

Aus der Klinik für Fische und Reptilien
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Kommissarische Leitung: Prof. Dr. R. Korbel)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. R. W. Hoffmann

**Untersuchung der Empfänglichkeit
von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Koi-Karpfen (*Cyprinus carpio koi*),
Zebraärblingen (*Danio rerio*), Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)
gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
M'hamed Oumouna
aus Cherchell / Algerien

München 2008

Arbeit angefertigt mit der Unterstützung des DAAD (Deutscher Akademischer
Austauschdienst)

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-86853-076-6

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hoffmann
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

© Verlag Dr. Hut, München 2009
Sternstr. 18, 80538 München
Tel.: 089/66060798

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler, z.B. bei der Beschreibung des Gefahrenpotentials von Versuchen, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Autor vor.

1. Auflage 2009

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Allgemeines zum Stamm der Myxozoa	2
2.1.1. Myxosporea	3
2.1.2. Actinosporea	6
2.1.3. Entwicklungszyklus der Myxozoa	7
2.1.4. Myxosporea bei Karpfen	9
2.1.5. Entwicklungszyklus	10
2.1.5.1. Entwicklung im Oligochaeten	10
2.1.5.2. Entwicklung im Fisch	12
2.2. Die Drehkrankheit der Salmoniden	15
2.2.1. Ursprung und Ausbreitung der Drehkrankheit	15
2.2.2. Wirtsspektrum	16
2.3. Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit	18
2.3.1. Fischarten	18
2.3.2. Fischalter	22
2.3.3. Infektionsdosis	22
2.3.4. Stressoren	23
2.4. Klinische Symptomatik	24
2.5. Diagnostik	26
2.6. Differentialdiagnosen	28
2.7. Prophylaxe	29
2.8. Bekämpfung	30
2.9. Therapie	31
2.10. Verbreitung der Drehkrankheit in den USA	33
3. Material und Methoden	35
3.1. Material	35
3.1.1. Regenbogenforellen zur Gewinnung von <i>Myxobolus cerebralis</i>	35
3.1.2. Fischmaterial zur Gewinnung der <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen	35
3.1.3. Haltung der parasitenfreien Tubificiden (<i>Tubifex tubifex</i>)	35
3.1.4. Spezifische pathogenfreie SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraabräbler und	

Inhaltsverzeichnis

SPF-Regenbogenforellen-Brut für die Infektionsversuche mit Triactinomyxon-Sporen	36
3.2. Untersuchungsmethoden	36
3.2.1. Gewinnung von <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen	36
3.2.2. Infektion der Oligochaeten und Gewinnung der Triactinomyxon Sporen	37
3.2.3. Infektionsversuche mit den SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und der SPF-Regenbogenforellen-Brut mit Triactinomyxon-Sporen	37
3.2.4. Infektionsschema der Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und Regenbogenforellen mit Triactinomyxon-Sporen	38
3.2.5. Beobachtung der klinischen Symptome	39
3.2.6. Post-mortem-Untersuchungen	39
3.2.6.1. Histologie des Kopfknorpels	39
3.2.6.2. Histologische Untersuchung	41
3.2.6.3. Entwässerung der Gewebeproben	41
3.2.6.4. Herstellung der Paraffinschnitte	42
3.2.6.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung – Prinzip	42
3.2.6.6. Molekularbiologische Untersuchungen	43
3.2.6.6.1. DNA-Extraktion	43
3.2.6.6.2. Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel	43
3.2.6.6.3. Nachweis von <i>M. cerebralis</i> mittels Nested-PCR	44
3.2.6.6.4. Primer und amplifiziertes Fragment für First-Round	45
4. Ergebnisse	48
4.1. Postexpositionelle Überprüfung des Infektionserfolges	48
4.2. Histologische Untersuchung der Fischepidermis	50
4.3. Histologische Untersuchung der Schädelknorpel	65
4.3.1. Tag 50 post expositionem	65
4.3.2. Tag 150 post expositionem	67
4.4. Klinische Symptome bei den infizierten Fischen	68
4.4.1. Tag 50 post expositionem	69
4.4.2. Tag 100 post expositionem	70
4.4.3. Tag 150 post expositionem	71
4.5. Molekularbiologischer Nachweis von <i>M. cerebralis</i> mittels Nested-PCR	72
4.5.1. Nested-PCR Regenbogenforelle	73

Inhaltsverzeichnis

4.5.2. Nested-PCR Karpfen	76
4.5.3. Nested-PCR Koi-Karpfen	79
4.5.4. Nested-PCR Zebrabärblinge	82
4.6. Überprüfung des Infektionserfolges der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und Regenbogenforellen mit Triactinomyxon-Sporen mittels Nested-PCR und histologischer Untersuchung	85
4.7. Korrelation zwischen Nested-PCR, histologischer Untersuchung und dem Auftreten von Drehkrankheit-Symptomen bei Regenbogenforellen	88
4.7.1. 50 Tage post expositionem	88
4.7.2. 150 Tage post expositionem	90
5. Diskussion	92
5.1. Histologische Untersuchung	92
5.2. Klinische Symptomatik	95
5.3. Molekularbiologische Untersuchung (Nested-PCR)	98
5.4. Überprüfung des Infektionserfolges der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und Regenbogenforellen mit Triactinomyxon-Sporen mittels Nested-PCR und histologischer Untersuchung	103
6. Zusammenfassung	104
7. Summary	106
8. Abkürzungen	107
9. Literaturverzeichnis	108
10. Danksagung	141
11. Lebenslauf	143

1. Einleitung

Der Erreger der Drehkrankheit ist *Myxobolus cerebralis* (HOFER 1903). Diese Erkrankung trat ursprünglich in Europa bei Forellen auf und wurde wahrscheinlich durch den verstärkten internationalen Handel in den 50er Jahren in vielen Ländern rund um den Globus eingeschleppt. In den USA wurde die Krankheit erstmals im US-Staat Pennsylvania entdeckt, heute sind über 23 Staaten betroffen. Der Parasit führt aufgrund einer hohen Mortalität zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in Forellenzuchten. Aufgrund der Schäden in den Fischzuchten und der Dezimierung der heimischen Regenbogenforellenpopulation wurde von einer Bevölkerungsinitiative in den Vereinigten Staaten im Jahre 1994 die „Whirling Disease Foundation“ gegründet.

Die Kardinalsymptome der Drehkrankheit bei Salmoniden sind Gleichgewichtsstörungen mit typischen Drehbewegungen, Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie und Deformationen an Kopf und Wirbelsäule (SCHÄPERCLAUS 1990; ROSE et al. 2000).

Die kranken Fische, welche die akute Phase überstanden haben, beherbergen den Parasiten vermutlich lebenslang und sind als infektiös zu betrachten (latente Infektion). Nach dem Tod der Fische erfolgt dann die Freisetzung der Sporen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die mögliche Empfänglichkeit von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Koi-Karpfen (*Cyprinus carpio koi*) und Zebraäbblingen (*Danio rerio*) gegenüber der Drehkrankheit zu untersuchen. Zum Vergleich wurde ein für die Drehkrankheit empfänglicher amerikanischer Regenbogenforellenstamm (*Onchorhynchus mykiss*) mit untersucht.

Dazu sollten verschiedene Gewebe (Epidermis, Muskulatur, Kopfknochen, Flossen) von experimentell infizierten Fischen entnommen und histologisch sowie molekularbiologisch (Nested-PCR) untersucht werden.

2. Literatur

2.1. Allgemeines zum Stamm der Myxozoa

Die Vertreter dieses Stammes kommen sowohl bei Invertebraten und poikilothermen Vertebraten (Fischen, Amphibien und Reptilien) als auch bei Säugetieren vor (CANNING und OKAMURA 2004; PRUNESCU et al. 2007; DYKOVA et al. 2007).

Es handelt sich dabei um etwa 1350 Arten, die ungefähr 52 Gattungen zugeordnet werden (KENT et al., 2001). Der Stamm Myxozoa wurde zunächst durch die International Commission on Protozoan Nomenclature in die zwei Klassen Myxosporea, BÜTSCHLI (1881) und Actinosporea, NOBLE (1980) aufgeteilt, deren jeweilige Ordnungen und Familien (LEVINE et al. 1980) in Tabelle 1 dargestellt sind.

In der Vergangenheit wurden die Myxozoa den Protozoa zugeordnet. Da sie aber mehrere, sowohl morphologisch als auch funktionell unterschiedliche vegetative (somatische) und generativen Zellen besitzen, vertritt man heute die Ansicht, dass die Myxozoa den Metazoa zugeordnet werden sollten (SMOTHERS et al. 1994). Der Stamm Myxozoa enthält die beiden Klassen Myxosporea und Malacosporea (CANNING und OKAMURA 2000). Die Myxozoa kommen sowohl im Meer als auch im Süßwasser vor und können bei ihren Wirten in allen Organen und Geweben auftreten. Eine Myxozoa-Spore besteht aus einer jeweils speziesabhängig unterschiedlichen Anzahl von Schalenzellen, Polkapselzellen und infektiösen Amöboidkeimen bzw. Sporoplasmen.

Die Myxozoa besitzen Polkapselzellen mit einem ausschleuderbaren Polfilament, das als Verankerung am Wirt dient. Die infektiösen Amöboidkeime und Polkapselzellen werden von den Schalenzellen umgeben. Die Schalenzellen bilden die Sporenhülle (LOM und NOBLE 1984).

Die wichtigsten und meist beschriebenen Fischkrankheiten, die durch Myxosporea hervorgerufen werden, sind die Drehkrankheit der Salmoniden (*Myxobolus cerebralis*), die Schwimmblasenentzündung der Karpfenbrut (*Sphaerospora renicola*), die Beulenkrankheit der Barben (*Myxobolus Pfeifferi*) und die infektiöse Nierenvergrößerung (Kidney Enlargement Disease) durch *Hofferellus carasaii* beim Goldfisch. In der intensiven Fischzucht führen die Myxosporea zu hohen Schäden besonders durch Pseudozysten (*Myxobolus, Henneguya*) z.B. mechanische Schäden von Salmoniden (Verkrümmungen der Wirbelsäule) durch

Literatur

Myxobolus cerebralis oder Entzündungsreaktionen in den Nieren, Leber oder anderen Organen (*Sphaerospora*, *Myxosoma*, *Tetracapsuloides*).

2.1.1. Myxosporea

LOM und DYKOVÁ (2006) berichteten über etwa 2180 Arten, die in 62 Gattungen unterteilt werden. Die meisten Vertreter von *Myxosporea* parasitieren in Fischen (LOM 1987), aber auch Wirbellose und zahlreiche höhere Wirbeltiere wurden als Wirte beschrieben. So sind auch Berichte über *Myxosporea* bei Amphibien und Reptilien zu finden (LOM und NOBLE 1984). Die meisten Spezies dürften als wenig pathogen für ihre Wirte angesehen werden. Die Pathogenität der Myxosporidien für Fische ist sehr unterschiedlich. Die wohl größere Anzahl der Arten hat auf die Fische keinen oder geringeren Einfluss. Obwohl man gelegentlich bei den Fischen große Mengen von Plasmodien (z.B. *Myxobolus cyprini* in der Muskulatur) nachweisen konnte, sind allerdings für die betroffenen Karpfen harmlos zu sein; es handelt sich um ein gut adaptiertes Wirt-Parasit-System (MOLNÁR und KOVÁCS-GAYER 1985). Einige Arten jedoch sind für unsere Süßwassernutzfische hoch pathogen. Sie können, besonders in der intensiven Fischzucht, zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen. Die wichtigsten *Myxosporea*-Krankheiten bei Fischen sind die Drehkrankheit der Salmoniden (*Myxobolus cerebralis*), die Darmerkrankung der Salmoniden mit *Ceratomyxa shasta* als Erreger, die von *Hoferellus carassii* AKHMEROV, 1960 beim Goldfisch und beim Karpfen die von *Hoferellus cyprini* DOFLEIN, 1898 hervorgerufene Nierenerkrankung, sowie *Chloromyxum cyprini* Fujita 1927 in der Gallenblase von Karpfen (LOM und DYKOVÁ 1981); bei den Goldfischen führt *Hoferellus carassii* der Erreger der Proliferativen Nierenerkrankung zu schweren Veränderungen in den Nieren (DYKOVÁ und LOM 1984; DYKOVÁ und LOM 1988).

Myxosporidia werden in den verschiedensten Geweben des Wirts gefunden; man unterscheidet coelozoische und histozoische Arten. Die coelozoischen Myxosporea können die perforierten Hohlorgane (z.B. Schwimmblase, Gallenblase, Harntrakt) und Blutgefäße befallen. Histozoische Myxosporea können im Gewebe oder in teilweise sehr großen Plasmodien in der Nähe vieler Organsysteme der Fische angetroffen werden (LOM und NOBEL 1984; LOM und DYKOVÁ 1992).

Die Vermehrung der Myxosporea erfolgt hauptsächlich vegetativ über die Trophozoiten. Die

Literatur

geschlechtliche Vermehrung findet durch Autogamie statt; aus ihr resultieren entweder eine oder zahlreiche Sporen (LOM und NOBLE 1984; LOM und DYKOVÁ 1992). Die Erscheinung und die Anzahl der Myxosporea-Trophozoiten sind speziesabhängig und sie weist eine große Variabilität auf. So schwankt die Größe der Trophozoiten zwischen 10 µm (*Sphaerospora molnari*) und bis 2 cm bei *Sphaeromyxa maiyai* (MORRISON und PRATT 1973). Die Form der Sporen unterscheidet sich und ist sehr variabel. Sie wird durch die Gestalt der Schalenzellen bestimmt. Die Sporen können spindelförmig zugespitzt sein und besitzen jeweils eine Polkapsel an beiden Enden (Vertreter der Gattung *Myxidium*). An einem Pol sind sie pyramidenförmig zugespitzt oder können auch mondsichelförmig gebogen sein, wie bei den Vertretern der Gattung *Ceratomyxa*. Die Vertreter der Gattung *Henneguya* besitzen Polkapseln an einem Sporende (SHULMAN 1984; LOM und NOBLE 1984). Myxosporea-Sporen enthalten 2 bis 7 Schalenzellen, 1 bis 7 Polkapselzellen und den Amöboidkeim. Die Polkapseln sind im Durchmesser zwischen 10 µm und 20 µm groß und können kugel-, rund-, oval- oder ellipsoidförmig sein. Die Vertreter der Gattungen *Myxobolus* und *Henneguya* besitzen Sporen, in denen die Polkapseln eine Mündung haben. Diese Mündung hat Kontakt mit einem Kanal für die Entladung eines spiralig gewundenen Polarfilaments (SHULMAN 1984; LOM und NOBLE 1984; LOM und DYKOVÁ 1992). (wie in Abbildung 1 zu erkennen ist).

Literatur

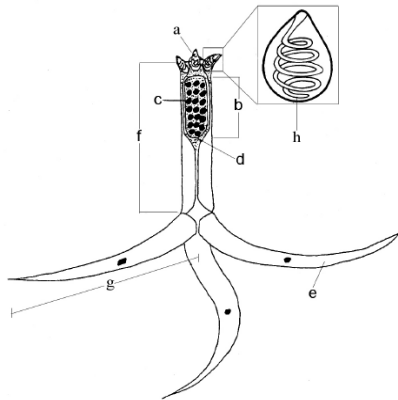


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Triactinomyxon-Spore (nach EL-MATBOULI et al., 1998)

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| a.) Polkapsel | e.) Fortsatz |
| b.) Sporoplasma (=Amöboidkeim) | f.) Stiel |
| c.) Amöboidkeimzellen | g.) Länge des Fortsatzes |
| d.) das Sporoplasma umhüllende Zelle | h.) Polfilament |

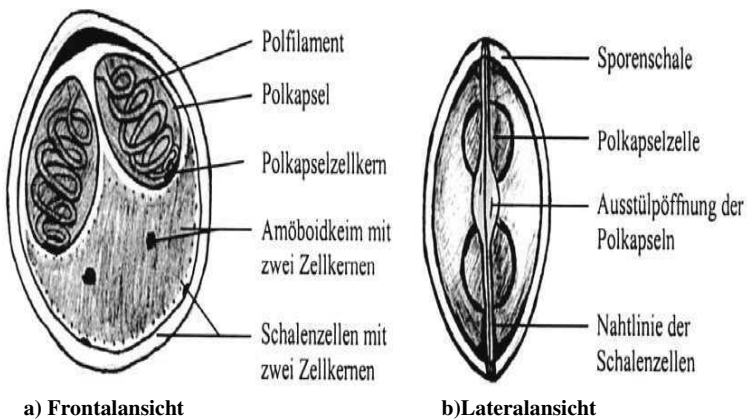


Abbildung 2: Schematische Darstellung *Myxobolus cerebralis*-Spore (nach EL-MATBOULI 1996)

2.1.2. Actinosporea

Die Klasse Actinosporea wurde 1899 von ŠTOLC entdeckt und in die drei Genera Synactinomyxon, Triactinomyxon und Hexactinomyxon eingeteilt.

Die Actinosporea-Stadien wurden in zahlreichen marinen Oligochaeta und Sipunculida gefunden. Im Jahre 1984 wurde die Actinosporea durch MARQUÈS (1984) in 44 Arten beschrieben und in 14 Gattungen unterteilt. Bis heute wurden über 136 Arten neu beschrieben und von etwa 33 Myxozoa ist deren Entwicklungszyklus sicher aufgeklärt (LOM und DYKOVÁ 2006). Bei den Actinosporea handelt es sich um eine Gruppe von Organismen, die überwiegend in Anneliden (Tubificidae, Umbricidae, Sipunculidae) parasitieren (JANISZEWSKA 1955). Die Actinosporea befallen hauptsächlich das Darmepithel und die Coelomhöhle des Wirtes. Die reifen Sporen werden ins Wasser ausgeschieden und über große Gebiete verteilt (JANISZEWSKA 1955). Werden sie ins Wasser ausgeschieden, können sie durch ihre Schwimmfähigkeit schweben oder im Schlamm lange Zeit überleben. Die Sporen besitzen eine hohe Widerstandskraft und können bei einer Temperatur von -6°C bis -20°C überleben (JANISZEWSKA 1955; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Die Sporenhülle setzt sich zusammen aus einer aus zwei bis vier Zellen bestehenden Endospore und der Epispore, welche aus sechs Zellen besteht und triradial symmetrisch ist. Drei dieser sechs Zellen, die Polkapselzellen, enthalten je eine Polkapsel und liegen an der Sporenspitze. In den meisten Genera sind die Episporalzellen dreistrahlig radialsymmetrisch angeordnet und lange Anhänge bestehen aus 3 Polkapselzellen. Die Endospore stellt den infektiösen Amöboidkeim dar, der aus einem bis zu 128-kernigem Sporoplasma besteht. Die Polkapselstruktur entspricht derjenigen der Myxosporea. Drei vorne gelegene Polkapseln werden von Schalenzellen bedeckt, die eine Lücke für die ausschleuderbaren Polfilamente freilassen. Das Sporoplasma ist in einer Kavität zwischen den Episporalzellen untergebracht. Es besteht aus einem zweikernigen Sporozoit oder aus vielen einkernigen Sporozoit.

Als taxonomische Einteilungskriterien werden die Unterschiede in den Abmessungen der Fortsätze, der Polkapseln und des Stieles, sowie die Anzahl und die Form der Schalenzellen und das Vorhandensein eines Stieles, sowie die Anzahl der Kerne bzw. Kerne im Amöboidkeim herangezogen (MACKINNON und ADAM 1924; JANISZEWSKA 1955; JANISZEWSKA 1957; MARQUES 1984).

2.1.3. Entwicklungszyklus der Myxozoa

Der Entwicklungszyklus der Myxozoa war noch bis vor wenigen Jahren unbekannt. Die zahlreichen direkten Infektionsversuche mit Myxosporea-Sporen auf Fische brachten genauso wenig Erfolg wie Infektionsversuche von Actinosporea-Sporen auf Oligochaeten. (JANISZEWSKA 1955 und 1957; HOFFMAN et al. 1962; HOFFMAN et al. 1965; MOLNÁR 1979; MARQUES 1984). WOLF und MARKIW (1984) bewiesen erstmals, dass die Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxosporea) über einen Zwischenwirt erfolgt und der Parasit im Fisch und im Zwischenwirt in unterschiedlichen Erscheinungsformen vorkommt, also ein Wirtswechsel zwischen dem Fisch und *Tubifex tubifex* stattfindet. Diese Erkenntnisse über den Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* wurden in den folgenden Jahren durch Untersuchungen anderer Autoren bestätigt (EL-MATBOULI 1988; HOFFMANN 1989).

