weiterhin wurde zur Ermittlung der am besten geeigneten Zelllinie für die Replikation und Re-Isolation des *CyHV-3* Monolayer-Kulturen von Zellen aus den verschiedenen Zelllinien mit Viruslösungen unterschiedlicher Virusgehalte inokuliert und über 14 Tage kultiviert. Die verwendete Ausgangslösung hatte auf CCB-Zellen einen Virustiter von 3,5 x 10^5 $TCID_{50}$ / ml und es wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe von 10^0 bis 10^{-6} eingesetzt. Bei den in Abb. 5 dargestellten Werten handelt es sich um $TCID_{50}$ Angaben, wobei ein höherer Wert auf eine größere Empfänglichkeit der infizierten Zelllinie hinweist. Dabei zeigte sich, dass Zellen der ccAbre 44 Zelllinie unter den neuentwickelten Zelllinien mit einem vollständigen cytopathischen Effekt in einer Verdünnung von 10^{-6} die größte Empfänglichkeit für

CyHV-3 aufwies. Mit einem CPE in einer signifikant geringeren Viruskonzentration folgten auf einem nahezu identischen Niveau ccApin 152 und CCB 133 Zellen. Die geringste Empfänglichkeit für *CyHV-3* zeigten unter den untersuchten Zelllinien ccAgill 60-Zellen mit einem CPE bis zu einer Verdünnung von 10^{-3}.

4.1.2 Infektionsversuche von Zellkulturen mit CEV

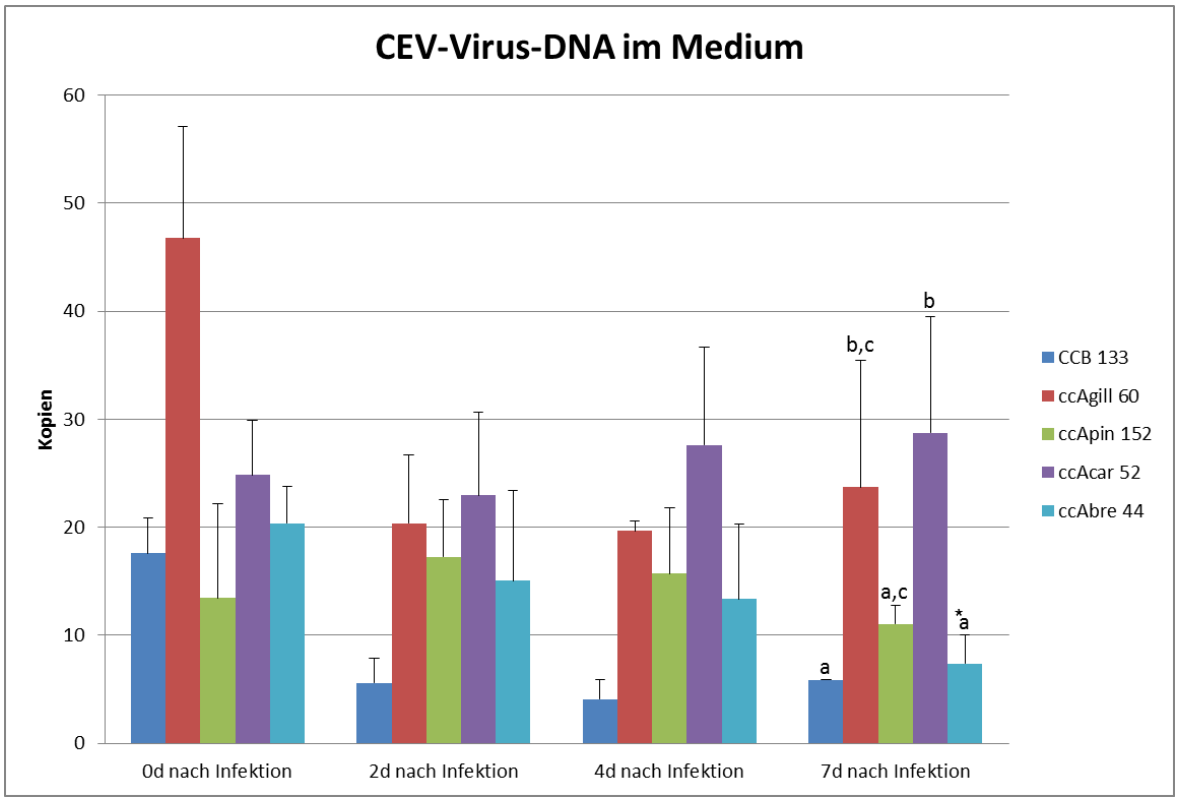

Abb. 6: Viruslast im Medium von Kulturen unterschiedlicher Zelllinien nach Infektion mit CEV. Untersucht wurden die Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin sowie CCB-Zellen. Angegeben ist die Anzahl Kopien virusspezifischer DNA in 1 µl Zellkulturmedium.
*signifikante Unterschiede relativ zu 0. Tag *p.i.*
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Bei den Infektionsversuchen mit CEV wurden Monolayerkulturen der Zelllinien CCB 133, ccAgill 60, ccApin 152, ccAcar 52 und ccAbre 44 mit infektiösem Virus inokuliert (Abb. 6). Im Anschluss wurde direkt nach der Infektion (Tag 0) sowie am 2., 4. und 7. Tag Mediumüberstand von den Zellkulturplatten gewonnen und mittels qPCR auf virale DNA untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Gehalt an viraler DNA in den

Zelllinien über den beobachteten Zeitraum kontinuierlich abnahm. Lediglich die ccAcar 52 und die ccAgill 60 zeigten eine geringe Zunahme viraler DNA, wobei die statistische Auswertung lediglich für die Gehalte von CEV spezifischer DNA im Überstand von ccAbre 44-Zellen eine signifikante Veränderung in Form einer kontinuierlichen Virusabnahme ergab. Zwischen den Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede der Gehalte an CEV-spezifischer DNA an Tag 7 *p.i.* festgestellt werden.

Die Untersuchungen von Zellkultur-Monolayern auf das Auftreten bzw. den Gehalt viraler mRNA ergaben für die untersuchten Zellkulturen keine Nachweise für CEV. Somit ergaben sich keine Hinweise auf eine Replikation von CEV in den untersuchten Zelllinien.

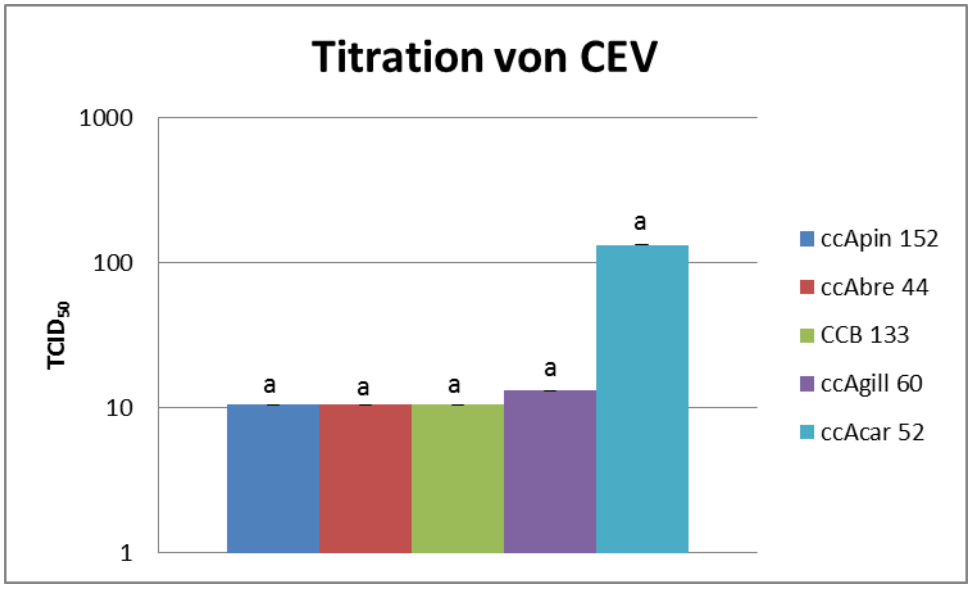

Abb. 7: Titer von CEV in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen von den Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB Zellen. Angegeben ist die Viruskonzentration im Zellkulturmedium als $TCID_{50}$ / ml. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien.

Weiterhin wurden Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration mit CEV in Monolayerkulturen von allen Zelllinien in gleicher Weise wie das *CyHV-3* inokuliert und diese Kulturen inkubiert, um die Empfänglichkeit der unterschiedlichen Zelllinien für eine Infektion mit CEV zu vergleichen (Abb. 7). Dabei kam es in den Vertiefungen, die mit unverdünntem *CEV* inokuliert wurden zu einem Absterben der

Zellen. Nur bei ccAcar 52 waren davon auch Zellen in einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} betroffen.

4.1.3 Infektionsversuche von Zellen mit einem karpfenpathogenen Paramyxovirus

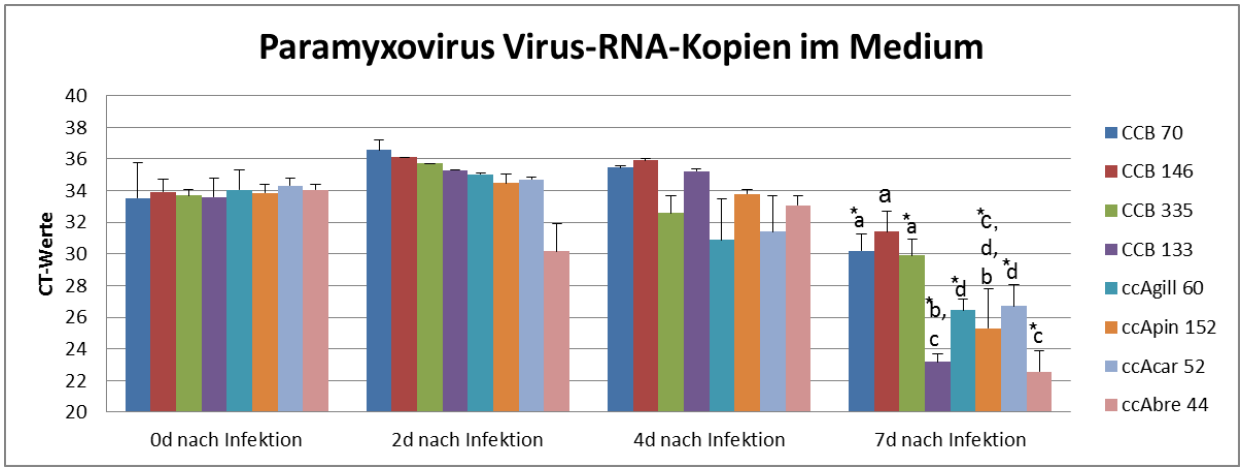

Abb. 8: Viruslast im Medium von Kulturen unterschiedlicher Zelllinien nach Infektion mit dem Paramyxovirus. Untersucht wurden die Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin sowie CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335. Angegeben ist der CT-Wert der virusspezifischen RNA.
*signifikante Unterschiede relativ zu 0. Tag *p.i.*
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Neben den bereits beschriebenen Viren wurden die unterschiedlichen Zelllinien als auch CCB-Zellen aus verschiedenen Passagen mit einem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert. Anschließend wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion der Gehalt viraler RNA im Überstand bestimmt (Abb. 8). Da für die Quantifizierung der Virusgehalte kein Plasmid-basierter Standard zur Verfügung stand, wurden in Abb. 8 CT-Werte der Real-Time qPCR aufgetragen. Zunächst wurde beobachtet, dass die so im Kulturmedium bestimmten Virusgehalte von Tag 0 auf 2. Tag *p.i.* abnahmen. Dabei war die Menge an viraler RNA des karpfenpathogenen Paramyxovirus im Medium von ccAbre 44 und CCB 133 am höchsten, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gehalten auf den beiden Zelllinien gab. Danach folgten die im Medium von ccApin 152, ccAgill 60 und ccAcar 52 bestimmten Gehalte. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Zelllinien. Die geringste Replikationsrate wies das Virus in der

Zelllinie CCB 146 auf. Allerdings gab es auch hier keine signifikanten Unterschiede zu CCB 70 und CCB 335.

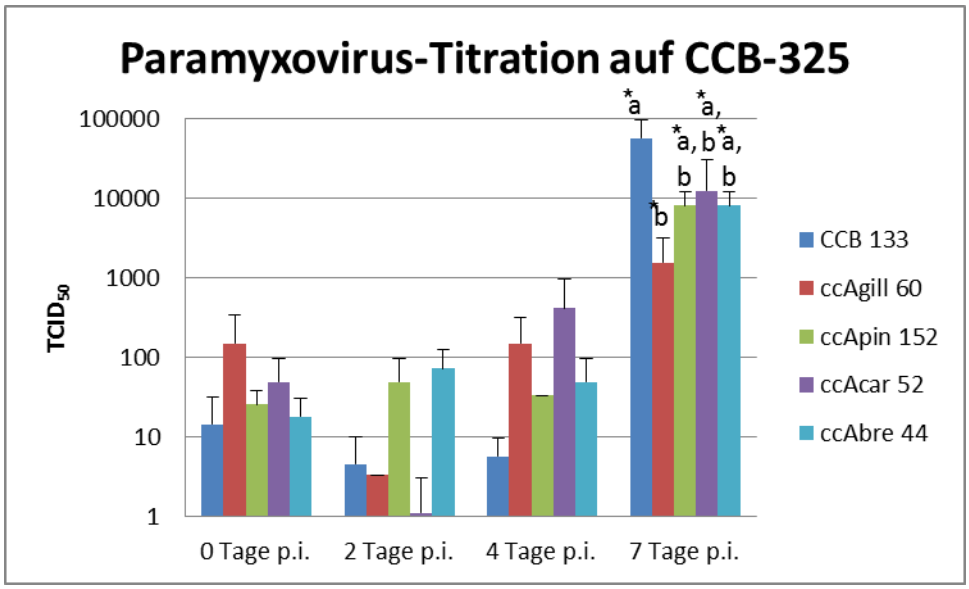

Abb. 9: Titer von Paramyxovirus in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen unterschiedlicher Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
*signifikante Unterschiede relativ zum 0. Tag p.i.
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Zum Nachweis infektiöser Viruspartikel im Kulturüberstand wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, unterschiedliche Verdünnungen von Mediumproben aus den mit Paramyxovirus-infizierten Kulturen der unterschiedlichen Zelllinien in Monolayerkulturen von CCB-Zellen der Passage 325 inokuliert. Die dabei ermittelten Virusgehalte im Mediumüberstand der mit Paramyxovirus infizierten Zelllinien wurden als $TCID_{50}$ Werte angegeben (Abb. 9). Dabei ließen sich die höchsten $TCID_{50}$ / ml Werte in infizierten Kulturen von CCB-133 Zellen nachweisen, wobei es aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den infizierten CCB, ccAbre, ccAcar und ccApin Zellen gab. Die geringste Replikationsleistung für das Paramyxovirus wies die ccAgill Zelllinie mit im Mittel knapp über 1000 infektiösen Viruspartikeln pro Milliliter auf. Alle eingesetzten Zelllinien wiesen am 7 Tag *p.i.* einen signifikant höheren Gehalt infektiöser Viruspartikel als am 0. Tag *p.i.* auf.

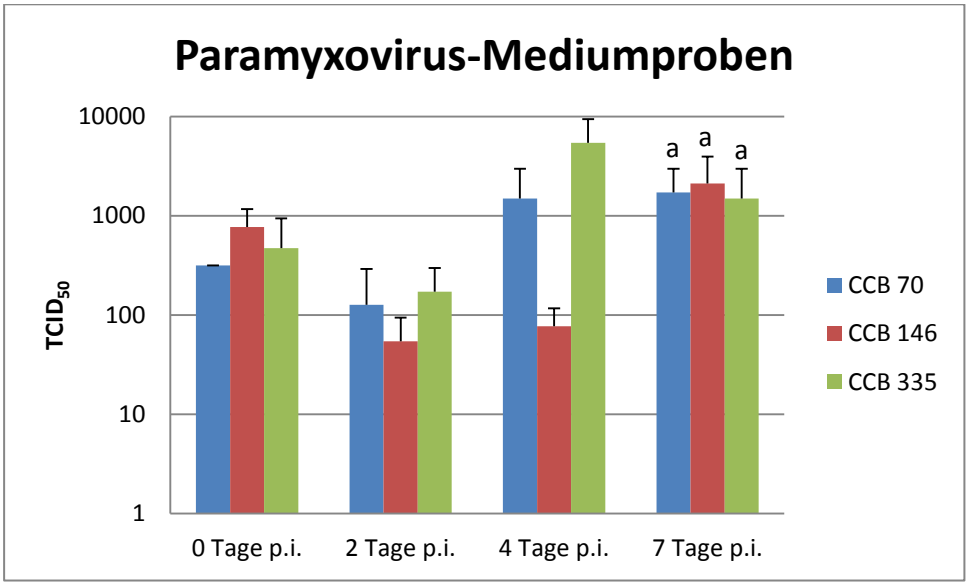

Abb. 10: Titer von Paramyxovirus in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen von CCB-Zellen unterschiedlicher Passagen. Angegeben ist die Viruskonzentration im Zellkulturmedium als TCID50 / ml. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
*signifikante Unterschiede innerhalb der Passage relativ zum 0. Tag p.i.
Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts.

Zur Überprüfung passagespezifischer Unterschiede zwischen unterschiedlichen CCB-Passagen in Bezug auf ihre Empfänglichkeit für das karpfenpathogene Paramyxovirus wurden Infektionsversuche mit verschiedenen Zellpassagen durchgeführt (Abb. 10). Dazu wurden die CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335 infiziert, der Mediumüberstand am 0., 2., 4. und 7. Tag *p.i.* abgenommen und auf CCB-Zellen der Passage 72 titriert. Dabei zeigte sich, dass die CCB Passage 146 am 4. Tag *p.i.* deutlich weniger infektiöse Viruspartikel ins Medium abgab als die CCB-Passagen 70 und 335. Aus der Auswertung der Ergebnisse am 7. Tag *p.i.* geht hervor, dass die Virustiter im Medium der Zell-Passagen 70, 146 und 335 zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant voneinander abwichen und auch zum Tag 0 *p.i.* keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Es kam somit zu keinem signifikanten Anstieg der Replikation infektiösen Paramyxovirus über den Beobachtungszeitraum von 7 Tagen.

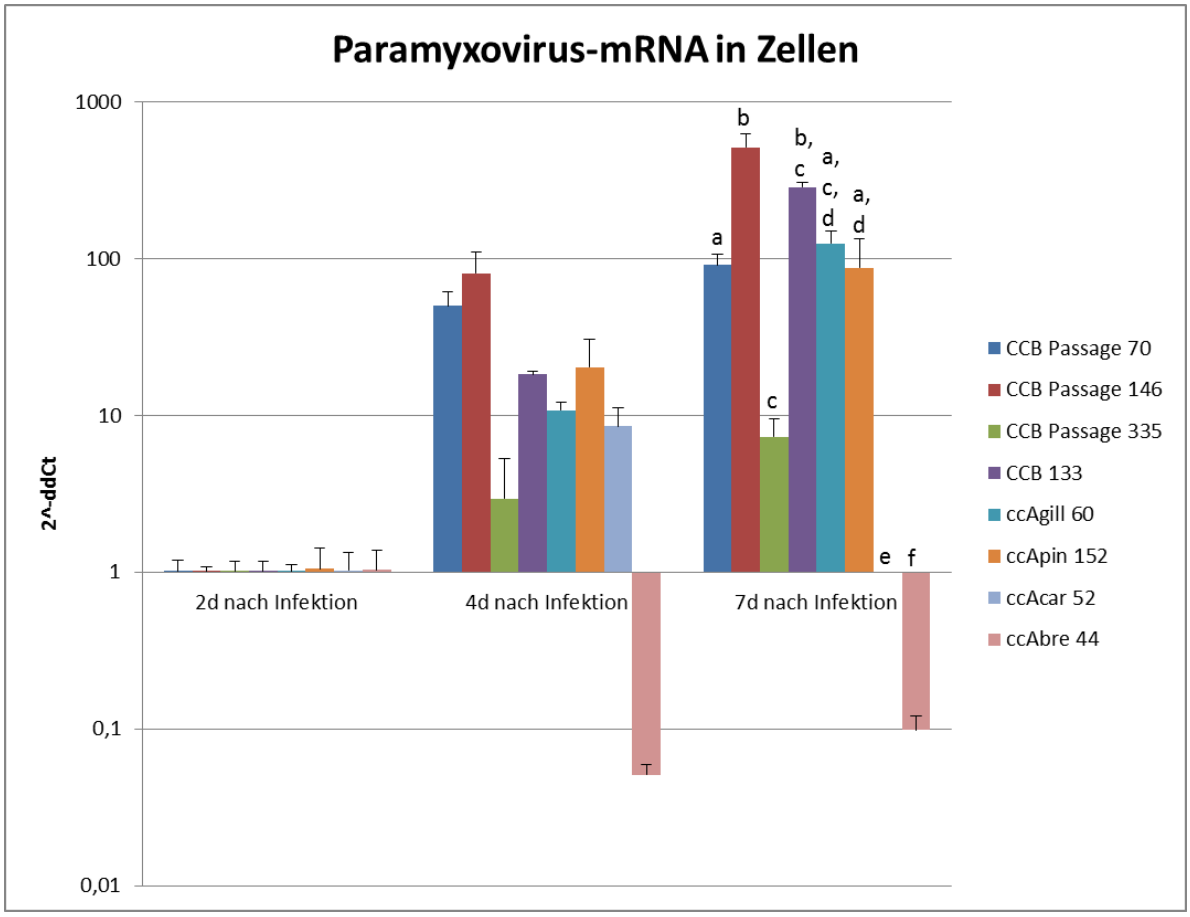

Abb. 11: Replikation des Paramyxovirus in Zellen aus unterschiedlichen Zelllinien, sowie in CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335. Als Indikator für die Replikation von Paramyxovirus wurde die Transkriptionsrate viraler RNA mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen.
Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien innerhalb eines Zeitpunkts an.

Neben dem Gehalt an viraler RNA im Medium wurde auch der Gehalt an Paramyxovirus-mRNA in den Zellen der infizierten Zelllinien und in Zellen aus unterschiedlichen CCB-Passagen bestimmt, wobei die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode zur Quantifizierung der ermittelten CT-Werte genutzt wurde (Abb. 11). Dabei zeigte sich, dass die Menge Paramyxovirus-spezifischer mRNA in den Zellen vom 2. bis zum 7. Tag *p.i.* signifikant zunahm. Weiterhin war zu erkennen, dass sich in den CCB-Zellen der Passage 146 der höchste Gehalt an viraler mRNA nachweisen ließ. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu CCB-Zellen der Passage 133. Innerhalb der unterschiedlichen CCB-Passagen wurde in CCB-Zellen der Passage 335 der geringste Gehalt viraler mRNA ermittelt, während die geringste Menge an viraler

mRNA im Vergleich aller Zelllinien in ccAbre 44 gefunden wurde. Für die Zelllinie ccAcar 52 stehen für Tag 7 *p.i.* keine Daten zur Verfügung.

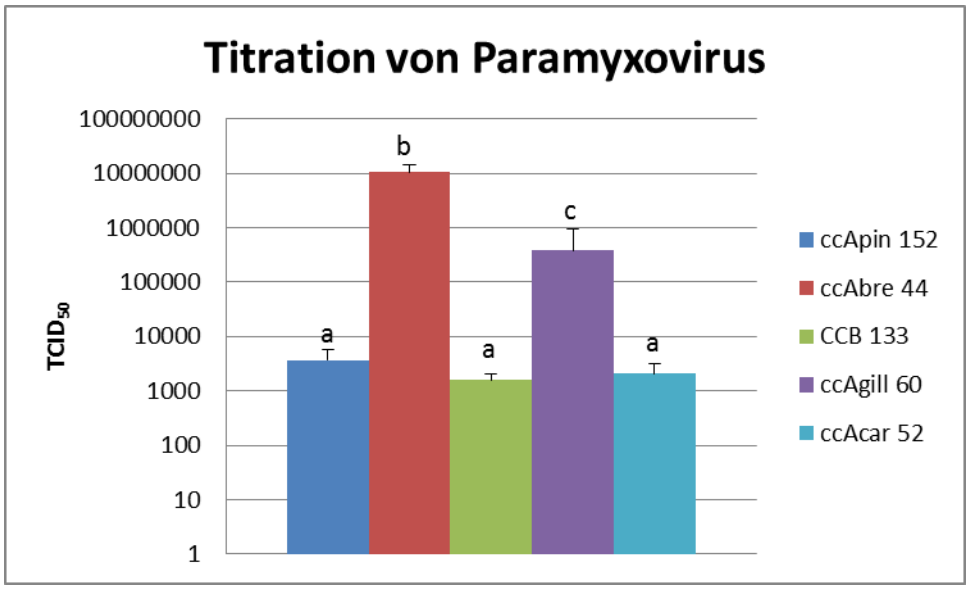

Abb. 12: Titer von Paramyxovirus in Zellkulturmedium von Monolayerkulturen von den Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB Zellen. Angegeben ist die Viruskonzentration im Zellkulturmedium als $TCID_{50}$ / ml. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte von n=3 Kulturen. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien.

Die Inokulation von Lösungen mit unterschiedlichen Gehalten des Paramyxovirus in Monolayerkulturen aus allen Zelllinien bestätigte, dass das Virus in ccAbre 44-Zellkulturen die besten Replikationsergebnisse erreichte. Dabei zeigte sich, dass bei diesen Zellen mindestens ein $TCID_{50}$ von $1{,}05 \times 10^{7}$ erreicht wurde, wobei für genauere Angaben eine höhere Verdünnung über 10^{-6} hinaus nötig gewesen wäre. Mit einem $TCID_{50}$ von $3{,}8 \times 10^{5}$ folgte ccAgill 60. An dritter Stelle und ohne signifikante Unterschiede untereinander schlossen sich die Zelllinien ccApin 152, CCB 133 und ccAcar 52 mit einem $TCID_{50}$ zwischen $1{,}5 \times 10^{3}$ und $3{,}7 \times 10^{3}$ an (Abb. 12).

Tabelle 9: Kopienzahl virusspezifischer DNA bzw. RNA in 1µl Zellkulturmedium von *CyHV-3*, CEV und Paramyxovirus aus dem Mediumüberstand von CCG-Zellen.

	Tag 1 *p.i.*	**Tag 2 *p.i.***	**Tag 3 *p.i.***	**Tag 4 *p.i.***
CyHV-3	151558,95± 3039,21	113091,91± 18573,21	118770,34± 17044,13	122280,98± 8197,68
CEV	1974,58± 397,31	1290,55± 80,15	1076,22± 117,00	891,77± 157,42
Paramyxovirus (Ct-Werte)	32,39± 1,34	36,01± 0,81	33,81± 3,81	34,28± 0,53

Tabelle 10: Angegeben ist die Kopienanzahl viraler mRNA aus *CyHV-3*, CEV, Paramyxovirus in Monolayerkulturen aus CCG-Zellen an Tag 4 *p.i.* normalisiert gegen 100000 Kopien des Gens, das für das 40S ribosomale Protein S11 kodiert

Virus	**CyHV-3**	**CEV**	**Paramyxovirus ($2^{-\Delta\Delta CT}$-Werte)**
Virale mRNA	1021503,03± 180831,42	2,49	1,02± 0,30

Die *Cyprinus Carpio* Gill Zelllinie (CCG) wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, mit den untersuchten karpfenpathogenen Viren infiziert und kultiviert. Im Anschluss wurde täglich über einen Zeitraum von 4 Tagen Medium zur Bestimmung der Menge an freigesetzter viraler DNA bzw. RNA wie beschrieben beprobt. Am 4. Tag *p.i.* wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturvertiefungen gesammelt und auf virale mRNA von *CyHV-3*, CEV und Paramyxovirus untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 und 10 dargestellt. Dabei zeigten die ermittelten Virusgehalte, dass es bei *CyHV-3* zu einer Abnahme der viralen DNA bis Tag 2 *p.i.* kommt. Nach Tag 2 *p.i.* bis zum Ende des Versuches war eine leichte Zunahme erkennbar, wobei die statistische Auswertung der erhobenen Daten keine signifikante Veränderung des Virusgehaltes über den gesamten Zeitraum ergab.