Die Invasion in den Fischwirt findet durch das Epithel von Haut und Kiemen sowie die Maulhöhle statt (MARKIW 1989; EL-MATBOULI et al. 1995). Im Darm der Oligochaeten wandert der Amöboidkeim von *Myxobolus cerebralis* zwischen die Epithelzellen (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Im Zuge dieser Erkenntnisse wurde nicht nur der Infektionsweg von *Myxobolus cerebralis* aufgedeckt, sondern zugleich wurden auch Kenntnisse über den Entwicklungszyklus von *Myxobolus cotti* bei der Mühlkoppe (*Cottus gobio*) (EL-MATBOULI 1988 und EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989), *Myxobolus pavlovskii* beim Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*) (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1991), *Myxobolus carassii*, einem Parasiten der Goldorfe (*Leuciscus idus*), vervollständigt (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1993).

Bisher wurden ähnliche Lebenszyklen mit Zwei-Wirt-Zyklus für 25 Süßwasser-Myxozoa der Gattungen *Myxobolus*, *Henneguya*, *Sphaerospora*, *Ceratomyxa*, *Myxidium*, *Zschokkella*, *Thelohanellus*, *Hoferellus* und *Tetracapsuloides* nachgewiesen (BENAJIBA und MARQUES 1993; KENT et al. 2001).

Literatur

Tabelle 1: Übersicht über die derzeit bekannten Myxosporea/Actinosporea-Zwei-Wirt-Zyklen

Myxosporea-Spezies	Fischwirt	Oligochaetenwirt	Actinosporea	Autoren
<i>Myxobolus cerebralis</i>	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomyxon	WOLF und MARKIW (1984) EL-MATBOULI und HOFFMANN (1989)
<i>Myxobolus cotti</i>	Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomyxon	EL-MATBOULI und HOFFMANN (1989)
<i>Myxobolus pavlovski</i>	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Hex-actinomyxon	EL-MATBOULI und HOFFMANN (1991) RUIDISCH et al. (1991)
<i>Myxobolus</i> sp.	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Raabeia	YOKOHAMA et al. (1991)
<i>Hoferellus carassii</i>	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Nais elinguis</i>	Auranti-actinomyxon	EL-MATBOULI et al. (1992)
<i>Hoferellus cyprini</i>	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Nais communis</i>	Nicht bekannt	GROßHEIDER und KÖRTING (1992)
<i>Ceratomyxa shasta</i>	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Nais</i> sp.	Auranti-actinomyxon	BARTHOLOMEW et al. (1992)
<i>Myxobolus carassii</i>	Goldorfe (<i>Leuciscus idus</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomyxon	EL-MATBOULI und HOFFMANN (1993)
<i>Myxidium giardi</i>	Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>Tubifex</i> sp.	Auranti-actinomyxon	BENAJIBA und MARQUÉS (1993)
<i>Myxobolus arcticus</i>	Soockeyelachs (<i>Oncorhynchus necra</i>)	<i>Stylodrilus heringianus</i>	Triactinomyxon	KENT et al. (1993)
<i>Zschokella</i> sp.	Karausehe (<i>Carassius carassius</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Siedleckiella	USPENSKAYA (1995)
<i>Myxobolus hungaricus</i>	Brachse (<i>Abramis brama</i>)	<i>Tubifex tubifex</i> und <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Triactinomyxon	EL-MANSY und MOLNÁR (1997)

Literatur

2.1.4. Myxosporea bei Karpfen

Von den ca. 500 Myxobolus-Arten, die bekannt sind, haben verschiedene Autoren mehrere Arten beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) beschrieben. DONEC und SHULMAN (1984)

Table 2: Auflistung der bisher bekannten Myxosporea-Actinosporea-Zyklen bei Karpfen

Myxosporea-Spezies	Fischwirt	Oligochaetenwirt	Actinosporea	Autoren
<i>Thelohanellus hovorkai</i> (Achmerov 1960)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>B. sowerbyi</i>	Aurantiactino- myxon	YOKOYAMA 1997; ZÉKELY et al.1998; ANDERSON et al. 2000
<i>Myxobolus basilamellaris</i>	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomyxon	LOM und MOLNAR 1983
<i>Hoferellus cyprini</i> (Doflein 1898)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Nais sp</i>	Aurantiactino- myxon	GROßHEIDER und KÖRTING 1992
<i>Myxobolus Dispar</i> (Thélohan 1895)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Aurantiactino- myxon	MOLNAR et al. 1999a
<i>Myxobolus pavlovskii</i> (Achmerov 1954)	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	<i>Tubifex tubifex</i>	Hexactionmyxon	EL-MATBOULI und HOFFMANN 1991 RUIDISCH et al. 1991
<i>Myxobolus artus</i> (Achmerov 1954)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Nais sp.</i>	Aurantiactino- myxon	ACHMAROV 1960
<i>Myxobolus hungaricus</i> (Jaczo, 1940)	Die Brachse (<i>Abramis abramis</i>)	<i>Tubifex tubifex</i> , <i>L. hoffmeisteri</i>	Triactinomyxon	EL-MANSY und MOLNÁR 1997b
<i>Myxobolus drjagini</i> (Achmerov 1954)	Silberkarpfen (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	<i>Tubifex tubifex</i> ,	Triactinomyxon	EL-MANSY und MOLNÁR 1997a
<i>Myxobolus koi</i> (Kudo 1919)		<i>Tubifex tubifex</i>	Siedleckiella	CRAWSHAW und SWEETING. 1986
<i>Thelohanellus nikolskii</i> (Achmerov 1955)	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>B. sowerbyi</i>	Aurantiactino- myxon	SZEKELY et al. 1998

Literatur

DONEC und SHULMAN (1984) berichten von 25 Myxobolus-Arten, die den Karpfen befallen und dort gefunden wurden, während CHEN und MA (1998) über das Auftreten von 60 Myxobolus-Arten in *Carassius auratus auratus* (L.) und anderen Karpfenfischen (Cyprinidae) in Chinas Flüssen berichten.

LANDSBERG und LOM (1991) betrachten 19 dieser beschriebenen Sorten als ursprünglich beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) parasitierend. In Ungarn wurden beim Karpfen die meisten Myxobolus-Arten beschrieben (*M. basilamellaris*, *M. cyprini*, *M. dispar*, *M. intrachondrealis*) (LOM und MOLNAR 1983; MOLNAR und KOVACS-GAYERS 1985; MOLNAR 1979; MOLNAR 2000). In Tabelle 2 werden die Myxobolus-Arten beschrieben, die den Karpfen befallen:

2.1.5. Entwicklungszyklus

2.1.5.1. Entwicklung im Oligochaeten

Die Sporen, die vom Wirtsfisch freigesetzt werden, werden von einem Oligochaeten (z.B. *Tubifex tubifex*) aufgenommen. Im Oligochaeten schleudern sie ihr Polfilament aus und verankern sich mit diesem an dessen Darmwand. Der Amöboidkeim von *Myxobolus cerebralis* dringt zwischen den Darmepithelzellen von *Tubifex tubifex* ein (WOLF et al. 1986; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Nach der Freisetzung des Amöboidkeims aus der Spore machen die zwei diploiden Kerne eine interepitheliale Kernvermehrung (Schizogonie) durch und produzieren mehrkernige Zellen. Durch Plasmotomie teilen sich die mehrkernigen Stadien um zahlreiche einkernige Zellen zu produzieren, welche interzellulär durch das Darmepithel des Wurmes wandern. Einige dieser Zellen machen weitere Kern- und Zellteilungen durch und bilden zusätzliche einkernige und mehrkernige Zellen. Andere verschmelzen in Plasmotomie und bilden zweikernige Stadien. Durch Plasmogamie zweier Einzell-Stadien entsteht ein zweikerniges Stadium (ab dem 25. Tag nachweisbar) (EL-MATBOULI 1996), welches dann eine Plasmotomie durchläuft und so einen frühen Pansporoblasten (Pansporocyst) mit vier Zellen bildet. Im frühen Pansporoblasten befinden sich zwei umhüllende somatische Zellen und zwei generative Zellen, die als a und b bezeichnet werden. Drei mitotische Teilungen der beiden generativen Zellen liefern 16 diploide Gametozysten (8a und 8b), welche dann eine meiotische Teilung durchmachen um

Literatur

16 haploide Gametozysten und 16 Polkörper zu produzieren. Jeder Kern der zweikernigen Stadien teilt sich (Karyogamie) und bildet ein vierkerniges Stadium. Im vierzelligen Stadium werden die zwei Zellen von zwei anderen Zellen umhüllt. Es entsteht eine junge vierzellige Pansporozyste mit zwei äußeren somatischen Hüllzellen und zwei inneren generativen Zellen. Diese α - und β -Zellen durchlaufen je drei mitotische Teilungen, die Hüllzellen jeweils zwei. Nach drei mitotischen Teilungen der beiden generativen Zellen entstehen 16 diploide Gameten (8a und 8b), welche dann eine meiotische Teilung durchmachen, um 16 haploide Gameten und 16 Polkörper zu produzieren. Jeder Gamet der A-Linie vereint sich mit einer aus der b-Linie um acht Zygoten zu bilden. Synchron dazu teilen sich die beiden somatischen Zellen zweimal mitotisch um acht Hüllzellen zu produzieren. Basierend auf dem Lebenszyklus von *Myxobolus cerebralis* ist dies die einzige Phase des Lebenszyklus, in welcher sexuelle Stadien vorkommen. Die entstandene Pansporozyste besitzt acht Hüllzellen und 16 generative Zellen (Gameten). Die 16 diploiden Gameten durchlaufen eine meiotische Teilung um 16 haploide Gametozysten und 16 Polkörper zu produzieren. Am Ende entstehen daraus 16 haploide Gameten (acht α - und 8 β -Gameten) und 16 Polkörper. Je eine Gametozyste aus einem α - und einem β -Gameten verschmelzen und bilden je acht diploide Zygoten. Am Anfang der Sporogenese teilt sich jede Zygote zweimal durch mitotische Teilungen und es entstehen vierzellige pyramidenförmige Zellstadien; drei davon liegen peripher und eine zentral. Nach mitotischer Teilung der drei peripheren Zellen differenzieren sie sich zu drei Schalenzellen und drei Polkapselzellen. Die vierte zentrale Zelle teilt sich wieder, durchläuft viele mitotische Teilungen und führt am Ende zum Sporoplasma der Triactinomyxonspore.

Die drei Schalenzellen beginnen die drei Polkapseln zu umhüllen. Nach mitotischer Teilung der Ursprungszelle des Amöboidkeims entstehen eine somatische und eine generative Amöboidkeimzelle. Nach der Teilung entwickelt sich der Amöboidkeim (bis zu ca. 64 Zellen) außerhalb der drei Schalen, um besseren Zugang zur Darmwand zu haben (JANISZWISKA 1955).

Die Triactinosmyxon-Sporen gelangen nach Platzen der Pansporozystenwand in das Darmlumen und werden über den Anus mit dem Kot ins Wasser abgegeben (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1992). Drei Monate nach Infektion der Oligochaeten und bei einer Wassertemperatur von $15 \pm 2^\circ\text{C}$ werden die ersten Triactinomyxon-Sporen im Wasser freigesetzt (EL-MATBOULI und HOFFMANN, 1998).

2.1.5.2. Entwicklung im Fisch

Bereits eine Minute nach der Infektion des Fischwirts durch Kontakt mit den frei im Wasser schwebenden *Triactinomyxon*-Sporen verankern sich diese mit ihrem Polfilament im Wirt. Wahrscheinlich chemotaktisch gesteuert dringen sie an den sekretorischen Öffnungen der Epidermisschleimzellen und dem respiratorischen Kiemenepithel, sowie über Maulhöhle oder Flossen ein. Die Infektion des Fisches könnte nach oraler Aufnahme infizierten *Tubifex tubifex* durch Eindringen von *Triactinomyxon*-Sporen in das Darmepithel geschehen (WOLF und MARKIW 1984; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989). Der ersten 60 Minuten nach der Penetration wandert das Sporoplasma interzellulär tiefer in Epidermis und Kiemenepithel. Dann zersetzt sich die das Sporoplasma umhüllende Zelle und jede der inneren Sporoplasmazellen penetriert eine Wirtsepidermis- oder Kiemenepithelzelle. Diese nun intrazellulär gelegenen Zellen machen danach eine endogene Zellteilung durch, um so eine innere Sekundärzelle innerhalb einer umhüllenden Primärzelle zu produzieren. Durch endogene Teilung der Sekundärzellen entstehen neue Doppelzellstadien mit einer Hüllzelle und einer inneren Zelle (elektronenmikroskopisch 7 Stunden post expositionem sichtbar). Die Doppelzellstadien zerreißen die Membran der ursprünglichen Primärzelle.

Die extrazellulär gelegenen Doppelzellstadien, die frei im Wirtszellzytoplasma sind, infizieren anschließend die benachbarten Epithelzellen oder dringen tiefer in die Dermis oder Subkutis ein (EL-MATBOULI et al. 1995). zwei bis vier Tage nach Exposition können die interzellulär liegenden Doppelzellstadien in der Subkutis gefunden werden (elektronenmikroskopisch 4 Tage post expositionem sichtbar). Danach erfolgt die Wanderung der Doppelzellstadien in das periphere Nervengewebe. Es schließt sich eine Migration zum Zentralnervensystem (ZNS) an. Der proliferative interzelluläre Zyklus wird im Nervengewebe wiederholt. Ab Tag 6 bis 14 können die meisten parasitischen Stadien im Rückenmark nachgewiesen werden; von Tag 16 bis 24 werden die meisten im Gehirn gefunden. Am Ort der Sporulation entwickelt sich ein Plasmodium. Die Primärzelle wächst und ihr Kern teilt sich, um zahlreiche vegetative Kerne zu bilden, während die umhüllte Sekundärzelle sich teilt und viele so genannte generative Zellen bildet (EL-MATBOULI et al. 1995). Ab Tag 40 post expositionem findet im Knorpelgewebe die Sporogonie statt. Dadurch entstehen große Plasmodien (Plasmodien mit mehreren Pseudopodien, die in die Interzellulärsubstanz eindringen), die im Knorpelgewebe ab dem 40. Tag post expositionem

Literatur

nachweisbar sind (EL-MATBOULI et al.1995). Nach der Auflösung der umhüllenden Zelle des Plasmodiums findet entweder die Wiederholung des Zyklus durch jede umhüllte Zelle statt, um zahlreiche Plasmodien zu bilden, oder es erfolgt die Vereinigung mit einer anderen generativen Zelle. Die innere Zelle bildet die sporogonische Zelle. Diese Einheiten generieren Pansporoblasten mit zwei Sporen (bei *Myxobolus cerebralis*) (EL-MATBOULI et al. 1995).

Nach mehreren Teilungen der Sporoblast-Zellen entstehen 12 (diploide) Zellen, die jeweils zwei *Myxobolus cerebralis*-Sporen bilden. Diese 12 Zellen entwickeln sich zu 2 valvogenen Zellen (die zu den Sporenklappen werden), 2 kapsulogenen Zellen (die zu Polkapseln werden) und einem zweikernigen Amöboidkeim. Die reifen *Myxobolus cerebralis*-Sporen lassen sich lichtmikroskopisch ab dem 90. Tag post expositionem im Knorpelgewebe nachweisen (EL-MATBOULI et al. 1992a). Nach dem Tod des Fisches werden die Sporen aus dem Knorpelgewebe entlassen und der Entwicklungszyklus bei *Tubifex tubifex* beginnt von neuem. Bei der Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* werden somit zwei Sporengenerationen gebildet, und zwar im Fisch und im Oligochaeten, wobei die Reduktionsteilung und die Gametenfusion im Oligochaeten stattfinden. Damit ist der Oligochaet als Endwirt und der Fisch als Zwischenwirt anzusehen (EL-MATBOULI et al. 1998).

Literatur

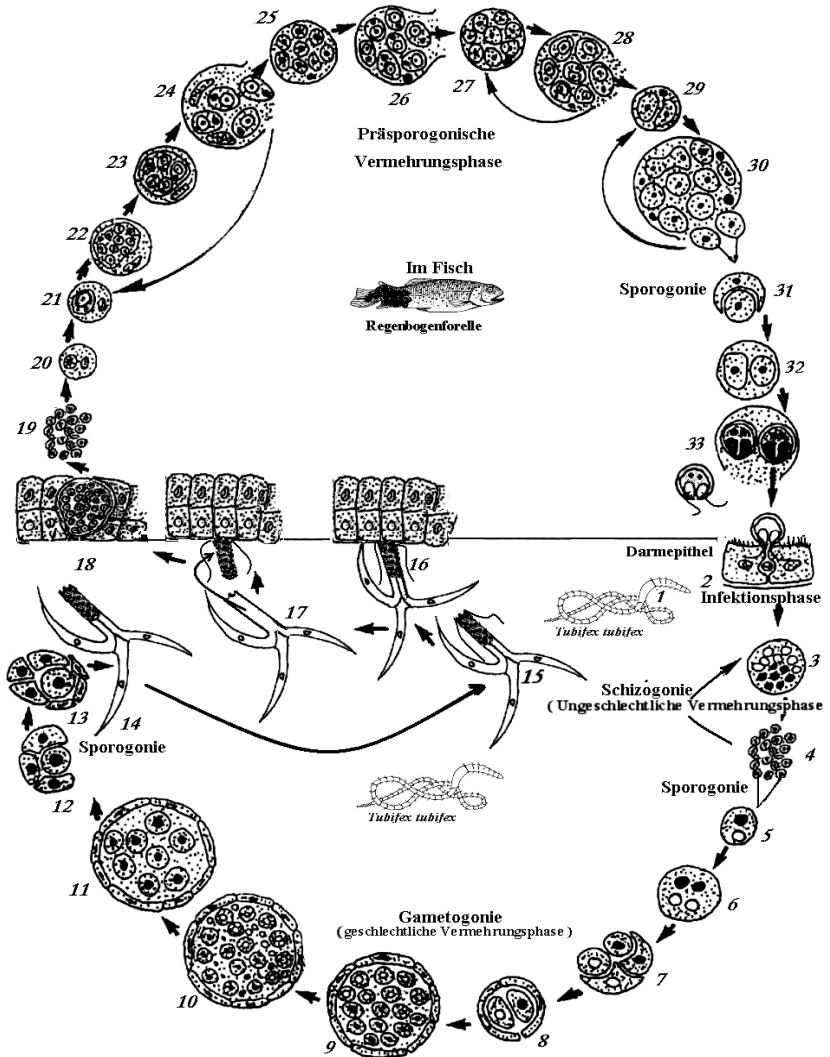


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* im Darmepithel von *Tubifex tubifex* zu Triactinomyxon-Sporen; modifiziert nach ELMATBOULI und HOFFMANN (1998)

2.2. Die Drehkrankheit der Salmoniden

2.2.1. Ursprung und Ausbreitung der Drehkrankheit

Zum ersten Mal wurde der Erreger der Drehkrankheit 1898 von HOFER beim Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) beschrieben (HOFER 1903). Diese Krankheit hat sich in den 50er bis 70er Jahren auf höchst alarmierende Weise verbreitet in Forellenzuchten weltweit aufgrund fehlende Kontrolle im Handel mit lebendem und gefrorenem Fisch und sorgte für die Verbreitung des Erregers *Myxobolus cerebralis* weltweit (HOFFMAN et al. 1962; BOGDANOVA 1970; ELSON 1969; HEWITT und LITTLE 1972; HALLIDAY 1976; HOFFMAN 1990; BARTHOLOMEW 2001).

Erste Berichte in Nordeuropa kamen im Jahr 1926 aus Dänemark (BRUHL 1926; SCHÄPERCLAUS 1931; LULING 1952; VANCO 1992), gefolgt von Schweden im Jahr 1966, Schottland 1968, Norwegen im Jahr 1971, Irland 1974, Finnland 1972 und England 1981.