Die Menge viraler DNA im Mediumüberstand von mit CEV infizierten Zellen nahm über den gesamten Zeitraum kontinuierlich ab.

Bei mit dem Paramyxovirus infizierten Zellen war, wie auch beim *CyHV-3*, zunächst eine leichte Abnahme der Virus-RNA von Tag 2 *p.i.* zu Tag 3 *p.i.* zu beobachten. Danach nahm der Gehalt an viraler RNA wieder leicht zu, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gehalten viraler RNA im Überstand über den beobachteten Zeitraum festzustellen war.

Bei der Untersuchung auf virale mRNA an Tag 4 *p.i.* (Tab. 10) zeigten sich relativ hohe Werte für *CyHV-3*, während mRNA von CEV und vom karpfenpathogenen Paramyxovirus lediglich in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 11: Kopienzahl virusspezifischer DNA bzw. RNA in 1 µl Zellkulturmedium von *CyHV-3*, CEV, Paramyxovirus re-isoliert aus Primärkulturen von Kiemenzellen von *Cyprinus carpio*

Virus	Fisch	Tag 1 *p.i.*	Tag 2 *p.i.*
CyHV-3	Karpfen 1	995653,39 ± 94946,48	776981,34* ± 75259,01
	Karpfen 2	895648,92± 41433,35	829969,70* ± 117363,05
	Karpfen 3	962116,81± 120664,41	979409,69 * ± 203579,46
CEV	Karpfen 1	216,91± 14,30	200,26*± 22,78
	Karpfen 2	236,54± 24,81	223,62*± 19,23
	Karpfen 3	158,68± 14,88	128,10*± 19,62
Paramyxovirus (Ct-Werte)	Karpfen 1		27,54 ± 0,38
	Karpfen 2		29,78 ± 1,37
	Karpfen 3		27,91± 1,40

*: signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 *p.i.* und Tag 2 *p.i.*

Die Primärkulturen aus vereinzelten Kiemenzellen wurden aus Kiemen von drei Karpfen angelegt, mit den hier untersuchten Viren infiziert und weiter kultiviert. Anschließend wurden am 1. und am 2. Tag *p.i.* Mediumproben von den Kulturen gewonnen und der Gehalt an *CyHV-3* und CEV-spezifischer DNA sowie Paramyxovirus-spezifischer RNA bestimmt, wobei sich die Probennahme zur Untersuchung auf Paramyxovirus auf den 2. Tag *p.i.* beschränkte. Dabei zeigte sich, dass es ausschließlich beim 3. Karpfen zu einer leichten Zunahme der *CyHV-3*-spezifischen DNA-Gehalte kam (Tab. 11). Bei den anderen Fischen wurden am 2. Tag *p.i.* dagegen signifikant geringere Virusgehalte bestimmt.

Tabelle 12: Kopienanzahl viraler mRNA spezifisch für *CyHV-3*, CEV und Paramyxovirus aus Primärkulturen von Kiemenzellen von Karpfen an Tag 2 *p.i.* normalisiert gegen 100000 Kopien des Gens, das für das 40S ribososomale Protein S11 kodiert

Fisch	***CyHV-3***	**CEV**	**Paramyxovirus (delta,delta CT-normalisiert)**
Karpfen 1	47077,77± 10019,30		27,54± 0,38
Karpfen 2	39692,12± 2538,11	37,70± 13,08	29,78± 1,37
Karpfen 3	87001,23± 12467,26		27,91± 1,40

Die Bestimmung der Gehalte an viraler mRNA der drei Viren in den Primärkulturen von Kiemenzellen zeigte, dass es in den Kiemenzellen aus den untersuchten Karpfen zu einer Replikation des *CyHV-3* und des Paramyxovirus kam (Tab. 12). Für *CEV* war nur in Kiemenzellen des 2. Karpfens ein relativ geringer Gehalt an viraler mRNA nachweisbar.

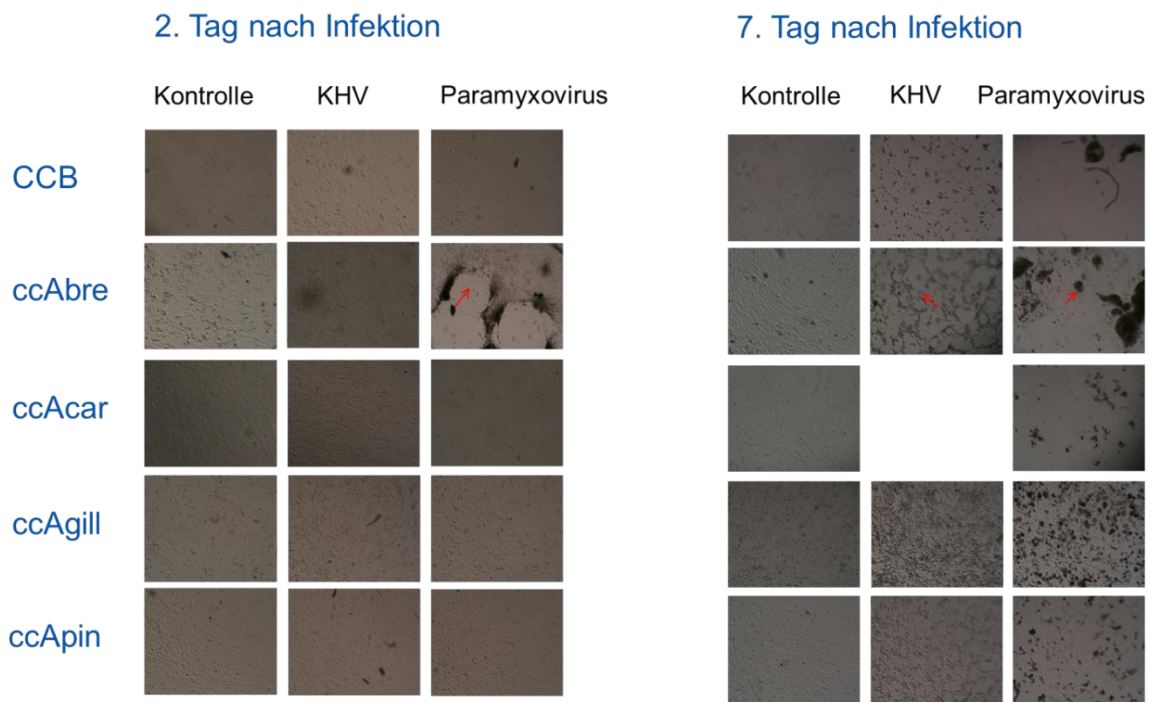

Abb. 13: Übersicht über die Morphologie von nicht infizierten Zellkulturen der untersuchten Zelllinien und nach Infektion mit *CyHV-3* und dem Paramyxovirus nach 2 und 7 Tagen Inkubation. Die Übersicht zeigt Fotographien von alle Zelllinien bei 100-facher Vergrößerung am 2. Tag *p.i.* und am 7. Tag *p.i..* Das CEV induziert auf den untersuchten Zelllinien keinen cytopathischen Effekt und wurde daher nicht gesondert dargestellt. Die eingetragenen Pfeile bezeichnen häufige Kennzeichen eines cytopathischen Effektes auf den verwendeten Zelllinien wie zum Beispiel Lochbildung im Zellrasen und Entstehung von Riesenzellen.

4.1.4 Infektionsversuche von Explantatkulturen von Kiemengewebe mit CEV

Die Infektionsversuche mit Explantatkulturen aus Kiemenfragmenten von Karpfen waren, wie bereits im Kapitel Material und Methoden unter Versuchsansätze beschrieben, durchgeführt worden. Dabei sollte ein geeigneter Zelltyp für die Replikation und Re-Isolation von CEV *in vitro* gefunden werden. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung eines cytopathischen Effektes in den Zellkulturen. Es war jedoch in mehreren Versuchsdurchgängen auch nach einer Woche Inkubationszeit in mit CEV inokulierten Kulturen ein cytopathischer Effekt in keiner der Explantatkulturen zu beobachten.

4.2 Zelllinientypisierung mittels der Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin

4.2.1 Typisierung der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB

Tabelle 13: Typisierung der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB an Tag 2 p.i. Angegeben ist die Anzahl mRNA-Kopien der Gene die die Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin codieren, als Mittelwert und Standardabweichung in n=3 Kulturen normalisiert gegen 100000 Kopien des 40S ribosomalen Proteins S11.

	Inkubationszeit: Tag 2				
	Kontrolle: nicht infizierte Zelllinien				
	Zelllinien				
Zellmarker	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	499,07 ± 78,37	45,84 ± 7,60	667,05 ± 38,13	896,48 ± 113,92	216,77 ± 26,92
CK15	1438,21 ± 156,57	8496,29 ± 825,11	200,92 ± 28,35	9884,38 ± 412,90	11503,92 ± 2036,57
Occludin	31,57 ± 15,47	66,89 ± 4,06	122,38 ±	59,50 ±	171,98 ±

			12,01	12,83	36,75
Vimentin	81724,77 ± 1562,00	44224,57 ± 12922,49	127923,23 ± 3789,90	5464,17 ± 313,47	4536,91 ± 1289,92
	Infektion mit *CyHV-3*				
	CCB	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	511,11 ± 75,32	67,08 ± 25,66	508,00 ± 334,95	1079,54 ± 121,50	186,20 ± 39,77
CK15	1653,40 ± 182,49	4558,64* ± 508,55	98,57* ± 68,69	8330,12 ± 379,62	7687,52* ± 1097,02
Occludin	26,44 ± 8,39	95,25 ± 25,02	95,49 ± 72,04	59,50 ± 12,83	163,35 ± 6,02
Vimentin	72117,62 ± 5628,71	42965,93 ± 4194,90	84083,95* ± 50898,08	4747,62 ± 52,23	3230,25 ± 843,73
	Infektion mit Karpfenpathogenes Paramyxovirus				
Zelllinie	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	648,22 ± 238,47	44,49 ± 10,08	798,32 ± 102,18	969,39 ± 119,69	186,81 ± 37,46
CK15	1406,58 ± 245,29	5560,61* ± 1162,40	183,10 ± 13,91	7482,56 ± 1383,59	9152,95 ± 1422,94
Occludin	45,82 ± 1,56	66,46 ± 30,54	131,65 ± 36,28	53,39 ± 3,63	123,76 ± 13,29
Vimentin	76084,41 ± 3729,50	39469,93 ± 2974,70	147216,55 ± 2626,14	4905,35 ± 1067,75	4387,43 ± 525,65
	Infektion mit CEV				
Zelllinie	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	462,79 ± 47,82	55,92 ± 8,79	797,56 ± 112,75	858,95 ± 129,51	238,33 ± 45,02
CK15	1583,17 ± 175,18	1468,60* ± 90,30	213,74 ± 41,06	5918,77 ± 627,37	4406,78* ± 667,50
Occludin	27,27 ± 15,27	34,87* ± 17,85	104,73 ± 6,15	51,35 ± 2,69	82,73 ± 16,40
Vimentin	68692,87 ± 8233,33	36121,15 ± 4005,60	122634,19 ± 2377,02	4133,38 ± 573,98	5013,67 ± 1040,71

* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Tabelle 14: *Typisierung der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB an Tag 4 p.i. Angegeben ist die Anzahl mRNA Kopien der Gene, die die Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin codieren, als Mittelwert und Standardabweichung von n=3 Kulturen normalisiert gegen 100000 Kopien des 40S ribosomalen Proteins S11.*

	Inkubationszeit: Tag 4				
	Nicht infizierte Kontrolle				
	Zelllinien				
Zellmarker	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	960,68 ± 126,19	46,93 ± 7,23	566,69 ± 18,27	1266,62 ± 93,32	172,61 ± 63,35
CK15	2353,65 ± 65,60	12868,11 ± 317,94	276,66 ± 21,52	12827,11 ± 1327,41	16628,59 ± 1821,42
Occludin	41,91 ± 16,09	122,19 ± 28,14	101,29 ± 11,77	53,87 ± 7,93	238,80 ± 84,05
Vimentin	76272,39 ± 1997,29	56502,77 ± 10133,35	151231,22 ± 3809,22	5885,36 ± 494,99	2065,47 ± 1322,52
	Infektion mit *CyHV-3*				
Zelllinie	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	835,58 ± 153,60	252,95* ± 6,83	196,27* ± 33,97	1312,62 ± 273,50	224,36 ± 55,85
CK15	1450,25* ± 371,06	714,25* ± 105,61	105,76* ± 12,66	9971,66 ± 2143,62	618,49* ± 65,94
Occludin	27,69 ± 11,72	198,07 ± 51,73	198,10 ± 9,31	65,35 ± 4,57	154,57 ± 32,92
Vimentin	67124,61 ± 9704,82	21157,58* ± 1412,08	37170,59* ± 5080,54	5310,91 ± 1097,64	2192,44 ± 525,66
	Infektion mit karpfenpathogenem Paramyxovirus				
Zelllinie	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	825,52 ± 120,98	108,99* ± 60,43	694,41 ± 28,03	1627,72 ± 56,93	114,82 ± 56,50
CK15	3158,31 ± 208,58	6696,88* ± 879,03	81,96* ± 7,98	10887,18 ± 1343,54	10497,90* ± 2100,14
Occludin	38,77 ± 11,46	102,54 ± 5,40	133,64 ± 17,84	65,90 ± 5,12	174,94 ± 32,88
Vimentin	64193,04 ± 3885,97	52888,22 ± 16162,30	157491,48 ± 3516,95	4894,48 ± 332,73	2817,94 ± 236,14
	Infektion mit CEV				
Zelllinie	**CCB**	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	957,80 ± 77,84	57,59 ± 5,90	705,49 ± 89,88	1290,76 ± 199,34	165,36 ± 19,28
CK15	1953,76 ± 331,41	2829,98* ± 436,49	168,00* ± 14,23	11805,41 ± 1080,88	10801,85* ± 204,32
Occludin	39,57 ± 1,61	41,79* ± 1,59	110,27 ± 19,23	57,72 ± 14,45	148,93 ± 8,62
Vimentin	66028,48 ±	24883,99* ±	146705,69 ±	4034,30 ±	1823,99 ±

	6873,89	3102,10	19064,43	641,73	414,68

* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Tabelle 15: *Typisierung der Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB an Tag 7 p.i. Angegeben ist die Anzahl mRNA Kopien der Gene, die die Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin codieren, als Mittelwert und Standardabweichung in n=3 Kulturen normalisiert gegen Kopien des 40S ribosomalen Proteins S11.*

	Inkubationszeit: Tag 7				
	Nicht infizierte: Kontrolle				
	Zelllinien				
	CCB	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	1347,85 ± 184,16	36,75 ± 22,60	576,11 ± 56,93	859,26 ± 303,50	149,83 ± 21,21
CK15	6880,50 ± 1838,64	13813,68 ± 1690,89	209,70 ± 32,52	5588,71 ± 1418,43	15939,83 ± 3489,63
Occludin	70,06 ± 18,95	71,48 ± 15,13	138,47 ± 31,47	36,63 ± 14,83	260,03 ± 60,72
Vimentin	69468,82 ± 17129,59	53891,37 ± 13019,67	166544,94 ± 8740,13	2959,96 ± 690,13	1211,13 ± 171,23
	Infektion mit *CyHV-3*				
	CCB	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	1210,72 ± 108,39	241,02* ± 94,15	57,36* ± 22,21	768,46 ± 166,04	118,57 ± 32,05
CK15	8011,09 ± 396,80	178,32* ± 27,93	97,82* ± 16,00	3900,12 ± 573,31	191,56* ± 22,17
Occludin	96,07 ± 5,25	170,25* ± 42,88	193,87 ± 27,37	50,20 ± 4,23	143,44 ± 28,75
Vimentin	81448,30 ± 5594,21	13988,80* ± 4637,57	9588,22* ± 1134,27	2995,31 ± 492,39	1153,53 ± 957,81
	Infektion mit karpfenpathogenem Paramyxovirus				
	CCB	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	2101,49 ± 435,35	46,72 ± 4,41	827,60 ± 155,44	1434,71 ± 185,88	469,94* ± 144,17
CK15	13333,01* ± 1440,25	9041,97* ± 1680,94	158,02 ± 16,15	4655,41 ± 2214,18	2818,17* ± 734,37
Occludin	228,96* ± 40,35	47,84 ± 17,61	161,88 ± 50,69	68,19 ± 7,75	255,46 ± 63,89
Vimentin	139744,51* ± 14119,40	35041,75 ± 9742,79	144255,32 ± 14609,70	3338,40 ± 817,57	8846,93* ± 580,14
	Infektion mit CEV				
	CCB	**ccAcar**	**ccAbre**	**ccAgill**	**ccApin**
CDH1	1120,42 ± 61,38	154,55* ± 36,10	532,85 ± 75,91	1032,69 ± 24,64	128,48 ± 10,08
CK15	7228,87 ±	3434,31* ±	251,14 ±	5343,96 ±	12266,30

	595,25	334,21	26,35	309,49	± 2108,36
Occludin	101,77 ± 8,16	63,05 ± 14,96	147,84 ± 8,78	65,42 ± 5,06	276,28 ± 45,81
Vimentin	82756,02 ± 3199,52	55764,18 ± 23241,88	132165,27 ± 5549,44	2240,06 ± 326,92	916,44 ± 301,73

* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Tabelle 16: Expression der Zellmarker in den Ausgangsgeweben der verwendeten Zellkulturen. Angegeben ist die Anzahl mRNA-Kopien der Gene, die die Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin codieren, als Mittelwert und Standardabweichung in n=3 Gewebefragmenten normalisiert gegen 100 000 Kopien des 40S ribosomalen Proteins S11 dargestellt.

Gewebe	**Flosse**	**Kieme**	**Herz**	**Gehirn**
CDH1	50331± 1658	58295± 11297	312± 218	313± 38
CK15	283128± 36595	23647± 1050	56284± 11899	12434± 2541
Ocld	7005± 858	8068± 1850	63± 33	578± 215
Vim	132190± 20340	16301± 1288	63843± 5841	1215838± 132925

Zur Typisierung der neu etablierten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und der Referenzzelllinie CCB wurde die Transkription von Genen untersucht, die für die Proteine Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin kodieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 13 - 15 dargestellt. Bei CDH1, CK15 und Occludin handelt es sich um charakteristische Marker für epitheliale Zellen und bei Vimentin um einen Marker für Fibroblasten. Die Tabelle 13 zeigt die Expressionsraten der genannten Zelllinien in der Kontrollgruppe und unter Infektion mit *CyHV-3*, CEV und einem Paramyxovirus am 2. Tag *p.i.*. Die folgenden beiden Tabellen 14 und 15 stellen die Werte am 4. und 7. Tag nach der Infektion zusammen. Zum Vergleich wurden auch die Ausgangsgewebe der Zelllinien, Flosse, Kieme, Herz und Gehirn von Karpfen, mittels der eingesetzten Marker typisiert (Tabelle 16).

In CCB Zellkulturen wurden von Tag 2 bis 7 *p.i.* eine einheitliche Zunahme der Genexpression der epithelialen Marker und eine Abnahme der Expression von Vimentin beobachtet, wobei Vimentin trotzdem eine höhere Expression aufwies als die anderen Zellmarker.

Die statistische Auswertung der Genexpressionsraten der Markerproteine hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede zwischen nicht infizierten Kontrollen und

Kulturen unter Infektion ergab an Tag 2 *p.i.* bei einer Infektion mit *CyHV-3* eine signifikant niedrigere Ausprägung für Transkription von CK15 in ccAcar, ccAbre und ccApin-Zellen. Bei einer Infektion mit dem Paramyxovirus kam es ebenfalls an Tag 2 *p.i.,* zu einer signifikant geringeren Expression des CK15 in der ccAcar Zelllinie. In den mit CEV behandelten ccAcar und ccApin Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine signifikante Abnahme der Transkription von CK15 und bei ccAcar auch eine signifikante Abnahme von Occludin festgestellt.

Eine Betrachtung der Genexpression für die unterschiedlichen Zellmarker an Tag 4 *p.i.* zeigte eine signifikant geringere Expression für CK15 gegenüber der Kontrolle unter Infektion mit dem *CyHV-3* für CCB-, ccAcar-, ccAbre- und ccApin- Zellen. Weiterhin kam es zu einer signifikant höheren Expression von CDH1 in ccAcar und einer signifikant niedrigeren Expression dieses Markers in ccAbre Zellen. Die Expression von Vimentin war bei einer Infektion mit *CyHV-3* bei den Zelllinien ccAcar und ccAbre ebenfalls geringer.

Unter Infektion mit dem Paramyxovirus kam es, ebenfalls an Tag 4 *p.i.,* zu einer signifikant geringeren Expression von CK15 bei ccAcar-, ccAbre- und ccApin-Zellen. Dagegen wurde CDH1 relativ zur Kontrolle an Tag 4 *p.i.* bei Paramyxovirus-infizierten ccAcar-Zellen signifikant stärker exprimiert.

Mit CEV behandelte ccAcar-Zellen zeigten zum gleichen Zeitpunkt eine signifikant geringere Expression von CK15, Occludin und Vimentin. Dieses war auch bei ccAbre und ccApin Zellen ebenfalls in Bezug auf die CK15-Expression festzustellen.

An Tag 7 *p.i.* konnten signifikante Unterschiede in der Expression aller Zellmarker unter Infektion mit *CyHV-3* bei ccAcar-Zellen beobachtet werden. Dabei wurden im Vergleich zu den ccAcar-Zellen der Kontrolle CDH1 und Occludin signifikant höher und CK15 sowie Vimentin signifikant niedriger exprimiert. Des Weiteren kam es bei ccAbre-Zellen zu einer signifikanten Abnahme von CDH1, CK15 und Vimentin. Die ccApin-Zellen zeigten eine erhebliche und signifikante Abnahme der Genexpression des CK15.

Unter Infektion mit dem Paramyxovirus waren an Tag 7 *p.i.* signifikant veränderte Expressionraten von Zellmarkern bei CCB-, ccAcar- und ccApin-Zellen festzustellen. Dabei lag die Expressionsrate von CK15, Occludin und Vimentin bei den CCB-Zellen deutlich höher als in den Zellen der Kontrolle. Die Expression von CK15 war bei der ccAcar und ccApin-Zelllinie zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer. Weiterhin war bei ccApin eine signifikant erhöhte Expression von CDH1 und Vimentin zu beobachten. Die einzigen signifikanten Veränderungen der Expressionsrate der Zellmarker waren bei ccAcar-Zellen nach Exposition mit CEV an Tag 7 *p.i.* nur bei CDH1 mit einer Erhöhung der Expressionsrate und bei CK15 mit einer Erniedrigung der Genexpression der untersuchten Marker festzustellen.

Insgesamt ergab die Typisierung der neu-entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und der Referenzzelllinie CCB mit Zellmarkern für epitheliale Zellen (CDH1, CK15, Occludin) und Fibroblasten (Vimentin), dass es sich um Mischkulturen aus Epithelzellen und Fibroblasten handelt, wobei das Verhältnis zwischen beiden Zelltypen zwischen den unterschiedlichen Zelllinien variierte. So wiesen Zellen aus dem Gehirn-(CCB, ccAbre) und dem Herzen (ccAcar) einen sehr hohen Anteil an Vimentin auf und zeigten damit eine sehr ähnliche Zelltypverteilung wie ihr jeweiliges Ausgangsgewebe. Dagegen war bei ccAgill (Kieme) und ccApin (Flosse) ein deutlich geringerer Vimentin- und ein deutlich höherer Cytokeratingehalt festzustellen, wobei sich auch diese Verteilung in den untersuchten Kiemen und Flossenproben wiederfand. Die Auswertung der Expression der Markergene unter Infektion mit *CyHV-3, CEV* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus ergab keine eindeutigen Zelltypveränderungen relativ zur Kontrolle. Auch waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Zelllinien oder zwischen den Viren über den Untersuchungszeitraum festzustellen.