Kurze Zeit nach der Entdeckung der Krankheit in den nordeuropäischen Ländern wurde sie in einigen ost- und südeuropäischen Ländern entdeckt: Italien 1954 (SCOLARI 1954), Bulgarien 1960 (MARGARITOV 1960), Jugoslawien 1960 (TOMASEC 1960), Spanien 1974 (CORODERO-DEL-CAMPILLO und ALVEREZ-PELLITERO 1974). Erste Berichte über ein Auftreten der parasitären Erkrankung auf dem afrikanischen Kontinent existieren seit 1966 aus Tunesien und Südafrika (WYK 1968; HOFFMAN 1990), dazu kommt ein Bericht im Jahr 1970 aus Marokko (PREUDHOMME 1970). In der ehemaligen Sowjetunion sind seit Anfang der 50er Jahre nach USPENSKAYA (1955) drehkranke Fische zu beobachten und 1960 ist die Krankheit auf den Sachalininseln entdeckt worden (BOGDDANOVA 1960). Rund um den Globus hat der Krankheitserreger in kürzester Zeit mehr als fünf Staaten auf dem asiatischen Kontinent erobert (Korea 1962, Japan 1970, China 1973, Taiwan 1973, Libanon 1973) (Abbildung 4). Als Folge des zunehmenden Handels breitete sich die Drehkrankheit explosionsartig weiter in Nord- und Südamerika aus. Besonders betroffen waren unter anderem Venezuela (1969), Kolumbien (1972), Ecuador (1971), Mexiko (1973) und in der Folge auch Kanada (1969). Lediglich Australien scheint bislang frei von der Drehkrankheit zu sein. In Neuseeland wurde die Krankheit im Jahr 1980 zum ersten Mal bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in einer Fischzucht in der

Literatur

Nähe von Christchurch (größte Stadt der Südinsel von Neuseeland) entdeckt. Die Drehkrankheit tritt laut BOUSTEAD in großen Flüssen, vor allem des Waimakariri, Rakaia, Waitaki und des Rangitata-Flusses auf (BOUSTEAD 1993). Während die Schäden in den Fischzuchten hoch waren, breitete sich die Krankheit in den großen Flüssen von Neuseeland stark auf die Populationen von Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*), Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*) und Königslachs (*Oncorhynchus tshawytscha*) aus (BOUSTEAD 1993).

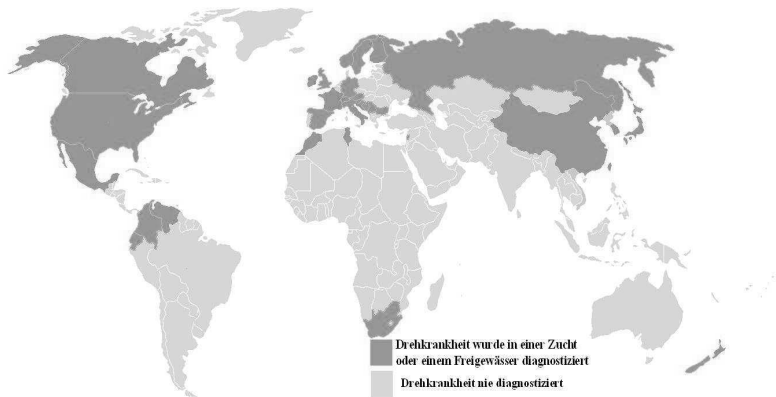


Abbildung 4 : Geographische Ausbreitung der Drehkrankheit weltweit

2.2.2. Wirtsspektrum

In der Forellenzucht ist *Myxobolus cerebralis*, der Erreger der Drehkrankheit, besonders gefürchtet. Befallen werden die Jungfische im Alter von einem Tag bis zu einem Jahr. Die meisten Vertreter der Salmoniden (bisher 18 der Gattungen *Salmo*, *Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Thymallus* und *Hucho*) (EL-MATBOULI et al. 1992a) erwiesen sich als empfänglich für die Drehkrankheit. Die Regenbogenforelle repräsentiert jedoch den empfänglichsten Wirt (HOFER 1903; HOFFMAN und PUTZ 1969). Die Untersuchungen an der Bachforelle (*Salmo trutta*) ergaben, dass sie widerstandsfähiger gegenüber *Myxobolus cerebralis* ist als die Regenbogenforelle (HOFFMAN et al. 1962).

Die *Triactinomyxon*-Spore schwebt frei im Wasser und verankert sich mit ihrem Polfilament außen am Fisch und der freiwerdende Amöboidkeim dringt in die Haut oder Kiemen ein

Literatur

(MARKIW 1989; EL-MATBOULI et al. 1995). Die Morphologie der Sporen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Der Amöboidkeim beherbergt 64 Zellen (EL-MATBOULI et al. 1995), die Länge des Stiels beträgt 146,67 (135,25-155,83) μm und die Länge der Fortsätze beträgt 193,62 (147,38-214,21) μm .

Die Myxosporen sind wegen ihrer Schale sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen (KERANS und ZALE 2002). Im Schlamm bleiben sie bei einer Temperatur von 13°C für etwa fünf Monate infektiös und auch Einfrieren für drei Monate bei -20°C beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Sporen nicht (EL-MATBOULI und HOFFMAN 1991). Die Sporen von *Myxobolus cerebralis* im frischen Zustand sind rundlich-oval; in der Seitenansicht sind sie linsenförmig (Abbildung 2). Die Sporenmaße von *Myxobolus cerebralis* werden mit 8,7 μm (7,4 - 9,7 μm) Länge 8,2 μm (7,0 - 10,0 μm) Breite 6,3 μm (6,2 - 7,4 μm) Dicke angegeben. Die beiden eiförmigen Polkapseln sind 5,1 μm (5,0 - 6,0 μm) lang und 3,2 μm (3,0 - 3,5 μm) breit. Sie setzen sich aus zwei Schalenzellen und zwei Polkapselzellen, in denen sich die in fünf bis sechs Windungen aufspiralisierten Polfilamente befinden und einem zweikernigen Amöboidkeim zusammen (LOM und HOFFMAN 1971). Nach dem Tod des Fisches werden die *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Wasser freigesetzt. Im Darm des Oligocheaten (*Tubifex tubifex*) dringt der Amöboidkeim von *Myxobolus cerebralis* zwischen die Epithelzellen ein (EL-MATBOULI und HOFFMANN 1989; EL-MATBOULI und HOFFMANN 1998). Im Darmepithel erfolgt die Entwicklung zu Triactinomyxon-Sporen. Nach 90 Tagen post expositionem wurde eine Ausscheidung der Triactinomyxon-Sporen ins Wasser festgestellt (EL-MATBOULI 1988; EL-MATBOULI et al. 1991a).

Die Gattung *Tubifex tubifex* stellt den einzigen Wirt für die Entwicklung der Triactinomyxon-Sporen von *M. cerebralis* dar (WOLF et al. 1986; HEDRICK et al. 1998; KERANS und ZALE 2002; BEAUCHAMP et al. 2001, BEAUCHAMP 2002). *Tubifex tubifex* lebt normalerweise im Schlamm von stehenden sowie fließenden, auch stark verschmutzten Süßgewässern mit hohen organischen Sedimentationsraten (BRINKHURST 1996; GUSTAFSON 1997), wo er sich bei Temperaturen von +20 bis +25°C entwickelt und vermehrt (TIMM 1972). Die Prävalenz der Infektion mit *M. cerebralis* liegt bei 9°C bei 11,4 % und steigt bei 17°C bis 22,2 %. Bei einer Temperatur von 8°C werden die Triactinomyxon-Sporen nach 170 Tagen und bei 15°C nach 89 bis 90 Tagen ausgeschieden.

2.3. Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit

2.3.1. Fischarten

Über die Empfänglichkeit für die Drehkrankheit wurde bei 18 Salmonidenarten berichtet.

Die meisten Vertreter der Gattung *Salmo* und der Gattung *Oncorhynchus* sind besonders anfällig für die Drehkrankheit. Es gibt jedoch einige Arten, z.B. der Saibling (*Salvelinus*) sowie die Europäische Äsche (*Thymallus thymallus*) und der Huchen (*Hucho hucho*), die als wenig empfänglich gegenüber der Drehkrankheit angesehen werden dürften. Im Folgenden sind für die Drehkrankheit empfängliche Fischarten aufgelistet (O'GRODNICK 1979; HOFFMANN 1998). Diejenigen Spezies, die sehr empfänglich sind, gehören den Gattungen *Salmo*, *Oncorhynchus*, *Salvelinus* und *Thymallus* an. Auf der Liste der empfänglichsten Fischarten stehen die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), der Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*, engl. Sockeye), die Goldforelle (*Oncorhynchus aguabonita*) und die Cutthroatforelle (*Oncorhynchus clarki*) (VINCENT 1997; THOMPSON et al. 1998), weiter die Bachforelle (*Salmo trutta fario*), die Stahlkopfforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (HORSCH 1987), der Chinooklachs (*Oncorhynchus tshawytscha*), der atlantische Lachs (*Salmo salar*), der Coholachs (*Oncorhynchus kisutch*) (O'GRODNICK 1978a, O'GRODNICK 1979), der Nordamerikanische Saibling (*Salvelinus namaycush* und *Salvelinus confluentus*) (MAC CONNELL et al. 1997; HEDRICK et al. 1999b; THOMPSON et al. 1999; BALDWIN et al. 2000), die Äsche (*Thymallus thymallus*) (WOLF 1957; HAVELKA und WOLF 1970; BOGDANOVA. 1971; EL-MATBOULI et al. 1992), die Arktische Äsche (*Thymallus arcticus*) (HEDRICK et al. 1999), die Maräne (*Coregonus sp.* und *Prosopium sp.*) (BALDWIN et al. 1997), der Gründling (*Gobio gobio*), die Schleie (*Tinca tinca*) sowie der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) (RAMIREZ-MEDINA 1962) (siehe Tabelle 4).

DENSMORE et al. (2001) setzten die Untersuchung in Labor- und Feldversuchen bei drei Regenbogenforellenstämmen und bei Stahlkopfforellen (*Oncorhynchus mykiss*) fort.

Nach einer Expositionszeit unter natürlichen sowie unter Laborbedingungen wurde eine Infektionsdosis von 200 bzw. 2.000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch verwendet. Die Autoren stellten fest, dass sich bei der Stahlkopfforelle die klinische Symptomatik wie Deformation und Drehverhalten viel deutlicher entwickelte als bei der zweiten Versuchsgruppe, der Cayuga-Lake-Regenbogenforelle. Auch zeigte die Cayuga-Lake-Forelle

Literatur

signifikant mehr Schwarzverfärbung der Kaudalpartie als die andere Artgruppe. Bei niedrigen Infektionsdosen zeigten sich bei der Cayuga-Lake-Forelle und der Mount-Lassen-Forelle weniger Kopfknochenläsionen als bei der Stahlkopfforelle (DENSMORE et al. 2001). Die relative Unempfindlichkeit der Bachforelle (*Salmo trutta*) und die Empfänglichkeit der Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber der Drehkrankheit sind von mehreren vergleichenden Untersuchungen bestätigt worden (HOFER 1903; HOFFMAN und PUTZ 1969).

Nach einem Expositionsversuch mit mehreren Fischarten, unter anderem Karpfen (*Cyprinus caprio*), Guppy (*Poecilia reticulata*), Nase (*Chondrostoma nasus*), Goldfisch (*Carassius auratus*) und der Regenbogenforelle als Kontrollgruppe stellte sich heraus, dass nur bei der Regenbogenforelle und beim Guppy der Nachweis der Entwicklung von Sporen erbracht werden konnte (EL-MATBOULI et al. 1999).

Durch eine experimentelle Untersuchung im Schädelgewebe von verschiedenen Fischen konnte nachgewiesen werden, dass die eosinophilen Granulozyten im Knorpelgewebe (membranöses Labyrinth) bei der Bachforelle, dem atlantischen Lachs (*Salmo salar*) und dem Coholachs (*Oncorhynchus kisutch*) signifikant zahlreicher waren als bei der empfindlichen Regenbogenforelle (HEDRICK et al. 1999b).

Untersuchungen an der arktischen Äsche (*Thymallus arcticus*) ergaben, dass diese Fische unempfindlich gegenüber der Drehkrankheit sind. Es wurden keine Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* gefunden, die sich normalerweise in der Haut und in den Nerven entwickeln. Die Autoren begründen dies damit, dass bei resistenteren Arten die Immunantwort der Fische, d.h. die eosinophilen Granulozyten, die frühen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* abtöten kann (MAC CONNELL et al. 1997; HEDRICK et al. 1999).

Ein besonders deutlicher Unterschied zwischen Regenbogenforelle und Bachforelle war in der Histologie des Kopfknochenknorpels zu entdecken. Bei der Regenbogenforelle treten häufig die Läsionen in den Schädelregionen, hauptsächlich dem ventralen Calvarium des Kopfknochenknorpels auf. Bei der Bachforelle (*Salmo trutta fario*) wurden Läsionen in den Kiemenbögen gefunden, die Anzeichen einer Entzündung erkennen ließen. Im Gegensatz dazu sind bei der Stierforelle (*Salvelinus confluentus*) und der Gebirgsmaräne (*Prosopium williamsoni*) die Läsionen meistens im axialen Skelett zu finden (BALDWIN et al. 2000). Nach Angaben von HEDRICK et al. (1999a) scheint die Cutthroatforelle (*Oncorhynchus clarki*) mit niedrigerer Sporenzahlproduktion im Kopfknochenknorpel und geringeren klinischen Symptomen weniger

Literatur

empfindlich für die Drehkrankheit zu sein. Außerdem machten sich bei der Cutthroatforelle (*Oncorhynchus clarki*) bei höheren Infektionsdosen (ab 1000 *Triactinomyxon*-Sporen) signifikant geringere klinische Symptome bemerkbar als bei der Regenbogenforelle.

Bei HEDRICK et al. (2001) zeigten sich die Chinooklachs (*Oncorhynchus tshawytscha*) im Feldversuch als sehr empfindlich mit schwereren klinischen Anzeichen der Erkrankung und einer höheren Infektionsprävalenz. Bei Versuchen unter standardisierten Bedingungen wurden beim Coholachs (*Oncorhynchus kisutch*) nach Infektionsversuch keine klinischen Symptome diagnostiziert und weniger Sporen im Kopfknochen als bei der Regenbogenforelle gezählt. Die Autoren konnten mit anderen Infektionsversuchen zeigen, dass die Stahlkopfforelle (*Oncorhynchus mykiss*) signifikant höhere Infektionsraten und schwerere histologische Veränderungen aufwies als der Coholachs (*Oncorhynchus kisutch*) (HEDRICK et al. 2001).

KÜPPERS (2003) arbeitete im Rahmen ihrer Dissertation vergleichend über unterschiedliche Empfänglichkeiten gegenüber der Drehkrankheit unter anderem die des amerikanischen Regenbogenforellen-Stammes (*AmTL*) und vier verschiedener deutscher Regenbogenforellenstämme (*DtHo*, *DtLh*, *DtHs*, *DtHa*) sowie von Bachforellenbrütlingen (*Salmo trutta*). Post-mortem-Laboruntersuchungen ergaben bei den amerikanischen Forellen schwerere histologische Veränderungen mit bis zu 25-mal höheren Sporenzahlen, die sich im Kopfknochen entwickelten, als beim deutschen Stamm *DtHo*. Aus den Untersuchungen resultierte, dass die deutschen Stämme *DtLh* und *DtHo* widerstandsfähiger sind als der amerikanische Stamm. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Symptomausprägung im Vergleich mit allen anderen deutschen Stämmen. Die amerikanischen Regenbogenforellen vom Stamm TL wiesen die kürzesten Inkubationszeiten auf. Außerdem waren das Auftreten der Kardinalsymptome und die Infektionsprävalenz signifikant höher. Die Autorin konnte auch in der Felduntersuchung nachweisen, dass der deutsche Regenbogenforellenstamm (*Ho*) und Bachforellen in allen drei höheren Infektionsdosen als unempfindlicher bezeichnet werden können. Daneben erwies sich der amerikanische *AmTL* Regenbogenforellenstamm als sehr empfindlich. Bei der Vergleichsgruppe *DtLh* und *AmTL* bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Krankheitsausprägung in allen TAM-Dosierungen. In Tabelle 3 gibt einen kurzen Überblick über das Vorkommen der Drehkrankheit bei verschiedenen Fischarten.

Literatur

Table 3: Vorkommen der Drehkrankheit bei verschiedenen Fischarten Skala von 0 bis 3 oder v: 0= resistent, keine Sporenentwicklung; 1= teilweise resistent, selten klinische Erkrankung und Entwicklungen nur wenn sehr hohen Parasitendosen ausgesetzt; 2= empfänglich, klinische Erkrankung bei hohen Parasitendosen, aber größere Resistenz bei niedrigeren Parasitendosen; 3= hohe Empfänglichkeit, zeigt klinische Symptome; v= Empfänglichkeit ist unklar (widersprüchliche Berichte, unzureichende Daten, kein *Myxobolus cerebralis* bestätigt).

Wissenschaftlicher Name:	Deutscher Name:	Empfänglichkeit
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Regenbogenforelle	3
<i>Oncorhynchus clarki</i>	Yellowstone-Cutthroat-Forelle	0
<i>Oncorhynchus c. bouveri</i>	Yellowstone-Cutthroat-Forelle	2
<i>Oncorhynchus c. lewisi</i>	Westslope-Cutthroat-Forelle	2
<i>Oncorhynchus c. pleuriticus</i>	Colorado-Cutthroat-Forelle	2
<i>Oncorhynchus c. virginialis</i>	Rio Grande-Cutthroat-Forelle	2
<i>Oncorhynchus c. stomias</i>	Greenback-Cutthroat-Forelle	2
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Königslach	2
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Rotlach	3
<i>Oncorhynchus keta</i>	Ketalach	1
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Buckellach	1
<i>Oncorhynchus masu</i>	Masulach	1
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Silberlach	1
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Bachsaibling	2
<i>Salvelinus malma</i>	Malmasaibling	1
<i>Salvelinus confluentus</i>	Stierforelle	1
<i>Salvelinus namaycush</i>	Amerikanischer Seesaibling	0
<i>Salvelinus Salmo salar</i>	Atlantischer Lachs	2 v
<i>Prosopium williamsoni</i>	Gebirgsmaräne	2 v
<i>Thymallus thymallus</i>	Europäische Äsche	2 v
<i>Hucho arcticus</i>	Arktischer Huchen	0
<i>Hucho hucho</i>	Huchen	3

2.3.2. Fischalter

Die pathogene Wirkung von *Myxobolus cerebralis* ist vom Alter der infizierten Salmoniden, der Wassertemperatur und von der Infektionsdosis abhängig. Die klinischen Erscheinungen treten erstmals 35 bis 80 Tage nach der Infektion auf (MARKIW 1991). MARKIW (1992) berichtet in seiner Publikation, dass einen Tag alte Regenbogenforellen für die Infektion empfänglich sind. Die Infektion junger Regenbogenforellen, bei denen die Ossifikationsprozesse des Schädels noch nicht so weit fortgeschritten sind (1 Tag bis ca. 2 Monate) und höhere Sporenkonzentrationen sind verbunden mit schweren klinischen Symptomen und höheren Mortalitätsraten (RYCE 2004). Der hohe Knorpelanteil am Skelett des jungen Fisches begründet die starke Abhängigkeit und Empfänglichkeit vom Alter. Je älter der Fisch wird, desto mehr schreitet die Ossifikation voran und desto weniger „Zielgewebe“ steht für den Parasiten zur Verfügung; somit sinkt die Anfälligkeit des Fisches proportional zu seinem Alter (SCHÄPERCLAUS 1931). Wenn die Forelle zum Zeitpunkt des Kontakts mit dem Erreger den sechsten Lebensmonat erreicht hat, führt die Infektion zu keiner klinischen Manifestation der Drehkrankheit mehr. Jedoch können diese Fische als subklinische Träger, sog. Carrierfische, fungieren, die die Krankheit weiterhin verbreiten (SCHÄPERCLAUS 1931; HALLIDAY 1976; EL-MATBOULI et al. 1992a; ROSE et al. 2000).