4.2.2 Typisierung von CCB- Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335

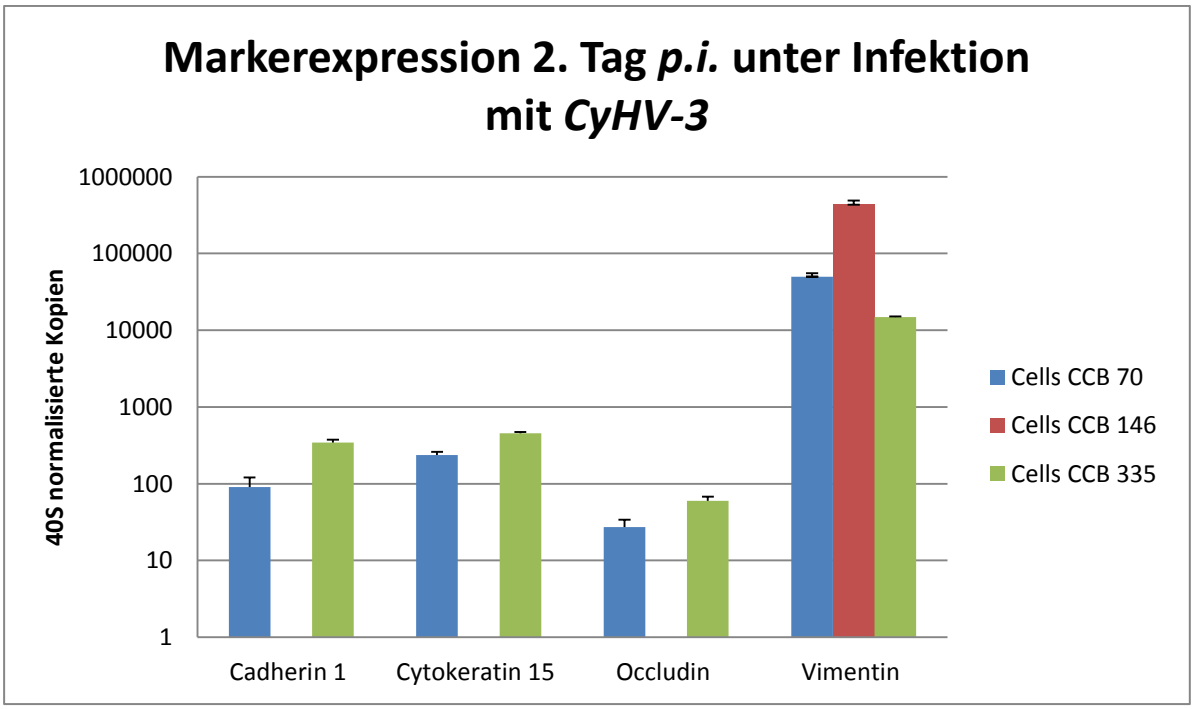

Abb. 14: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 an Tag 2 *p.i.* unter Infektion mit dem *CyHV-3*. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur

Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 17: Signifikante Unterschiede in der Expression von Zellmarkern bei CCB Zellen aus unterschiedlichen Passagen am Tag 2 nach Infektion mit CyHV-3

	Signifikanzen 2. Tag *p.i.* unter Infektion mit *CyHV-3*		
	CCB-Passagen	**P**	**P<0,05**
CDH1	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
CK15	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
Occludin	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
Vimentin	146 vs. 335	<0,001	Ja
	146 vs. 70	<0,001	Ja
	70 vs. 335	<0,001	Ja
CCB-Passagen	**Zellmarker**	**P**	**P<0,05**
CCB-70	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CK15 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CK15 vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-146	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-335	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CK15 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CK15 vs. CDH1	0,024	Ja

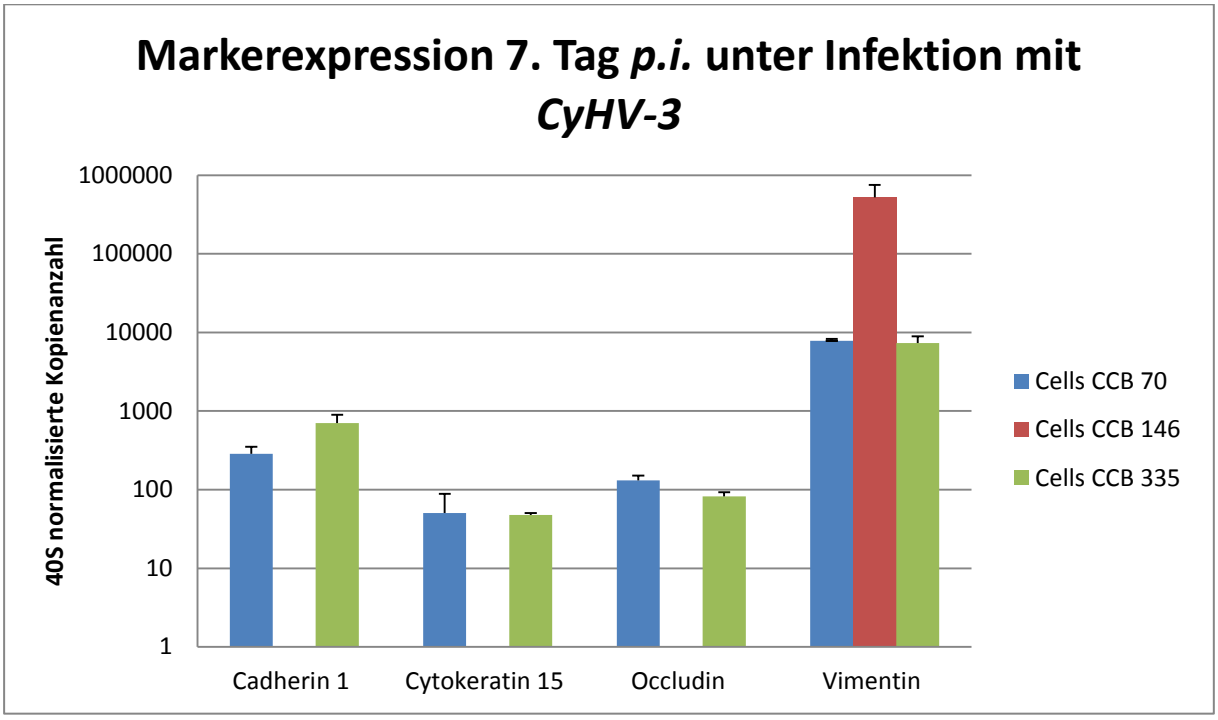

Abb. 15: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 an Tag 2 *p.i.* unter Infektion mit dem *CyHV-3*. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 18: *Signifikante Unterschiede in der Expression von Zellmarkern bei CCB Zellen aus unterschiedlichen Passagen am Tag 7 nach Infektion mit CyHV-3*

	Signifikanzen 7. Tag *p.i.*unter Infektion mit *CyHV-3*		
Zellmarker	**CCB-Passagen**	**P**	**P<0,05**
CDH1	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	0,001	Ja
CK15	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
Occludin	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 146	<0,001	Ja
Vimentin	146 vs. 335	<0,001	Ja

	146 vs. 70	<0,001	Ja
CCB-Passagen	**Zellmarker**	**P**	**P<0,05**
CCB-70	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	CDH1 vs. CK15	<0,001	Ja
	Occludin vs. CK15	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	0,004	Ja
CCB-146	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-335	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
	Occludin vs. CK15	0,038	Ja

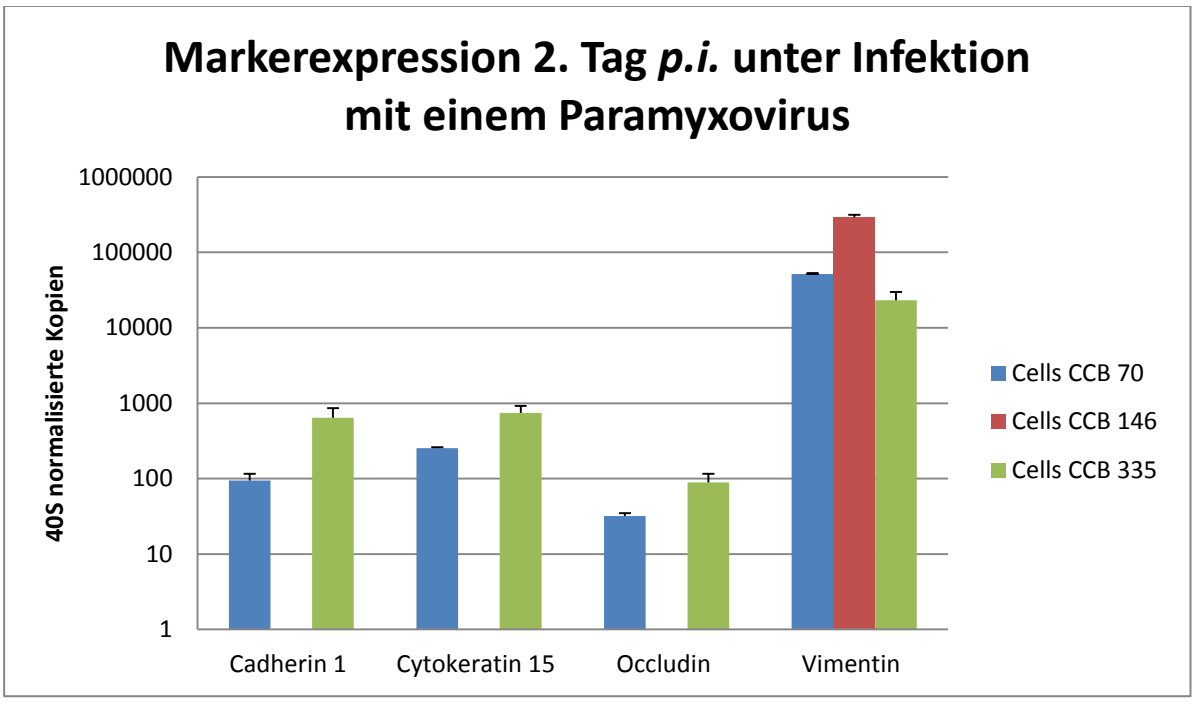

Abb. 16: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 an Tag 2 *p.i.* unter Infektion mit dem Paramyxovirus. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur

Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 19: *Signifikante Unterschiede in der Expression von Zellmarkern bei CCB Zellen aus unterschiedlichen Passagen am Tag 2 nach Infektion mit dem Paramyxovirus*

	Signifikanzen 2. Tag *p.i.* unter Infektion mit einem Paramyxovirus		
	CCB-Passagen	**P**	**P<0,05**
CDH1	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
CK15	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
Occludin	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
Vimentin	146 vs. 335	<0,001	Ja
	146 vs. 70	<0,001	Ja
	70 vs. 335	<0,001	Ja
CCB-Passagen	**Zellmarker**	**P**	**P<0,05**
CCB-70	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CK15 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CK15 vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-146	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-335	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CK15 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja

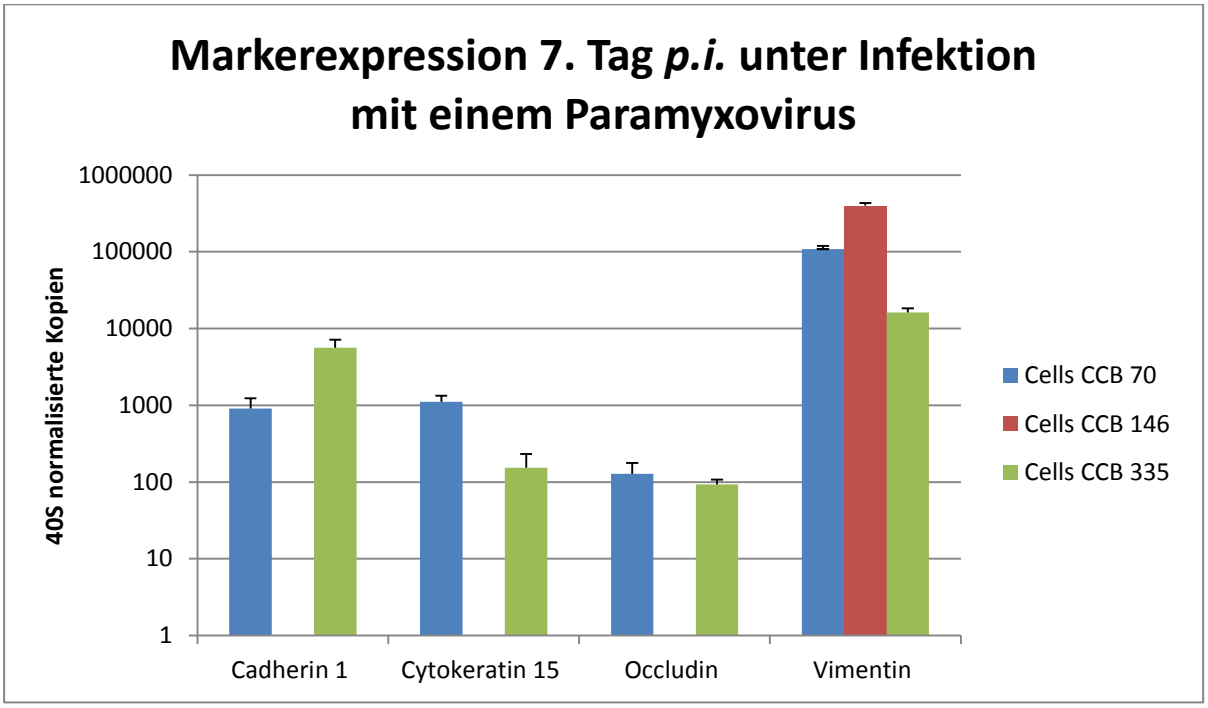

Abb. 17: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 an Tag 7 p.i. unter Infektion mit dem Paramyxovirus. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 20: Signifikante Unterschiede in der Expression von Zellmarkern bei CCB Zellen aus unterschiedlichen Passagen am Tag 7 nach Infektion mit dem Paramyxovirus

	Signifikanzen 7. Tag *p.i.* unter Infektion mit einem Paramyxovirus		
	CCB-Passagen	**P**	**P<0,05**
CDH1	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 70	<0,001	Ja
CK15	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 146	<0,001	Ja
	70 vs. 335	<0,001	Ja
Occludin	70 vs. 146	<0,001	Ja
	335 vs. 146	<0,001	Ja
Vimentin	146 vs. 335	<0,001	Ja
	70 vs. 335	<0,001	Ja
	146 vs. 70	<0,001	Ja
CCB-Passagen	**Zellmarker**	**P**	**P<0,05**
CCB-70	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CK15 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
CCB-146	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja
CCB-335	Vimentin vs. Occludin	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CK15	<0,001	Ja
	CDH1 vs. Occludin	<0,001	Ja
	CDH1 vs. CK15	<0,001	Ja
	Vimentin vs. CDH1	<0,001	Ja

Da CCB-Zellen aus verschiedenen Passagen eine unterschiedliche Empfänglichkeit insbesondere für eine Infektion mit *CyHV-3* aufwiesen, wurden Zellen aus diesen Passagen auf Expression der Gene, die für die hier untersuchten Markerproteine kodieren untersucht. In den Abbildungen 14 - 17 ist die Expression der Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin in CCB-Zellen aus den Passagen 70, 146 und 335 unter Infektion mit *CyHV-3* und dem Paramyxovirus an Tag 2 und 7 *p.i.*

dargestellt. In den Tabellen 17 - 20 sind signifikante Unterschiede in der Expression der Marker zwischen Zellen aus den unterschiedlichen Passagen und zwischen den vier Markern dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass CCB-Zellen aus der Passage 146 im Unterschied zu Zellen aus den Passagen 70 und 335 keine epithelialen Marker exprimierten. Bei diesen Zellen war jedoch das Gen, das den Fibroblastenmarker Vimentin kodierte, signifikant höher exprimiert als in CCB-Zellen aus den Passagen 70 und 335. Dies wurde an beiden Zeitpunkten nach Virusinfektion beobachtet. Sowohl bei einer Infektion mit *CyHV-3* als auch mit dem Paramyxovirus. Dies lässt vermuten, dass es sich bei CCB-Zellen der Passage 146 um eine reine Fibroblastenkultur handelte. Bei der Betrachtung der CCB-Zellen aus den unterschiedlichen Passagen am Tag 2 *p.i.* mit *CyHV-3* zeigte sich, dass Zellen der Passage 335 alle epithelialen Marker signifikant am höchsten exprimierten, während Vimentin signifikant am geringsten exprimiert wurde. An Tag 7 *p.i.* mit *CyHV-3* zeigte sich eine Angleichung in der Expression epithelialer Marker zwischen Zellen aus den Passagen 70 und 335, sodass nur bei Cadherin 1 eine signifikant höhere Expression in den CCB-Zellen der Passage 335 erkennbar war.

Die Expression der Zellmarker am Tag 2 nach Infektion mit dem Paramyxovirus zeigt ein vergleichbares Bild wie unter Infektion mit *CyHV-3* am 2. Tag *p.i.* So wurden auch in diesem Fall von CCB-Zellen der Passage 146 keine epithelialen Marker exprimiert. Darüber hinaus zeigten CCB-Zellen der Passage 335 die signifikant höchste Expression epithelialer Marker und die signifikant niedrigste Expression von Vimentin, wobei auch hier das Vimentin bei allen Passagen um ein Vielfaches höher exprimiert war als die epithelialen Marker. Auch am Tag 7 nach Infektion der CCB Zellen mit dem Paramyxovirus wurde ein zur Infektion mit *CyHV-3* an Tag 7 *p.i.* übereinstimmendes Expressionsmuster der Zellmarker gefunden. Nur Cytokeratin 15 wird zu diesem Zeitpunkt anders als nach 2 Tagen *p.i.* in CCB- Zellen der Passage 70 signifikant höher exprimiert als in CCB Zellen der Passage 335. Insgesamt zeigte sich, dass die Infektion mit unterschiedlichen Viren zu keinen einheitlichen Veränderungen des Zelltyps zwischen dem 2. und dem 7. Tag *p.i.* führt. Weiterhin schien der Anteil epithelialer Zellen in den CCB-Passagen 70 und 335 vergleichbar zu sein, während die Zellen der Passage 146 keine epithelialen Marker exprimierten.

4.2.3 Typisierung von CCG-Zellen und von Primärkulturen aus Kiemen

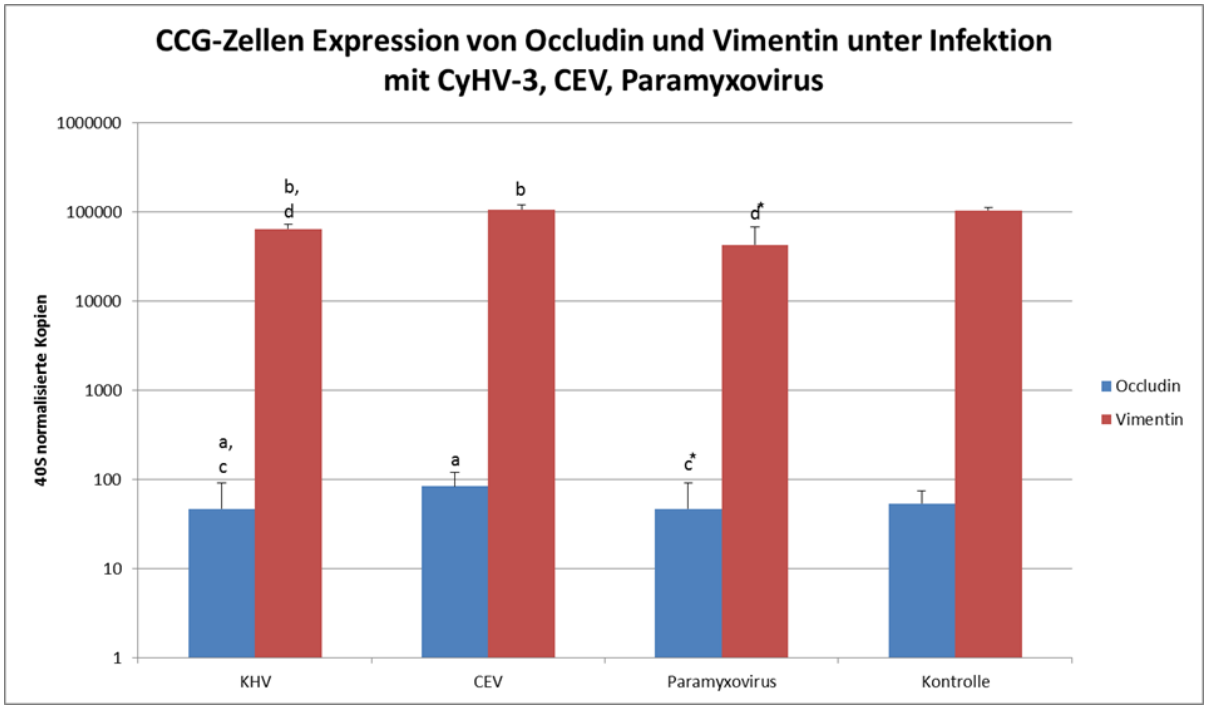

Abb. 18: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in den CCG-Zelllinie an Tag 4 *p.i.* unter Infektion mit dem *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens kodiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Viren.
* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Da bei Infektionen von Karpfen mit CEV und *CyHV-3* Kiemenveränderungen auftreten, wurden sowohl eine Kiemenzelllinie als auch Primärkulturen von Kiemen hinsichtlich Virusinfektion und Zellmarker untersucht. Um eine Typisierung der CCG-Zelllinie mittels der Zellmarker CDH1, CK15, Occludin und Vimentin durchführen zu können, wurde von infizierten CCG-Zellen am 4. Tag *p.i.* zelluläre mRNA gewonnen und diese auf die Expression der genannten Zellmarker untersucht (Abb. 18). Dies ergab, dass von den untersuchten Markern die Genexpression für Vimentin signifikant am höchsten war. Des Weiteren wurde auch Occludin exprimiert, jedoch in deutlich geringerem Umfang. Eine Expression der beiden epithelialen Marker CDH1 und CK15 konnte nicht nachgewiesen werden. Somit handelte es sich bei den hier vorliegenden CCG-Zellen um eine mesenchymale Zelllinie. Nach Virusinfektion konnte nur für CCG-Zellen, die mit dem Paramyxovirus infiziert worden waren, eine

im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere Expression der beiden Markergene festgestellt werden (Abb. 18). Zudem lag nach Infektion mit dem Paramyxovirus die Expression der beiden Markergene auch signifikant niedriger als bei CEV behandelten CCG-Zellen.

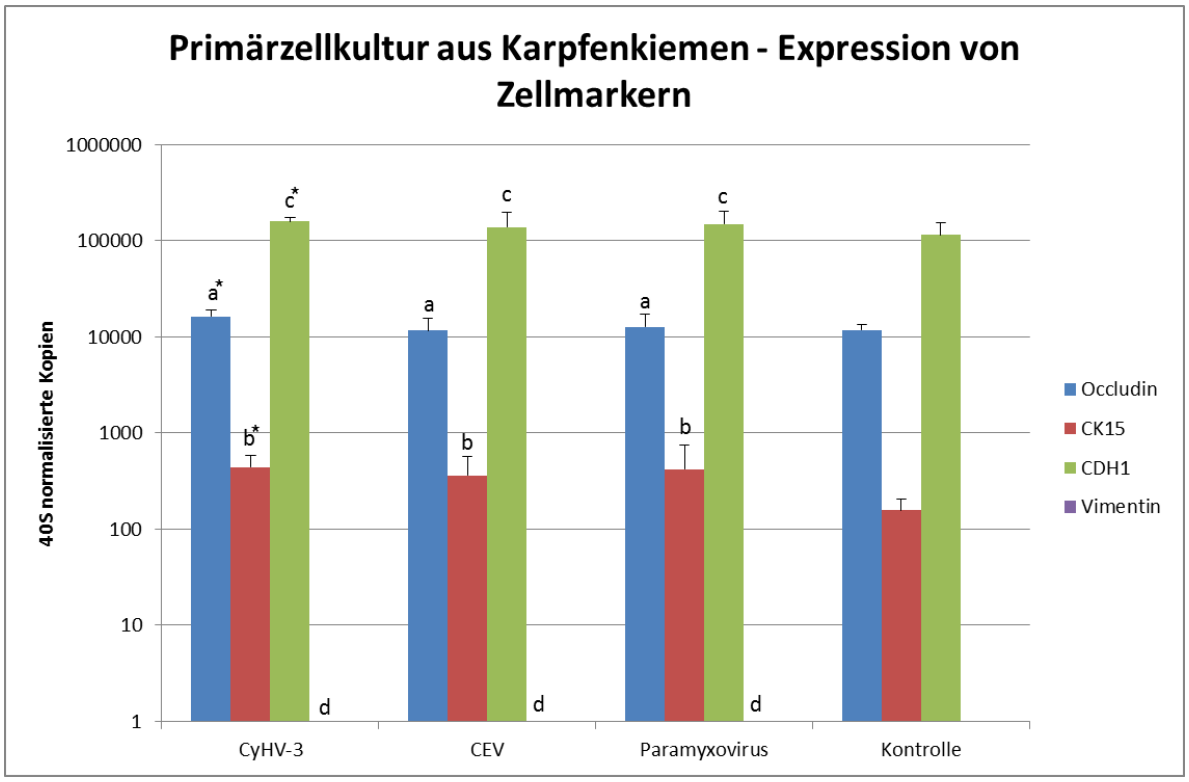

Abb. 19: Expression der Zellmarkergene Cadherin 1, Cytokeratin 15, Occludin und Vimentin in Primärkulturen aus Karpfenkiemen an Tag 2 p.i. unter Infektion mit dem *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus. Die Expressionsraten der Markergene wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens kodiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen. Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien.
* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Für Primärzellkulturen aus Kiemen von Karpfen wurden zunächst Kiemenzellen aus dem Gewebeverband vereinzelt und wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben kultiviert. Nach 48 h Kultur wurden die Zellen beprobt, indem die Zellen vom Boden der Zellkulturplatten gewonnen und daraus zelluläre mRNA isoliert wurde, die im Anschluss auf die Expression von CDH1, CK15, Occludin und Vimentin untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass von den so gewonnenen Zellen ausschließlich die epithelialen Zellmarker Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin exprimiert wurden (Abb. 19). Die Genexpressionsraten für diese Zellmarker waren

jedoch nur nach Infektion der Kiemenzellen mit *CyHV-3* höher als in der Kontrollgruppe. Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate der untersuchten Marker zwischen den mit verschiedenen Viren infizierten Zellkulturen (Abb. 19). Zusammengefasst handelte es sich bei den untersuchten Primärkulturen aus Karpfenkiemen um epitheliale Zellen.

Tabelle 21: Expression der Zellmarkergene CDH1, CK15, Occludin und Vimentin in den Flossenzelllinien ccApin und KFC im Vergleich zur Referenzzellinie CCB nach Infektion der Zellen mit CyHV-3 und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der mRNA-Kopienzahl der Zellmarkergene in n=3 Zellkulturen, normiert auf 100 000 Kopien des Gens, das das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert.

Tag 2	**Zellmarker**	**KFC**	**CCB**	**ccApin**
Kontrolle	CDH1	17,99 ± 7,79	675,08 ± 143,17	53,01 ± 45,86
	CK15	14,07 ± 4,50	570,13 ± 55,23	735,16 ± 118,00
	Occludin	7,95 ± 2,92	20,16 ± 9,21	20,19 ± 10,16
	Vimentin	217,24 ± 52,12	27033,28 ± 3929,40	1145,47 ± 285,51
CyHV-3	CDH1	20,67 ± 9,73	630,94 ± 116,94	86,21 ± 50,57
	CK15	11,51 ± 2,81	558,42 ± 64,82	597,26 ± 44,34
	Occludin	14,49* ± 2,66	28,95 ± 8,35	76,73* ± 20,59
	Vimentin	455,87* ± 51,22	28141,45 ± 4331,25	730,37 ± 151,64
Paramyxovirus	CDH1	117,59 ± 46,36	695,68 ± 110,47	49,30 ± 10,26
	CK15	93,45* ± 10,08	801,24* ± 65,19	489,15* ± 106,18
	Occludin	30,27* ± 5,60	45,88 ± 8,29	270,20* ± 186,95
	Vimentin	1072,93* ± 256,72	25405,51 ± 5405,40	1612,24 ± 1093,39
Tag 4	**Zellmarker**	**KFC**	**CCB**	**ccApin**
Kontrolle	CDH1	4,22 ± 3,71	343,42 ± 52,66	13,79 ± 9,16
	CK15	7,54 ± 2,92	484,93 ± 33,11	1317,47 ± 216,30
	Occludin	5,91 ± 2,27	25,21 ± 3,04	34,88 ± 6,82
	Vimentin	182,24 ± 80,18	27015,86 ± 3802,17	955,86 ± 399,44
CyHV-3	CDH1	2,49 ± 0,70	152,86 ± 51,67	60,44* ± 22,42
	CK15	7,43 ± 2,13	483,18 ± 142,62	522,29 ± 126,95
	Occludin	3,39 ± 1,49	26,25 ± 6,05	16,09 ± 4,61
	Vimentin	198,38 ± 36,38	16446,22 ± 4042,32	1445,00 ± 167,57
Paramyxovirus	CDH1	72,80* ± 27,27	525,33 ± 92,24	281,52* ± 135,93
	CK15	44,60 ± 21,63	931,34 ± 134,73	218,39* ± 30,39
	Occludin	14,90 ± 0,69	79,08* ± 25,34	28,11 ± 5,26

	Vimentin	3753,32* ± 1861,98	51234,59 ± 9660,88	3108,63 ± 944,24

* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

Neben den bereits beschriebenen Versuchsansätzen wurde die Expression der Zellmarkergene in mehreren Flossenzelllinien von Karpfen untersucht. Dazu wurde die neuentwickelte Karpfenflossenzelllinie ccApin im Vergleich zu der etablierten Flossenzelllinie KFC aus Koi und der Referenzzelllinie CCB unter Infektion mit *CyHV-3* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus betrachtet. Dies erfolgte an Tag 2 *p.i*. und an Tag 4 *p.i.* (Tab. 21). Die in diesem Zusammenhang durchgeführte statistische Auswertung ließ keine einheitliche Entwicklung der Expression der Zellmarker zwischen dem 2. und dem 4. Tag *p.i.* im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Unterschiede wurden weder zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen einer Zelllinie beobachtet noch zwischen den Zelllinien.

Es ließen sich jedoch eine Reihe von signifikanten Unterschieden in der Expression der verschiedenen Marker nachweisen. So war die Expression von Occludin und Vimentin in KFC-Zellen unter Infektion mit *CyHV-3* signifikant höher als in nicht infizierten Kontrollen. In den mit Paramyxovirus infizierten KFC-Zellen war neben Cytokeratin 15 auch bei Occludin und Vimentin eine signifikant höhere Expression zu erkennen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der neuentwickelten ccApin-Zelllinie. Hier war unter Infektion mit *CyHV-3* Occludin signifikant höher exprimiert, während Paramyxovirus infizierte ccApin-Zellen Cytokeratin 15 signifikant niedriger und Occludin signifikant höher exprimierten. An Tag 4 *p.i.* war unter Paramyxovirusinfektion in KFC-Zellen die Transkription von Cadherin 1 und Vimentin signifikant höher ausgeprägt und bei ccApin-Zellen kam es unter Infektion mit *CyHV-3* zu einer signifikant höheren Expression von Cadherin 1. Weitere signifikante Unterschiede in der Transkription der Zellmarker sind in Tabelle 21 dargestellt. Allerdings fällt bei einigen Versuchsgruppen eine teilweise erhebliche Streuung der Meßwerte auf, die sich in einer großen Standardabweichung äußert, z. B. in der nicht infizierten Kontroll-Kultur als auch in Zellen unter Infektion mit dem *CyHV-3* und dem Paramyxovirus, unabhängig von der Dauer der Infektion bzw. der Zellkultivierung.

4.3 Zelluläre Immunantwort: Expression des Gens Interferon a2 in infizierten Zelllinien

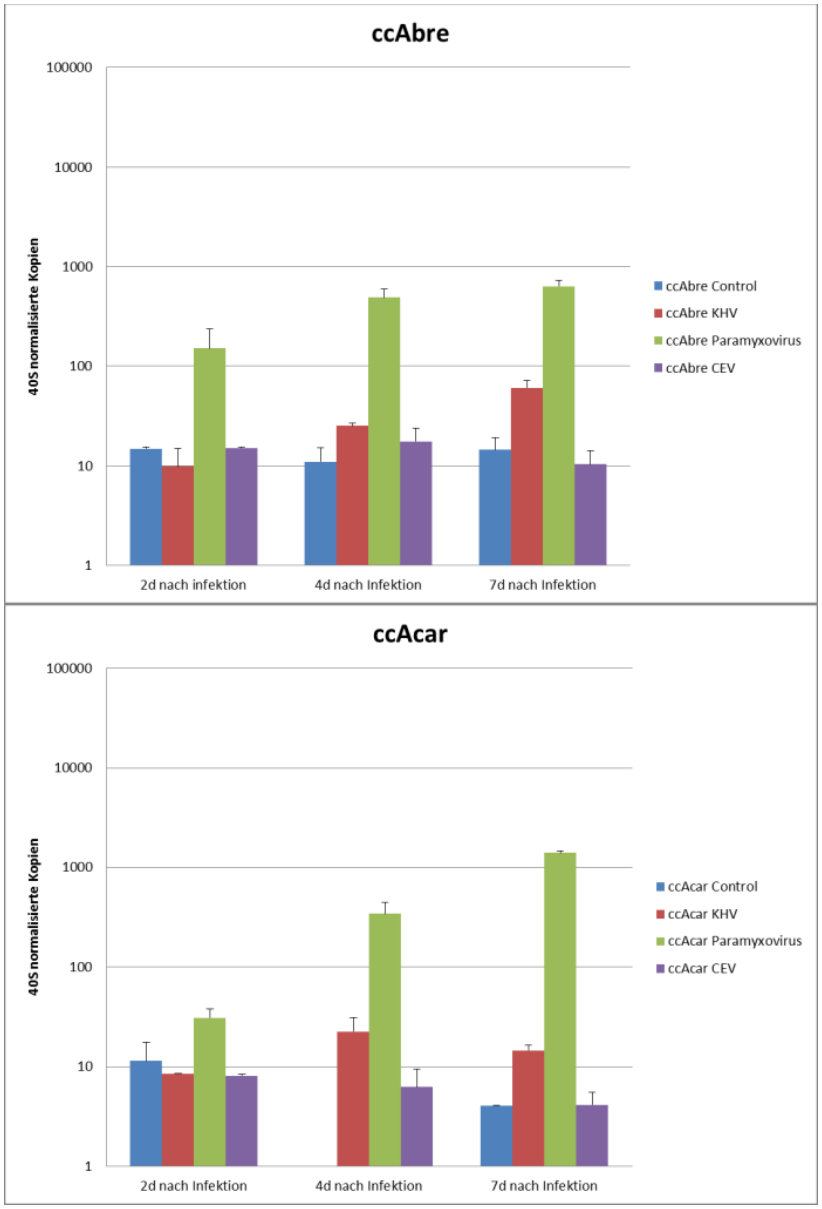

Abb. 20: Expression des Interferon a2 codierenden Gens in den Zelllinien ccAbre und ccAcar. Die Zelllinien wurden mit dem *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus infiziert. Die Expressionsraten des Interferon a2 codierenden Gens wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

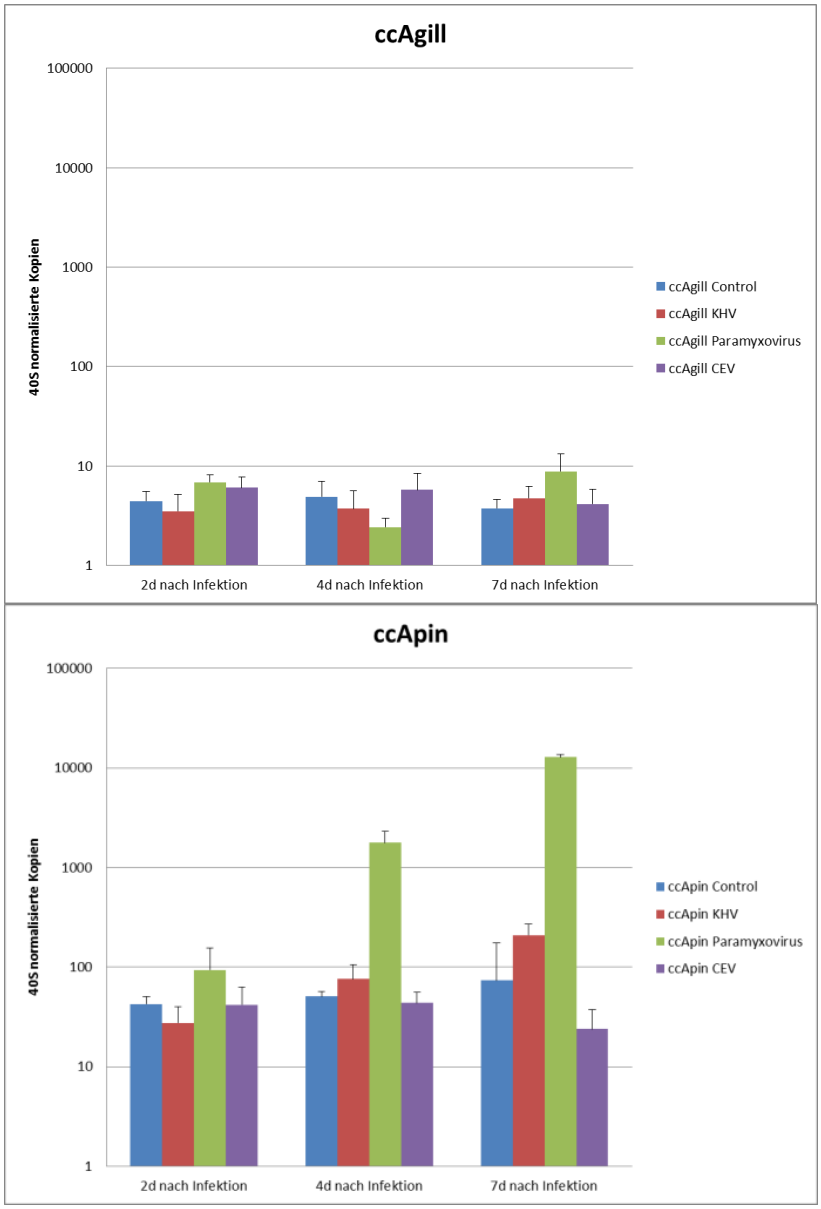

Abb. 21: Expression des Interferon a2 codierenden Gens in den Zelllinien ccAgill und ccApin. Die Zelllinien wurden mit dem *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus infiziert. Die Expressionsraten des Interferon a2 codierenden Gens wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

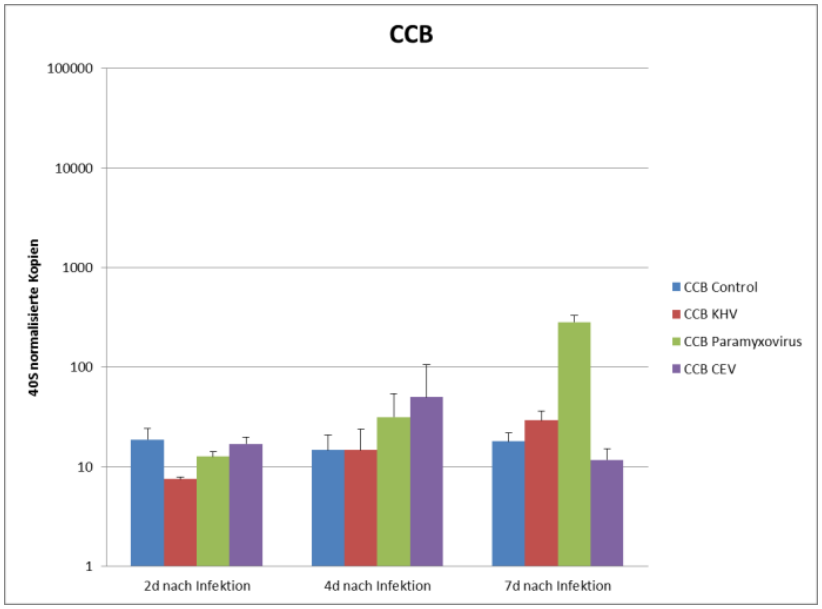

Abb. 22: Expression des Interferon a2 codierenden Gens in der als Referenz genutzten CCB-Zelllinie. Die Zelllinie wurde mit dem *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus infiziert. Die Expressionsraten des Interferon a2 kodierenden Gens wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens codiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 22: Signifikante Unterschiede in der Expression des Interferon a2 kodierenden Gens zwischen Kulturen der Zelllinien ccAbre, CCB, ccAcar, ccAgill und ccApin unter Infektion mit CyHV-3, CEV und dem Paramyxovirus, 4 und 7 Tage p.i., Vergleich der Zelllinien

Tag 4	Vergleich von Zelllinien	P	P<0,05
Kontrolle	CCB vs. ccAcar	<0,001	Ja
	CCB vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAcar	<0,001	Ja
	CCB vs. ccAbre	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAgill	0,013	Ja
	ccAbre vs. ccAcar	0,013	Ja
	CCB vs. ccApin	0,049	Ja
CyHV-3	ccApin vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAcar	0,037	Ja
Paramyxovirus	ccApin vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccAbre vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccAcar vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. CCB	<0,001	Ja
	ccAbre vs. CCB	0,002	Ja

	CCB vs. ccAgill	0,003	Ja
	ccAcar vs. CCB	0,005	Ja
CEV	ccApin vs. ccAcar	0,01	Ja
	CCB vs. ccAcar	0,026	Ja
Tag 7	Vergleich von Zelllinien	P	P<0,05
Kontrolle	ccApin vs. ccAcar	0,001	Ja
	ccApin vs. ccAgill	0,007	Ja
	CCB vs. ccAcar	0,017	Ja
	ccAbre vs. ccAcar	0,036	Ja
CyHV-3	ccApin vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAcar	0,007	Ja
	ccAbre vs. ccAgill	0,008	Ja
Paramyxovirus	ccApin vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccAcar vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccAbre vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. CCB	<0,001	Ja
	CCB vs. ccAgill	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAbre	<0,001	Ja
	ccApin vs. ccAcar	0,018	Ja

Tabelle 23: Signifikante Unterschiede in der Expression des Interferon a2 kodierenden Gens in Kulturen der Zelllinien CCB, ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin unter Infektion mit *CyHV-3, CEV* und dem Paramyxovirus an Tag 4 und 7 *p.i.,* Vergleich der Infektion mit unterschiedlichen Viren

Tag 4	Vergleich der Viren	P	P<0,05
ccAcar	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. Kontrolle	0,025	Ja
ccAbre	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	<0,001	Ja
ccApin	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	<0,001	Ja
CCB	Kontrolle vs. Paramyxovirus	0,005	Ja
	Kontrolle vs. CEV	0,009	Ja
ccAgill	Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kulturen, die mit den unterschiedlichen Viren infiziert wurden.		
Tag 7	Vergleich der Viren	P	P<0,05

ccAcar	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. Kontrolle	0,014	Ja
ccAbre	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	0,01	Ja
ccApin	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. CEV	0,012	Ja
	CyHV-3 vs. Kontrolle	0,038	Ja
CCB	Paramyxovirus vs. CEV	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. Kontrolle	0,002	Ja
	Paramyxovirus vs. CyHV-3	0,014	Ja
ccAgill	Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kulturen, die mit den unterschiedlichen Viren infiziert wurden.		

Die Zelllinien ccAbre, CCB, ccAcar, ccAgill, ccAgill wurden mit *CyHV-3*, *CEV* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert. Im Rahmen der durchgeführten Infektionsversuche wurde anschließend zelluläre mRNA von allen Zelllinien an Tag 2, 4 und 7 *p.i.* gesammelt und die Expression des Interferon a2-Gens unter Infektion untersucht. Bei den in Abbildung 20, 21 und 22 dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die mittels qPCR ermittelte Kopienzahl der mRNA des Gens, die mit Hilfe der Expression des Gens, das das 40S Ribosomale Protein S11 kodiert, normalisiert wurde. In diesem Versuch kam es in der ccAbre-Zelllinie an Tag 4 und 7 *p.i.* zu einer signifikant erhöhten Expression des Interferons unter Paramyxovirusinfektion, sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber *CyHV*-3 und *CEV* infizierten ccAbre-Zellen (Abb. 20, Tab. 23). In den ccAcar-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier kam es zu einer signifikant erhöhten Expression von Interferon unter Paramyxovirusinfektion, sowohl an Tag 4 als auch an Tag 7 *p.i.* gegenüber der Kontrolle und den beiden anderen eingesetzten Viren. Zudem konnte hier ein signifikanter Unterschied zwischen *CyHV-3* infizierten ccAcar-Zellen und der Kontrolle an Tag 4 und 7 *p.i.* nachgewiesen werden. Die Auswertung der Ergebnisse für die ccAgill Zellen ergab keine Signifikanzen für Interferonexpression zwischen den mit unterschiedlichen Viren infizierten Zellkulturen oder zwischen Virus-infizierten Zellkulturen und nicht infizierten Kontrollen (Abb. 21, Tab. 23). Bei den ccApin-Zellen ergab die statistische Auswertung einen signifikanten Anstieg der Interferonexpression unter Paramyxovirusinfektion an Tag 4 und 7 *p.i.* Zudem kam es unter Infektion mit dem *CyHV-3* zu einem signifikanten Anstieg der Interferonexpression gegenüber der Kontrolle und den mit *CEV* inokulierten Zellen

(Abb. 21, Tab. 23). In der Referenzzelllinie CCB kam es zu einem signifikanten Anstieg des Interferons in mit Paramyxovirus und mit *CEV* infizierten Zellen relativ zur Kontrollgruppe am 4. Tag *p.i.* Am 7. Tag *p.i.* war allerdings ausschließlich in Paramyxovirus infizierten CCB-Zellen die Interferonexpression signifikant zu *CEV, CyHV-3* und der Kontrolle erhöht (Abb. 22, Tab. 23).

Im Vergleich der Zelllinien untereinander zeigten sich an Tag 4 *p.i.* innerhalb der nicht infizierten Kontrollgruppe signifikante Unterschiede zwischen nahezu allen Zellen (Tab. 22). Darüber hinaus war bei den ccAgill-Zellen unter Infektion mit dem Paramyxovirus eine signifikant geringere Interferon-Expression als bei den anderen Zelllinien zu erkennen, sie schienen anders als die anderen Zelllinien nicht mittels einer erhöhten Interferonexpression auf die Virusinfektion zu reagieren (Tab. 22).

Am 7. Tag *p.i.* zeigten besonders die ccAgill und die ccApin Zellen signifikante Unterschiede in der Interferonexpression bei einer Infektion mit dem Paramyxovirus im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien, da die ccApin Zellen die höchsten und die ccAgill Zelllinie die niedrigste Interferonexpression der getesteten Zelllinien aufwies (Abb. 21, Tab. 22). Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede in der Interferonexpression zwischen den mit *CEV* behandelten Zellen aller Zelllinien nachgewiesen werden (Tab. 22). Da es keine Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Infektion der verwendeten Zelllinien mit CEV gab, ist davon auszugehen, dass dies die Ursache für die ausbleibende Interferonantwort der Zellen war.

Zelluläre Immunantwort: Expression des Interferon a2 kodierenden Gens in unterschiedlichen Passagen der CCB-Zelllinie nach Virusinfektion

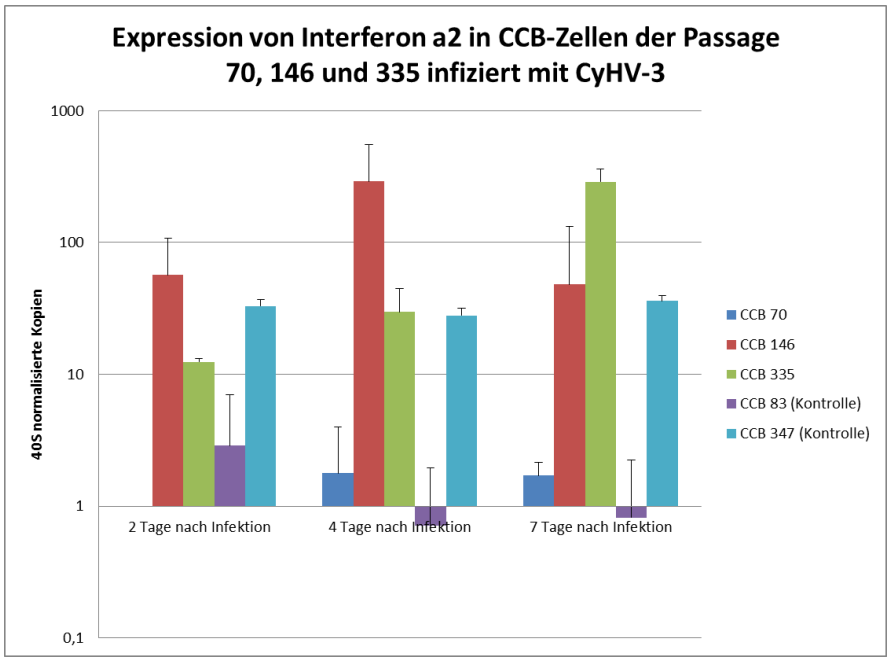

Abb. 23: Expression des Interferon a2 kodierenden Gens in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 mit den Passagen 83 und 347 als Kontrollen. Die CCB-Zellen wurden mit dem *CyHV-3* infiziert. Die Expressionsraten des Interferon a2 Gens wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens kodiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

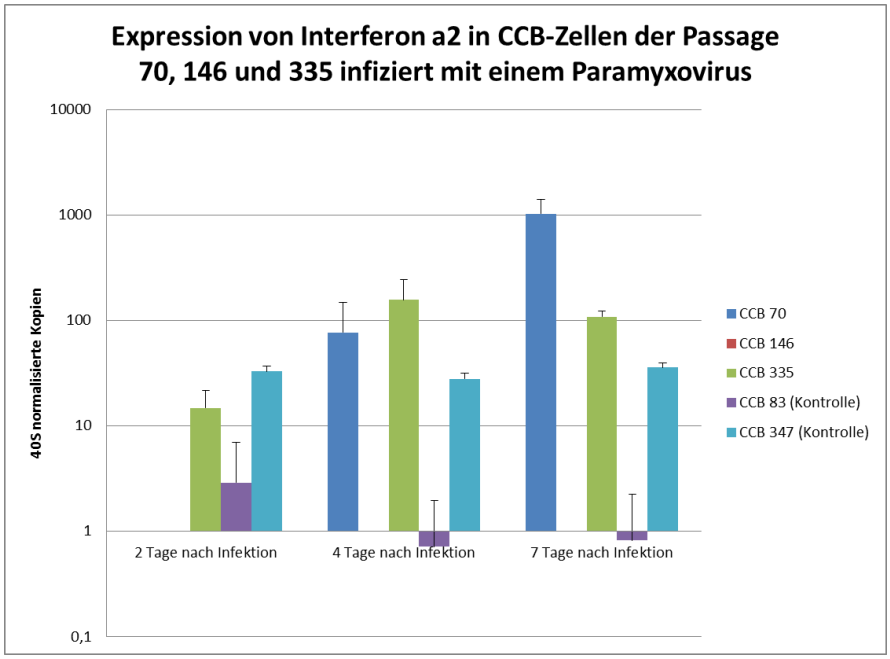

Abb. 24: Expression des Interferon a2 Gens in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 mit den Passagen 83 und 347 als Kontrollen. Die CCB-Zellen wurden mit dem Paramyxovirus infiziert. Die Expressionsraten des Interferon a2 Gens wurden ins Verhältnis zur Transkription von 10^5 Kopien des Gens gesetzt, das für das 40S ribosomale Protein S11 des Karpfens kodiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte von n=3 Kulturen.

Tabelle 24: Signifikante Unterschiede in der Expression des Interferon a2 codierenden Gens in Kulturen von CCB-Zellen aus unterschiedlichen Passagen unter Infektion mit *CyHV-3* und einem Paramyxovirus an Tag 2, 4 und 7 *p.i.:* Vergleich zwischen den Zelllinien

Tag 2	Vergleich von CCB-Passagen	P	P<0,05
Kontrolle	CCB 347 vs. CCB 83	<0,001	Ja
	CCB 146 vs. CCB 70	<0,001	Ja
CyHV-3	CCB 146 vs. CCB 70	<0,001	Ja
	CCB 335 vs. CCB 70	<0,001	Ja
Paramyxovirus	CCB 335 vs. CCB 70	<0,001	Ja
	CCB 335 vs. CCB 146	<0,001	Ja
Tag 4	Vergleich von CCB-Passagen	P	P<0,05
Kontrolle	CCB 347 vs. CCB 83	<0,001	Ja
	CCB 146 vs. CCB 70	<0,001	Ja
CyHV-3	CCB 146 vs. CCB 70	<0,001	Ja
	CCB 335 vs. CCB 70	<0,001	Ja
	CCB 146 vs. CCB 335	0,001	Ja
Paramyxovirus	CCB 335 vs. CCB 146	<0,001	Ja
	CCB 70 vs. CCB 146	<0,001	Ja
Tag 7	Vergleich von CCB-Passagen	P	P<0,05
Kontrolle	CCB 347 vs. CCB 83	<0,001	Ja
	CCB 146 vs. CCB 70	<0,001	Ja
CyHV-3	CCB 335 vs. CCB 70	<0,001	Ja
	CCB 335 vs. CCB 146	<0,001	Ja
Paramyxovirus	CCB 70 vs. CCB 146	<0,001	Ja
	CCB 335 vs. CCB 146	<0,001	Ja
	CCB 70 vs. CCB 335	<0,001	Ja

Tabelle 25: Signifikante Unterschiede in der Expression des Interferon a2 kodierenden Gens in Kulturen von CCB-Zellen aus unterschiedlichen Passagen unter Infektion mit *CyHV-3* und einem Paramyxovirus an Tag 2, 4 und 7 *p.i.:* Vergleich unterschiedlicher Virusinfektionen

Tag 2	Vergleich der Viren	P	P<0,05
CCB-70	keine Signifikanzen		
CCB-146	Kontrolle vs. Paramyxovirus	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. Paramyxovirus	<0,001	Ja
Tag 4	Vergleich der Viren	P	P<0,05
CCB-70	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. *CyHV-3*	<0,001	Ja
CCB-146	*CyHV-3* vs. Paramyxovirus	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Kontrolle vs. Paramyxovirus	<0,001	Ja
Tag 7	Vergleich der Viren	P	P<0,05
CCB-70	Paramyxovirus vs. Kontrolle	<0,001	Ja
	Paramyxovirus vs. *CyHV-3*	<0,001	Ja
CCB-146	Kontrolle vs. Paramyxovirus	<0,001	Ja
	CyHV-3 vs. Paramyxovirus	0,017	Ja
	Kontrolle vs. CyHV-3	0,021	Ja
CCB-335	*CyHV-3* vs. Kontrolle	<0,001	Ja

Neben den bereits beschriebenen Versuchen mit den vom Fraunhofer EMBL neu entwickelten Zelllinien wurden ebenfalls unterschiedliche Passagen der bereits etablierten und als Referenz genutzten CCB-Zelllinie mit *CyHV-3* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert. Auf die Inokulation mit CEV wurde verzichtet, da es bei den vorher durchgeführten Versuchen keinen Hinweis auf eine gelungene Infektion gab. Nach Virusinfektion waren deutliche Unterschiede im Interferonexpressionsniveau von nicht infizierten CCB-Zellen aus unterschiedlichen Passagen zu erkennen (Abb. 23, Tab. 24, 25). So war die Interferonexpression bei

nicht infizierten CCB 347 zu allen Zeitpunkten signifikant höher als bei CCB 83. Weiterhin war die Interferonexpression von CCB 146 am 7. Tag einer Infektion mit *CyHV-3* signifikant höher als von CCB 335, ebenso war auch die Interferonexpression von CCB 335 höher als von CCB 70.

Bei der Infektion der unterschiedlichen Passagen von CCB-Zellen mit dem Paramyxovirus kam es bei CCB 146 am 2., 4. und 7. Tag *p.i.* zu keiner Genexpression des Interferon a2. Weiterhin zeigte an Tag 7 die CCB 70 Passage die signifikant höchste Interferonexpressionsrate aller getesteten CCB-Passagen (Abb. 24).

Am 7. Tag *p.i.* ergab der Vergleich der Interferonexpression nach *CyHV-3* – Infektion und nach Paramyxovirusinfektion eine signifikant höhere Genexpressionsrate bei CCB-70-Zellen nach einer Infektion mit Paramyxovirus als nach *CyHV-3 Infektion*. Ein umgekehrtes Bild ergab sich für CCB-146 mit signifikant höheren Werten unter Infektion mit *CyHV-3*.

Dabei bestätigen die Ergebnisse für die Interferonexpressionsraten der unterschiedlichen CCB-Passagen die vorausgegangenen Auswertungen der Immunantwort von CCB-Zellen. So zeigte diese eine nahezu um den Faktor 10 höhere interferonvermittelte Immunantwort bei einer Infektion mit dem Paramyxovirus als bei *CyHV-3*. Weiterhin offenbarten die Ergebnisse eine erhebliche passageabhängige Varianz in der Genexpression des Interferons bei CCB-Zellen.

4.4 Diagnostische Eignung der Zelllinien CCB, ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin

4.4.1 Reaktivierungsversuche von CyHV-3 aus latent infizierten Fischen durch Mitogen vermittelte Stimulation von Leukozyten

Im Rahmen von Untersuchungen an Karpfen, die latent mit *CyHV-3* infiziert waren, wurden in insgesamt drei Versuchsdurchgängen Leukozyten von diesen Fischen gewonnen und mittels Lipopolysacchariden, Pokeweed Mitogen, Concanavalin A und Poly IC stimuliert, um zu überprüfen, ob sich auf diese Weise das *CyHV-3* reaktivieren und anschließend durch Kulturversuche mit den neu etablierten Zelllinien nachweisen lässt. Dabei wurden Leukozyten-, Flossen- und Makrophagenproben verwendet. Im 3. Durchgang wurden die Fische in zwei Gruppen unterteilt, wobei die Fische der einen Gruppe vor der Probennahme gestresst und die Fische der anderen Gruppe nicht gestresst wurden.