2.3.3. Infektionsdosis

Im Laborversuch von RYCE et al. (1998) wurden Regenbogenforellenbrütlinge mit einer niedrigen Dosis von 100 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch infiziert sowie mit einer Sporenkonzentration von 1.000 bzw. 10.000 Triactinomyxon-Sporen. Das Ergebnis war signifikant: die Forellenbrütlinge, die mit der niedrigsten Infektionsdosis infiziert wurden, zeigten die klinische Manifestation der Drehkrankheit zwei Wochen später als die Vergleichsgruppen, die mit höherer Sporenkonzentration infiziert wurden. Die hohe Sporenkonzentration und die damit verbundenen schweren klinischen Symptome führten zu höheren Mortalitätsraten bei den Regenbogenforellenbrütlingen (RYCE 2004).

MARKIW (1991) infizierte zwei Gruppen von Regenbogenforellen im Alter von ein Tag und zwei Monaten mit derselben Sporenkonzentration (10 Triactinomyxon-Sporen) über einen Zeitraum von drei Stunden. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt. Bei zwei Monate alten Regenbogenforellen wurde bei

Literatur

niedrigerer Sporenkonzentration kein Ausbruch der Erkrankung festgestellt. Dagegen sind bei zwei Tage alten Regenbogenforellenbrütlingen zehn *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch ausreichend, um die Krankheit klinisch zu manifestieren (MARKIW 1991, 1992a). Die Forellen, die älter als ein Jahr waren, konnten zwar bei der Dauerexposition mit der höchsten Sporenkonzentration von 10.000 und 100.000 *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch erfolgreich infiziert werden, zeigten aber keine klinische Manifestation der Drehkrankheit (MARKIW 1992a). Je höher die Sporenkonzentration, mit der die Forellenbrütlinge in Kontakt kamen, desto schwerer war die Ausbildung von *M. cerebralis* im Fischschädel und desto früher war das Auftreten von Symptomen der Drehkrankheit zu diagnostizieren (MARKIW 1992a).

2.3.4. Stressoren

Bei allen Wirbeltieren ist Stress eine natürliche Reaktion auf Belastungen und lässt sich auch bei Fischen nachweisen. Wenn ein starker Stressor lange auf einen Fisch einwirkt, sind dessen Ressourcen nach einiger Zeit erschöpft und das Individuum stirbt (SELYE 1974). BARTON und IWAMA (1991) bezeichnen den Begriff „Stress“ als Antwort auf hervorgerufene physikalische, chemische oder biologische Umweltfaktoren, die zu biochemischen und physiologischen Änderungen sowie Verhaltensänderungen befähigt. Von GRONOW (1974) als auch von WEDEMEYER und MC LEAY (1981) wurde Stress als Reaktion des Fisches auf extreme endogene und exogene Stressoren bezeichnet. SINDERMANN (1983, 1984) wiederum definiert Stress als eine biochemische und morphologische Reaktion auf Stressoren oder äußere Reize. Die Reaktionen des Organismus auf einen Stressor werden als allgemeines Anpassungssyndrom bezeichnet, das in bis zu drei Phasen aufgeteilt werden kann (SELYE 1974; GRONOW 1974; PETERS 1979, 1988; ROSS und ROSS 1999).

Verschiedene Autoren beschreiben eine Reihe von äußeren Stressoren bei Fischen, die Beschränkung der Bewegungsfreiheit, die Hälterung in einem Netz, sozialer Stress, Handling (REICHENBACH-KLINKE 1987; OIDTMANN und HOFFMAN 2001), ungünstige Umweltbedingungen (SELYE 1950; BEITINGER und MC CAULEY 1990; NOLAN et al 1998), Transport (CHIWEYITE EJIKE and SCHRECK 1980) und der Umgang mit Fischen (engl. „*handling*“) bei Versuchen zur Gewinnung des Rogens oder des Streifens von Milch oder beim Versuch die Fische festzuhalten oder zu töten (MC FARLAND, 1959; BONATH,

Literatur

1977; SCHULZ, 1982; BROWN, 1988; FAWC, 1996; ROSS und ROSS, 1999). Bei gestressten Fischen erhöhte sich die Krankheitsanfälligkeit und es kam zu einem verstärkten Auftreten von bakteriellen Krankheiten zum Beispiel wie Furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) und Befall mit *Flexibacter sp.* (RICHARDS et al. 1985; PICKERING und POTTINGER, 1989; WEDEMEYER, 1997).

Bei der dichten Haltung von Salmoniden treten morphologisch erkennbare Veränderungen in Form von Verkürzungen der Flossen, Flossendefekten, Hautläsionen und so genanntem Flossenklemmen sowie Kiemenveränderungen auf (OIDTMANN, 1994). WOODWARD und SMITH (1985) untersuchten verschiedene Lachsarten nach dreiwöchigem Schwimmtraining mit anschließender dreitägiger Erholungsphase. Dieses Schwimmtraining führte zu keiner Mortalität bei den Versuchsgruppen. Die Autoren gehen davon aus, dass diese Belastung innerhalb der Kompensationsfähigkeit der Fische liegt. Einen Hinweis auf Schädigung von Fischen durch Stresseinwirkung liefert die Erkenntnis, dass zwei Minuten Zwangsschwimmen (Drill) bei der Regenbogenforelle ausreichen, um offenbar alle Reserven des Stresshormons Kortisol auszuschütten (BLÜM und BORCHARD, 1983). Durch Blutuntersuchungen von lebenden Fischen nach dem Transport konnten eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels sowie die Bildung von Laktat und erhöhte Cortisolwerte nachgewiesen werden (PICKERING et al. 1982).

2.4. Klinische Symptomatik

Die Symptomatik der Drehkrankheit entwickelt sich in enger Korrelation zum Lebenszyklus von *Myxobolus cerebralis*. Die Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* im Knorpelgewebe ist zweiphasig mit vegetativer Vermehrung und Sporenbildung, wobei hauptsächlich das Nervensystem durch den Parasiten schwer geschädigt wird (MANDOK 1993; EL-MATBOULI et al. 1995). Die pathogene Wirkung von *M. cerebralis* ist vom Alter der infizierten Salmoniden, der Infektionsdosis und der Wassertemperatur abhängig (MARKIW 1992a).

Nach der Penetration der Epidermis durch den Amöboidkeim der Triactinomyxon-Spore wandert diese tiefer in Dermis- und Subcutisschichten. Bereits vom vierten Tag bis zum 24. Tag post expositionem können die Entwicklungsstadien im Nervengewebe nachgewiesen werden. Kurze Zeit später (zwischen 6 - 14 Tagen) finden sich Entwicklungsstadien im

Literatur

Rückenmark, nach einem Zeitraum von vier bis 24 Tagen post expositionem erreichen die Sporen das Gehirn und nach 40 Tagen entwickeln sich schließlich Pseudoplasmodien in den knorpeligen Bereichen des Schädel skeletts. Die Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* befinden sich sowohl in der verknöchern den Schädel kapsel als auch in den knöchernen Anteilen von Kiemendeckel und Kiemenbogen (MANDOK, 1993; EL-MATBOULI et al. 1995). Der Nachweis der Sporenbildung im Knorpelgewebe des Kopfes und in der Wirbelsäule ist frühestens etwa vier Monate nach der Infektion möglich, während die Sporoplasmen (Trophoziten, Plasmodien) bereits etwa nach 40 Tagen nachweisbar sind (HALLIDAY, 1976). Die klinische Manifestation der Drehkrankheit bei Forellen ist nur bei bis zu sechs Monate alten Fischen möglich, da nach einem Jahr das Skelett zu stark verknöchert, so dass kaum entzündliche Reaktionen oder nur geringerer Schaden am Gewebe beobachtet werden können (HALLIDAY, 1976). Die primäre Ansiedlung der Parasiten befindet sich zwischen der Ossifikationszone des Knorpels und der bedeckenden Knochen (HERMANNNS und KÖRTING, 1985). Die drehenden und kreisenden Schwimmbewegungen und die Schwarzverfärbung des hinteren Körperdrittels sind die klassischen Symptome der akuten Drehkrankheit und treten erstmals 35 bis 80 Tage nach der Infektion auf (SCHÄPERCLAUS, 1931; MARKIW, 1992).

ROSE et al. (2000) führten eine umfassende klinische und histologische Untersuchung bei drehkranken Regenbogenforellenbrütlingen durch. Nach einer intensiven Beobachtung beschreiben die Autoren das Verhalten der drehkranken Forellen folgendermaßen: Die Forellen stehen leicht geneigt, mit ihrem Schwanz leicht höher als der Kopf und führen mit dem Schwanz Fluchtreaktionen mit mäßigen Bewegungen aus. Sie sinken auf den Boden des Aquariums ab und bleiben ein paar Minuten unbeweglich und leicht geneigt. Die Herzfrequenz und die Frequenz der Kiemendeckelbewegung werden sehr stark reduziert. Manche Fische reagieren vor allem bei Erschrecken nach einem visuellen oder olfaktorischen Stimulus und machen plötzlich Fluchtbewegungen assoziiert mit einer kreisförmigen Bewegung (Schwanzjagen) und sinken auf den Boden ab. Nach einer gewissen Zeit konnten diese Fische wieder intensiver schwimmen.

Das Gehirn und das Rückenmark wiesen im histologischen Befund in zahlreichen Anschnitten Entwicklungsstadien (Trophoziten) und eine kleine Anzahl von reifen *M. cerebralis*-Sporen im Perineuralraum sowie eine granulomatöse Entzündung auf. Die Zerebrospinalflüssigkeit zwischen Wirbelkörper und Rückenmark war ringförmig

Literatur

eingeschnürt und teilweise konnte eine Kompression des Hirnstammes gefunden werden (ROSE et al. 2000). Nach der Verknöcherung des Kopfknoorpels treten bei älteren Fischen häufig Missbildungen des Skeletts, wie z.B. verkürzte Kiemendeckel, Wirbelsäulenverkrümmungen, verkürzte und missgebildete Kiefer mit offen stehendem Maul, Buckelbildung hinter dem Kopf und Vertiefungen im Kopfbereich hinter den Augen im Bereich des Gehörorgans auf (PLEHN 1904; SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al. 1962; ROSE et al. 1998).

Es ist festzuhalten: Wenn einmal die normale Knochenbildung gestört ist, treten die folgenden Kardinalsymptome auf: Deformation des Skeletts, pathologisches Schwimmverhalten (ROSE et al. 2000) und Schwarzverfärbung des Schwanzbereiches etwa ab dem After (SCHÄPERCLAUS, 1990). Als Ursache des Symptoms des Kreisschwimmens vermutete man die Beschädigung des Vestibularorgans durch Deformationen im Bereich des Kraniums (HOFFMAN und DUNBAR, 1961; SCHÄPERCLAUS, 1986). Die Beeinträchtigung des Nervus sympathicus durch mechanischen Druck könnte die Ursache der Schwarzverfärbung des Schwanzbereiches sein. Die Sympathikusnerven versorgen die zu der entsprechenden Schwanzregion gehörenden Pigmentzellen, dadurch kommt es bei Schädigung dieses Nervs zu Farbveränderungen der kaudalen Körperpartien (SCHÄPERCLAUS, 1954; HOFFMAN et al. 1962; HOFFMAN, 1966; HALLIDAY, 1976; SCHÄPERCLAUS, 1990), die mit zunehmendem Alter der Fische wieder verschwinden (EL-MATBOULI et al. 1992b). Im Gegensatz zur Schwarzfärbung der Schwanzregion sind die verkrüppelten Unterkiefer sowie die Wirbelsäulenverkrümmung als irreversibel zu bezeichnen (PLEHN 1904; SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al. 1962).

2.5. Diagnostik

Vom dritten Monat post expositionem an können die reifen Sporen von *M. cerebralis* mittels mikroskopischer Untersuchung leicht aufgefunden werden (EL-MATBOULI et al. 1992a; SCHÄPERCLAUS, 1990). Für Nativuntersuchungen wird aus einem zerkleinerten Stück Kopfknoorpel ein Tropfen Gewebe mit einer Pipette entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und lichtmikroskopisch auf *M. cerebralis*-Sporen untersucht. In histologischen Schnittpräparaten färben sich die Sporen (Polkapselzellen und Amöboiden) blau mit May-

Literatur

Grünwald, Giemsa und Methylenblau und rot mit der Färbung Hämatoxylin-Eosin (HE) (SCHÄPERCLAUS, 1931; WOLF und MARKIW, 1979).

Untersuchungen zu dem nach wie vor aktuellen Problem beschäftigen sich vor allem mit der Gewinnung von Sporen für die Identifizierung von *Myxobolus cerebralis*-Infektionen sowie für weiterreichende biochemische und immunbiologische Forschungen (MACLEAN 1971; PRASHER et al. 1971; RYDLO, 1971; ANDOLT, 1973; HALLIDAY, 1973a; CONTOS et al. 1974; MARKIW und WOLF, 1974; LORZ und AMANDI, 1994).

Mit der Pepsin-Trypsin-Verdauung (PTD) wurde eine erfolgreiche Nachweismethode für die Diagnose latenter oder überstandener *M. cerebralis*-Erkrankungen entwickelt. Dabei werden Teile von drehkranken Fischen enzymatisch verdaut und die Sporen über eine anschließende Planktonzentrifugation in 55%iger Dextrose-Lösung isoliert (MARKIW und WOLF, 1974a; O'GRODNICK, 1975; MARKIW und WOLF, 1980).

40 Tage post expositionem konnten bei Infektionsträgern serologisch Antikörper detektiert werden (HOFFMANN et al. 1991). GRAFFIN und DAVIS (1978) stellten eine serologische Nachweismethode mittels IFAT an Regenbogenforellen vor. Als weitere Methoden zum Nachweis von *M. cerebralis*-Infektionen sind molekularbiologische Verfahren, wie Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction (PCR)) (ANDREE et al. 1997a) und in-situ-Hybridisierung (ANTONIO et al. 1998) entwickelt worden. Diese sind sensitiver als reine histopathologische Verfahren und ermöglichen die Ermittlung einer geringen Anzahl von Entwicklungsstadien im Gewebe (LORZ und AMANDI 1994; BALDWIN et al. 2000; ANDREE et al. 2002). Diese molekularbiologische Technik ermöglicht sowohl eine postmortale Diagnostik als auch eine Diagnostik am lebenden Tier durch die Verwendung von Hautbiopsien oder Knorpelproben.

Die Sensitivität der PCR (92 % Detektionsrate) ist höher als die der Histopathologie und des Trypsin/Pepsin-Verdaus (PTD) (LORZ und AMANDI, 1994, BALDWIN et al. 2000; ANDREE et al. 2002). ANDREE et al. (1998) entwickelte zusätzlich eine „verschachtelte“ (nested) PCR zum Nachweis der genomischen DNA von *M. cerebralis* bereits zwei Stunden nach der Infektion. Die quantitative PCR (qPCR) weist die höchste Nachweisrate von *M. cerebralis* bei den untersuchten Proben auf. EL-MATBOULI und SOLIMAN (2005) entwickelten ein empfindliches und sehr spezifisches Verfahren, den sogenannten LAMP-Test um geringe Mengen *Myxobolus cerebralis*-DNA nachzuweisen. Der Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)-Test erfordert, trotz hoher Sensitivität, minimale

Literatur

Infrastruktur und stellt damit eine kostengünstige Diagnosemöglichkeit für die Drehkrankheit dar.

2.6. Differentialdiagnosen

Unkoordiniertes Schwimmverhalten und Drehbewegungen können ebenfalls als Begleiterscheinungen anderer Krankheiten, wie z.B. bei enteritischen Infektionen (PLEHN 1904), bei bakteriellen Infektionen zum Beispiel *Flexibacter psychrophilum* bei infizierten Silberlachsen (KENT et al. 1989; ENTRALA et al. 1996) oder bei Regenbogenforellen (BUSTOS et al. 1995), auch bei *Renibacterium salmoninarum* bei infizierten Silberlachsen vorkommen (BUSTOS et al. 1992; SPEARE et al. 1993). Die klinischen Erscheinungen des Drehens bei Fischen sind auch bei der infektiösen Pankreasnekrose und bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie zu beobachten (PLEHN, 1904; CONRAD und DECEW, 1967; HALLIDAY 1973a).

Schwarzverfärbungen bei Fischen könnten auch eine Stressreaktion aufgrund von Sauerstoffübersättigung sein. Dieses Symptom kann auch durch die intravenöse bzw. intramuskuläre Medikamentenapplikation verursacht werden (WALKER und NEHRING 1995).

Die zwei bei der Drehkrankheit zu beobachtenden Hauptsymptome, Skelettdeformation und Schwarzverfärbung, können sowohl genetisch bedingt, als auch die Folge haltungsbedingter Mängel sein; außerdem können nutritive Defizite z.B. Vitamin-C-Mangel und Tryptophanmangel die Ursache sein (HALLIDAY, 1973b; ASHLEY et al. 1975; WOLF et al. 1981).

Differenzialdiagnostisch muss auch an andere Myxosporeasporien gedacht werden; diese können genau wie *Myxobolus cerebralis* im ZNS parasitieren, jedoch können sie sich nicht im Knorpel entwickeln. So parasitieren zum Beispiel *Myxobolus kisutchi*, *Myxobolus buri* und *Myxobolus arcticus* im Nervengewebe und im Rückenmark der Coholachse (*Oncorhynchus kisutch*), Königslachse (Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*), der Silberlachse (*Oncorhynchus kisutch*), der English Sockeyelachse (*Oncorhynchus nerka*), der "Dolly Varden"- Saiblinge (*Salvelinus malma malma*), der "Neyva"-Seesaiblinge (*Salvelinus neiva*), der Arktischen Äschen (*Thymallus arcticus*), der Seesaiblinge (*Salvelinus alpinus*) und der Heringsmaränen (*Coregonus clupeaformis*) (YASUTAKE und WOOD, 1957; PUGACHEV und KHOKHLOV 1979; MOLES und HEIFETZ, 1998).

Literatur

Bei histologischen Untersuchungen von Gehirn (ZNS) und Rückenmark der Bachforelle (*Salmo trutta*), der Arktischen Äsche (*Thymallus arcticus*), der Europäischen Äsche (*Thymallus thymallus*), des Seesaiblings (*Salvelinus alpinus*) und des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) wurden *Myxobolus farionis* und *Myxobolus neurobius* oft fälschlicherweise als *Myxobolus cerebralis* diagnostiziert (GONZALEZ-LANZA und ALVAREZ-PELLITERO, 1984; MALONEY et al. 1991). *Myxobolus squamalis* ist in den Schuppen der Regenbogenforellenbrut (*Oncorhynchus mykiss*) zu finden (IVERSEN, 1954). *Myxobolus insidiosus* sammelt sich in der Muskulatur der Cutthroatforelle (*Oncorhynchus clarki*), des Königslachses (Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha*) und des Coholachses (*Oncorhynchus kisutch*) an (WYATT und PRATT, 1963; WOOD, 1968).

2.7. Prophylaxe

Die erste Maßnahme in einem von der Drehkrankheit betroffenen Betrieb ist die Vernichtung und unschädliche Beseitigung aller mit *Myxobolus cerebralis* infizierten Fische, um eine Verbreitung einzudämmen (SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al. 1962). Die wichtigste prophylaktische Maßnahme besteht zunächst darin, dass die Betriebe, die nachweislich frei vom Drehkrankheitserreger sind, keine Setzlinge aus fremden Teichwirtschaften oder aus natürlichen Gewässern einsetzen dürfen, um eine Einschleppung der Drehkrankheit zu verhindern (SCHÄPERCLAUS, 1931; HALLIDAY, 1974). WOLF und MARKIW (1982) empfahlen als drastische Maßnahme, alle infizierten Fische zu schlachten und anschließend heiß zu räuchern, um die Sporen abzutöten. Das Räuchern von infizierten Fischen bei einer Erhitzung auf 70°C, während einer Dauer von 40 Minuten, brachte in 60 % der Proben eine Abtötung der Sporen, wogegen durch eine 10-minütige Erhitzung auf 90°C eine erfolgreiche Abtötung der gesamten (100 %) im Fischgewebe befindlichen Sporen erreicht werden konnte (HOFFMAN und MARKIW, 1977; WOLF und MARKIW, 1981).