Tabelle 26: Versuch 1 zur Reaktivierung von *CyHV-3* aus Karpfen, die latente Träger des Virus sind. Es wurden 18 Fische beprobt. Die Ergebnisse sind in Viruskopien pro 10^6 Zellen angegeben. Es wurden Flossen, Makrophagen und Leukozytenproben untersucht. Die Leukozyten wurden mit Lipopolysaccharid, Pokeweed Mitogen und Concanavalin A stimuliert.

			Mitogene			
	Flosse	**Makrophagen**	**Lipopolysaccharid**	**Pokeweed Mitogen**	**Concanavalin A**	**Kontrolle**
Karpfen 1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 9	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 10	neg.	neg.	4,31	neg.	neg.	neg.
Karpfen 11	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 13	729,7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 14	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 15	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 16	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 17	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 18	neg.	neg.	2,58	neg.	neg.	neg.

Tabelle 27: Versuch 2 zur Reaktivierung von *CyHV-3* aus Karpfen, die latente Träger des Virus sind. Es wurden 7 Tiere beprobt. Die Ergebnisse sind in Viruskopien pro 10^6 Zellen angegeben. Es wurden Flossen, Makrophagen (Mak.) und Leukozytenproben untersucht. Die Leukozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS), Pokeweed Mitogen (PWM) und Concanavalin A (Con A) stimuliert.

			Mitogene				
	Flosse	**Mak.**	**LPS**	**PWM**	**Con A**	**B-DNA; Z-DNA; Poly I:C**	**Kontrolle**
Karpfen 1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Karpfen 7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tabelle 28: Versuch 3 zur Reaktivierung von *CyHV-3* aus Karpfen, die latente Träger des Virus sind. Es wurden 2 Gruppen mit jeweils 3 Tieren beprobt, wobei eine Gruppe vor der Blutentnahme gestresst wurde. Die Ergebnisse sind in Viruskopien pro 10^6 Zellen angegeben. Es wurden Flossen, Makrophagen (Mak.) und Leukozytenproben untersucht. Die Leukozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS), Pokeweed Mitogen (PWM) und Concanavalin A (Con A) stimuliert.

				Mitogene				
		Flosse	**Mak.**	**LPS**	**PWM**	**Con A**	**B-DNA; Z-DNA; Poly I:C**	**Kontrolle**
vor der	**Karpfen 1**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blutentnahme	**Karpfen 2**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
gestresst	**Karpfen 3**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
vor der	**Karpfen 4**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Blutentnahme	**Karpfen 5**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
nicht gestresst	**Karpfen 6**	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Ein Nachweis von *CyHV-3*-spezifischer DNA aus Leukozyten und Flossenepithelien von latent mit *CyHV-3* infizierten Karpfen war, wie aus Tabelle 26, 27 und 28 ersichtlich, auch nach Stimulierung der Leukozyten mit Mitogenen nicht zuverlässig möglich. Auch die Anwendung von Stress vor der Blutentnahme erhöhte in diesem Versuch nicht die Nachweisbarkeit des *CyHV-3*.

4.4.2 Eignung der Zelllinien zum Nachweis des CyHV-3 aus Organproben erkrankter Karpfen

Tabelle 29: Kultureller Nachweis von *CyHV-3* aus Nierenproben von mit *CyHV-3* infizierten Karpfen, Nierenproben aus 5 Karpfen vom 8.Tag *p.i.* mit *CyHV-3*

		Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3	Fisch 4	Fisch 5	positiv Kontrolle	negativ Kontrolle
ccAbre 67	1:20	k.V.	CT	CT	CT	CT	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
ccAcar 35	1:20	k.V.	CT	CT	CT	CT	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	CT	CT	CT	k.V.	CPE	k.V.
ccAgill 85	1:20	CT	CT	CT	CT	CT	CPE	k.V.
	1:200	CT	CT	CT	k.V.	CT	CPE	k.V.
ccApin 177	1:20	k.V.	k.V.	CT	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
CCB 85	1:20	CT	CT	CT	CT	CT	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.

CT: cytotoxischer Effekt CPE: cytopathischer Effekt k.V.: keine Veränderung

Tabelle 30: Kultureller Nachweis von *CyHV-3* aus Nierenproben von mit *CyHV-3* infizierten Karpfen, Nierenproben aus 5 Karpfen vom 14. Tag *p.i.* nach Übertragen von 10 µl auf neu angelegte Zellen aller Zelllinien

		Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3	Fisch 4	Fisch 5	positiv Kontrolle	negativ Kontrolle
ccAbre 68	1:20	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
ccAcar 36	1:20	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
ccAgill 86	1:20	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
ccApin 178	1:20	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
CCB 86	1:20	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.
	1:200	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	CPE	k.V.

CT: cytotoxischer Effekt CPE: cytopathischer Effekt k.V.: keine Veränderung

Tabelle 31: Kultureller Nachweis von *CyHV-3* aus Nierenproben von mit *CyHV-3* infizierten Karpfen. Auswertung 14 Tage *nach Inokulation von* Diagnostikproben und mit KHV-T behandelte Organe von Karpfen 1-3 in Monolayerkulturen der untersuchten Zelllinien

	ccAbre 73	ccAcar 42	ccAgill 92	ccApin 134	CCB 91
Koi_Niere_22	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Niere_24	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen_Niere_26	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Niere_28	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Niere_29	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Kieme_26	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen_Kieme_27	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Kieme_28	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Kieme_29	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Koi_Kieme_30	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 1 Leber	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 1 Niere	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 1 Milz	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 2 Leber	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 2 Niere	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 2 Milz	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 3 Leber	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 3 Niere	CPE	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
Karpfen 3 Milz	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.
positiv Kontrolle	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE
negativ Kontrolle	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.	k.V.

CT: cytotoxischer Effekt CPE: cytopathischer Effekt k.V.: keine Veränderung

Für Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *CyHV-3* aus Geweben infizierter Karpfen wurde, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben aus der Niere von 5 an *CyHV-3* erkrankten Koi Virus isoliert und dieses in einer Verdünnung von 1:20 und 1:200 jeweils in Dubletten auf die neu etablierten Zelllinien und die CCB-Zellen aufgebracht. Bei der nachfolgenden Beobachtung der so infizierten Zelllinien war am 8. Tag *p.i.* ein cytotoxischer Effekt in den meisten Zellkulturen zu erkennen, die mit den 1:20 verdünnten Proben inokuliert worden waren (Tab. 29). Daher wurden 10 µl Zellkulturmedium aus allen Vertiefungen auf jeweils neue Zellkulturen der jeweiligen Zelllinien übertragen und über einen Zeitraum von 14 Tagen auf die Entstehung eines cytopathischen Effektes beobachtet. Dieser ließ sich am Ende des Versuches nur in den Positivkontrollen nachweisen (Tab. 30).
In einem zweiten Durchgang wurden neben Diagnostikproben aus Kopfniere und Kieme von insgesamt 10 Karpfen und Koi auch Leber, Niere und Milz aus drei Karpfen mit KHV-T-Viruslösung in der Verdünnung 10^6, 10^3 und 10^1 $TCID_{50}$/ml behandelt und nach der Virusisolation zur Infektion der Zelllinien verwendet. Dabei zeigte sich 14 Tage nach Infektion der Zellen die Ausbildung eines cytotoxischen Effektes (Daten nicht gezeigt). Ein cytopatischer Effekt war auch hier ausschließlich in den Positivkontrollen zu erkennen. Daraufhin wurde auch in diesem Durchgang 10 µl von jeder Vertiefung auf eine neu vorbereitete Zellkulturplatte der jeweiligen Zelllinie übertragen. Die Auswertung 14 Tage nach der Übertragung ergab einen positiven cytopathischen Effekt in beiden Vertiefungen der ccAbre-73 Zelllinie, die mit einer Probe aus Nierengewebe, dem KHV-T mit einer Konzentration von 1,5 x 10^6 DNA-Kopien / µl Viruslösung injiziert worden war, beimpft wurden (Tab. 31). Es gelang somit nicht, mittels Organproben kranker Fische einen cytopathischen Effekt auf den neu entwickelten Zelllinien hervor zu rufen.

5 Diskussion

Das *CyHV-3* wurde zum ersten Mal bei Massenverlusten von Karpfen 1998 in den USA und Israel nachgewiesen (GILAD et al. 2002). Seitdem hat es seine Verbreitung kontinuierlich fortgesetzt und ist mittlerweile in 26 Ländern nachgewiesen worden (SANO et al. 2011). Dabei kann die Virulenz der nachgewiesenen Viren zuverlässig nur auf empfänglichen Zelllinien überprüft werden (RAKERS et al. 2018). Auf Grund der hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten, die mit der durch *CyHV-3* verursachten Erkrankung einhergehen, wurde bereits nach Ausbrüchen in Israel an der Entwicklung eines geeigneten Vakzins geforscht (RONEN et al. 2003). Dabei wurde ein Vakzin auf Basis eines attenuierten Virus entwickelt, das jedoch verschiedene Nachteile aufwies. So handelt es sich hierbei nicht um eine Markervakzine, sodass kranke Tiere nicht von geimpften zu unterscheiden sind. Zudem besteht für diesen Impfstoff ausschließlich in Israel eine Zulassung (RONEN et al. 2003; PERELBERG et al. 2005, 2008). Auf Grund seiner Verbreitung und der verursachten erheblichen finanziellen Schäden besteht somit nach wie vor der Bedarf an einem Vakzin gegen das *CyHV-3*.

Zu diesem Zweck wurden 4 neue Zelllinien aus Karpfengeweben zur zuverlässigen Reproduktion und Re-Isolation von größeren Mengen *CyHV-3* entwickelt, um das für die Impfstoffentwicklung benötigte Virus bzw. spezifische Virusisolate wie attenuierte Viren herstellen zu können (RAKERS et al. 2018). In vorausgegangenen Impfstoffentwicklungen waren Koi Fin Cells (KFC)-Zellen verwendet worden, in denen jedoch keine hohen Virustiter erreicht wuden (RONEN et al. 2003). Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die neu entwickelten Zelllinien auf ihre Eignung zur Reproduktion und Re-Isolation von karpfenpathogenen Viren getestet werden, wobei neben *CyHV-3* noch CEV und ein karpfenpathogenes Paramyxovirus in die Untersuchungen mit eingebunden wurden.

Es gibt bereits seit längerem Bestrebungen, einen geeigneten Zelltyp zur *in vitro* Replikation von CEV zu ermitteln. Da dies bislang nicht gelungen ist, wurden neben der Inokulation der neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin auch Primärkulturen aus Kiemengewebe und die etablierte *Cyprinus carpio* Gill (CCG) Kiemenzelllinie in die Betrachtungen mit eingebunden. Für die Primärkulturen wurde Kiemengewebe ausgewählt, da es als wichtigstes Zielgewebe von CEV beschrieben ist (ADAMEK et al. 2017a). Es wurden daher mehrere Versuche, zunächst mit Explantatkulturen aus Kiemenfragmenten von Karpfen, durchgeführt und die Zellen mit CEV inokuliert. Da die Explantate keine cytopathischen Effekte zeigten, wurden unterschiedliche Techniken zur Vereinzelung der Kiemenzellen angewendet, um dadurch ihre Infizierbarkeit durch das Virus zu erhöhen. Nach Beimpfen der Primärkulturen wurde eine Abnahme des Virustiters im Zellkulturmedium beobachtet. Diese Abnahme des Titers bzw. der Kopienzahl viraler

DNA von *CyHV-3* und CEV im Überstand der Kulturen zwischen 24 h *p.i.* und 48 h *p.i.* beruht vermutlich auf der in diesem Zeitraum stattfindenden Virusabsorption der Zellen. Als Nachweis für eine Virusreplikation in den Zellen war 48 h nach Virusinfektion virale mRNA aus den infizierten Zellkulturen isoliert worden. Die Expressionsanalyse viraler mRNA zeigte, dass sowohl das *CyHV-3* als auch das Paramyxovirus in den Zellen repliziert wurde. Für CEV wurden lediglich in Explantat-Kulturen aus einem von drei Karpfen sehr geringe Gehalte an viraler mRNA nachgewiesen. Dies wird von Angaben aus der Literatur bestätigt. So beschrieben Adamek et al. (2017a), dass sie Spuren viraler mRNA von CEV in Primärkulturen aus Kiemen zwei Tage nach Inkubation mit einem CEV-Isolat nachweisen konnten und dies interpretierten die Autoren so, dass es in geringem Umfang zu einer Replikation von CEV gekommen war. Es besteht jedoch weiterer Forschungsbedarf zur Klärung der Frage, welchen Zelltyp CEV für eine erfolgreiche Replikation benötigt.

Zum Vergleich zu den Kiemenexplantaten wurde die etablierte Kiemenzelllinie CCG mit *CyHV-3*, CEV und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus infiziert. Nach Infektion wurde ebenfalls in den ersten 48 h eine Abnahme und ab dem 3. Tag *p.i.* eine Zunahme von DNA des *CyHV-3* im Mediumüberstand beobachtet, während bei CEV eine kontinuierliche Abnahme zu verzeichnen war. Bei dem Paramyxovirus war die Endkonzentration an viraler RNA im Überstand am 4. Tag *p.i.* ebenfalls geringer als zu Beginn der Inokulation, wobei zwischen dem 2. Tag *p.i.* und dem 4. Tag *p.i.* eine leichte Zunahme festzustellen war. Die Ergebnisse zeigen, dass es beim *CyHV-3* und beim Paramyxovirus nach der Virusabsorption zu einer Infektion der Zellen und einer Replikation des jeweiligen Virus kam. Dies wird zusätzlich durch den Nachweis viraler mRNA aller drei Viren in den Zellen bestätigt. Die CCG-Zelllinie wurde als Zelllinie aus Karpfenkiemen etabliert und als Mischkultur aus epitheloiden und Fibroblastenzellen charakterisiert (NEUKIRCH et al.1999). Zur Bestätigung, ob es sich bei dem vorliegenden Isolat der CCG-Zelllinie tatsächlich um Karpfenzellen handelt, wurde mit Primern für das Gen der Cytochromoxidase-Untereinheit 1 des Karpfen (*Cyprinus carpio*) zelluläre mRNA aus Zellen der CCG-Zelllinie amplifiziert und anschließend eine Sequenzierung des Amplifikats durchgeführt. Nach Abgleich der erhaltenen Nukleotidsequenz mit Sequenzen in der GenBank wurde sie als Nukleotidsequenz des SET-Proteins (LOC107739692) von *Sinocyclocheilus rhinocerous* mit einer Übereinstimmung von 88% identifiziert (Adamek, nicht publizierte Beobachtung). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das vorliegende Isolat der CCG-Zelllinie keine Karpfenzellen (*Cyprinus carpio*) enthält. Auf Grund der geringen Übereinstimmung der amplifizierten Nukleotidsequenz mit der Nukleotidsequenz aus der Datenbank von lediglich 88 % ist es jedoch ebenfalls sehr unwahrscheinlich, dass es sich um Zellen der Spezies *Sinocyclocheilus rhinocerous* handelt. Da die verwendeten Primer spezifisch für Fische aus der Gattung *Cyprinus* sind, ist davon auszugehen, dass die Zelllinie aus Zellen eines Fisches dieser

Gattung stammt. Fische der Gattung *Cyprinus*, die eng mit den Karpfen (*C. carpio*) verwandt sind, kommen vor allem in Ost- und Südostasien vor. Aus chinesischen Gewässern sind 16 Spezies bekannt (HU et al. 2018).

Bewertet man die erzielten Ergebnisse unter dem Aspekt, dass es sich nicht um eine Karpfenzelllinie handelt, so fallen insbesondere die Replikationsraten des *CyHV-3* auf. Bislang wurde nur der Karpfen (*Cyprinus carpio*) als Wirt des *CyHV-3* identifiziert (SANO et al. 2011). Vorausgehende Studien zeigten jedoch, dass auch in Zelllinien aus Goldfisch (*Carassius auratus auratus*) und Silberkarpfen *(Hypophthalmichthys molitrix)* virale mRNA und eine Zunahme viraler DNA des *CyHV-3* nachweisbar waren (DAVIDOVICH et al. 2007) und somit eine Replikation des Virus auch in Zellen erfolgt, die nicht vom Karpfen stammen. Die Typisierungs-Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass die CCG-Zellen von einer mit dem Karpfen verwandten Fischspezies aus der Gattung *Cyprinus* isoliert wurden. Über die Empfänglichkeit von Fischen aus diesen Spezies für Infektionen mit *CyHV-3* liegen bisher keine Informationen vor. Die hier erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass Fische aus der Gattung *Cyprinus* ebenfalls für *CyHV-3* empfänglich sein könnten. Bisher ist außerdem nicht bekannt, welche Charakteristika Zellen aufweisen müssen, um *CyHV-3* erfolgreich zu replizieren.

Neben unterschiedlichen Kulturen aus Kiemenzellen wurden die neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin, sowie die Referenzzelllinie CCB mit CEV inokuliert. Die Auswertung der Ergebnisse ergab keinen Hinweis auf eine erfolgreiche Infektion der Zellen mit dem Virus. Die Konzentration viraler DNA im Mediumüberstand nahm von Tag 0 *p.i.* bis zum 7. Tag *p.i.* kontinuierlich ab. Daher wurde im Weiteren auf die Isolation viraler mRNA aus den Zellen der Monolayerkulturen vom Boden der Zellkulturplatten verzichtet und es wurde geschlossen, dass CEV in diesen Zellen nicht repliziert. Um dieses weiter zu bestätigen, wurde ebenfalls eine Titration von CEV auf ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und CCB-Zellen durchgeführt. Auf diese Weise sollte die Empfänglichkeit der unterschiedlichen Zelllinien für CEV im direkten Vergleich zwischen den Zelllinien betrachtet werden. Dabei ergaben sich lediglich bei den ccApin Zellen Hinweise auf eine Replikation, denn es wurde ein $TCID_{50}$ / ml von über 100 beobachtet. In ccAbre, ccAcar, ccAgill und CCB-Zellen lag der $TCID_{50}$ / ml bei 10. Da jedoch mit keiner der durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen in einer der untersuchten Zelllinien eine deutliche Replikation von CEV nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass es sich bei den nachgewiesenen Zellveränderungen um cytotoxische und nicht um cytopathische Effekte handelte. Insgesamt zeigen die durchgeführten Infektionsversuche mit CEV, dass es im Einklang mit in der Literatur postulierten Ergebnissen zu einer minimalen Replikation des Virus in Primärkulturen aus Karpfenkiemen kommt (ADAMEK et al. 2017a). CEV ist aber nicht in der Lage, *in*

vitro einen der angebotenen Zelltypen in den neu etablierten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin bzw. die Referenzzelllinie CCB zu infizieren.

Als weiteres Virus wurde ein als Paramyxovirus klassifiziertes RNA-Virus, über das bislang wenig bekannt ist (HAENEN et al. 2016a), in die Arbeit mit eingebunden. Dieses Virus wies gute Replikationseigenschaften auf den Zelllinien Ca F-2, CCB, CCG und EPC auf (NEUKIRCH und KUNZ 2001). Daher wurde es zur zusätzlichen Charakterisierung der hier untersuchten Zelllinien unter Infektion mit einem RNA-Virus verwendet. Ausserdem sollten die Untersuchungen zum besseren Verständnis der Infektion von Zellen mit diesem Virus dienen. Aus den gesammelten Ergebnissen der Infektionsversuche der neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill, ccApin und unterschiedlichen Passagen der Referenzzelllinie CCB mit dem Paramyxovirus lässt sich in Bezug auf die Empfänglichkeit der einzelnen Zelllinien ein differenziertes Bild ableiten. So wird deutlich, dass die ccAbre Zellen im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien die geringste Menge Paramyxovirus benötigen, damit es zu einer Infektion der Zellen kommt. Darüber hinaus lässt sich die größte Menge viraler RNA im Überstand der ccAbre Zellen detektieren. Außerdem zeigte die ccAbre Zelllinie bereits nach 2 Tagen *p.i.* einen deutlichen zytopathischen Effekt mit Entstehung großer Löcher im Zellrasen und Synzytienbildung. Die Auswertung der viralen mRNA in den Zelllinien zeigte, dass es in den CCB-Zellen, insbesondere in der Passage 146 zu den höchsten Gehalten viraler mRNA des Paramyxovirus kam. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse der Titration von Medium aus dem Überstand aller Zelllinien, dass die größte Menge infektiöser Viruspartikel im Überstand der CCB-Zellen und nicht im Überstand der ccAbre-Zellen nachzuweisen war, während eine vergleichende Analyse der unterschiedlichen CCB-Passagen nur eine geringgradige und nicht signifikant bessere Replikation in der Passage 146 verglichen mit den Resultaten aus Passage 70 und 335 ergab.

Somit scheinen die ccAbre Zellen zwar sehr leicht durch das Paramyxovirus infiziert zu werden, infolge dessen zytopathische Effekte auftreten. Dies führt möglicherweise zur Apoptose der Zellen und zur Freisetzung großer Mengen unvollständiger Viruspartikel, die nicht weiter infektiös sind, was den geringeren Virustiter im Medium dieser Zellkulturen erklären könnte. Miest et al. (2015) beschreiben, dass es bei der Infektion von Zellen mit Viren mit größerem Genom zu einer Regulation der Apoptose in den Wirtszellen kommt (MIEST et al. 2015), während kleinere RNA-Viren, wie das Rhabdovirus *Spring Viremia of Carp Virus* (SVCV) oder das hier eingesetzte Paramyxovirus dazu nicht in der Lage sind. Die CCB-Zellen scheinen deutlich höhere Konzentrationen des Paramyxovirus für eine erfolgreiche Infektion zu benötigen. Ist eine Infektion jedoch erfolgt, kommt es zu einer stabilen Virusreplikation in den Zellen mit den höchsten Gehalten an infektiösen Viruspartikeln im Überstand, wobei in dieser Arbeit die CCB-Zellen der Passage 146,

die keine epithelialen Marker exprimierte, die besten Replikationsrate des Virus und den höchsten Titer infektiöser Viruspartikel zeigten. Es ist jedoch weiterer Forschungsbedarf zur Absicherung dieser Hypothese nötig.

Bei der Untersuchung der neu entwickelten Zelllinien aus Karpfen zeigte sich, dass alle Zelllinien für das *CyHV-3* empfänglich sind, wobei die ccAbre Zelllinie die besten Replikations- und Reisolationsergebnisse für das *CyHV-3* erzielte. Der Unterschied zwischen der ccAbre und ccApin-Zelllinie war jedoch nur an Tag 7 *p.i.* bei der Detektion viraler DNA als signifikant zu bewerten. Im Vergleich zwischen ccApin und CCB-Zellen konnten die von Rakers et al. (2018) beschriebenen Ergebnisse, dass bei ccApin Zellen ein um den Faktor 2 höherer Virustiter im Medium vorlag als bei CCB-Zellen, in der vorliegenden Studie deutlich übertroffen werden. Die in diesem Zusammenhang zur Analyse der Infektiosität des re-isolierten *CyHV-3* durchgeführten Titrationsversuche ergaben für die neu entwickelten Zelllinien am 7. Tag *p.i.* nur im Vergleich zur CCB-Zelllinie eine signifikant bessere Produktion infektionsfähiger Viruspartikel. Wurden die neu entwickelten Zelllinien untereinander verglichen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Vergleich der Replikationsrate und der Titrationsversuche von *CyHV-3* auf unterschiedlichen CCB-Passagen zeigte, dass diese deutlich voneinander abwichen. In den Passagen 133 und 146 der CCB-Zelllinie zeigten sich niedrigere Replikationsleistungen für das *CyHV-3* im Vergleich zu Passagen 70 und 335. Die geringere Replikation von *CyHV-3* in CCB-Zellen mit mittlerer Passagezahl läßt vermuten, dass die Kulturbedingungen während der Kultur der CCB-Zellen zu den Passagen 133 und 146 eine Ausdifferenzierung der Zellen oder die Vermehrung einer Zellpopulation begünstigten, die für eine Infektion mit *CyHV-3* weniger empfänglich war. Bei der Kultur von CCB-Zellen zur Passage 335 waren möglicherweise diese Kulturbedingungen nicht gegeben. Diese Hypothese sollte durch eine Charakterisierung der Zellen aus den unterschiedlichen Passagen untersucht werden. Eine solche Untersuchung wurde in dieser Studie vorgenommen.

Neben der Empfänglichkeit der unterschiedlichen Zelllinien für *CyHV-3*, CEV und das Paramyxovirus wurde im Rahmen dieser Arbeit der prägende Zelltyp in den unterschiedlichen Zelllinien charakterisiert und untersucht, ob unter Infektion mit den drei Viren eine Veränderung des Zelltyps erfolgte. Zudem sollte die Hypothese überprüft werden, ob der Zelltyp Einfluss auf die Empfänglichkeit der Zelllinien und von Primärkulturen für eine Infektion mit den unterschiedlichen Viren nimmt. Dazu wurden die Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin sowie die Referenzzelllinie CCB hinsichtlich der Expression der epithelialen Marker Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin sowie hinsichtlich des Fibroblastenmarkers Vimentin typisiert. Weiterhin wurde die Expression dieser Marker in den Ausgangsgeweben der Zelllinien, Haut, Herz, Kieme und Gehirn, als Referenz bestimmt, um zu prüfen, ob

eine Ähnlichkeit zwischen den Charakteristika der Zelllinien und ihrem Ausgangsgewebe besteht. Zudem wurde die Expression der oben genannten Zellmarker in der ccApin Zelllinie im Vergleich zu der Flossenzelllinie Koi Fin Cell (KFC) und der CCB-Zelllinie als Referenz analysiert. Im Rahmen der Zellkulturarbeiten zur Entwicklung einer geeigneten Kultur zur *in vitro* Replikation von CEV wurde ebenso das Expressionsmuster der verwendeten Zellmarker bei den eingesetzten Primärkulturen aus Kiemen und den CCG-Zellen bestimmt. Außerdem sollte durch diese Untersuchung geklärt werden, ob es Passage-abhängige Veränderungen in der Zelltypzusammensetzung in der etablierten CCB-Zelllinie gibt.

Die Expressionmuster der verwendeten Zellmarker ließen vermuten, dass es sich bei den Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin um Mischkulturen aus epithelialen und mesenchymalen Zellen handelte, wobei die Kulturen von ccAbre und ccAcar Zellen vor allem Fibroblasten enthielten und bei ccAgill- und ccApin-Kulturen epitheliale Zellen den charakteristischen Zelltyp darstellen. Der Vergleich der Zelllinien mit den Ausgangsgeweben Gehirn und Herz bzw. Kieme und Flosse zeigte, dass in den Zelllinien eine ähnliche Verteilung der Expression epithelialer Marker und Fibroblastenmarkern vorlag wie in den Ursprungsgeweben. Lakra et al. (2011) beschreiben, dass es in Mischkulturen aus unterschiedlichen Zelltypen mit zunehmender Passage zu einer Überwucherung langsam wachsender Zellen durch schnellwachsende Zellarten wie Bindegewebszellen kommen kann (LAKRA et al. 2011). Dies kann mit einem Verlust von Charakteristiken des Ausgangsgewebes verbunden sein (MCKEE u. CHAUDHRY 2017). Derartige Veränderungen konnten in den neu etablierten Zelllinien nicht detektiert werden. Es wurden in den durchgeführten Versuchen mit ccAbre 44, ccAcar 52, ccAgill 60 und ccApin 152 allerdings Zellen aus relativ niedrigen Passagen für die Zelltypisierung verwendet. Somit besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen Effekte des Überwachsens von langsam wachsenden epithelialen Zellen durch schnell wachsende Bindegewebszellen bei den Zelllinien in dieser Untersuchung in späteren Passagen noch auftreten können.

Die Typisierung der Zelllinien unter Infektion mit dem *CyHV-3* und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus zeigten, dass die Infektionen zu keinen signifikanten Veränderungen der Anteile an epithelialen und mesenchymalen Zellen in den Kulturen führten. Da CEV nicht in der Lage war, die neu entwickelten Zelllinien zu infizieren, konnte nach Inokulation von CEV in die Zellkulturen keine Virus-bedingten Veränderung festgestellt werden.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen zur Empfänglichkeit der Zelllinien für eine Infektion mit *CyHV-3* mit den Ergebnissen zur Charakterisierung der Zellen, gibt es einige bemerkenswerte Beobachtungen. Verschiedene Untersuchungen früherer Autoren (COSTES et al. 2009; ADAMEK et al. 2012) legen

nahe, dass das *CyHV-3* einen Tropismus zu epithelialem Gewebe aufweist. Eine im Vorfeld der Arbeit entwickelte Hypothese war, dass es in einer gemischten Zellkultur bei einer überproportionalen Infektion der epithelialen Zellen zu einem verstärkten Absterben dieses Zelltyps kommt. Somit wäre in der Zellkultur eine Verschiebung der Zellpopulationen hin zu Fibroblasten und damit zu einer verstärkten Vimentinexpression unter Infektion zu erwarten gewesen. Solche Veränderungen konnten in der vorliegenden Arbeit bei den Zellkulturen unter Infektion nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die epithelialen Zellen zwar verstärkt infiziert wurden aber in dem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen nicht in signifikantem Umfang abstarben. So ist beschrieben, dass *CyHV-3* die Apoptose infizierter Zellen blockiert, um die Fertigstellung der Viruspartikel sicher zu stellen (ADAMEK et al. 2014a). Weiterhin beschrieben Adamek et al. (2013), dass es in der Haut infizierter Fische unter Infektion mit *CyHV-3* zu einer Herabregulation von für Claudine kodierende Gene kommt (ADAMEK et al. 2013). Diese sind, wie auch das hier verwendete Occludin, für Epithelzellen charakteristische Tight Junctions Proteine und regulieren neben der epithelialen Permeabilität die Polarität der Epithelzellen und könnten ebenfalls als Marker für Epithelzellen betrachtet werden. In den hier durchgeführten Versuchen konnte jedoch keine signifikante Abwärtsregulation der betrachteten epithelialen Markergene festgestellt werden, was ebenfalls nicht auf ein verstärktes Absterben von epitheloiden Zellen in Zellkulturen unter *CyHV-3*-Infektion schließen läßt.

Neukirch und Kunz (1999) postulierten bereits bei der Entwicklung der CCB-Zelllinie, dass es sich auch bei dieser Zelllinie um Mischkulturen aus epithelialen Zellen und Fibroblasten handelt. Außerdem beschrieben sie, dass bei der Etablierung der Zelllinie mit zunehmender Passage eine Zunahme des Fibroblastenanteils festzustellen war. Ähnliche Ergebnisse postulieren Yu und Kollegen (1997), die mit zunehmender Passage eine Selektion von schnell wachsenden Zelltypen beobachteten (YU et al. 1997). Daher wurden die CCB-Passagen 70, 146 und 335 mit den epithelialen Zellmarkern Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin sowie dem Fibroblastenmarker Vimentin typisiert, um eine mögliche Veränderung des Zelltyps mit fortschreitender Passage zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu CCB-Zellen aus anderen Passagen die Zellen der Passage 146 keine epithelialen Marker, dafür aber Vimentin in hohem Maße exprimierten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den CCB-Zellen dieser Passage um eine reine Fibroblastenkultur handelte. Eine Hypothese zu Beginn dieser Arbeit, die auf Basis unterschiedlicher Literaturangaben (u.a. COSTES et al. 2009, ADAMEK et al. 2012, MICHEL et al. 2010, PIKARSKY et al. 2004) entwickelt wurde, bestand in der Annahme, dass ein Tropismus des *CyHV-3* für epitheliales Gewebe besteht. So treten histopathologische Veränderungen im Kiemenepithel und Degenerationen des Tubulusepithels der Niere bereits 2 Tage nach Beginn der Infektion auf (MICHEL et

al. 2010; PIKARSKY et al. 2004). Weiterhin beschreiben Costes et al. (2009), dass die Haut die Haupteintrittspforte des *CyHV-3* darstellt. Bei der äußersten Schicht der Haut echter Knochenfische handelt es sich um ein mehrschichtiges Plattenepithel, dass von einer Mukusschicht bedeckt ist, die eine wirkungsvolle Barriere gegen den Eintritt von Pathogenen darstellt (COSTES et al. 2009). Weitere Untersuchungen von Gilad et al. (2004) zur Virusmenge von *CyHV-3* in unterschiedlichen Geweben infizierter Fische zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion zeigten hohe Virustiter von 3 x 10^5 Viruskopien pro 10^6 Wirtszellen bereits nach einem Tag *p.i.* in der Mukusschicht der Haut (GILAD et al. 2004). Diese Annahme wurde von Adamek et al. (2012) bestätigt, die virale DNA in Hautproben nachwiesen und virale mRNA in Hautzellen detektierten (ADAMEK et al. 2012). Somit ist davon auszugehen, dass die Haut als Eintrittspforte für das *CyHV-3* genutzt wird und ihre Zellen bereits zu Beginn der Infektion ein Zielgewebe für das Virus darstellt.

Somit wird die Hypothese einer bevorzugten Infektion epithelialer Zellen durch das *CyHV-3* von den Zellkulturergebnissen der vorliegenden Arbeit, die einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Anteil epithelialer Zellen in der Zellkultur und den erzielten Replikationsergebnissen des *CyHV-3* darstellen, zusätzlich gestützt. Die Zellen in den beiden CCB-Passagen 70 und 335 exprimierten in vergleichbarem Umfang die epithelialen Marker Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin, wobei am 2. Tag *p.i.* mit *CyHV-3* und mit dem karpfenpathogenen Paramyxovirus die Zellen der CCB Passage 335 signifikant geringere Kopienanzahlen an mRNA für alle epithelialen Zellmarker exprimierten und höhere Werte für Vimentin. Am Tag 7 *p.i.* kam es unter Infektion der Zellen mit dem *CyHV-3* zu erheblichen Schwankungen in der Expression der Zellmarker. Diese Ergebnisse wurden auch im Rahmen der Typisierung der neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin bei der Zelltypisierung der mitgeführten Kontrolle, den Zellen der CCB-Passage 133, bestätigt, bei der es zu Varianzen von über 30 % in der Expressionsrate der Zellmarker kam. Dies steht zum Teil im Widerspruch zu der genannten Literatur, die mit zunehmender Passage eine Zunahme des Fibroblastenanteils in der Zellkultur beschreibt. Berücksichtigt man in der Bewertung der Ergebnisse die bei den Zellen der CCB-Passage 133 beobachteten Varianzen in der Expression aller vier Zellmarker, so lässt sich nicht ausschließen, dass es sich bei den Unterschieden um physiologische Schwankungen handelt.

Weiterhin postulierten Hughes et al. (2007), dass es bei aus humanem Darmepithel isolierten Caco-2 Zellen zu unterschiedlichen passagebedingten Veränderungen in den Zellen kommt. So beschreiben sie eine Zunahme des transepithelialen elektrischen Widerstandes von Passage 29 zu Passage 198 mit einer vorübergehenden Abnahme zwischen Passage 36 und 86. Als ein weiteres Beispiel für wechselnde Eigenschaften der Caco-2-Zelllinie ist die parazelluläre

Durchlässigkeit der Zellen zu nennen. Dabei zeigte sich, dass es von Passage 29 bis Passage 198 zu einer Abnahme aber zwischen Passage 36 und 86 zu einer Zunahme der parazellulären Durchlässigkeit kam. Dabei vermuteten die Autoren, dass diese Veränderungen in den Eigenschaften der Zelllinien sehr wahrscheinlich durch die genetische Heterogenität der Ausgangslinie verursacht wird, die zu einer positiven Selektion bestimmter Zellcharakteristiken führt (HUGHES et al. 2007). Weitere Untersuchungen von Poiesz und Mitarbeitern (1980) an zwei humanen Lymphozytenzelllinien (HUT 102; CTCL-3) und ihrer Fähigkeit zur Replikation eines humanen Retrovirus Typ C zeigten, dass die Zellkulturen erst ab Passage 56 eine stabile Virusreplikation des humanen Retrovirus C aufwiesen. Diese blieb dann bis Passage 200 erhalten (POIESZ et al. 1980). Vautherot et al. (2017) postulierten, das eine pluripotente Stammzelllinie aus Hühnerembryonen zunächst keine Empfindlichkeit gegenüber gallidem Herpesvirus 2 aufwies. Erst nach dem Einsatz unterschiedlicher Methoden zur Induktion einer weiteren Zelldifferenzierung erlangten die Zellen eine stabile Empfänglichkeit für eine Infektion mit dem *GaHV-2* (VAUTHEROT et al. 2017).

Somit stehen die gewonnenen Ergebnisse im Einklang zu den Angaben in der Literatur, die in Abhängigkeit von der Zellpassage zahlreiche Veränderungen in den Eigenschaften von Zelllinien beschreibt. Dabei ist als Ursache eine Differenzierung der Zellen als Anpassung an die Kulturbedingungen anzunehmen, im Zuge derer sich ihre Reaktion auf Pathogene, wie Viren ebenfalls verändert.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Typisierung der Primärkulturen aus Kiemen und der CCG-Zelllinie durchgeführt, um den prägenden Zelltyp der Kulturen zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass in den Primärkulturen aus Kiemen ausschließlich epitheliale Marker nachweisbar waren, während die CCG-Zelllinie neben Occludin vor allem Vimentin exprimierten. Auf Grund des sehr niedrigen Expressionsniveaus von Occludin ist davon auszugehen, dass die CCG-Zelllinie nahezu ausschließlich mesenchymale Zellen enthält. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie nicht um Zellen aus *Cyprinus carpio* handelte. Daher ist nicht auszuschließen, dass Cadherin 1 und Cytokeratin 15 nicht nachgewiesen wurden, weil die für Karpfen entworfenen Primer nicht in der Lage waren an die entsprechende Gensequenz zu binden. Da die Primer für Occludin und Vimentin ähnlich spezifische Bindungseigenschaften aufweisen wie die Primer für Cadherin 1 und Cytokeratin 15, ist dies jedoch unwahrscheinlich.

Es zeigte sich, dass die Infektion mit *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus keinen Einfluss auf das Expressionsverhältnis der untersuchten Marker zueinander nahm. In der CCG-Zelllinie war jedoch eine signifikant niedrigere Expression von Occludin und Vimentin unter Infektion mit dem Paramyxovirus im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Bezieht man allerdings die sehr geringe Menge viraler mRNA des

Paramyxovirus in der typisierten CCG-Kultur in die Betrachtungen mit ein, so ist nicht davon auszugehen, dass die verringerte Expression der Markergene durch die Virusinfektion bedingt ist. In der Literatur ist keine Regulation des Tight-Junctions-Protein Occludin oder anderer Zellkontaktproteine durch dieses Virus beschrieben. Somit besteht weiterer Forschungsbedarf zu der Frage, ob und wie das Paramyxovirus die Expression einzelner Gene unter Infektion verändert.

Die Untersuchung der epithelialen Marker in den Primärkulturen aus Kiemen zeigte, dass es 48 h nach Infektion mit dem *CyHV-3* zu einer signifikant höheren Expression von Cadherin 1, Occludin und Cytokeratin 15 kam. Vimentin wurde nicht exprimiert, woraus auf das Vorliegen einer Epithelzellkultur geschlossen werden kann. Adamek et al. (2013) beschreiben, dass *CyHV-3* Gene für verschiedene Claudine sowie ein Mucin in der Haut infizierter Karpfen bereits nach 24 h *p.i.* herabreguliert. Da Claudine, wie auch andere Tight-Junctions-Proteine eine wichtige Rolle in der Durchlässigkeit der Haut spielen, werden diese von zahlreichen Viren herab reguliert (ADAMEK et al. 2013). So werden z.B. von einer Rhinovirusinfektion in den Zellen des menschlichen Nasenepithels unter anderem die Genexpression von Claudin-1 und Occludin herabreguliert (YEO u. JANG 2010). Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der Genexpression dieser Markergene in den Primärkulturen von Kiemen in der vorliegenden Studie könnte an der Bestimmung der Expression nach 48 h liegen. So zeigen Untersuchungen von Gilad et al. (2004), dass es bei infizierten Fischen erst nach 3 Tagen *p.i.* zu vergleichbaren Virusgehalten in den Kiemen wie in der Haut kam. Eine weitere mögliche Erklärung besteht in den relativ großen kulturspezifischen Unterschieden zwischen Primärkulturen (BOLS u. LEE 1991). So zeigte die Expression der Markergene in den mit CEV inokulierten Kulturen nahezu dieselbe Expressionsrate wie die mit *CyHV-3*, obwohl die Auswertung der viralen mRNA von CEV lediglich Spuren einer Infektion zeigen. Damit könnte es sich bei den Ergebnissen auch um physiologische Varianzen zwischen den Kulturen in der Expression der eingesetzten Marker handeln.

In einem weiteren Versuch wurde die Expression der Zellmarkergene CDH1, CK15, Occludin und Vimentin in der neu etablierten Flossenzelllinie ccApin und der bereits etablierten Flossenzelllinie KFC sowie der Referenzzelllinie CCB nach Infektion der Zellen mit *CyHV-3* und dem karpfenpathogenen Paramyxovirus bestimmt, um diese vergleichend zu typisieren. Dabei sollte die Hypothese überprüft werden, dass eine charakteristische Verteilung der Expression dieser Zellmarker für Zelllinien aus Flossen existiert und diese der CCB-Zelllinie gegenüber gestellt werden. Die Auswertung erfolgte an Tag 2 *p.i.* und an Tag 4 *p.i.* und zeigte, dass es sich bei allen Zelllinien um Mischkulturen aus epithelialen und mesenchymalen Zellen handelte. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Flossenzelllinien KFC und ccApin deutlich weniger Vimentin exprimierten als die CCB-Zelllinie und damit über einen

geringeren Anteil Fibroblasten verfügte. Die signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen und der Kontrolle, die besonders unter Infektion mit dem Paramyxovirus auftraten, zeigten kein einheitliches Bild. Es ist daher nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen der Infektion mit einem der untersuchten Viren und dem Grad der Expression eines Markers herzustellen. Es scheint nicht zu einer Veränderung der Zelltypverteilung in den Kulturen unter Infektion mit *CyHV-3* bzw. dem Paramyxovirus zu kommen.

Neben der Ausprägung des Zelltyps sollte auch die Immunantwort der unterschiedlichen Zellen nach Inokulation der drei Viren betrachtet werden. Dazu wurde die Expression des Interferon a2-Gens in den neu etablierten Zelllinien und in den unterschiedlichen CCB-Passagen näher untersucht. Es zeigte sich, dass das *CyHV-3* in allen Zelllinien nur eine geringe und in ccAgill Zellen gar keine Interferonantwort auslöste. Das Paramyxovirus provozierte in allen Zelllinien mit Ausnahme der ccAgill-Zelllinie eine signifikante Interferonantwort. Die ccAgill Zelllinie zeigte keine interferonvermittelte Reaktion auf die Inokulation mit allen drei Viren.

Interferone sind bei allen Spezies wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunantwort gegen Viren. Dabei wird das Typ I Interferon von den meisten infizierten Zellpopulationen sezerniert und erfüllt die Funktion eines Alarmproteins. Sie binden an entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche benachbarter Zellen und lösen über den JAK-STAT Signalweg die Expression zahlreicher antiviraler Gene aus, die eine Virusreplikation in diesen Zellen behindern sollen (ADAMEK et al. 2012). Es wurde beschrieben, dass es unter Infektion mit dem *CyHV-3* in infizierten Zellen zur Induktion einer interferonvermittelten Immunantwort (IFN-a2) kommt. So beobachteten Adamek et al. (2013) bereits 24 h *p.i.* einen signifikanten Anstieg der Expression des Interferon a2 in Primärkulturen aus Karpfenhaut. *In vitro* Untersuchungen an der CCB-Zelllinie zeigten jedoch, dass es in diesen Zellen zu keiner signifikanten Interferon Typ I Antwort unter Infektion mit dem *CyHV-3* kam und die Autoren diskutierten, ob das *CyHV-3* möglicherweise die Interferonantwort der Zellen kontrollieren und dabei herab regulieren könne. Dies wurde durch Untersuchungen mit anderen Viren bestätigt. Harte et al. (2003) beschrieben, dass es bei *Vaccinia-virus-* Infektionen zu einer erfolgreichen Unterbrechung des Toll Like Rezeptor-Wegs durch das Virus kommt (HARTE et al. 2003). Weiterhin ist für humane Herpesviren wie das Eppstein-Barr-Virus beschrieben, dass sie mittels viraler micro RNA die Immunantwort der Wirtszellen beeinflussen (GOTTWEIN u. CULLEN 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein. So konnte in den CCB-Zellen keine signifikante Zunahme der Interferonexpression nach 4 und 7 Tagen *p.i.* unter Infektion mit dem *CyHV-3* beobachtet werden. Die Betrachtung der Interferon a2-Expression in den CCB-Passagen 70, 146 und 335 ergab ebenfalls ein sehr niedriges

Expressionsniveau in allen Passagen, wobei Passage 70 die niedrigsten Expressionsraten zeigte. Bezieht man die Ergebnisse der Zelltypisierung mit ein, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Anteil epithelialer Zellen bzw. Fibroblastenzellen und der Höhe der Interferonexpression. Unter Berücksichtigung der Replikationsraten für das *CyHV-3* ist jedoch zu sehen, dass die Passage 70 mit der niedrigsten Interferonantwort die höchsten Gehalte an viraler mRNA aufweist. Allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Gehalten viraler mRNA in der CCB-Passage 335, die an Tag 7 *p.i.* die höchste Interferonantwort zeigte. Adamek et al. (2012) beobachteten, dass eine Stimulation der Interferonantwort der CCB-Zellen durch den Einsatz von Poly I:C zu einer signifikanten Reduktion der ermittelten Virustiter führte und vermuteten, dass dies zu einem Schutz der Zellen vor der Infektion führte. Damit zeigten die Autoren, dass der Grad der Infektion mit dem *CyHV-3* vom Expressionsniveaus des Interferons abhängig ist (ADAMEK et al. 2012). Die nicht signifikanten Unterschiede in der Expression viraler mRNA zwischen den CCB-Zellen in unterschiedlichen Passagen sind sehr wahrscheinlich auf die geringen absoluten Unterschiede in der Expression des Interferon a2-Gens zwischen den Passagen zurück zu führen.

Bei den Zelllinien ccAbre, ccAcar und ccApin zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei der CCB-Zelllinie und ihren unterschiedlichen Passagen. Es gab ausschließlich Unterschiede im physiologischenInterferonexpressionsniveau, dass die Zellen unabhängig von einer Infektion zeigten. Die ccAgill-Zelllinie zeigte keine interferonvermittelte Reaktion auf die Infektion mit dem *CyHV-3*. Da die Auswertung der Infektionsversuche darlegte, dass sie unter den neu entwickelten Zelllinien die schlechtesten Replikationsergebnisse für das *CyHV-3* aufwies, ist davon auszugehen, dass sich die Zellen in anderer Weise z.B. mittels Mukus vor einer Infektion schützen. Ein möglicher Vorteil für den Organismus beim Verzicht auf eine interferonvermittelte Immunantwort in Kiemenzellen könnte in einer geringeren Beeinträchtigung der Funktion der Kiemen im Falle einer Infektion begründet liegen.

In den mit CEV inokulierten Zellkulturen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Kultur im Vergleich zu den Kontrollen. Die Auswertung der Gehalte viraler mRNA aus den Zellen und viraler DNA aus dem Überstand zeigten, dass CEV nicht in der Lage war, die angebotenen Zellen zu infizieren. Adamek et al. (2017a) detektierten eine Interferonantwort des Interferon a2 *in vivo* in mit CEV infizierten Karpfenkiemen. Somit ist davon auszugehen, dass es auch *in vitro* zu einer Interferonantwort kommt, wenn es gelingt, CEV *in vitro* zu kultivieren. Es besteht weiterer Forschungsbedarf zur *in vitro* Kultur von CEV und der Immunantwort der infizierten Zellen.

Das untersuchte Paramyxovirus löste in allen untersuchten Zelllinien außer in den ccAgill-Zellen eine signifikante interferonvermittelte Immunantwort aus, wobei die

Analyse der viralen mRNA und die Titration des Kulturüberstandes zeigte, dass es in ccAgill-Zellen trotzdem zu einer Replikation des Virus und einer Reproduktion infektiöser Viruspartikel kam. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es in den CCB-Passagen 70 und 335 zu einer deutlichen Interferonantwort kam, während in der CCB-Passage 146 keine interferonvermittelte Reaktion auf das Paramyxovirus erfolgte. Dies passt zu den Ergebnissen der Infektionsversuche, die die höchsten Gehalte viraler mRNA des Paramyxovirus in CCB-146 aufzeigten. Es ist somit davon auszugehen, dass die guten Replikationsraten des Paramyxovirus durch das Fehlen einer Interferon Typ 1-Antwort zumindest begünstigt wird, da beschrieben ist, dass Interferone eine große Bedeutung für die angeborene Immunantwort aller Wirbeltiere gegen Viruserkrankungen haben (MOSSMAN u. ASHKAR 2005; ADAMEK et al. 2012).

Ähnliche Interferonantworten des Interferon a2, wie bei dem Paramyxovirus wurden nach Infektion von Zellen mit *Rhabdovirus carpio* nachgewiesen, bei dem es sich ebenfalls um ein RNA-Virus handelt. Adamek et al. (2012) beschrieben, dass es bei einer Infektion von CCB-Zellen mit dem *Rhabdovirus carpio* zu einer starken Aktivierung des Interferon I-Systems kommt. Weiterhin beobachteten sie, dass es trotz der starken Interferonantwort zu einer erfolgreichen Infektion der Zellen und 2-4 Tage *p.i.* zu einem zytopathischen Effekt kam. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen zu dem verwendeten Paramyxovirus, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden. Kileng et al. (2007) stellten ähnliche Ergebnisse bei *Infectious salmon anemia virus (ISAV)*, einem RNA-Virus bei Lachsen fest. Dabei beobachteten sie in Zellen aus atlantischen Lachsen eine starke Interferon I Antwort ohne Einschränkung in der Replikation des Virus (KILENG et al. 2007).

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit die diagnostische Eignung der neu entwickelten Zelllinien und der CCB-Zelllinie für das *CyHV-3* überprüft werden, da der Nachweis des *CyHV-3* auf Zellkultur schwierig und die Bestimmung der Viruslast ungenau ist (HEDRICK et al. 2005). Dabei zeigte sich, dass sich das *CyHV-3* mit den neu entwickelten Zelllinien nicht aus Geweben infizierter Karpfen reisolieren und somit die Infektion bei diesen Fischen nicht nachweisen ließ. Nur auf der ccAbre-Zelllinie ließ sich für eine Probe ein positiver zytopathischer Effekt detektieren. Dies passt zwar zu den Resultaten der Infektionsversuche, die die ccAbre Zelllinie als sensibelste Zelllinie identifizierten. Eine einzelne positive Probe muss jedoch als Zufallsbefund eingeordnet werden. Neukirch und Kunz (2001) beschrieben die Isolation unterschiedlicher Virusisolate aus Koi auf Ca F-2, CCB, CCG und EPC-Zellen, wobei sie für das *CyHV-3* auf CCG und EPC-Zellen einen vorübergehenden zytopathischen Effekt beschrieben, der nach 10 Tagen auftrat aber später wieder verschwand. Weiterhin zeigten Neukirch et al. (1999), dass es mit Hilfe homogenisierter Organproben klinisch erkrankter Fische möglich war, einen

zytopathischen Effekt nach 6 Tagen *p.i.* auf CCG-Zellen zu erzielen. Ähnliche Beobachtungen machten Hedrick et al. (2000), die einen zytopathischen Effekt nach 7-10 Tagen *p.i.* auf KF-1 Zellen nach Infektion mit re-isoliertem *CyHV-3* aus Organproben nachwiesen. Allerdings beschrieben Hedrick et al. (2005), dass sich der Virusnachweis auf Basis von Zellkultur als sehr schwierig erweist, wenn die Fische zuvor längere Zeit tot oder gefroren waren. Dies könnte ebenfalls in den durchgeführten Versuchen von Bedeutung gewesen sein, da die mittels RT-qPCR bestimmten Virusgehalte in den verwendeten Nieren (nicht gezeigte Daten) für eine Infektion hätten ausreichen müssen. Darüber hinaus wurde mit 1:20 und 1:200 eine höhere Verdünnung verwendet als von Neukirch et al. (1999) mit 1:10 und 1:100 beschrieben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das Virus während der Isolation inaktiviert bzw. von dem zur Organzerkleinerung verwendeten Sand gebunden und damit dem Medium entzogen wurde. Die korrekte Kultivierung der Zellen und ihre Empfänglichkeit für das *CyHV-3* wurden durch die mitlaufenden Positivkontrollen sichergestellt.

Im Rahmen der Erprobung der diagnostischen Eignung der neu entwickelten Zelllinien sollte untersucht werden, ob die Reaktivierung des *CyHV-3* aus Leukozyten latent infizierter Karpfen mittels Mitogenstimulation gelingt und ob das in dieser Weise reaktivierte Virus mit Hilfe der neu entwickelten Zelllinien detektiert werden kann. Dies basierte auf Beschreibungen von Eide et al. (2011), die zeigten, dass B-Zellen in der Latenzphase den Hauptrückzugsort für das *CyHV-3* darstellen. Weiterhin beschrieben Moser et al. (2005) die Reaktivierung des Gammaherpesvirus 68 aus latent mit diesem Virus infizierten B-Zellen mittels einer alpha-Ig/alpha-CD40 oder Lipopolysaccharidstimulation (MOSER et al. 2005).

Zusätzlich wurden Flossenproben und Makrophagen auf Nachweisbarkeit des *CyHV-3* in der Latenzphase untersucht, da diese als geeignete Zielgewebe beschrieben sind. So publizierten Costes et al. (2009), dass die Haut und das Epithel der Flossen die Haupteintrittspforten und die ersten Zielgewebe für die Replikation des *CyHV-3* darstellen, während Weck et al. (1999) beschrieben, dass Makrophagen das Hauptreservoir für Gammaherpesviren wie das murine Gammaherpesvirus 68 darstellen (WECK et al. 1999; COSTES et al. 2009). Daher wurden Makrophagen und Flossenfragmente in die Untersuchungen mit eingebunden.

Zudem würde die Möglichkeit des Nachweises von *CyHV-3* aus Blutproben latenter Träger durch Stimulation von Leukozyten und Aufbringen auf empfängliche Zelllinien ermöglichen, die Fische für eine diagnostische Untersuchung nicht letal beproben zu müssen.