Hinzu kommt, dass die Fischzucht dazu übergeht, keinen potentiell verseuchten Schlamm mehr zu nutzen und so die Fischzucht frei von Parasiten zu halten. Wichtig sind ferner eine absolut wassergetrennte Aufzucht aus Beton- bzw. Kunststoffrohren oder -rinnen und die Versorgung mit sauberem Wasser. Durch Einsatz von Plastikfolien in Erdteichen oder Ausbetonierung der Anlage soll die Vermehrung der Tubificiden verringert oder komplett unterbunden werden. In Wassereinzugsgebieten kann der Einsatz von Schwimmkäfigen für

Literatur

empfängliche Forellen als vorbeugende Maßnahme in Betracht gezogen werden (HNATH, 1970; HORCH, 1987). Man sollte die Forellenbrut erst ab 5-13 cm Länge (entspricht einem Alter von 4 - 8 Monaten) von *M. cerebralis*-freien Zuchtbetrieben beziehen. In diesem Alter sind die Ossifikationsprozesse des Schädels bereits so weit fortgeschritten, dass die noch verbliebenen Knorpelanteile von den Parasiten zwar noch als Zielgewebe aufgesucht werden können, aber bei der Pathogenese der Drehkrankheit keine Rolle mehr spielen (HOFFMAN 1961; HALLIDAY 1976; HOFFMAN 1976; WOLF 1986; LOM 1987; SCHÄPERCLAUS 1991 ; RYCE et al. 2005).

2.8. Bekämpfung

Die Beseitigung von *M. cerebralis* ist in Bruthäusern und bei Gerätschaften zwingend notwendig, wenn die Drehkrankheit dort auftritt. Als Desinfektionsmittel stehen u. a. Lösungen aus Natriumhydroxid, Calciumoxid (Ca(OH)_2) und Calciumhydroxid zur Verfügung (HOFFMAN und PUTZ, 1969). Neben Calciumhydroxid ist unter bestimmten Voraussetzungen auch die Anwendung von Calciumoxid möglich. Kaliumhydroxid (KOH, Ätzkali) ist ein Mittel zur Wasserdesinfektion, das aufgrund seiner vielen Vorteile in immer mehr Applikationen angewandt wird (YASUTAKE und WOOD, 1957; USPENSKAYA, 1957; LEWIS und SUMMERFELT, 1964). Seine Wirkung ist stärker und vor allem Myxosporea werden abgetötet (HOFFMAN und HOFFMAN, 1972). Nach 30-minütiger Anwendung von Calciumhypochlorit Ca(OCl) im Teich wurde keine Infektion der Fische mehr festgestellt (HOFFMAN und O'GRODNICK, 1977). Kalkstickstoff (TACK 1951) und 5%iger Chlorkalk (Ca(OCl)_2) wurden zur Wasserdesinfektion in Bruthäusern und an Gerätschaften eingesetzt, um die Krankheit einzudämmen (SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al. 1962). Ihre Verwendung in Bruthäusern ist nicht unproblematisch, da die zu dosierenden Mengen sehr genau berechnet werden müssen. Die Desinfektionsdauer von Wasserstoffperoxid (10% H_2O_2) beträgt nur etwa 10 Minuten. Das alkalische Milieu bewirkt eine Ausstülpung der Polfilamente aus den Polkapseln der Spore und damit verbunden einen Verlust ihrer Infektiosität (PLEHN, 1904; HOFFMAN und HOFFMAN, 1972).

Die Dekontamination des zulaufendem Wasser mittels eines Filters (25 μm Durchmesser) hat sich als wirksam erwiesen (HOFFMAN et al. 1962; HOFFMAN 1974).

Literatur

Die Effektivität eines Sandfilters wurde kürzlich bestätigt (NEHRING et al. 2003; ARNDT und WAGNER, 2004). Weitere prophylaktische Möglichkeiten bestehen in der Filtrierung und UV-Bestrahlung des zufließenden Wassers. Der Einsatz von UV-Strahlen zur Dekontamination von fließendem Wasser bietet eine Reihe von Vorteilen. Das Verfahren ist sehr umweltfreundlich und für den Aufbereitungsprozess sind keine Chemikalien wie Chlorkalk notwendig; außerdem behält das Wasser seine natürliche Zusammensetzung. Bei der UV-Desinfektion wird das zu desinfizierende Wasser mit einer Leistung von 3500 Microwatt/sec/cm² nach Filtration mittels eines 25 µm-Filter bestrahlt und dadurch eine 100 %ig sichere *Myxobolus cerebralis*-Abtötung erreicht (HOFFMAN, 1974; HOFFMAN, 1975; HEDRICK et al. 2000). Das Verfahren der elektrolytischen Wasserdessinfektion nutzt eine elektrische Ladung von 1 – 3 kV ein bis 25 mal mit 99 µsec/Puls, die auf *M. cerebralis* eine abtötende Wirkung hat (PUTZ, 1969). Über Wiederbesiedlung mit spezifischen pathogenfreien Setzlingen besonders resistenter Zuchtlinien und durch die Beseitigung von Oligochaeten-Populationen könnte der Befall der Fische in den Gewässern reduziert werden (NOGA, 1996; YOKOYAMA, 2003).

2.9. Therapie

In der Prophylaxe der Drehkrankheit kamen verschiedene Chemotherapeutika zum Einsatz. GUSTAFSON und O'GRODNICK testeten im Jahr 1973 zehn verschiedene Medikamente und befanden das Amprolium als sehr wirksam und dazu geeignet, die Sporenanzahl bei Versuchsfischen zu verringern. Allerdings zeigte diese Substanz auch eine hohe Toxizität. Amprolium ist ein Struktur analog von Thiamin (Vitamin B1), das gegen Schizontenstadien von Kokzidien Wirkung zeigte. Eine Studie von TAYLOR et al. (1973) konnte die Wirksamkeit von Furazolidon belegen. Auch das Malariamittel Proguanil und ein Mittel gegen Darmamöben (Clamoxyquin) waren in der Lage, die Sporenanzahl bei geringen Nebenwirkungen zu vermindern (ALDERMAN, 1986). Die besten Ergebnisse brachte die Verfütterung von Furazolidon in einer Dosierung von 152-194 mg pro kg Fischmasse gegeben über ein Jahr. Allerdings war der Zuwachs dann um rund 50 % verringert. Im selben Jahr machten TAYLOR et al. (1973) ebenfalls einen Versuch mit fünf verschiedenen Medikamenten. Nach elf Monaten oraler Aufnahme von Furazolidon über das Fischfutter konnte eine signifikante Reduktion der Sporenanzahl im Schädelskelett des Fisches gezeigt

Literatur

werden. Zu der Bekämpfung der Drehkrankheiten versuchte ALDERMAN (1986) die fünf Stoffe Cycloguanil, Proguanil, Clamoxyquin, Bialmicol und Acetrasol zu vergleichen. Seine Untersuchungen zeigten, dass nur zwei gut abgeschnitten, nämlich Proguanil und Clamoxyquin, die eine gute Wirkung bei geringen Nebenwirkungen zeigten. Fumagillin ist ein Antibiotikum, das von einem saprophytischen Schimmelpilz (*Aspergillus fumigatus*) produziert wird. Er wurde ursprünglich zur Therapie gegen *Nosema apis* bei Bienen eingesetzt (KATZNELSON und JAMIESON 1953). Bei Fischen wurde Fumagillin erstmals bei Japanischen Aalen (*Anguilla japonica*) gegen die Microsporea-Arten *Glugea pelcoglossi* und *Pleisophora abguillarum* eingesetzt (KANO und FUKUI, 1982). EL-MATBOULI und HOFFMANN (1991) setzten erstmals Fumagillin zur Bekämpfung der Drehkrankheit ein. Bei Gabe von 1g/kg pro Tag über das Futter, konnte die klinische Erscheinung nach 50 Tagen von 100 % auf 3 % reduziert werden. EL-MATBOULI und HOFFMANN (1991) stellten fest, dass durch Applikation dieses Medikamentes die Entwicklung von *M. cerebralis* im Fisch unterbrochen wird. Bei den Überdosierungen waren Nebenwirkungen in Form von Nierenschäden und einer erhöhten Infektanfälligkeit zu beobachten. Eine orale Behandlung mit Fumagillin über einen Zeitraum von zwei bis sechs Wochen zeigte nach klinischen und histologischen Untersuchungen gute Ergebnisse (LUZT 1992; HEDRICK et al. (1988) und LAUREN et al. (1989) berichten, dass das Fumagillin an den Sporen von *M. cerebralis* zu deutlichen morphologischen Veränderungen führt. SCHOTT (2002) untersuchte in seiner Arbeit sowohl Fumagillin als auch ein semisynthetisches Analogon von Fumagillin (TNP-470) auf Wirksamkeit gegen *M. cerebralis*. Nach zehn Tagen Behandlung mit TNP-470 wurde die klinischen Befallshäufigkeit um 55 %, die Mortalität um 3,2 % und die Sporenanzahl pro Schädelhälfte um 63 % reduziert. Bei der histologischen Untersuchung der inneren Organe wurden Nebenwirkungen von TNP-470 in der Leber und in der Niere festgestellt. Die rasterelektronmikroskopische Untersuchung von *Myxobolus cerebralis*-Sporen zeigte, dass die Oberflächen der Schalen nicht mehr kugelförmig waren und erkennbare Perforationen, Vertiefungen und Rillen aufwiesen. Weder TNP-470 noch Fumagillin sind in der Lage, die Entwicklung von *M. cerebralis* vom Amöboideikum in der Epidermis zur Spore im Knorpelgewebe vollkommen zu verhindern.

2.10. Verbreitung der Drehkrankheit in den USA

In den Vereinigten Staaten von Amerika wurden die Ausbrüche der Krankheit erstmals 1956 beim Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) in Staat Pennsylvania entdeckt (HOFFMAN, 1962; GRAFF, 1996). Nach der Einschleppung aus Europa hat sich die Krankheit immer schneller verbreitet und schließlich die einheimische amerikanische Salmonidenpopulation in 22 US-Staaten der USA erreicht: Nevada 1966, New Jersey 1968, Kalifornien 1966, New Mexiko 1987, Colorado 1987, New York 1984, Connecticut 1961, Ohio 1970, Idaho 1960, Oregon 1986, Maryland 1995, Massachusetts 1966, Utah 1991, Michigan 1968, Virginia 1965, Montana 1994, Washington 1996, West Virginia 1969, New Hampshire 1981, Wyoming 1988, Arizona 2000 und Nebraska 2001 (BARTHOLOMEW und RENO, 2002). Nach den letzten Meldungen wurden neue Fälle der Drehkrankheit auch im berühmtesten Lachsgebiet Alaska (2006) gemeldet.

Der Fliegenfischertourismus im Staat Colorado spielt eine sehr wichtige wirtschaftliche Rolle für diese Region, etwa eine ebenso große wie die gewerbliche Fischerei. Im Jahr 1993 versetzte die Drehkrankheit jedoch die Staaten Colorado und Montana an den Rocky Mountains aufgrund einer statistischen Untersuchung in Alarmbereitschaft. Es wurde ein starker Rückgang der Regenbogenforellenpopulationen von bis zu 90% im Madison River und im Colorado festgestellt und den heimischen Braunforellen drohte ebenfalls eine Dezimierung (WALKER und NEHRING, 1995; VINCENT, 1996). Im Staat Colorado konnte in 13 von 15 untersuchten Flusslaufsystemen, vor allem Colorado, South Platte, Gunnison, Arkansas und Rio Grande, die Drehkrankheit identifiziert werden (NEHRING und WALKER 1996). Wegen dieser bedrohlichen Situation setzten die Behörden des Staates Kalifornien von 1965 bis 1984 auf radikale Maßnahmen in mehreren Betrieben, Seen und Flüssen der betroffenen Gebiete. Insgesamt 660.000 kg Fisch und fast 2.300.000 Brütlinge wurden vernichtet, um die Ausbreitung der Krankheit einzudämmen (MODIN, 1998). Der Staat Oregon zog in gefährdeten Wassereinzugsgebieten den Einsatz von Schwimmkäfigen für empfindliche Forellen als vorbeugende Maßnahme in Betracht; im Staat Colorado wurden die betroffenen Zuchtstätten unter Quarantäne gestellt (HNATH 1970,1988; BALADWIN, 2000; HINER und MOFFITT, 2001; ENGELKING, 2002; STATON et al. 2002; WAGNER 2002; SCHISLER und KEHMEIER, 2003).

Literatur

Die Bekämpfung der Schlammröhrenwürmer (*Tubifex tubifex*) stellte sich als schwierige Maßnahme dar. Als eine Möglichkeit zur Bekämpfung von *Tubifex tubifex* wird der Einsatz von Chemikalien (z.B. Bayluscid® Molluskizid (0,3 mg/l Wasser)), die eine Reduktion zwischen 73 - 82% erreichen können, in Betracht gezogen (SCHÄPERCLAUS, 1990; KOWALSKI und BERGERSEN, 2003).

Für ein Forschungsprojekt im Bereich der Bekämpfung der Drehkrankheit hat die „National Partnership on the Management of Wild and Native Cold Water Fisheries“ im Jahre 1998 für 16 Forschungsprojekte in vier betroffenen Staaten insgesamt 535.000 Dollar bewilligt. Der Colorado Division of Wildlife (CDOW) investierte insgesamt 7,9 Millionen Dollar für die Modernisierung der betroffenen Forellenzuchten, um die Krankheit einzudämmen

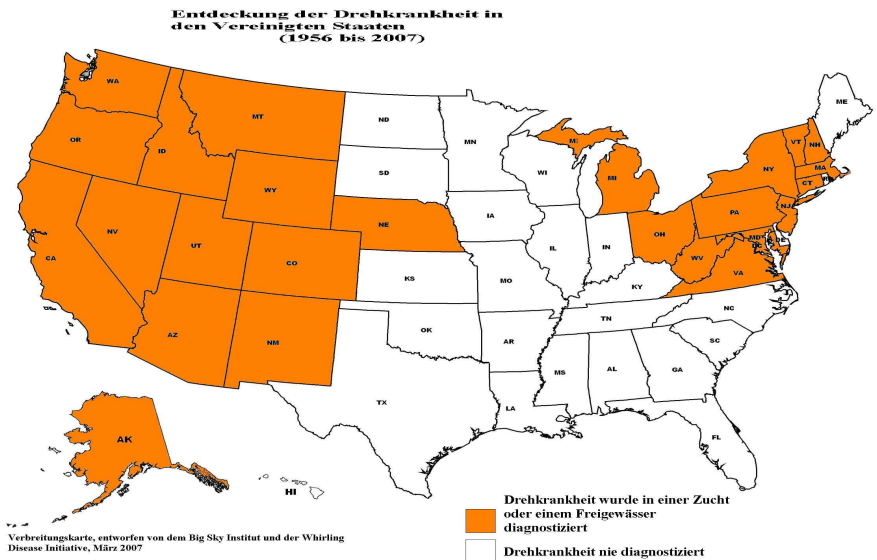


Abbildung 5: Verbreitung der Drehkrankheit in den USA (Big Sky und Whirling Disease Initiative, März 2007)

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Regenbogenforellen zur Gewinnung von *Myxobolus cerebralis*

Regenbogenforellen-Brütlinge (*Oncorhynchus mykiss*) wurden als Eier im Augenpunktstadium aus Fischzuchtanlagen in Bayern bezogen und im SPF-Raum des Instituts zum Schlüpfen gebracht.

Für die Arbeit wurden circa drei Wochen alte, als empfänglich geltende Regenbogenforellen-Brütlinge eines amerikanischen Zuchtstamms mit einer Körperlänge von $1,5 \pm 1,7$ cm und einem Gewicht von $0,5 \pm 0,6$ g verwendet.

Die Fische wurden in 73 Liter fassenden belüfteten Glasaquarien mit Wasserdurchlauf zwischen 1 - 3 l/min bei einer Wassertemperatur zwischen 9°C bis 14°C gehalten. Verwendet wurde chlorfreies Münchener Leitungswasser, das eine Wasserhärte von 16,4° dH aufwies. Einmal täglich erfolgte eine Fütterung mit handelsüblichem Fischtrockenfutter.

3.1.2. Fischmaterial zur Gewinnung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen

Zur Gewinnung von *Myxobolus cerebralis*-Sporen für die Infektion der Tubificiden wurden institutseigene, ca. drei Monate alte, drehkranke Regenbogenforellen mit einer Körperlänge von 4- 5 cm verwendet. Die Fische wurden in 200 l Plastiktonnen mit Durchfluss von entchlortem Leitungswasser gehalten und mit einem Kieselgurausströmer belüftet. Der Wasserdurchlauf betrug ca. 0,5 l pro min. und die Wassertemperatur lag bei ca. 12°C. Die Beleuchtung wurde auf einen Hell/Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden eingestellt. Täglich wurde mit handelsüblichem Forellenfutter gefüttert.

3.1.3. Haltung der parasitenfreien Tubificiden (*Tubifex tubifex*)

Zur Produktion von Triactinomyxon-Sporen für die Infektion der Fische wurden parasitenfreie Tubificiden der Art *Tubifex tubifex* verwendet. Die Oligochaeten wurden in einer 200 Liter fassenden Plastiktonne mit einem Wasserdurchlauf von ca. 0,3 l pro min. gehalten und mittels Kieselgurausströmer belüftet. Die Temperaturen schwankten zwischen

Material und Methode

ca. 8°C im Winter und bis zu fast 24°C im Sommer. Gefüttert wurde ca. drei mal pro Woche mit einer Mischung von Spirulina–Algen und zerkleinertem Salat.

3.1.4. Spezifische pathogenfreie SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblinge und SPF-Regenbogenforellen-Brut für die Infektion-sversuche mit *Triactinomyxon*-Sporen

Die für Infektionsversuche benötigten SPF-Spiegelkarpfen wurden als befruchtete Eier von einem Karpfenzuchtbetrieb bezogen. Die Koi-Karpfen wurden als befruchtete Eier von einem privaten Koi-Karpfenzuchtbetrieb und die Zebrabärblinge als befruchtete Eier von Institut für Wasserwirtschaft bezogen. Die Eier wurden im Institut bis zum Schlupf der Fische gehältert. Bis die Fische die für diese Arbeit notwendige Größe erreichten, wurden sie in Aquarien mit Belüftung bei einer Wassertemperatur zwischen 20°C und 22°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden gehalten. Die jungen Karpfen wurden mit Karpfenfutter in pulverisierter Form gefüttert, anfangs einmal täglich, später zweimal täglich.

3.2. Untersuchungsmethoden

3.2.1. Gewinnung von *Myxobolus cerebralis*-Sporen

Um die *M. cerebralis*-Sporen von drehkranken Regenbogenforellen zu gewinnen, wurden die Fische in einem Betäubungsbad (0,007 % MS 222 (Tricain-Methan-Sulfat; Thomson & Joseph Ltd., Norwich) betäubt und anschließend mittels Genickschnitt getötet. Den Fischen wurden mittels einer Pinzette die Augen entfernt und schließlich die Muskulatur von den Knorpelteilen abgetrennt. Die präparierten Knorpelteile wurden unter Zugabe von Wasser in einem Mixer (Fa. Moulinex®) zerkleinert. Die entstandene wässrige Knorpelsuspension wurde durch eine Gaze mit einer Maschenbreite von 200 µm filtriert um Gewebereste zu entfernen. Von der erhaltenen Suspension wurden jeweils 50 µl entnommen und auf einem Objektträger die darin enthaltenen Sporen bei 400-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Anzahl der Sporen im Gesamtvolumen der Suspension berechnet.

3.2.2. Infektion der Oligochaeten und Gewinnung der Triactinomyxon Sporen

Zur Produktion der Triactinomyxon-Sporen wurden ca. 20 g der Oligochaeten mit einem Sieb entnommen, mit Wasser gereinigt und in ein Becken mit einer 4 cm hohen Bodenschicht aus sterilisiertem Schlamm verbracht. Die Becken wurden in einem Brutschrank (Fa. Binder®) bei einer Temperatur von 8,1°C und Belüftung gelagert. Die Fütterung erfolgte drei mal pro Woche mit Spirulina und zerkleinertem Salat. Jede Woche wurde ein Wasserwechsel durchgeführt, um eine gute Versorgung der Oligochaeten zu gewährleisten.