In den durchgeführten Versuchen wurde neben Lipopolysacchariden auch Pokeweed Mitogen, Concanavalin A und ein Gemisch synthetischer DNA und RNA-Analoga

eingesetzt. Dabei wurde für Pokeweed Mitogen eine Stimulation von B- und T-Lymphzoyten, für Concanavalin A eine Stimulation der T-Zellen beschrieben und die eingesetzten Lipopolysaccharide entwickeln als Bestandteile gramnegativer Bakterien eine antigene Wirkung (TIZARD 2018). Die Mischung aus synthetischer rechts und linksgängiger DNA sowie synthetischer doppelsträngiger RNA eignet sich zur Stimulation des Immunsystems, wobei insbesondere Poly I:C über eine verstärkte Expression von TLR-3 Rezeptoren und Interferon-β wirkt (LI et al. 2015).

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass ausschließlich im ersten Versuchsdurchgang in einzelnen Proben sehr geringe Kopienzahlen von *CyHV-3*-spezifischer DNA mittels RT-qPCR nachgewiesen werden konnten. Die im Anschluss geplanten Infektionsversuche mit den Zelllinien wurden daher nicht mehr durchgeführt, da für eine erfolgreiche Infektion der Kulturen deutlich mehr virale DNA in den Proben nötig gewesen wäre.

Im 3. Versuchsdurchgang wurden die Karpfen vor der Blutentnahme gestresst. Der zusätzliche Stress sollte, in Kombination mit den verwendeten Mitogenen, zu einer Reaktivierung des Virus und zu einer besseren Nachweisbarkeit von *CyHV-3* aus Blut und damit zu einer besseren Detektion symptomloser Carriertiere führen. Eine Reaktivierung von *CyHV-3* nach einem kurzzeitigen Stress war in der Literatur beschrieben worden (BERGMANN u. KEMPTER 2011). Dabei sollten die Mitogene die Mitose bzw. Zellproliferation anregen und damit die Anfälligkeit der Leukozyten gegenüber dem Virus erhöhen, während der Stress eine Immunsuppression bewirken sollte. Im Anschluss sollten auch hier die mit Mitogenen stimulierten Leukozyten auf die neu etablierten Zelllinien aufgebracht werden. Dies wurde auch hier ausgesetzt, da es zu keinem positiven Nachweis von *CyHV-3* in den Leukozytenproben nach Stimulation kam.

Die Ergebnisse zeigen, dass es nicht möglich war mittels Mitogenstimulation *CyHV-3* aus Blutleukozyten latent infizierter Karpfen zu reaktivieren. Damit wurde der zweite Teil des Versuches, in dem das reaktivierte Virus mittels der neu entwickelten Zelllinien detektiert werden sollte, nicht durchgeführt.

Moser et al. (2005) beschreiben allerdings, dass sie mittels Mitogenen nur in durchschnittlich 10 % der infizierten Zellen eine Reaktivierung des Eppstein-Barr-Virus erreichen konnten. Dies zeigt, dass bei Mitogen-vermittelter Stimulation von Zellen, die mit Gammaherpesviren infiziert sind, mit einem geringen Anteil Virus-positiver Zellen zu rechnen ist. Darüber hinaus sehen die Autoren eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation viraler Schlüsselgene. Außerdem scheint DNA-Methylierung auch Latenzgene des Eppstein-Barr-Virus negativ zu beeinflussen (PAULSON et al. 2002; MOSER et al. 2005). Es besteht die Möglichkeit, dass ähnliche Faktoren eine Rolle für die erfolgreiche Reaktivierung des *CyHV-3* spielen.

In jedem Fall besteht Forschungsbedarf zu der Frage, welche viralen Gene für eine Reaktivierung des *CyHV-3* von Bedeutung sind und welche Mechanismen geeignet sind sie *in vitro* zu aktivieren.

Insgesamt zeigten die durchgeführten Versuche, dass sich die neu entwickelten Zelllinien unterschiedlich gut zur Replikation der untersuchten Viren eignen, wobei die Auswertung der Immunantwort und die Typisierung der Zelllinien einen deutlichen Zusammenhang zwischen Zelltyp, Immunantwort und Replikationseigenschaften offenbarten. Es zeigte sich, dass sich die neu entwickelte ccAbre-Zelllinie am besten zur Replikation des *CyHV-3* eignet und das eingesetzte Paramyxovirus die besten Replikationseigenschaften in CCB-146 erreicht, wobei es in allen Kulturen repliziert wurde. Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass sich die neu entwickelten Zelllinien nicht für eine Zellkultur basierte Diagnostik des *CyHV-3* eignen. CEV konnte in keiner der verwendeten Kulturen zuverlässig repliziert werden.

6 Zusammenfassung

Martin Felten

Die Eignung verschiedener Zelllinien aus Karpfen zur Replikation und Re-Isolation von karpfenpathogenen Viren

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neu entwickelte Zelllinien aus Karpfen auf ihre Eignung zur Replikation des Cypriniden Herpesvirus 3 (*CyHV-3)*, dem Carp Edema Virus (CEV) und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus und zur Re-Isolierung dieser Viren aus Geweben infizierter Fische näher zu untersuchen. Da nach wie vor der Bedarf nach einem geeigneten Vakzin gegen das *CyHV-3* besteht, sollte geprüft werden, welche der Zelllinien sich am besten zur Replikation von *CyHV-3* eignet, um über eine geeignete Zelllinie zur Herstellung von Antigen für das Vakzin zu verfügen. Zudem ist es bisher nicht gelungen CEV *in vitro* zu kultivieren, daher wurden im Rahmen dieser Arbeit neben den neu entwickelten Zelllinien auch bereits etablierte Zelllinien und Primärkulturen aus Kiemen von Karpfen auf ihre Eignung zur Replikation des CEV untersucht. Weiterhin sollten die Zelllinien hinsichtlich des Zelltyps charakterisiert und eine Veränderung der Zelldifferenzierung unter Infektion, die Interferon vermittelte Immunantwort der Zellen auf die Infektion und die diagnostische Eignung der Zelllinien zum Nachweis des *CyHV-3* in Organ- und stimulierten Leukozytenproben untersucht werden.

Dazu wurden von der Fraunhofer EMB die neu entwickelten Zelllinien ccAbre, ccAcar, ccAgill und ccApin bezogen und mit *CyHV-3*, CEV und dem Paramyxovirus infiziert. In allen Versuchen wurde die etablierte Zelllinie CCB als Referenz eingesetzt. Um zu prüfen, ob Unterschiede in der Empfänglichkeit von Zellen für Virusinfektion auf passagespezifischen Unterschieden beruhen könnten, wurden vier verschiedene Passagen der CCB-Zelllinie verwendet und die Eignung der verschiedenen Passagen zur Replikation der Viren mit den neu entwickelten Zelllinien verglichen. Es wurde von allen verwendeten Zelllinien 0, 2, 4 und 7 Tagen nach Infektion Virus aus dem Zellkultur-Überstand von jeweils drei Kulturen isoliert, wobei Tag 0 als Referenzwert für das eingesetzte Virus verwendet wurde. Nach 2, 4 und 7 Tagen Kultur wurden Zellen vom Boden der Kultur gewonnen und zelluläre sowie virale mRNA aus den Proben isoliert. Bei den Primärkulturen aus Karpfenkiemen und den Kulturen von CCG-Zellen stand der Nachweis viraler mRNA von CEV im Vordergrund, während bei Kulturen der KFC und ccApin-Zelllinien die Untersuchung der Transkription zellulärer mRNA zur vergleichenden Typisierung der neu entwickelten ccApin Zelllinie das Hauptziel darstellte. Die Analyse der Expression von Genen, die Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin kodieren, wurde im Rahmen der Zelltypisierung als Marker für epitheliale Zellen sowie das Gen, das Vimentin kodiert als Marker für Fibroblasten verwendet. Die Transkripton dieser

Gene und die Bestimmung der Virusgehalte wurden mit Hilfe der RT-qPCR durchgeführt. Die Analyse der Immunantwort anhand der Expression des Interferon a2-Gens erfolgte ebenfalls mittels RT-qPCR. Bei der Untersuchung der Zelllinien zur diagnostischen Eignung wurde der Virusgehalt des *CyHV-3* in den mitogenstimulierten Leukozyten von latent infizierten Karpfen und in Gewebeproben aus akut an *CyHV-3* erkrankten Tieren zunächst ebenfalls mit qPCR bestimmt. Die Auswertung von Zellveränderungen in der Kultur erfolgte anhand der Überprüfung auf die Entstehung eines zytopathischen Effektes.

Es zeigte sich, dass sich die ccAbre-Zelllinie am besten zur Replikation des *CyHV-3* eignet und die CCB-Zellen der Passage 146 die höchsten Gehalte viraler mRNA des karpfenpathogenen Paramyxovirus aufwiesen. Die höchste Empfänglichkeit für das karpfenpathogene Paramyxovirus zeigte die ccAbre-Zelllinie, aber sie replizierte das Virus schlechter als die CCB-146-Zelllinie. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Replikationsraten für das *CyHV-3* und das Paramyxovirus in der CCB-Zelllinie in erheblichem Maße von der verwendeten Passage abhängig waren, mit hohen Replikationsraten in Zellen der Passage 146 für das Paramyxovirus und Passage 70 bzw. 335 für das *CyHV-3* und geringer Replikation in Zellen der Passage 146 für das *CyHV-3* bzw. Passage 335 für das Paramyxovirus. Keine der verwendeten Zelllinien oder Primärkulturen war geeignet, das CEV *in vitro* zuverlässig zu replizieren. Die Zelltypisierung ergab, dass es sich bei allen neu entwickelten Zelllinien um Mischkulturen aus Epithel- und Mesenchymzellen handelte, wobei sich während einer Beobachtung über 7 Tage keine Veränderung des Zelltyps unter Infektion mit *CyHV-3* und dem Paramyxovirus zeigte. Zudem ergaben die Untersuchungen, dass Zellen der CCB-Passage 146 keine epithelialen Marker exprimierten, während Zellen der CCB Passagen 70 und 335 neben Vimentin auch Cadherin 1, Cytokeratin 15 und Occludin exprimierten. Bei den Primärkulturen aus Karpfenkiemen handelte es sich dagegen um Epithelzellkulturen.

Die Untersuchung der Immunantwort ergab, dass das Paramyxovirus eine deutliche Interferon a2-vermittelte Immunantwort in allen Zelllinien außer ccAgill-Zellen provozierte und dass *CyHV-3* zu einer deutlich schwächeren Interferonantwort führte oder sogar die Interferonantwort herabregulierte. Abschließend zeigte sich, dass sich die Zelllinien nicht zur Diagnostik für *CyHV-3* aus mitogenstimulierten Leukozyten latent infizierter Fische oder zum Nachweis von *CyHV-3* aus Gewebeproben akut erkrankter Fische eignete.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Zelltyp, dem Ausgangsgewebe, aus dem die Zelllinie angezüchtet wurde, der Passage der verwendeten Zelllinie und ihrer Immunantwort auf die Infektion und der Eignung der Zelllinie für die Replikation- und Reisolierung der Viren *CyHV-3*, CEV und des Paramyxovirus.

7 Summary

Martin Felten

The suitability of different carp cell lines for replication and re-isolation of carp pathogenic viruses

The aim of this work was to analyze newly developed carp cell lines for their suitability for replication of Cyprinid Herpesvirus 3 (*CyHV-3*), Carp Edema Virus (CEV) and a carp pathogenic Paramyxovirus and for re-isolation of these viruses from tissues of infected fish. Since there is still a need for a suitable vaccine against *CyHV-3*, it should be examined which of the cell lines is best suited for replication of *CyHV-3* in order to have a suitable cell line for the production of antigen for the vaccine. In addition, CEV has not yet been cultivated *in vitro*. Therefore, in addition to the newly developed cell lines, established cell lines and primary cultures from carp gills have also been investigated for their suitability for CEV replication. Furthermore, the cell lines should be characterized with regard to cell type and a change in cell differentiation under infection, the Interferon mediated immune response of the cells to infection and the diagnostic suitability of the cell lines for the detection of *CyHV-3* in organ and stimulated leukocyte samples should be investigated.

The Fraunhofer EMB prepared the newly developed cell lines ccAbre, ccAcar, ccAgill and ccApin and in this study, these cell lines were infected with *CyHV-3*, CEV and the Paramyxovirus. In all experiments, the established cell line CCB was used as a reference. To test whether differences in the susceptibility of cells to virus infection might be due to passage-specific differences, 4 different passages of the CCB cell line were used and the suitability of the different passages for replication of viruses was compared with the newly developed cell lines. From all cell lines used 0, 2, 4 and 7 days after infection with virus the cell culture supernatant was collected from 3 cultures each. Using day 0 as the reference value changes of the amount of virus in the culture supernatant during cultivations was determined. After 2, 4 and 7 days of culture, cells were collected from the bottom of the culture and cellular and viral mRNA were isolated from the samples. For primary cultures from carp gills and from CCG cell cultures the detection of viral mRNA from CEV was in the foreground, whereas for the cultures of KFC and ccApin cell lines the investigation of transcription of cellular mRNA for comparative typing of the newly developed ccApin cell line was the main objective. The analysis of the expression of genes coding for Cadherin 1, Cytokeratin 15 and Occludin was used as markers for epithelial cells and the gene coding for Vimentin as marker for Fibroblasts. The transcription of these genes and the determination of virus levels were performed using RT-qPCR. The analysis of the immune response by expression analysis of the Interferon a2 gene was also performed by RT-qPCR. When examining the cell lines for diagnostic suitability, the

virus content of the *CyHV-3* in the mitogen-stimulated leukocytes of latently infected carp and in tissue samples from fish acutely infected with *CyHV-3* was initially also determined with qPCR. The evaluation of cell changes in the culture was based on the examination of the development of a cytopathic effect.

It was shown that the ccAbre cell line is best suited for replication of *CyHV-3* and that the CCB cells of passage 146 had the highest viral mRNA levels of the Paramyxovirus. The ccAbre cell line showed the highest susceptibility to the Paramyxovirus, but it replicated the virus worse than the CCB-146 cell line. In addition, replication rates for *CyHV-3* and Paramyxovirus in the CCB cell line were significantly dependent on the used passage, with high replication rates in cells of passage 146 for Paramyxovirus and passage 70 and 335 for *CyHV-3*, respectively, and low replication in cells of passage 146 for *CyHV-3* and passage 335 for Paramyxovirus. None of the cell lines or primary cultures were suitable for reliably replicating the CEV in vitro. The cell typing showed that all newly developed cell lines were mixed cultures of epithelial and mesenchymal cells. During an observation over 7 days no change of the cell type was observed under infection with *CyHV-3* and the Paramyxovirus. In addition, the investigations showed that cells of CCB passage 146 did not express epithelial markers, while cells of CCB passages 70 and 335 also expressed Cadherin 1, Cytokeratin 15 and Occludin in addition to Vimentin. The primary cultures from carp gills were epithelial cell cultures.

The investigation of the immune response showed that the Paramyxovirus provoked a distinct Interferon a2 mediated immune response in all cell lines except ccAgill cells and that *CyHV-3* led to a significantly weaker Interferon response or even down-regulated the interferon response. Finally, it was found that the cell lines were not suitable for the diagnosis of *CyHV-3* from mitogen-stimulated leukocytes of latently infected fish or for the detection of *CyHV-3* from tissue samples of acutely diseased fish.

The results of this work show a clear correlation between cell type, the starting tissue from which the cell line was cultured, the passage number of the cell line used and its immune response to infection, and the suitability of the cell line for replication and re-isolation of the viruses *CyHV-3*, CEV and the Paramyxovirus.

8 Literaturverzeichnis

ADAMEK, M., F. BASKA, B. VINCZE u. D. STEINHAGEN (2018):
Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary.
Journal of fish diseases 41, 463-468

ADAMEK, M., D. HAZERLI, M. MATRAS, F. TEITGE, M. REICHERT u. D. STEINHAGEN (2017c):
Viral infections in common carp lead to a disturbance of mucin expression in mucosal tissues.
Fish & shellfish immunology 71, 353-358

ADAMEK, M., V. JUNG-SCHROERS, J. HELLMANN, F. TEITGE, S. M. BERGMANN, M. RUNGE, D. W. KLEINGELD, K. WAY, D. M. STONE u. D. STEINHAGEN (2016):
Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD).
Diseases of aquatic organisms 119, 245-251

ADAMEK, M., M. MATRAS, V. JUNG-SCHROERS, F. TEITGE, M. HELING, S. M. BERGMANN, M. REICHERT, K. WAY, D. M. STONE u. D. STEINHAGEN (2017b):
Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus.
Diseases of aquatic organisms 126, 75-81

ADAMEK, M., A. OSCHILEWSKI, P. WOHLSEIN, V. JUNG-SCHROERS, F. TEITGE, A. DAWSON, D. GELA, V. PIACKOVA, M. KOCOUR, J. ADAMEK, S. M. BERGMANN u. D. STEINHAGEN (2017a):
Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture.
Veterinary research 48, 12

ADAMEK, M., K. L. RAKUS, J. CHYB, G. BROGDEN, A. HUEBNER, I. IRNAZAROW u. D. STEINHAGEN (2012):
Interferon type I responses to virus infections in carp cells: In vitro studies on Cyprinid herpesvirus 3 and Rhabdovirus carpio infections.
Fish & shellfish immunology 33, 482-493

ADAMEK, M., D. STEINHAGEN, I. IRNAZAROW, J. HIKIMA, T. S. JUNG u. T. AOKI (2014a):
Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp.
Developmental and comparative immunology 43, 151-159

ADAMEK, M., H. SYAKURI, S. HARRIS, K. L. RAKUS, G. BROGDEN, M. MATRAS, I. IRNAZAROW u. D. STEINHAGEN (2013):
Cyprinid herpesvirus 3 infection disrupts the skin barrier of common carp (Cyprinus carpio L.).
Veterinary microbiology 162, 456-470

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 Pathology 40 (2), 53-62

AMITA, K., M. OE, H. MATOYAMA, N. YAMAGUCHI u. H. FUKUDA (2002):
A survey of Koi Herpesvirus Virus and Carp Edema Virus in colorcarp cultured in Niigata Prefecture, Japan.
Fish Pathology 37 (4), 197-198

AOKI, T., I. HIRONO, K. KUROKAWA, H. FUKUDA, R. NAHARY, A. ELDAR, A. J. DAVISON, T. B. WALTZEK, H. BERCOVIER u. R. P. HEDRICK (2007):
Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide.
Journal of virology 81, 5058-5065

BABICH, H., N. MARTIN-ALGUACIL u. E. BORENFREUND (1989):
Arsenic-selenium interactions determined with cultured fish cells.
Toxicology Letters 45, 157-164

BARANOWSKI, R. L. u. C. WESTENFELDER (1988):
Secretion of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) from fish atrial and ventricular myocytes in tissue culture Life Sciences 44, 187-191

BAUER, G. E. u. B. D. NOE (1985):
Regulation of hormone biosynthesis in cultured islet cells from Anglerfish.
In Vitro Cellular & Developmental Biology 21, 15-21

BAUMER, A., M. FABIAN, M. R. WILKENS, D. STEINHAGEN u. M. RUNGE (2013):
Epidemiology of cyprinid herpesvirus-3 infection in latently infected carp from aquaculture.
Diseases of aquatic organisms 105, 101-108

BAUR, W. H. u. J. RAPP (2003):
Gesunde Fische Praktische Anleitung zum Vorbeugen, Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten.
Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Wien, 2. Auflage, S. 75-76

BAYN, C. J. (1986):
Pronephric leucocytes of Cyprinus carpio: Isolation, separation and characterization.
Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 141-151

BERGMANN, S. u. J. KEMPTER (2011):
Detection of koi herpesvirus (KHV) after re-activation in persistently infected common carp (Cyprinus carpio L.) using non-lethal sampling methods.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 31(3), 92-100

BERGMANN, S. M., J. SADOWSKI, M. KIELPINSKI, M. BARTLOMIEJCZYK, D. FICHTNER, R. RIEBE, M. LENK u. J. KEMPTER (2010):
Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD).
Journal of fish diseases 33, 267-272

BIGARRÉ, L., M. BAUD, L. LAURANE PALLANDRE, E. MEUNIER u. E. LEGUAY (2016):
Maladie du sommeil de la Carpe : état des lieux de connaissances et situation épidémiologique en France.
Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 76, 12-13

BODY, A., F. LIEFFRIG, G. CHARLIER u. A. COLLARD (2000):
Isolation of virus-like particles from koi (Cyprinus carpio) suffering gill necrosis.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 20(2), 87-88

BOLS, N. C., V. R. DAYEH , L. E. J. LEE u. K. SCHIRMER (2005):
Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology.
Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 6, 43-84

BOLS, N. C. u. L. E. J. LEE (1991):
Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish.
Cytotechnology 6, 163-187

BOLS, N. C. u. L. E. J. LEE (1994):
Cell lines: availability, propagation and isolation
In: Analytical Techniques, Biochemistry and molecular biology of fishes
(Hochachka, P. W., T. P. Mommsen).
Elsevier, Amsterdam, Band 3 S. 145-159

BOLS, N. C., D. D. MOSSER u. G. B. STEELS (1992):
Temperature studies and recent advances with fish cells in vitro.
Camp. Biochem. Physiol. 103A, No 1, 1-14

BOUTIER, M., M. RONSMANS, P. OUYANG, G. FOURNIER, A. RESCHNER, K. RAKUS, G. S. WILKIE, F. FARNIR, C. BAYROU, F. LIEFFRIG, H. LI, D. DESMECHT, A. J. DAVISON u. A. VANDERPLASSCHEN (2015):
Rational development of an attenuated recombinant cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and in vivo bioluminescent imaging.
PLoS pathogens 11, e1004690

BRÄUER, G. (2010):
Koi-Herpesvirus-Infektion der Karpfen (KHV-I, Koi-Seuche)
In: Nutzfische und Krebse Lebensraum, Erkrankungen und Therapie
(Baur, W. H., G. Bräuer, J. Rapp).
Enke Verlag Stuttgart, 3. Auflage, S. 167-170

BRAUN-NESJE, R., K. BERTHEUSSEN, G. KAPLAN u. R. SELJELID (1981):
Salmonid macrophages: separation, in vitro culture and characterization.
Journal of fish diseases 4, 141-151

BRETZINGER, A., T. FISCHER-SCHERL, M. OUMOUNA, R. HOFFMANN u. U. TRUYEN (1999):
Mass mortalities in koi carp, Cyprinus carpio assoziated with gill and skin diesease.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19(5), 182

BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ
Fischseuchenverordnung
"Fischseuchenverordnung vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315), die zuletzt durch Artikel 7 der Verordnung vom 3. Mai 2016 (BGBl. I S. 1057) geändert worden ist".
https://www.gesetze-im-internet.de/fischseuchv_2008/ abgerufen im Dezember 2018

CARDULLO, R. A., S. AGRAWAL, C. FLORES, P. C. ZAMECNIK u. D. E. WOLF (1988):
Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8790-8794

CASPI, R. R. u. R. R. AVTALION (1984):
The mixed leukocyte reaction (MLR) in carp: Bidirectional and unidirectional MLR responses developmental and comparative immunology 8, 631-637

CHANG, J. P., D. S. MACKENZIE, D. R. GOULD u. R. E. PETER (1984):
Effects of Dopamine and Norepinephrine on in vitro spontaneous and Gonadotropin-Releasing hormone-induced Gonadotropin release by dispersed cells or fragments of the goldfish pituitary.
Life Sciences 35, 2027-2033

CHEN, S.-L., Z.-X. SHA u. H.-Q. YE (2003):
Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (Lateolabrax japonicus) embryos.
Aquaculture 218, 141-151

COSSARINI-DUNIER, M. (1987):
Effects of the pesticides atrazine and lindane and of manganese ions on cellular immunity of carp, Cyprinus carpio.
J. Fish Biol. 31, 67-73

COSTES, B., V. S. RAJ, B. MICHEL, G. FOURNIER, M. THIRION, L. GILLET, J. MAST, F. LIEFFRIG, M. BREMONT u. A. VANDERPLASSCHEN (2009):
The major portal of entry of koi herpesvirus in Cyprinus carpio is the skin.
Journal of virology 83, 2819-2830

CUCHENS, M. A. u. L. W. CLEM (1977):
Phylogeny of lymphocyte heterogeneity.
Cellular Immunology 34, 219-230

DAVIDOVICH, M., A. DISHON, M. ILOUZE u. M. KOTLER (2007):
Susceptibility of cyprinid cultured cells to cyprinid herpesvirus 3.
Archives of virology 152, 1541-1546

DAVISON, A. J. (2002):
Evolution of the Herpesviruses.
Veterinary microbiology 86, 69-88

DISHON, A., M. DAVIDOVICH, M. ILOUZE u. M. KOTLER (2007):
Persistence of cyprinid herpesvirus 3 in infected cultured carp cells.
Journal of virology 81, 4828-4836

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.
Applied and environmental microbiology 71, 7285-7291

DIXON, P. F., C. L. JOINER, K. WAY, R. A. REESE, G. JENEY u. Z. JENEY (2009):
Comparison of the resistance of selected families of common carp, Cyprinus carpio L., to koi herpesvirus: preliminary study.
Journal of fish diseases 32, 1035-1039

DONG, C., S. WENG, W. LI, X. LI, Y. YI, Q. LIANG u. J. HE (2011):
Characterization of a new cell line from caudal fin of koi, Cyprinus carpio koi, and first isolation of cyprinid herpesvirus 3 in China.
Virus research 161, 140-149

EIDE, K. E., T. MILLER-MORGAN, J. R. HEIDEL, M. L. KENT, R. J. BILDFELL, S. LAPATRA, G. WATSON u. L. JIN (2011):
Investigation of koi herpesvirus latency in koi.
Journal of virology 85, 4954-4962

EL-MATBOULI, M. u. H. SOLIMAN (2011):
Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naive common carp by cohabitation.
Research in veterinary science 90, 536-539

ELLSAESSER, C. F., J. E. BLY u. L. W. CLEM (1988):
Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The thymus of the Channel Catfish
Developmental and comparative immunology 12, 787-799

ETLINGER , H. M., H. O. HODGINS u. J. M. CHILLER (1976):
Evidence for lymphocyte heterogeneity in Rainbow Trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses The Journal of Immunology 116, 1547-1553

FABIAN, M., A. BAUMER, M. ADAMEK u. D. STEINHAGEN (2016):
Transmission of Cyprinid herpesvirus 3 by wild fish species--results from infection experiments.
Journal of fish diseases 39, 625-628

FAISAL, M. u. W. AHNE (1990):
A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp, Cyprinus carpio.
Developmental and comparative immunology 14, 255-260

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
Nationales Referenzlabor für Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV-I), OIE-Referenzlabor für Koi Herpesvirus Disease
https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-infektionsmedizin-imed/referenzlabore/oie-und-nrl-fuer-khv-infektion abgerufen Dezember 2018

FRYER, J. L. u. C. N. LANNAN (1994):
Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes.
Journal of Tissue Culture Methods 16, 87-94

GANASSIN, R. C. u. N. C. BOLS (1996):
Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells.
Fish & shellfish immunology 6, 17-34

GANASSIN, R. C., K. SCHIRMER u. N. C. BOLS (2000):
Cell and Tissue Culture
In: The Laboratory Fish (G. K. Ostrander) Academic press, London S. 631-651

GELLERSEN, B., G. F. WAGNER, D. H. COPP u. H. G. FRIESEN (1988):
Development of a primary culture system for Rainbow Trout corpuscles of Stannius and characterization of secreted Teleocalcin.
Endocrinology 123, 913-921

GHANMI, Z., M. ROUABIA, O. OTHMANE u. P. A. DESCHAUX (1988):
Effects of metal ions on cyprinid fish immune response: In Vitro effects of Zn2+ and Mn2+ on the mitogenic response of carp pronephros lymphocytes.
Ecotoxicology and Environmental Safety 17, 183-189