Vor Zugabe der *M. cerebralis*-Sporensuspension wurde das Wasser in den *Tubifex*-Becken auf ca. 1/3 der ursprünglichen Menge reduziert. Nach der Zugabe der Sporen wurde langsam der ursprüngliche Wasserpegel wieder hergestellt. Ab dem dritten Monaten post-infectionem wurde alle vier Tage eine Filtration des Wassers der Becken durch Siebe einer Maschenweite von 20 µm durchgeführt. Die im Sieb zurückgehaltenen Sporen wurden mit Leitungswasser aus- gespült und aufgefangen. Von 100 ml erhaltenem Sporenkonzentrat wurden 50 µl in einen Objektträger verbracht. Die Auszählung der Sporen erfolgte bei 100-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss. Anschließend wurde die Gesamtmenge der im Becken enthaltenen Sporen hochgerechnet.

3.2.3. Infektionsversuche mit den SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraärblingen und der SPF-Regenbogenforellen-Brut mit Triactinomyxon-Sporen

Um artbedingte Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem Parasiten festzustellen, wurden Infektionsversuche mit vier verschiedenen Fischarten: SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraärblingen und SPF-Regenbogenforellen-Brut durchgeführt. Eine Woche vor der Exposition wurden ca. 100 Fische von jeder Gruppe in belüftete und mit einem Außenfilter versehene 70 Liter Aquarien eingesetzt. Die Wassertemperatur lag bei 14°C für die Regenbogenforellen-Brut und bei 21°C bis 22°C für die SPF-Karpfen, Koi-Karpfen und die Zebraärblinge. Die Becken wurden täglich kontrolliert. Bei diesem Versuchsvorhaben wurden SPF-Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraärblinge und SPF-Regenbogenforellen-Brut, die zu diesem Zeitpunkt etwa 2-3 cm lang waren und ein durchschnittliches Gewicht von 1,2 g hatten, verwendet. Die Brütlinge wurden in einem Plastikgefäß für 3 Stunden gegenüber 5000 TAM-Sporen/Fisch exponiert. Zur Erhöhung der Infektionsfähigkeit der Sporen wurde der

Material und Methode

Kieselgurausströmer erst nach 30 Minuten wieder eingesetzt. Nach Ablauf von drei Stunden Exposition wurden die Fische aus dem Plastikgefäß entnommen, gemessen und gewogen und in 70 Liter Glasaquarien unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in Leitungswasser und mit geringem Wasserdurchlauf und Belüftung gehalten.

Die Wassertemperatur betrug 14 °C für die Regenbogenforellen und 22°C für die anderen Fische. Nach der Exposition wurden Wasserproben aus dem Infektionsbad entnommen, um zu kontrollieren, ob die Triactinomyxon-Sporen durch schwimmende Fische zum Ausschleudern ihrer Polfilamente und Freigeben des Amöboidkeimes angeregt wurden. Die Triactinomyxon-Sporen wurden im Wasser mikroskopisch untersucht und ausgezählt, um eine erfolgreiche Infektion zu beurteilen. Nach 5 min, 60 min, 4, 6, 8, 12, 18 h und 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 60, 80, 120, 150 Tagen post expositionem mit Triactinomyxon-Sporen wurden jeweils 20 Fische entnommen und mit 0,007 % MS 222 (Tricain-Methan-Sulfat; Thomson & Joseph Ltd., Norwich) betäubt und mittels Genickschnitt getötet.

Mit einem sterilen Skalpell wurde die Rückenflosse abgetrennt und danach der Kopf sagittal in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde in 5%igem Formalin fixiert. Die zweite Hälfte des Kopfes, sowie ein Teil der Rückenflossen und der Kiemen wurden für die molekularbiologische Untersuchung mittels PCR eingefroren. Die Entnahme der Fische erfolgte jeweils zur gleichen Uhrzeit. Als Kontrolle wurden 20 weitere Versuchstiere von jeder Gruppe in triactinomyxonsporen-freiem Wasser entsprechend der Infektionsgruppe gehältert.

3.2.4. Infektionsschema der Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrlingen und Regenbogenforellen mit Triactinomyxon-Sporen

Infektionsbecken-Nr 1: 40 befruchtete Eier von Karpfen wurden mit 325.000 Triactinomyxon-Sporen / 500ml (Plastikgefäß) zusammengebracht.

Infektionsbecken-Nr 2: 40 befruchtete Eier von Koi-Karpfen wurden mit 325.000 Triactinomyxon-Sporen / 500 ml (Plastikgefäß) zusammengebracht.

Infektionsbecken-Nr 3: 40 befruchtete Eier von Zebraäbrlingen wurden mit 325.000 Triactinomyxon-Sporen / 500 ml (Plastikgefäß) zusammengebracht.

Infektionsbecken-Nr 4: 40 befruchtete Eier von Regenbogenforellen wurden mit 325.000 Triactinomyxon-Sporen / 1000 ml (Plastikgefäß) zusammengebracht.

Material und Methode

Die befruchteten Eier wurden nach drei Stunden aus einem Plastikgefäß entnommen und in das mit *Triactinomyxon*-Sporen befüllte Aquarium umgesetzt. Die befruchteten Eier blieben in diesem Aquarium dann 3 Tage lang bis zum Schlupf. Danach erfolgte die Probenahme für die PCR und die histologische Untersuchung der befruchteten Eier und der Brütlinge.

3.2.5. Beobachtung der klinischen Symptome

Die tägliche Allgemeinuntersuchung wurde unter Berücksichtigung von Ernährungszustand, Haltung und Wassertemperatur für alle infizierten Fische durchgeführt. Ab dem 5. Tage nach der Infektion wurden alle Brütlinge auf beginnende Symptome der Drehkrankheit untersucht und dokumentiert. Die folgenden drei Hauptsymptome der Drehkrankheit wurden erfasst: Störungen der Bewegungskoordination, typische Drehbewegungen der erkrankten Fische, Gleichgewichtsstörungen, Wirbelsäulenverkrümmung, Schwanzverkrümmungen, schwarze Verfärbung des Schwanzteiles.

3.2.6. Post-mortem-Untersuchungen

3.2.6.1 Histologie des Kopfnorpels

Ab dem 50 und 150 Tage nach der Infektion wurden die Versuchsfische mit MS 222 (0,007 %) betäubt und mit einem Genickschnitt getötet. Mit einem sterilen Skalpell wurde der Kopf sagittal in zwei Hälften geteilt und eine Hälfte anschließend in 5 %-igem Formalin 48 Stunden im Kühlschrank gelagert. Die zweite Hälfte des Kopfes wurde für die molekularbiologische Untersuchung mittels PCR bei -20°C eingefroren. Die fixierten Proben wurden mit einem Autotechnicon-Gerät (TissueTek® Vip) entwässert, in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms (Modell 1140/Autocut, Fa. Reichert-Jung®) wurden pro Block 30 4,0 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte lichtmikroskopisch auf Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* untersucht. Die Beurteilung der so vorbereiteten Proben erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Firma Zeiss®). Farbmikrophotographien wurden angefertigt, wobei als Filmmaterial Ektachrom T 64 (Fa. Kodak) verwendet wurde.

Material und Methode

Die histopathologische Beurteilung der durch die Sporenbildung hervorgerufenen Veränderungen der Kopfnorpelstrukturen bei den jeweils 20 untersuchten Tieren aus jeder Gruppe erfolgte nach der numerischen MacConnell-Baldwin-Skala von Grad null bis fünf gegliedert und findet sich im Standard Protocol for Whirling Disease Research (BARTHOLOMEW et al. 2001). Sie orientiert sich an der Qualität und Quantität der Wirtsreaktion wie folgt:

- 0) Keine Abnormalitäten.
- 1) Ein oder mehrere kleine Herde der Knorpeldegeneration. Keine oder nur wenig Leukozyten assoziiert.
- 2) Einzelner, lokal ausgedehnter Bereich oder einzelne kleinere Bereiche der Knorpeldegeneration und Nekrose. Entzündungsgeschehen ist lokalisiert, wenig bis gemäßigte Anzahl Leukozyten infiltrieren bzw. umsäumen den lytischen Knorpel.
- 3) Multifokale Knorpeldegenerationen (3 - 4) und Nekrose. Einige Leukozyten assoziiert mit lytischem Knorpel. Bereiche mit Entzündungszellen dehnen sich leicht ins umliegende Gewebe aus.
- 4) Multifokale (4 oder mehr) bzw. zusammenfließende Bereiche der Knorpelnekrose Mäßige, bis große Anzahl an Leukozyten umgibt bzw. infiltriert den lytischen Knorpel.
Lokal ausgedehnte Bereiche mit Leukozyten infiltrieren das umliegende Gewebe.
- 5) Multifokale (6 oder mehr) bzw. zusammenfließende Knorpelnekrosen. Mäßige bis große Anzahl von Leukozyten umgeben bzw. infiltrieren nekrotischen Knorpel.
Die Entzündungsreaktion ist ausgedehnt und Leukozyten dringen tief in umliegendes Gewebe ein. Diese Klassifizierung ist charakterisiert durch den Verlust der normalanatomischen Knorpelarchitektur und nur bei stark betroffenen Tieren zu finden. In zweifelhaften Fällen wird Grad vier bevorzugt.

Material und Methode

3.2.6.2 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung von Fischepidermisproben wurde auf eingedrungene Amöboidkeime nach Ablauf der Exposition durchgeführt. Nach einer drei stündigen Expositionzeit wurden 20 Fische jeder Gruppe aus dem Infektionsbad entnommen und durch Genickschnitt getötet. Für die histologischen Untersuchungen wurde die Rückenflosse sagittal in zwei Hälften geteilt und in 5 %igem, gepufferten Formalin fixiert. Nach 48 Stunden wurden die fixierten Proben mit einem Autotechnicon-Gerät (TissueTek® Vip) entwässert, in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms (Modell 1140/Autocut, Fa. Reichert-Jung®) wurden pro Block 30 4,0µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die vorbereiteten Schnitte lichtmikroskopisch auf eingedrungene Amöboidkeime untersucht.

Von den Fischen wurden jeweils die Schwanzflossen und ein Stück Haut entnommen und 48 Stunden in Formalin (5 %) fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Paraffinblöcke. Mit einem Rotationsmikrotom (Firma Reichert-Jung®, Modell 1140/Autocut) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad bei +40°C gestreckt und auf Objektträger aufgezogen, zunächst bei Raumtemperatur gelagert und über Nacht im Trockenschrank bei +60°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt und mit Eukitt eingedeckt. In histologischen Schnittpräparaten färben sich die eingedrungenen Amöboidkeimzellen der Triactinomyxon-Sporen mit HE-Färbung blaurot und sind unter einem Lichtmikroskop (Firma Zeiss®) erkennbar.

3.2.6.3 Entwässerung der Gewebeproben

Die Proben werden entnommen und für mindestens 24 bis 48 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend werden sie in Kapseln überführt, welche wieder in Formalin gelegt werden. Die Entwässerung, Reinigung und Einbettung in Paraffin wurden mit einem Autotechnicon-Gerät (TissueTek® Vip) durchgeführt.

Material und Methode

3.2.6.4 Herstellung der Paraffinschnitte

Nach der Anfertigung des neuen Gewebeblocks wurde der Block in einer Gießform für fünf Minuten auf 50°C erhitzt um eine bessere Haftung der Stenzen im neuen Paraffinblock zu ermöglichen. Die Gewebelöcke wurden mit der Plastikunterlage so in das Mikrotom gespannt, dass der applikatornahe Teil messerwärts ausgerichtet war. Für die Herstellung der 4–5 µm dicken Paraffinschnitte wurde mittels eines Mikrotom (Reichert-Jung®, Modell 1140/Autocut) verwendet und pro Block 30 Schnittpräparate angefertigt. Die Schnittpräparate wurden mit Hilfe zweier feiner Pinsel von dem Mikrotommesser abgenommen und in ein Wasserbad bei ca. +40°C unter dem Schmelzpunkt des Einbettmediums gelegt. Anschließend wurde das Präparat blasenfrei auf Glasobjektträger (Super Frost Plus Objektträger) aufgezogen. Die fertigen Schnitte wurden 24 - 36 Stunden im Brutschrank bei + 58°C getrocknet und anschließend gefärbt.

3.2.6.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung - Prinzip

Die entparaffinierten und hydrierten Schnittpräparate wurden nach der Färbung in Hämalaun durch Spülen mit Leitungswasser gebläut, was die typisch blaue Farbe der Zellkerne erzeugt, die Rotfärbung des Zytoplasmas erfolgt mit einem sauren Farbstoff (Eosin). Zugleich bedeutet dieser Vorgang eine Fixierung der Färbung, da Hämalaun bei höherem pH-Wert schlechter löslich ist. Der saure Plasmafärbstoff Eosin Y bindet durch elektrostatische Wechselwirkungen an Gewebe und färbt dieses in verschiedenen rötlichen Tonabstufungen. Alle entparaffinierten und hydrierten Schnittpräparate wurden zunächst histologisch in der HE-Färbung beurteilt. Ein Schnitt wurde als positiv gewertet, wenn durch die HE-Färbemethode wenigstens ein typisches Entwicklungsstadium von *M. cerebralis* im Präparat entdeckt worden war.

Material und Methode

3.2.6.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.6.6.1 DNA-Extraktion

Die zweite Hälfte der entnommenen Proben wurde mit PCR untersucht. DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert. Es wurden zwischen 20 und 30 mg Gewebe entnommen und verarbeitet. Nach dem Extraktionsprotokoll des Herstellers wurden zunächst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1mg/ml) zur Gewebeprobe gegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend für mindestens drei Stunden oder über Nacht zum Gewebeaufschluss bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer, wurde das Reaktionsgefäß für zehn Minuten bei +70°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Gemisch auf eine Qiagen-Extraktionssäule pipettiert. Diese besteht aus einer Matrix aus Silikat, welche die DNA unter bestimmten Pufferbedingungen bindet. Bei 8000 rpm wurde die Extraktionssäule und das dazugehörige 2 ml Auffanggefäß für eine Minute zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde gewechselt und das abzentrifugierte Eluat verworfen. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden 500 µl Waschpuffer AW 1 auf die Säule pipettiert, für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und das Auffanggefäß gewechselt. Dann wurden 500 µl Waschpuffer AW2 auf die Säule pipettiert und für drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur anschließenden Elution der gewonnenen DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt, 50 µl AE-Puffer dazugegeben, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach einen Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Aufbewahrung der DNA-Lösungen bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank.

3.2.6.6.2 Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel

Herstellung Gel-Elektrophorese

Die durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Agarose-Gels getrennt. Zur Herstellung eines 1,2% -igen Agarose-Gel wurden 0,96 g Agarose in 80 ml 1x TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle kurz aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa + 40°C in

Material und Methode

eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Durch das Einsetzen eines Gelkammes mit 11-er Kämmen bildeten sich nach dem Gelieren der Agarose Geltaschen. Nach Zugabe von 6 µl Ethidiumbromidlösung in das noch flüssige Agarose-Gels wurde es für ca.30 Minuten bis zum vollständigen Erstarren stehen gelassen. Nach Verfestigung des Gels wurde es mit TAE-Puffer befüllt und der Kamm gezogen. Die 6 µl DNA Proben wurden in die Probenaschen des Gels pipettiert. Für die Größenbestimmung der DNA wurden 4 µl Standardmarker (50-100 bp DNA-Ladder Reddy Run Super ladder, Fa. ABGene®, UK) verwendet. Die anschließende Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 Volt bei 30 Minuten Laufzeit durchgeführt. Nach hinreichender Auftrennung der DNA-Banden wurden diese mittels einer Geldokumentationsanlage analysiert. Als positiv wurden die Proben bezeichnet, deren Banden auf Höhe der Bande der Positivkontrolle lagen und die anhand des Größenstandards die richtige von den verwendeten Primern abhängige Größe des DNA-Fragmentes aufwiesen.

3.2.6.6.3 Nachweis von *M. cerebralis* mittels Nested-PCR

Eine Nested-PCR basiert auf dem Prinzip zweier ineinander verschachtelter Polymerase-Kettenreaktionen. Aus der Zielsequenz der ersten PCR wird in der zweiten, der so genannten Nested-PCR, eine Sequenz aus dem ersten PCR-Produkt amplifiziert. Dies stellt eine Möglichkeit zur Steigerung der Sensitivität, aber auch der Spezifität der PCR-Untersuchung dar. Diese arbeitet mit zwei Primerpaaren, wobei die Bindungstellen des zweiten Paares auf der vom ersten Primerpaar amplifizierten Sequenz liegen. Unspezifische Produkte werden im zweiten PCR-Durchlauf durch das zweite Primerpaar weitgehend ausgeschaltet.

In dieser Arbeit wurde die *M. cerebralis*-spezifische Nested-PCR nach ANDREE et al. (1998) durchgeführt. Das speziesspezifische Primerpaar basiert auf einem repetitiven, 423 bp großen Fragment aus dem *M. cerebralis*-Genom.

Alle Ansätze für die Herstellung des PCR-Mastermix erfolgten unter einer Sterilwerkbank in einem abgetrennten Raum. Die PCR galt als positiv, wenn ein Produkt der erwarteten Größe im Gel (415 bp) dargestellt werden konnte.

Material und Methode

3.2.6.6.4 Primer und amplifiziertes Fragment für First-Round

Die Primerpaare wurden von der Firma MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Primerpaare der *M. cerebralis* spezifischen one-step-PCR detektieren ein 415 bp großes Fragment.

In Tabelle 4 und 5 sind die Primer und Komponenten, in Tabelle 6 das Temperatur-Zeit-Zykluszahl-Profil der *M. cerebralis* one-step-PCR bzw. der second round der Nested PCR entsprechend ANDREE et al. (1998) aufgeführt. Als Template-DNA wurde in der zweiten PCR 1 µl des Amplifikationsproduktes der ersten round verwendet. Das Produkt der zweiten PCR war ein 1030 bp großes Fragment.

Tabelle 4 : Primerpaar der First-Round (ANDREE et al. 1998)

Die für das Primerpaar Tr 5–16 und Tr 3–16 benutzten Mastermixe sind in Tabelle 2 aufgeführt. In der ersten Reaktion wurde ein 1030 bp großes Fragment amplifiziert.

Primer	Sequenz 5'-3'
Tr 5–16	GCA TTG GTT TAC GCT GAT GTA GCG A
Tr 3–16	GAA TCG CCG AAA CAA TCA TCG AGC TA

Tabelle 5 : Reaktionsansatz und Konzentrationen der Reagenzien für die one-step-PCR (1 Schritt) nach (ANDREE et al. 1998)

Komponente	Volumen (µl)
Reddy-Mix™	17,9 µl
Primer Tr5-16	0,8 µl
Primer Tr3-16	0,8 µl
Proben-DNA	0,5 µl

Material und Methode

Tabelle 6: Im Verlauf der one-step-PCR und second round mit Temperaturen, Zykluszeiten und Anzahl von Zyklen nach ANDREE et al.(1998)

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Reaktionszyklen		
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	65°C	2,5 min
Elongation	72 °C	1,5 min
Ende Zyklus		
finale Extension	72 °C	10 min
Herunterkühlung bis zur Entnahme	4 °C	

Second round

In Tabelle 7 und 8 sind die Primer und Komponenten, in Tabelle 9 das Temperatur-Zeit-Zyklenzahl-Profil der *M. cerebralis* one-step-PCR bzw. der second round der Nested PCR entsprechend ANDREE et al. (1998) aufgeführt. Als Template-DNA wurde in der zweiten PCR 1 µl des Amplifikationsproduktes der ersten round verwendet. Das Produkt der zweiten PCR war ein 415 bp großes Fragment.

Tabelle 7: Primerpaar für die zweite PCR (ANDREE et al. 1998)

Primer	Sequenz 5'-3'
Tr 5-17	GCC CTA TTA ACT AGT TGG TAG TAT AGA AGC
Tr 3-17	GGC ACA CTA CTC CAA CAC TGA ATT TG

Material und Methode

Reaktionsparameter Temperatur, Zeit, Konzentration von Reddy-Mix

Als alternative PCR für die Etablierung des Nachweises von *M. cerebralis* wurde eine Nested-PCR (two-step PCR) nach ANDREE et al. (1998) beschrieben

Das speziesspezifische Primerpaar basiert auf einem repetitiven 415 bp großen Fragment aus dem *M.cerebralis*-Genom

Tabelle 8.: Komponenten des zweiten PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen (µl)
Reddy-Mix TM	17,9 µl
Primer Tr5-17	0,8 µl
Primer Tr3-17	0,8 µl
Proben-DNA	0,5 µl

Tabelle 9: Zeit, die Anzahl von Zyklen und die Temperatur der zweiten PCR (ANDREE et al. 1998)

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 Reaktionszyklen		
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	65 °C	2,5 min
Elongation	72 °C	1,5 min
Ende Zyklus		
finale Extension	72 °C	10 min
Herunterkühlung bis zur Entnahme	4 °C	

4. Ergebnisse

4.1. Postexpositionelle Überprüfung des Infektionserfolges

Der Expositionsversuch wurde mit konzentriertem Triactinomyxonsporen-haltigen Wasser durchgeführt. Für diese Dissertation wurden jeweils 500 ml gefiltertes Wasser (enthielt 550.000 Triactinomyxon-Sporen) verwendet. Die Untersuchung des Infektionsbads nach der Infektion gibt Auskunft, welche Anzahl Triactinomyxon-Sporen im Infektionsbad post expositionem ausgeschiedert haben, ihre infektiösen Amöboidkeimzellen verloren haben oder keine Polkapseln besitzen.

Die klinische Beurteilung des Infektionserfolges der Versuchsfische wurde anhand der folgenden Symptome durchgeführt: schnelle Bewegung der Kiemendeckel, Luftschnappen an der Wasseroberfläche, weißliche Schleimproduktion auf der Haut, Zucken bei Expositionsbeginn im Infektionsbad. Das genannte Zucken entsteht wahrscheinlich bei der Penetration der Parasiten in die Haut und konnte bei allen Brütlingen (Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraärblingen) beobachtet werden, wobei die Zebraärblinge augenscheinlich schwächer reagierten als die Fische der anderen Testgruppen.

Um einen ersten Hinweis auf den Erfolg der Infektion zu erlangen, wurden die Fische jeder Gruppe drei Stunden im sporenhaltigen Wasser exponiert (5.000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch).

Bei der Auszählung des Filtrats wurden unter dem Lichtmikroskop 100 Sporen auf das Vorhandensein ohne Amöboidkeim untersucht.

Nach drei stündiger Expositionszeit der Fische mit Triactinomyxonsporenhaltigen-Wasser in den beiden Versuchen wurden bei der mikroskopischen Betrachtung jeweils bei den verwendeten Triactinomyxon-Sporen der prozentuale Anteil von Sporen ohne Amöboidkeim ausgezählt (in Tabelle 10 dargestellte Ergebnisse).

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 10 zu ersehen ist, waren nach drei Stunden Expositionszeit keine gravierenden Differenzen im morphologischen Sporenaufbau in den beiden Versuchen festzustellen. Nach drei stündiger Expositionszeit wurden von jeder Gruppe 20 Fische entnommen und eine histologische Untersuchung der Epidermis nach penetrierten Parasitenstadien durchgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der Triactinomyxon-Sporen ohne Amöboidkeim nach 3-stündiger Expositionszeit

Becherglas	Karpfen	Koi-Karpfen	Regenbogenforellen	Zebraabärblinge
Erster Versuch	35%	33%	48%	38%
Zweiter Versuch	46%	39%	34%	41%

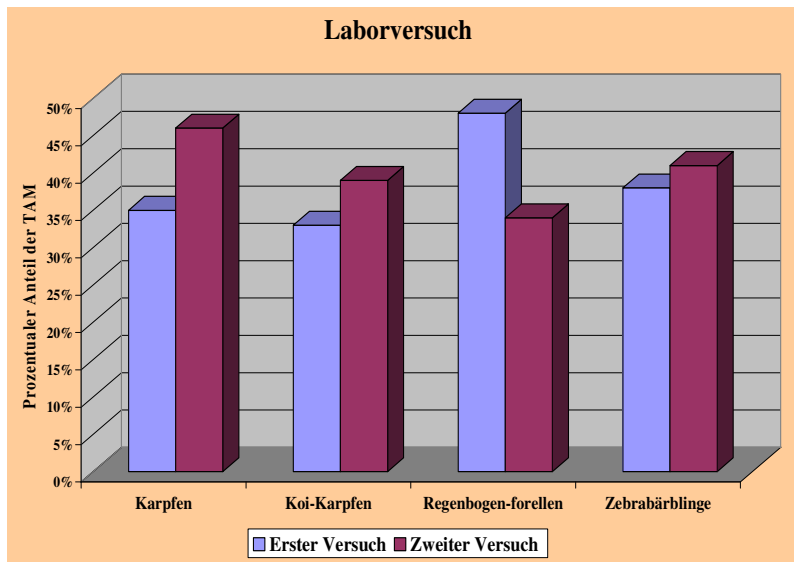


Abbildung 6: Prozentualer Anteil der Triactinomyxon-Sporen ohne Amöboidkeim nach 3-stündiger Expositionszeit

4.2 Histologische Untersuchung der Fischepidermis

Bei der histologischen Untersuchung wurden von den Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrblingen nach 5 Minuten, 4, 6, 8, 12 und 18 Stunden sowie nach 1, 3 und 5 Tagen post expositionem jeweils 20 Fische entnommen und je 30 HE-gefärbte Gewebeschnitte angefertigt und auf penetrierende Amöboidkeime hin untersucht. Um die Intensität der jeweiligen Infektionen in etwa vergleichen zu können, wurde die Anzahl der eingedrungenen Amöboidkeime in einem Schnittpräparat von Haut und Flossen auf einer Fläche von $7,502 \text{ mm}^2$ errechnet. Die Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* sind rund bis oval und haben einen Durchmesser von 2 bis $2,5 \mu\text{m}$. Beim Betrachten von einer Fläche von 1 Quadratzentimeter und bei 200- und 400-facher Vergrößerung konnten Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* entdeckt werden. Allerdings sind auf dieser Fläche (bei 1 Quadratzentimeter) im Durchschnitt nur wenige Entwicklungsstadien zu erwarten. Bisher gibt es keine veröffentlichte Untersuchung über die Dichte von Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* in der Haut (an der lateralen Körperseite) und den Flossen von Koi-Karpfen, Karpfen und Zebraäbrblingen. Von den Fischen der Kontrollgruppen (Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrblingen) wurden nach 5 Minuten, 4, 6, 8, 12 und 18 Stunden sowie nach 1, 3 und 5 Tagen post expositionem ebenfalls histologische Schnitte von Haut und Flossen angefertigt und ausgewertet. Bei je 30 untersuchten Schnitten von Kontrollgruppen wurden keine Amöboidkeimzellen in der Epidermis gefunden. Ergebnisse der histologischen Untersuchung und die durchschnittliche Anzahl der Entwicklungsstadien von *Triactinomyxon* auf einer Fläche von 1 cm^2 der Schwanzflossen zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme wurde in Tabelle 11 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 11: Ergebnisse der histologischen Untersuchung: Durchschnittliche Anzahl der Entwicklungsstadien von *Triactinomyxon* auf einer Fläche von 1 cm² der Schwanzflossen zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme.

Zeitpunkte	5 min	4h	6h	8h	12h	18h	1d	3d	5d
Regenbogenforellen	25,62	16,82	11,42	7,22	7,86	0,00	0,15	0,00	0,00
Karpfen	10,93	5,95	3,86	2,75	1,28	0,00	0,00	0,06	0,06
Koi-Karpfen	7,24	4,15	2,8	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Zebrabärblinge	6,93	3,73	1,48	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

5 Minuten post expositionem

Das in die Epidermis der Fische eingedrungene Sporoplasma der *Triactinomyxon*-Sporen ließ sich in der HE-Färbung gut darstellen. Bereits fünf Minuten nach Expositionsbeginn mit *Triactinomyxon* konnten zahlreiche Amöboidkeimzellen zwischen den Epithelzellen und von einem schmalen lytischen Hof umgeben festgestellt werden (Abbildung 7, 8, 9 und 10). Nach einer fünfminütigen Sporenexposition war die Anzahl der gefundenen Parasitenstadien in der Epidermis auf einer Fläche von 1 cm² bei Regenbogenforellen (25 Stadien) sowohl in der Epidermis der Schwanzflossen als auch der Haut (an der lateralen Körperseite) höher, während bei Karpfen (10 Stadien), Koi-Karpfen (7 Stadien) und Zebrabärblingen (6 Stadien) deutlich weniger zu erkennen waren. Die Amöboidkeimzellen in der Epidermis der Schwanzflossen bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebrabärblingen lagen kompakt, dunkelblau angefärbt und von rundlicher Gestalt zwischen den Epidermiszellen und waren voneinander abgegrenzt. Bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebrabärblingen wurden weniger eingedrungene Parasitenstadien in der Haut (an der lateralen Körperseite) festgestellt.

Unabhängig von der Fischart ist in der Epidermis der Schwanzflossen die durchschnittliche *Triactinomyxon*-Sporen-Dichte mit Abstand am höchsten. Generell ist in der Haut (an der lateralen Körperseite) eine geringere Konzentration von *Triactinomyxon*-Sporen auf einer Fläche von 1 cm² zu beobachten.

Ergebnisse

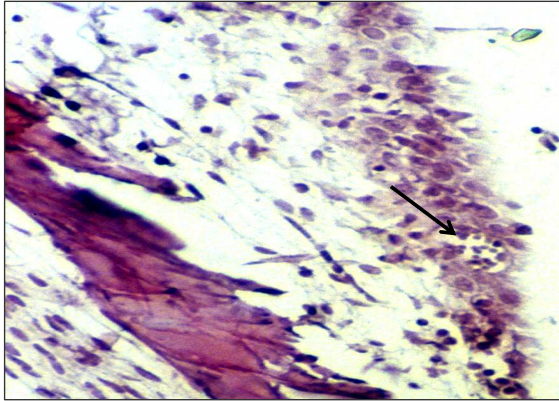


Abbildung 7: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 5 min nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 200-facher Vergrößerung

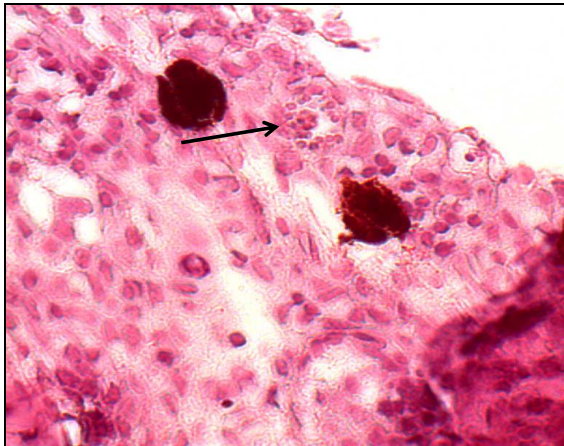


Abbildung 8: Regenbogenforellen; 5000 Triactinomyxon Sporen/Fisch; 5 min nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt intakt intrazellulär in den Epidermiszellen, HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

Ergebnisse

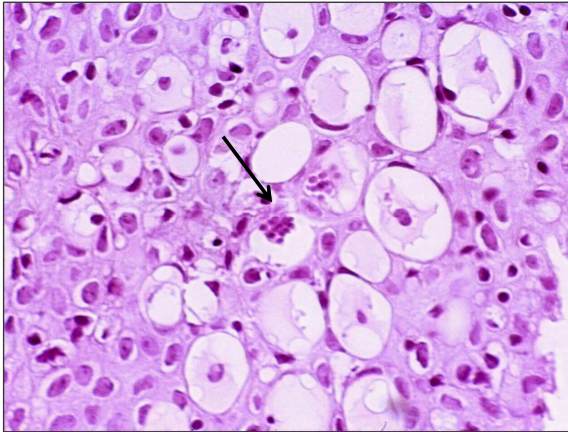


Abbildung 9: Koi-Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 5 min nach der Exposition; 2 Parasitenstadien liegen kompakt, intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

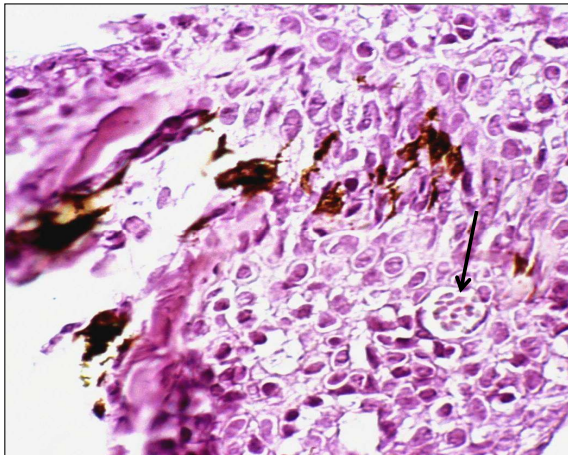


Abbildung 10: Zebraabärblinge; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 5 min nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 200-facher Vergrößerung

Ergebnisse

4 Stunden post expositionem

Bei den Regenbogenforellen waren nach 4 Stunden durchschnittlich 16 Parasitenstadien in der Epidermis der Flossen zu finden. Diese waren auf das gesamte Epithel verteilt, erreichten aber ihre höchste Dichte in den Flossenschnitten, vor allem der Schwanzflosse (Abbildung 12).

Bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen waren bei 20 beprobten Tieren durchschnittlich 4 Stadien von einander abgegrenzt in der Epidermis der Schwanzflossen zu beobachten, fast keine Stadien dagegen in der Haut (Abbildung 11, 13, 14).

Die Amöboidkeimzellen lagen dicht in der Epidermis in kleineren Verbänden von jeweils 8 bis 12 blassblau angefärbten rundlichen bis ovalen Zellen. Ihr Durchmesser betrug 2 bis 2,5 μm .



Abbildung 11: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

Ergebnisse

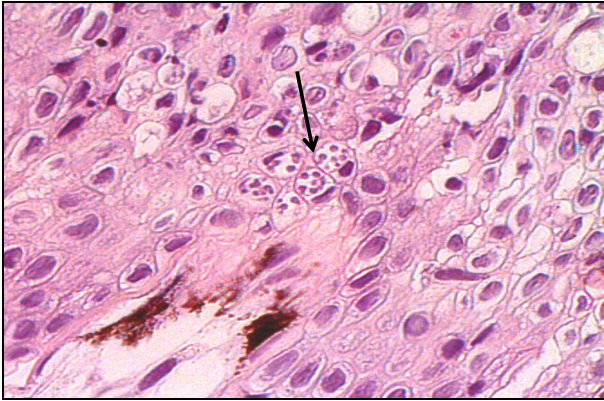


Abbildung 12: Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; 5 Parasitenstadien liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen, deren Kerne an den Rand verdrängt sind; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung



Abbildung 13: Koi-Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt kompakt, intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung



Abbildung 14: Zebraabrlinge; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt kompakt, intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

6 Stunden post expositionem

Bei den Regenbogenforellen waren nach 6 Stunden durchschnittlich 11 intakt erscheinende Parasitenstadien in der Epidermis von Schwanzflossen zu erkennen. Bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraabrlingen konnten bei je 30 histologischen Schnitten von 20 untersuchten Fischen durchschnittlich zwei Stadien in der Epidermis der Schwanzflossen entdeckt werden.

Bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraabrlingen wurde kein Befall mit Parasitenstadien in der Haut (an der lateralen Körperseite) festgestellt.

Bei den Regenbogenforellen konnten in der Epidermis der Flossen viel mehr eingedrungene Amöboidkeimzellen als in der Haut (an der lateralen Körperseite) nachgewiesen werden. Auffälligstes in der Haut ist, dass die Dichte der eingedrungene Amöboidkeimzellen in allen Lokalisationen durchschnittlich geringer ist, als in der Epidermis der Flossen.

Ergebnisse

8 Stunden post expositionem

Bei der Suche nach Parasitenstadien in den Schwanzflossen von Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrblingen war es gelungen, bei 30 histologischen Schnitten durchschnittlich zwei eingedrungene kompakte, intakte Amöboidkeimzellen dicht beieinander zu detektieren, während in der Haut (an der lateralen Körperseite) kein Befall mit Parasitenstadien festgestellt wurde (Abbildung 15, 17, 18).

Bei Regenbogenforellenbrütlingen fanden sich durchschnittlich sieben intakte Entwicklungsstadien dicht aneinander in der Epidermis der Schwanzflossen und der Haut (Abbildung 16).

Bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrblingen war der Befund in der Epidermis der Haut (an der lateralen Körperseite) negativ.

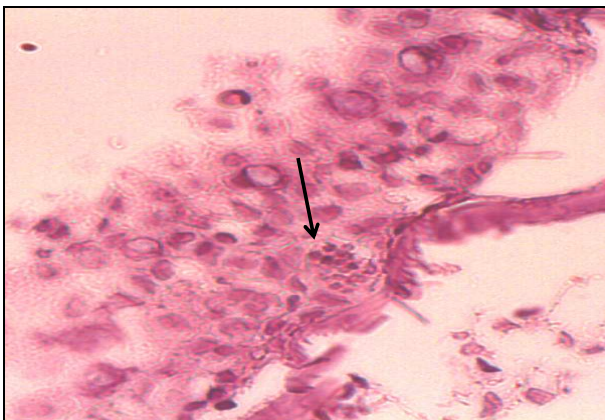


Abbildung 15: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt kompakt, intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

Ergebnisse

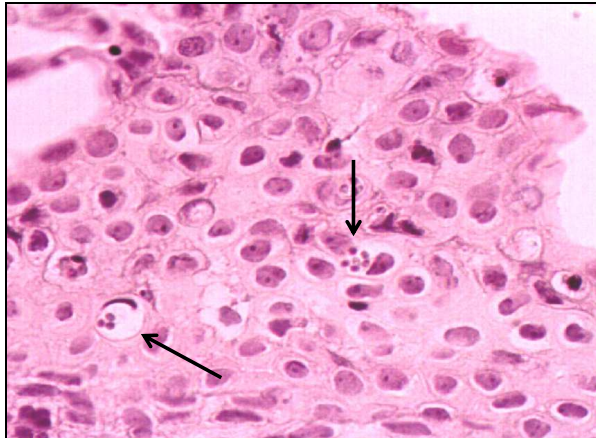


Abbildung 16: Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; 2 Parasitenstadien liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

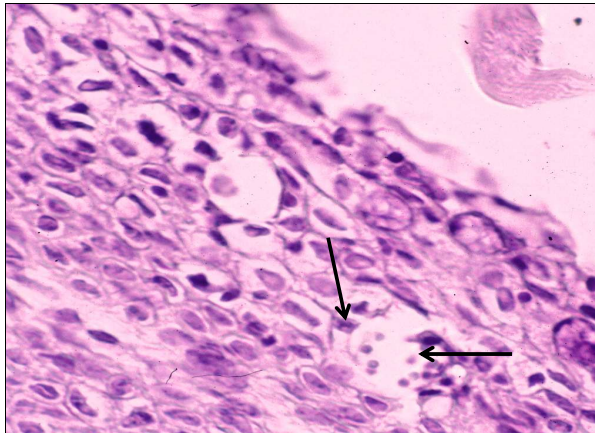


Abbildung 17: Koi-Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt intakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE Färbung in 400-facher Vergrößerung

Ergebnisse

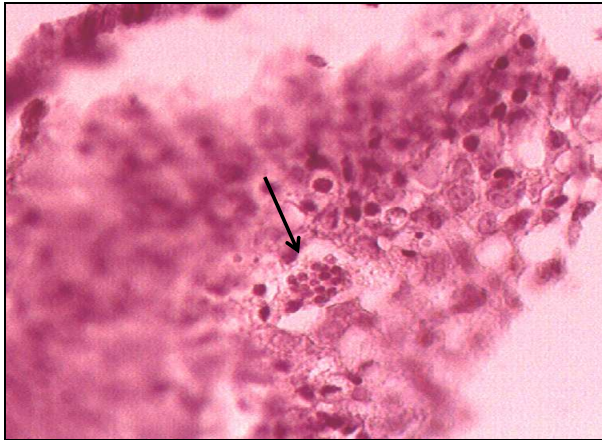


Abbildung 18: Zebrabärblinge; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt kompakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

12 Stunden post expositionem

12 Stunden nach Expositionsbeginn wurden in der Fischepidermis immer etwas weniger eingedrungene Amöboidkeimzellen gefunden als nach acht Stunden Sporenexposition.