GILAD, O., S. YUN, K. B. ANDREE, M. A. ADKISON, 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.
Diseases of aquatic organisms 48, 101-108

GILAD, O., S. YUN, F. J. ZAGMUTT-VERGARA, C. M. LEUTENEGGER, H. BERCOVIER u. R. P. HEDRICK (2004):
Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected Cyprinus carpio koi as assessed by real-time TaqMan PCR.
Diseases of aquatic organisms 60, 179–187

GOTTWEIN, E. u. B. R. CULLEN (2008):
Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity.
Cell host & microbe 3, 375-387

GRAHAM, S. u. C. J. SECOMBES (1990):
Do fish lymphocytes secrete interferon-y?
J. Fish Biol. 36, 563-573

GRANZOW, H., D. FICHTNER, H. SCHUTZE, M. LENK, B. DRESENKAMP, H. NIEPER u. T. C. METTENLEITER (2014):
Isolation and partial characterization of a novel virus from different carp species suffering gill necrosis - ultrastructure and morphogenesis.
Journal of fish diseases 37, 559-569

GRAY, W. L., L. MULLIS, S. E. LAPATRA, J. M. J M GROFF u. A. GOODWIN (2002):
Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish.
Journal of fish diseases 25, 171–178

HAENEN, O., K. WAY, R. PALEY, L. BIGARRÉ, B. GORGOGLIONE u. T. WAL (2016a):
Novel viral infections threatening Cyprinid fish.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 36(1) 11-23

HAENEN, O., K. WAY, N. VENDRAMIN, D. STONE, M. REICHERT, M. MATRAS, C. AXÉN, S. BERGMANN, L. BIGARRÉ, L. LOUBOUTIN, M. ADAMEK, V. JUNG-SCHROERS, T. VESELÝ, B. GORGOGLIONE, O. SCHACHNER, M. EL MATBOULI, V. PIAČKOVÁ, V. PANZARIN, A. TOFFAN, M. ABBADI, V. JENCIC, S. S. MIKKELSEN u. N. J. OLESEN (2016b):
Carp Edema Virus in Europe current status.
In: NRL Fish Diseases Annual Meeting CPH 31
May-1 June 2016, Wageningen,

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. Ass. Fish Pathol. 24(6), 293-307

HALLER, S. L., C. PENG, G. MCFADDEN u. S. ROTHENBURG (2014):
Poxviruses and the evolution of host range and virulence.
Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 21, 15-40

HARTE, M. T., I. R. HAGA, G. MALONEY, P. GRAY, P. C. READING, N. W. BARTLETT, G. L. SMITH, A. BOWIE u. L. A. J. O'NEILL (2003):
The Poxvirus protein A52R targets Toll-like Receptor signaling complexes to suppress host defense.
The Journal of Experimental Medicine 197, 343-351

HEDRICK, R. P., D. B. ANTONIO u. R. J. MUNN (1997):
Poxvirus like agent associated with epizootic mortality in Juvenile Koi.
Fish Health Section, Newsletter 25,

HEDRICK, R. P., O. GILAD, S. YUN u. J. V. SPANGENBERG (2000):
A Herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp.
Journal of Aquatic Animal Health 12, 44–57

HEDRICK, R. P., O. GILAD, S. C. YUN, T. S. MCDOWELL, 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. Agen. Supplement 2, 1-7

HESAMI, S., P. VIADANNA, N. STECKLER, S. SPEARS, P. THOMPSON, K. KELLEY, R. YANONG, R. FRANCIS-FLOYD, J. SHELLEY, J. GROFF, A. GOODWIN, O. HAENEN u. T. WALTZEK (2015):
Carp Edema Virus Disease (CEVD) / Koi Sleepy Disease (KSD).
FA189, one of a series of the School of Forest Resources and Conservation Program in Fisheries and Aquatic Sciences, UF/IFAS Extension

HIGHTOWER, L. E. u. J. L. RENFRO (1988):
Recent applications of fish cell culture to biomedical research.
The Journal of Experimental Zoology 248, 290-302

HU, X., Y. GE, C. LI, Z. JIA, M. SHANG, S. WANG u. L. SHI (2018):
Developments in common carp culture and selective breeding of new varieties
In: Aquaculture in China Success Stories and modern Trends (Jian-Fang Gui, Qisheng Tang, Zhongjie Li, Jiashou Liu, Sena S. De Silva)
S. 136.
Wiley, Blackwell, Oxford, UK

HUGHES, P., D. MARSHALL, Y. REID, H. PARKES u. C. GELBER (2007):
The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?
BioTechniques 43, 575, 577-578, 581-572 passim

HUISING, M. O., J. R. METZ, C. VAN SCHOOTEN, A.J. TAVERNE-THIELE, T. HERMSEN, B. M. L. VERBURG-VAN KEMENADE, G. FLIK (2004)
Structural characterisation of a cyprinid (Cyprinus carpio L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response
Journal of Molecular Endocrinology 32, 627-648

IMAJOH, M., H. FUJIOKA, K. FURUSAWA, K. TAMURA, K. YAMASAKI, S. KURIHARA, J. YAMANE, K. KAWAI u. S. OSHIMA (2015):
Establishment of a new cell line susceptible to Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) and possible latency of CyHV-3 by temperature shift in the cells.
Journal of fish diseases 38, 507-514

ITO, T., M. SANO, J. KURITA, K. YUASA u. T. IIDA (2007):
Carp larvae are not susceptible to Koi Herpesvirus.
Fish Pathology 42 (2), 107–109

JESERICH, G. u. T. RAUEN (1990):
Cell cultures enriched in Oligodendrocytes from the central nervous system of Trout in terms of phenotypic expression exhibit parallels with cultured Rat Schwann Cells.
Glia 3, 65-74

JUNG-SCHROERS, V., M. ADAMEK, F. TEITGE, J. HELLMANN, S. M. BERGMANN, H. SCHUTZE, D. W. KLEINGELD, K. WAY, D. STONE, M. RUNGE, B. KELLER, S. HESAMI, T. WALTZEK u. D. STEINHAGEN (2015):
Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany.
BMC veterinary research 11, 114

KAATTARI, S. L., M. J. IRWIN, M. A. YUI, R. A. TRIPP u. J. S. PARKINS (1986):
Primary in vitro stimulation of antibody production by Rainbow Trout lymphocytes.
Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 29-38

KASAI, H., Y. MUTO u. M. YOSHIMIZU (2005):
Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against Koi Herpesvirus(KHV).
Fish Pathology 40 (3), 137-138

KILENG, O., M. I. BRUNDTLAND u. B. ROBERTSEN (2007):
Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon.
Fish & shellfish immunology 23, 378-389

KIM, S. W., J. W. JUN, S. S. GIRI, C. CHI, S. YUN, H. J. KIM, S. G. KIM, J. W. KANG u. S. C. PARK (2017):
First report of carp oedema virus infection of koi (Cyprinus carpio haematopterus) in the Republic of Korea.
Transboundary and emerging diseases 65, 315-320

KOUMANS, J. T. M., H. A. AKSTER, G. J. DULOS u. J. W. M. OSSE (1990):
Myosatellite cells of Cyprinus carpio (Teleostei) in vitro: isolation, recognition and differentiation.
Cell Tissue Res 261, 173-181

KROVACEK, K., A. FARIS u. I. MANSSON (1987):
Cytotoxic and skin permeability factors produced by Vibrio anguillcirum.
Aquaculture 67, 87-91

KU, C. C. u. S. N. CHEN (1992):
Charakterization of three cell lines derived from color carp Cyprinus carpio.
J. Tiss. Cult, Meth. 14, 63-72

LAKRA, W. S., T. R. SWAMINATHAN u. K. P. JOY (2011):
Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review.
Fish physiology and biochemistry 37, 1-20

LAKRA, W. S., T. R. SWAMINATHAN, G. RATHORE, M. GOSWAMI, K. YADAV u. S. KAPOOR (2010):
Development and characterization of three new diploid cell lines from Labeo rohita (Ham.).
Biotechnology progress 26, 1008-1013

LANNAN, C. N., J. R. WINTON u. J. L. FRYER (1984):
Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from Salmonids
In Vitro 20, 671-676

LEWISCH, E., B. GORGOGLIONE, K. WAY u. M. EL-MATBOULI (2015):
Carp edema virus/Koi sleepy disease: an emerging disease in Central-East Europe.
Transboundary and emerging diseases 62, 6-12

LI, Y., X. L. XU, D. ZHAO, L. N. PAN, C. W. HUANG, L. J. GUO, Q. LU u. J. WANG (2015):
TLR3 ligand Poly IC Attenuates Reactive Astrogliosis and Improves Recovery of Rats after Focal Cerebral Ischemia.
CNS neuroscience & therapeutics 21, 905-913

LIN, S. L., Y. H. CHENG, C. M. WEN u. S. N. CHEN (2013):
Characterization of a novel cell line from the caudal fin of koi carp Cyprinus carpio.
Journal of fish biology 82, 1888-1903

LU, Y., C. N. LANNAN, J. S. ROHOVEC u. J. L. FRYER (1990):
Fish cell lines: Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp Ctenopharyngodon idella In Vitro Cell. Dev. Biol. 26, 275-279

MASADA, M., J. MATSUMOTO u. M. AKINO (1990):
Biosynthetic pathways of pteridines and their association with phenotypic expression in vitro in normal and neoplastic pigment cells from goldfish.
Pigment Cell Research 3, 61-70

MATRAS, M., E. BORZYM, D. STONE, K. WAY, M. STACHNIK, J. MAJ-PALUCH, M. PALUSINSKA u. M. REICHERT (2017):
Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp Cyprinus carpio (L.).
Journal of fish diseases 40, 319-325

MATSUMOTO, J., T. ISHIKAWA, P. MASAHLTO u. S. TAKAYAMA (1980):
Permanent cell lines from erythrophoromas in goldfish (Carassius auratus) Journal of the National Cancer Institute 64, 879-890

MCFADDEN, G. (2005):
Poxvirus tropism.
Nature reviews. Microbiology 3, 201-213

MCKEE, C. u. G. R. CHAUDHRY (2017):
Advances and challenges in stem cell culture.
Colloids and surfaces. B, Biointerfaces 159, 62-77

MEYER, K. (2007)
Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirusinfektionen durch symptomlose Carrierfische.
Hannover, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Doktorarbeit.
https://elib.tiho-hannover.de/servlets/solr/find?condQuery=kirsten+meyer+2007
abgerufen: Januar 2019

MICHEL, B., G. FOURNIER, F. LIEFFRIG, B. COSTES u. A. VANDERPLASSCHEN (2010):
Cyprinid herpesvirus 3.
Emerging infectious diseases 16, 1835-1843

MIEST, J. J., M. ADAMEK, N. PIONNIER, S. HARRIS, M. MATRAS, K. L. RAKUS, I. IRNAZAROW, D. STEINHAGEN u. D. HOOLE (2015):
Differential effects of alloherpesvirus CyHV-3 and rhabdovirus SVCV on apoptosis in fish cells.
Veterinary microbiology 176, 19-31

MINAMOTO, T., M. N. HONJO, H. YAMANAKA, K. UCHII u. Z. KAWABATA (2012):
Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan.
Research in veterinary science 93, 508-514

MINAMOTO, T., H. KONG, H. YAMANAKA, X. PU, X. YANG, J. XIE, Z. KAWABATA, Y. DONG, T. TAKAHARA, D. WU u. M. N. HONJO (2014):
Monitoring fish pathogenic viruses in natural lakes in Yunnan, China.
Limnology 16, 69-77

MISRA, S., M. ZAFARULLAH, J. PRICE-HAUGHEY u. L. GEDAMU (1989):
Analysis of stress-induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock.
Biochimica et Biophysica Acta 1007, 325-333

MIWA, S., I. KIRYU, K. YUASA, T. ITO u. T. KANEKO (2015):
Pathogenesis of acute and chronic diseases caused by cyprinid herpesvirus-3.
Journal of fish diseases 38, 695-712

MIYAZAKI, T., T. ISSHIKI u. H. KATSUYUKI (2005):
Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi Cyprinus carpio koi in Japan.
Diseases of aquatic organisms 65, 197-207

MIYAZAKI, T., Y. KUZUYA, S. YASUMOTO, M. YASUDA u. T. KOBAYASHI (2008):
Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV)-infected carp Cyprinus carpio, and the morphology and morphogenesis of KHV.
Diseases of aquatic organisms 80, 1-11

MOSER, J. M., J. W. UPTON, K. S. GRAY u. S. H. SPECK (2005):
Ex vivo stimulation of B cells latently infected with gammaherpesvirus 68 triggers reactivation from latency.
Journal of virology 79, 5227-5231

MOSS, B. (2006):
Poxvirus entry and membrane fusion.
Virology 344, 48-54

MOSSMAN, K. L. u. A. A. ASHKAR (2005):
Herpesviruses and the innate immune response.
Viral Immunology 18, 267-281

MÜLHARDT, C. (2002):
Molekularbiologie/ Genomics.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin 3. Auflage S. 71-103

NAITO, N. u. H. ISHIKAWA (1980):
Reconstruction of the gill from single-cell suspensions of the eel, Anguilla japonica.
American Physiological Society 165-170

NARDY, E. u. S. BERGMANN (2016):
Alles nur geträumt? Erste Fälle der Schlafkrankheit der Karpfen in Baden-Württemberg.
Informationsschrift der Fischereiforschungsstelle, des Fischgesundheitsdienstes und der Fischereibehörden des Landes Baden-Württemberg mit Beiträgen von Gastautoren 2, 20-23

NEGENBORN, J., M. C. VAN DER MAREL, M. GANTER u. D. STEINHAGEN (2015):
Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) disturbs osmotic balance in carp (Cyprinus carpio L.)--A potential cause of mortality.
Veterinary microbiology 177, 280-288

NEUKIRCH, M., K. BÖTTCHER u. S. BUNNAJIRAKUL (1999):
Isolation of a virus from koi with altered gills.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19(5) 221-224

NEUKIRCH, M. u. U. KUNZ (2001):
Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi (Cyprinus carpio) suffering gill necrosis and mortality.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 21(4),

NICHOLSON, B. L., D. J. DANNER u. J.-L. WU (1987):
Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia.
In vitro Cellular & Developmental Biology 23, 199-204

NOGA, E. J. (2010):
Fish Disease Diagnosis and Treatment.
Wiley-Blackwell Ames, Iowa, USA 2. Auflage S. 91-96

NOTOMI, T., H. OKAYAMA, H. MASUBUCHI, T. YONEKAWA, K. WATANABE, N. AMINO u. T. HASE (2000):
Loop-mediated isothermal amplification of DNA.
Nucleic Acids Research 28 (12),

NOVAKOV, N., M. ĆIRKOVIĆ, D. LJUBOJEVIĆ, M. PELIĆ, B. KARTALOVIĆ, D. LUPULOVIĆ u. V. RADOSAVLJEVIĆ (2016):
Carp Edema Virus Disease (CEVD) – New viral disease in carp aquaculture.
In: Second International Symposium of Veterinary Medicine – ISVM2016 Proceedings June 22–24, 2016., Hotel Metropol – Belgrade,

ONO, S., A. NAGAI u. N. SUGAI (1986):
A histopathological study on juvenile colorcarp, Cyprinus carpio showing edema.
Fish Pathology 21 (3), 167-175

OSTRANDER, G. K. u. E. H. HOLMES (1991):
Characterization of a CMPNEUAC: Lactosylceramide alpha2 3Sialyltransferase from Rainbow Trout Hepatoma (RTH-149) cells.
Comp. Biochem. Physiol. 98 87-95

OYAMATSU, T., N. HATA, K. YAMADA, T. SANO u. H. FUKUDA (1997):
An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema.
Fish Pathology 32(2), 81-88

PARAMESWARAN, V., R. SHUKLA, R. BHONDE u. A. S. HAMEED (2007):
Development of a pluripotent ES-like cell line from Asian sea bass (Lates calcarifer)--an oviparous stem cell line mimicking viviparous ES cells.
Marine biotechnology 9, 766-775

PAULSON, E. J., J. D. FINGEROTH, J. L. YATES u. S. H. SPECK (2002):
Methylation of the EBV Genome and establishment of restricted latency in low-passage EBV-Infected 293 epithelial cells.
Virology 299, 109–121

PERELBERG, A., M. ILOUZE, M. KOTLER u. M. STEINITZ (2008):
Antibody response and resistance of Cyprinus carpio immunized with cyprinid herpes virus 3 (CyHV-3).
Vaccine 26, 3750-3756

PERELBERG, A., A. RONEN, M. HUTORAN, Y. SMITH u. M. KOTLER (2005):
Protection of cultured Cyprinus carpio against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine.
Vaccine 23, 3396-3403

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.
The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh 55(1), 5-12.

PIACKOVA, V., M. FLAJSHANS, D. POKOROVA, S. RESCHOVA, D. GELA, A. CIZEK u. T. VESELY (2013):
Sensitivity of common carp, Cyprinus carpio L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV).
Journal of fish diseases 36, 75-80

PIKARSKY, E., A. RONEN, J. ABRAMOWITZ, B. LEVAVI-SIVAN, M. HUTORAN, Y. SHAPIRA, M. STEINITZ, A. PERELBERG, D. SOFFER u. M. KOTLER (2004):
Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus.
Journal of virology 78, 9544-9551

POIESZ, B. J., F. W. RUSCETTI, A. F. GAZDAR, P. A. BUNN, J. D. MINNA u. R. C. GALLO (1980):
Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7415-7419

POKOROVA, D., T. VESELY, V. PIACKOVA, S. RESCHOVA u. J. HULOVA (2005):
Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review.
Vet. Med. – Czech 50, 139-147

POWELL, R. L., M. V. DODSON u. J. G. CLOUD (1989):
Cultivation and differentiation of satellite cells from skeletal muscle of the Rainbow Trout Salmo gairdneri.
The Journal of Experimental Zoology 250, 333-338

RAKERS, S., A. K. ONDRUSCH, M. GRUENING, M. ADAMEK, B. MOECKEL u. M. GEBERT (2018):
Monitoring changing cellular characteristics during the development of a fin cell line from Cyprinus carpio.
Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology 225, 1-12

REED, L. J., H. MUENCH (1938)
A simple method of estimating fifty per cent endpoints
The American Journal of Hygiene 27, 493-497

REGAN, J. D. u. J. S. COOK (1967):
Photoreaktion in an established vertebrate cell line.
Microbiology 58, 2274-2279

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

RONSMANS, M., M. BOUTIER, K. RAKUS, F. FARNIR, D. DESMECHT, F. ECTORS, M. VANDECAN, F. LIEFFRIG, C. MÉLARD u. A. VANDERPLASSCHEN (2014):
Sensitivity and permissivity of Cyprinus carpio to cyprinid herpesvirus 3 during the early stages of its development: importance of the epidermal mucus as an innate immune barrier.
Veterinary research 45, 1-12

ROUGEE, L., G. K. OSTRANDER, R. H. RICHMOND u. Y. LU (2007):
Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish Carassius auratus muscle and swim bladder.
Diseases of aquatic organisms 77, 127-135

SADLER, J., E. MARECAUX u. A. E. GOODWIN (2008):
Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, Carassius auratus (L.), exposed to infected koi.
Journal of fish diseases 31, 71-72

SANO, M., T. ITO, S. MIWA, J. KURITA, K. YUASA u. T. IIDA (2004):
Experience on Common Carp Mass Mortality in Japan.
Proceedings of the Meeting on Current Status of Transboundary Fish Diseases in Southeast Asia: Occurence, Surveillance, Research and Training, Manila, Philippines, 23-24 June 2004 (pp. 13-19). Tigbauan, Iloilo, Philippines: SEAFDEC Aquaculture Department. 13-19

SANO, M., T. NAKAI u. N. FIJAN (2011):
Koi Herpesvirus Disease
In: Fish Diseases and Disorders Band 3 (Woo, Patrick T. K., David W. Bruno) CABI Wallingford, Cambridge USA 2. Auflage S. 189-198

SCHMITTGEN, T. D. u. K. J. LIVAK (2008):
Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.
Nature Protocols 3, 1101-1108

SENO, R., N. HATA, T. OYAMATSU u. H. FUKUDA (2003):
Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, Cyprinus carpio, infected with Carp Edema Virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host.
Suisanzoshoku 51(1), 123-124

SHAPIRA, Y., Y. MAGEN, T. ZAK, M. KOTLER, G. HULATA u. B. LEVAVI-SIVAN (2005):
Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (Cyprinus carpio L.) strains and crossbreds.
Aquaculture 245, 1-11

SHIMA, A., O. NIKAIDO, S. SHINOHARA u. N. EGAMI (1980):
Continued in vitro growth of fibroblast-like cells (RBCF-1) derived from the caudal fin of the fish, Carassius auratus Experimental Gerontology 15, 305-314

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.
Diseases of aquatic organisms 67, 15-23

STERNIŠA, M., J. MRAZ u. S. S. MOŽINA (2017):
Common carp - still unused potential.
Meso XIX 434-439

SWAMINATHAN, T. R., R. KUMAR, A. DHARMARATNAM, V. S. BASHEER, N. SOOD, P. K. PRADHAN, N. K. SANIL, P. VIJAYAGOPAL u. J. K. JENA (2016):
Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, Cyprinus carpio koi, in India.
The Journal of general virology 97, 3392-3399

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS Cellosaurus - a knowledge resource on cell lines
Stand: November 2018.
https://web.expasy.org/cellosaurus/ abgerufen im Dezember 2018

TAKASHIMA, Y., N. WATANABE, T. YANAI u. T. NAKAMURA (2005):
The status of Koi Herpesvirus Disease outbreaks in lake Kasumigaura and Kitaura.
Bull. Fish. Res. Agen. 2, 65-71

TIZARD, I. (2018):
Veterinary Immunology 10. Auflage.
Elsevier, St. Louis, Missouri S. 130

TOCHER, D. R. u. R. WILSON (1990):
Primary culture of astrocytic glial cells from Rainbow Trout, Salmo gairdneri L., brain.
Journal of Neuroscience Methods 33, 93-100

TRUYEN, U., M. BEER u. K. OSTERRIEDER (2015):
DNA-Viren
In: Tiermedizinische Mikrobiologie Infektions- und Seuchenlehre (Selbitz, H., U. Truyen, P. Valentin-Weigand) Enke Verlag 10. Auflage, Stuttgart S. 405-446

VAUTHEROT, J. F., C. JEAN, L. FRAGNET-TRAPP, S. REMY, D. CHABANNE-VAUTHEROT, G. MONTILLET, A. FUET, C. DENESVRE u. B. PAIN (2017):
ESCDL-1, a new cell line derived from chicken embryonic stem cells, supports efficient replication of Mardiviruses.
PloS one 12, e0175259

WALSTER, C. I. (1999):
Clinical observations of severe mortalities in koi carp, Cyprinus carpio, with gill disease.
Fish Veterinary Journal 3, 54-58

WALTZEK, T. B., G. O. KELLEY, M. E. ALFARO, T. KUROBE, A. J. DAVISON u. R. P. HEDRICK (2009):
Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae.
Diseases of aquatic organisms 84, 179-194

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.
The Journal of general virology 86, 1659-1667

WAY, K. u. P. F. DIXON (2017b):
Koi Herpesvirus Disease
In: Fish Viruses and Bacteria Pathobiology and Protection (Woo, P. T. K., Rocco C. Cipriano).
CABI, Wallingford, Oxfordshire S. 115-127

WAY, K., O. HAENEN, D. STONE, M. ADAMEK, S. M. BERGMANN, L. BIGARRE, N. DISERENS, M. EL-MATBOULI, M. C. GJESSING, V. JUNG-SCHROERS, E. LEGUAY, M. MATRAS, N. J. OLESEN, V. PANZARIN, V. PIACKOVA, A. TOFFAN, N. VENDRAMIN, T. VESEL u. T. WALTZEK (2017a):
Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi Cyprinus carpio.
Diseases of aquatic organisms 126, 155-166

WAY, K. u. D. STONE (2013):
Emergence of Carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK.
Finfish News 15, 32-34

WECK, K. E., S. S. KIM, H. W. VIRGIN u. S. H. SPECK (1999):
Macrophages are the major reservoir of latent murine Gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells.
Journal of virology 73, 3273–3283

WHARTON, J. H., R. D. ELLENDER, B. L. MIDDLEBROOKS u. P. K. STOCKS (1977):
Fish cell culture: Characteristics of a cell line from the Silver Perch, Bairdiella chrysura In Vitro 13, 389-397

WOLF, K. u. J. A. MANN (1980):
Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fish.
In Vitro 16(2), 168-179

YASUMOTO, S., Y. KUZUYA, M. YASUDA, T. YOSHIMURA u. T. MIYAZAKI (2006):
Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing Koi Herpesvirus antigen.
Fish Pathology 41 (4), 141-145

YEO, N. K. u. Y. J. JANG (2010):
Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells.
The Laryngoscope 120, 346-352

YU, H., T. J. COOK u. P. J. SINKO (1997):
Evidence for diminished functional of intestinal transporters in Caco-2 monolayers at high passages.
Pharmaceutical Research 14(6), 757-762

YUASA, K., T. ITO u. M. SANO (2008):
Effect of Water Temperature on Mortality and Virus Shedding in Carp Experimentally Infected with Koi Herpesvirus.
Fish Pathology 43 (2), 83–85

YUASA, K., J. KURITA, M. KAWANA, I. KIRYU, N. OSEKO u. M. SANO (2012):
Development of mRNA-specific RT-PCR for the detection of koi herpesvirus (KHV) replication stage.
Diseases of aquatic organisms 100, 11-18

YUASA, K. u. M. SANO (2009):
Koi Herpesvirus: Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research.
Israeli Journal of Aquaculture - BAMIGDEH
SEAFDEC International Workshop on Emerging Fish Diseases in Asia 169-179

YUI, M. A. u. S. L. KAATTARI (1987):
Vibrio anguillarum antigen stimulates mitogenesis and polyclonal activation of salmonid lymphocytes.
Developmental and comparative immunology 11, 539-549

ZHANG, X., Y. NI, J. YE, H. XU, Y. HOU, W. LUO u. W. SHEN (2017):
Carp edema virus, an emerging threat to the carp (Cyprinus carpio) industry in China.
Aquaculture 474, 34-39

ZHOU, J., J. XUE, Q. WANG, X. ZHU, X. LI, W. LV u. D. ZHANG (2014):
Vaccination of plasmid DNA encoding ORF81 gene of CJ strains of KHV provides protection to immunized carp.
In vitro cellular & developmental biology. Animal 50, 489-495

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhagen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die außerordentlich kompetente und zuverlässige Betreuung bedanken. Vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Dr. Mikolaj Adamek für die stets hervorragende Betreuung und die sehr kompetente, geduldige und hilfsbereite Unterstützung, sowohl bei der Durchführung der Versuche als auch beim Verfassen der Arbeit.

Bei Birgit Luckhard bedanke ich mich herzlich für die zuverlässige Betreuung der Zelllinien und die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken.

Auch möchte ich mich bei Anne-Carina Miebach für die Hilfe im Labor, die Korrekturen und die vielen aufmunternden Worte bedanken.

Julia Bauer, Felix Teitge, Franziska Hack und Dr. Verena Jung-Schroers danke ich für die netten Gespräche in der Mittagspause und das einzigartige Arbeitsklima, dass mir die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert hat und mir die Zeit in der Abteilung Fischkrankheiten unvergesslich macht.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner lieben Caro für die bedingungslose Unterstützung, den Rückhalt und die Geduld in dieser Zeit bedanken. Das war mir eine große Hilfe. Vielen Dank!