Bei den untersuchten Regenbogenforellen war bei den je 30 untersuchten Schnitten von den Epidermisproben 12 Stunden post expositionem eine große Ansammlung (8 Stadien) von intrazellulären Teilungsstadien (unregelmäßig-kantig), voneinander abgegrenzt, zwischen den Epithelzellen in den Flossen und der Haut zu ermitteln (Abbildung 19, 20). Bei den Regenbogenforellen zeigten die in die Epidermis eingedrungenen Amöboidkeimzellen eine unterschiedliche Morphologie und ihre Durchmesser schienen vergrößert (verdoppelt) zu sein. Der Kern zeigte sich dabei jeweils geteilt. Ihre Querdurchmesser nehmen von ca. 2,2 μm bis auf 3,8 μm bis 4,4 μm zu.

Ergebnisse

Bei den untersuchten Koi-Karpfen und den Zebraäbrblingen war zu diesem Zeitpunkt in keinem der 30 untersuchten Schnitte ein Parasitenstadium in der Epidermis von Haut (an der lateralen Körperseite) und Flossen zu finden. Bei Karpfen waren in über 30 Schnitten in der Epidermis der Schwanzflossen nur wenige isolierte Stadien (1 Stadium) zu finden. Bei diesen lagen die Amöboidkeimzellen in der Epidermis in kleinen Verbänden von sechs verklumpten Zellen vor, die von einer gemeinsamen Hülle umgeben waren (Abbildung 21).

12 Stunden post expositionem können intakte Entwicklungsstadien in der Epidermis beobachtet werden, danach sind nur noch einzelne ausgewanderte Amöboidkeimzellen zu erkennen.

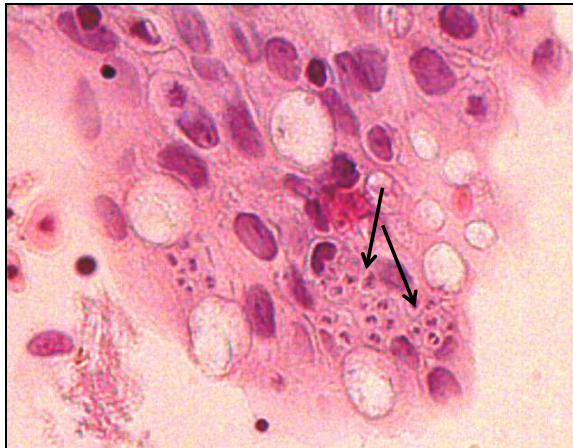


Abbildung 19: Regenbogenforelle; 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/ Fisch; 12 Stunden nach der Exposition; 5 Parasitenstadien im Teilungsprozess; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

Ergebnisse



Abbildung 20: Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 12 Stunden nach der Exposition; 4 Parasitenstadien im Teilungsprozess; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

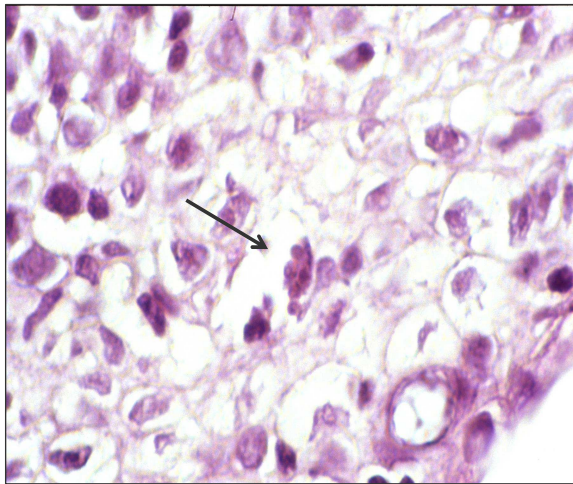


Abbildung 21: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 12 Stunden nach der Exposition; 1 Parasitenstadium liegt verklumpt in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

Ergebnisse

18 Stunden post expositionem

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung 18 Stunden nach der Exposition mit 5.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch je 30 Schnitten der 20 untersuchten Fische pro Versuchs- gruppe waren bei keiner der untersuchten Fischarten (Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrlinge) *M. cerebralis*-Stadien zu finden.

24 Stunden post expositionem

24 Stunden nach der Exposition konnte nach Durchmusterung von 30 Schnitten je 20 untersuchter Fische jeder Versuchsgruppe nur bei 5 Regenbogenforellen eine sehr geringe Anzahl von intakten, rot angefärbten rundlichen Zellen in der Epidermis gefunden werden, dagegen keine in den anderen untersuchten Fischarten (Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrlinge) (Abbildung 22).

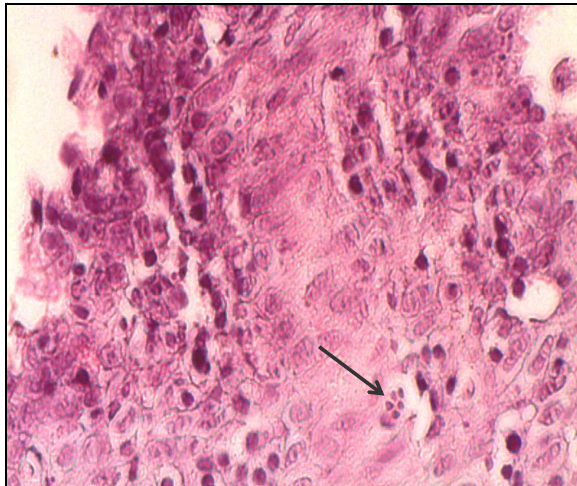


Abbildung 22: Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon- Sporen/ Fisch; 1 Tag nach der Exposition; Parasitenstadium ist intakt in der Epidermis;HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

Ergebnisse

3 Tage post expositionem

3 Tage nach der Exposition waren nur bei wenigen untersuchten Karpfen in der Schwanzflosse einzelne, degenerierte, zusammengeklumpte intrazelluläre Parasitenzellen zu finden, dagegen keine in den anderen untersuchten Fischarten (Regenbogenforellen, Koi-Karpfen, Zebraäbrlinge) (Abbildung 23).

Drei Tage nach erfolgter Infektion konnten anhand einer höheren Vergrößerung (1000-fach) die einzelnen ausgewanderten Amöboidkeimzellen in der Epidermis von anderen Zellen kaum unterschieden werden.

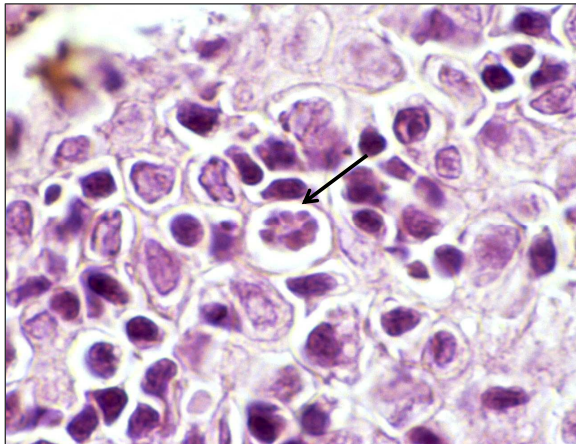


Abbildung 23: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 3 Tage nach der Exposition; 1 Parasitenstadium verklumpt; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung

Ergebnisse

5 Tage post expositionem

Wie bereits nach drei Tagen p. e. konnten nach fünf Tagen in wenigen histologischen Schnitten bei drei Karpfen in der Schwanzflossenepidermis Schwanzflosse intrazellulär Parasitenstadien gefunden werden, während die Epidermis der anderen untersuchten Fischarten (Regenbogenforellen, Koi-Karpfen, Zebraäbrblinge) histologisch negativ für *M. cerebralis*-Infektion war.

Die Amöboidkeimzellen beim Karpfen waren verklumpt und degeneriert (Abbildung 24).

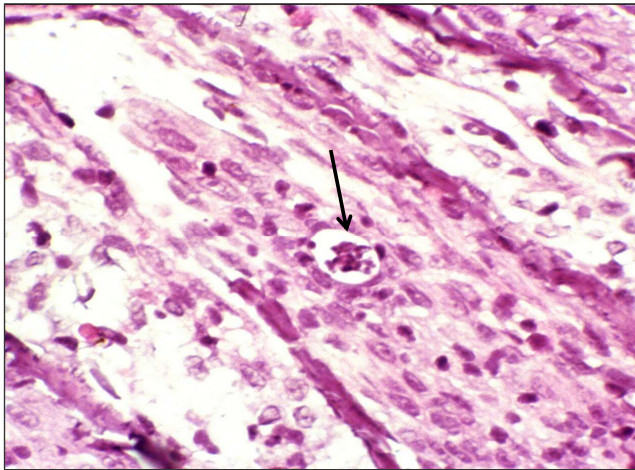


Abbildung 24: Karpfen; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 5 Tage nach der Exposition; 1 Parasitenstadium in Lyse mit Zelltrümmern; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

4.3. Histologische Untersuchung der Schädelknorpel

Die Teilung von Parasitenstadien in der Epidermis findet einen Tag nach der Infektion statt. Kurze Zeit später (zwischen 4 und 24 Tagen) beginnt die Wanderung der Entwicklungsstadien von der Epidermis durch Dermis und Subcutis bis zum Nervengewebe. Daher war 50 Tage p. e. der früheste Zeitpunkt, zu dem Entwicklungsstadien im Knorpel erwartet werden konnten. Die Parasitenstadien waren sehr schwer von anderen Zellen im Nervengewebe zu unterscheiden. Die histopathologische Beurteilung der durch die Sporenbildung hervorgerufenen Veränderungen der Kopfknochenstrukturen bei den jeweils 20 untersuchten Tieren aus jeder Gruppe erfolgte nach der numerischen MacConnell-Baldwin-Skala von Grad null bis fünf gegliedert. Die Definitionen der einzelnen Grade wurden in Abschnitt 3.2.6.1 dargestellt.

4.3.1 Tag 50 post expositionem

Bis zum 50. Tag nach der Infektion mit 5.000 *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch konnten bei der histologischen Untersuchung bei keinem der zwanzig untersuchten Karpfen, Koi-Karpfen und Zebrabärblinge in den Kopfknochenstrukturen Spuren von Knochenläsionen, Entzündungszellen detektiert werden.

Der Grad der histopathologischen ($^{\circ}$ H) Veränderungen lag bei diesen Infektionsgruppen bei null. Die histologische Untersuchung der Kopfknochenstrukturen der untersuchten Regenbogenforellen wies eine deutliche Anhäufung von Vermehrungsstadien und zerstörtes Knochengewebe auf. Neben Resten von intensiv violett gefärbtem gesundem Knochen fanden sich Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* (Plasmodien) in Teilen von blasig zu Lakunen erweitertem lytischem Knochengewebe des Neocraniums der Regenbogenforellen

Nach der numerischen MacConnell-Baldwin-Skala lag der Grad der histopathologischen Veränderungen ($^{\circ}$ H) bei 2 (Abbildung 25, 26).

Ergebnisse

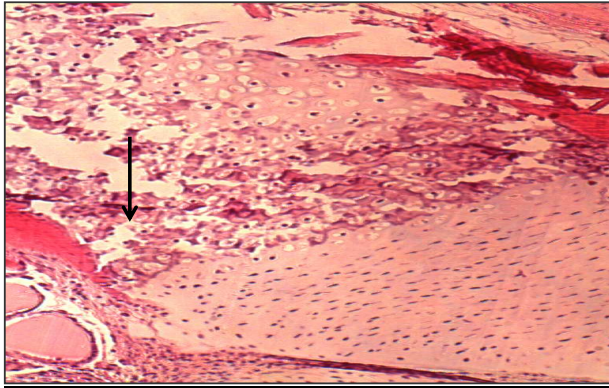


Abbildung 25: Regenbogenforelle 5000 Triactinomyxon-Sporen/
Fisch 50 Tage; zerstörte Knorpelbereiche blasig degeneriert
mit Granulozyten;
HE Färbung in 400-facher Vergrößerung



Abbildung 26: Regenbogenforelle 50 Tage; 5000 Triactinomyxon-
Sporen/Fisch; massive Leukozyteninfiltration zusammen mit
verschiedenen Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis*;
Knorpel ist vollständig lysiert; HE-Färbung 400-facher Vergrößerung

Ergebnisse

4.3.2 Tag 150 post expositionem

Alle 20 untersuchten Regenbogenforellen wiesen deutliche und typische Veränderungen der Knorpelarchitektur im Schädelbereich auf. Bei der histologischen Untersuchung 150 Tage post expositionem befanden sich reife Sporen von *Myxobolus cerebralis* im stark lysierten Knorpelgewebe des Schädels, häufig mit eindringenden Leukozyten in dem Knorpelteil. Nach der numerischen MacConnell-Baldwin-Skala lag der Grad der histopathologischen Veränderungen (°H) bei 4 (Abbildung 27, 28).



Abbildung 27: Regenbogenforelle 150 Tage; Entwicklungsstadien sowie massenhaft reife Sporen von *Myxobolus cerebralis*; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

Ergebnisse

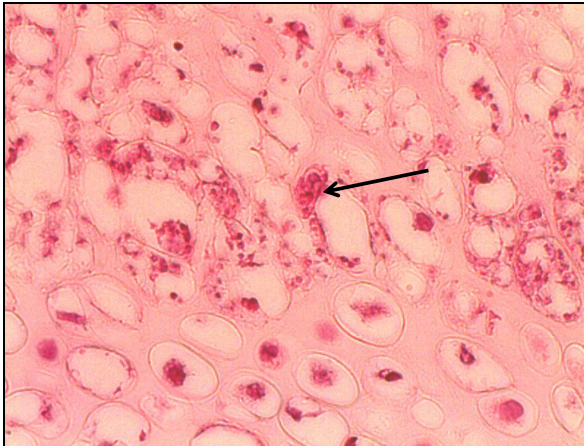


Abbildung 28: Regenbogenforelle 150 Tage; in den Lakunen des zerstörten Stützgewebes (Knorpellyse) finden sich zahlreiche Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis* bzw. Eosinophile Granulozyten, HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

4.4 Klinische Symptome bei den infizierten Fischen

Nach der Exposition der Regenbogenforellenbrütlinge, der Karpfen und Koi-Karpfen sowie der Zebraäbblinge mit 5000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch wurden die Tiere täglich auf die typischen Drehkrankheitssymptome (Schwarzfärbung, Drehverhalten, Deformation) hin beobachtet; die Veränderungen bzw. Auffälligkeiten der Tiere wurden dokumentiert. Die chronologische Darstellung der klinischen Symptomatik der Regenbogenforellenbrütlinge erfolgte beim Laborversuch zu folgenden Zeitpunkten: 50 Tage, 100 Tage und 150 Tage post expositionem. Dagegen waren bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen keine klinischen Symptome erkennbar.

Bei keiner der Kontrollgruppen (Regenbogenforellen, Karpfen und Koi-Karpfen sowie Zebraäbblinge) konnten zu irgendeinem der Zeitpunkte erkennbare Anzeichen der Drehkrankheit festgestellt werden.

Die zu den Zeitpunkten der klinischen Beobachtung post expositionem festgestellten Veränderungen an den Fischen sind in den Tabellen 12, 13 und 14 dargestellt.

Ergebnisse

4.4.1 Tag 50 post expositionem

Keiner der 20 infizierten Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrlinge wies zu diesem Zeitpunkt Symptome einer *M. cerebralis*-Infektion wie pathologisches Drehverhalten, Deformation oder Schwarzverfärbungen der Kaudalpartie auf. Bei den infizierten Regenbogenforellen-brütlingen wurde das Symptom des pathologischen Drehverhaltens (Fluchtbewegungen assoziiert mit einer kreisförmigen Bewegung) beobachtet.

Bei sechs von 20 Tieren war die hintere Körperpartie dunkel gefärbt. Bei keinem der Fische konnten Deformationen im Schädel- bzw. Wirbelsäulenbereich beobachtet werden. Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 50 post expositionem gibt Tabelle 12.

Tabelle 12: Übersicht über die klinischen Anzeichen des Laborversuchs am Tag 50 post expositionem bei Regenbogenforellen, Karpfen und Koi-Karpfen sowie den Zebraäbrlingen.

Symptome	Regenbogenforellen	Karpfen	Koi-Karpfen	Zebraäbrlinge
Deformationen der Kaudalpartie	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Schwarzfärbung der Kaudalpartie	6/20 (30 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Drehverhalten	6/20 (30 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)

Ergebnisse

4.4.2 Tag 100 post expositionem

Am Tag 100 post expositionem waren folgende Drehkrankheitssymptome zu beobachten. Bei 9 von 20 infizierten Regenbogenforellenbrütlingen konnten deutliche Drehbewegungen festgestellt werden. Durch Stress (Licht, Fütterung, Klopfen an die Aquarienscheibe) konnten bei allen Testfischen Kreisbewegungen ausgelöst werden. 17 von 20 Fischen litten an Deformationen der Kaudalpartie. Drei Regenbogenforellenbrütlinge zeigten stark verzögertes Wachstum, wiesen aber keine Schwarzverfärbung auf; zwei von 20 Fischen lagen auf dem Boden und wiesen deutlich deformierte Kiemendeckel auf. 17 von 20 Tieren hatten Schwarzverfärbungen (dunkel verfärbte hintere Körperabschnitte). Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 100 post expositionem gibt Tabelle 13.

Tabelle 13: Übersicht über die beobachteten Symptome 100 Tage post expositionem bei infizierten Regenbogenforellen, Karpfen und Koi-Karpfen sowie den Zebraäbblingen

Symptome	Regenbogenforellen	Karpfen	Koi-Karpfen	Zebraäbbling
Deformationen der Kaudalpartien	17/20 (85 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Schwarzfärbung der Kaudalpartie	17/20 (85 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Drehverhalten	9/20 (45 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)

Ergebnisse

4.4.3 Tag 150 post expositionem

150 Tage nach Exposition wurden bei den 20 beobachteten Regenbogenforellen folgende Krankheitssymptome dokumentiert: Jeweils 17 von 20 infizierten Regenbogenforellen wiesen Symptome einer *M. cerebralis*-Infektion wie pathologisches Drehverhalten (Schwanzjagen) (6), Deformation der Kaudalpartie (17) oder Schwarzverfärbungen der Kaudalpartien (17) auf (Abbildung 24).

Alle Regenbogenforellen zeigten unter Stresssituationen die krankheitstypische Drehbewegung (Fluchtbewegung assoziiert mit Kreisschwimmen (Schwanzjagen)).

Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 150 post expositionem gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Übersicht über die beobachteten Symptome 150 Tage post expositionem bei infizierten Regenbogenforellen, Karpfen und Koi-Karpfen sowie den Zebraäbrblingen

Symptome	Regenbogenforellen	Karpfen	Koi-Karpfen	Zebraäbrblinge
Deformationen der Kaudalpartie	17/20 (85 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Schwarzfärbung der Kaudalpartie	17/20 (85 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)
Drehverhalten	6/20 (30 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)	0/20 (0 %)

Ergebnisse

4.5 Molekularbiologischer Nachweis von *M. cerebralis* mittels Nested-PCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse der histologischen Untersuchung wurde Proben aus Hautproben, Schwanzflossenproben und Kopfknorpelproben von allen Fischen one-step-PCR und Nested-PCR nach dem Protokoll von ANDREE et al. (1998) durchgeführt.

Durch die molekularbiologische Testung von histologisch positiv diagnostizierten Proben konnte das von ANDREE et al. (1998) beschriebene Nested-PCR-Protokoll mit den verwendeten Primerpaaren bestätigt werden. Die PCR-Produkte von jeweils 20 Proben wurden direkt nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetragen, um sie optimal miteinander vergleichen zu können. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetragen und durch Ethidiumbromid angefärbt. Es wurden jeweils 5 µl pro Spur eingesetzt.

Zu sehen ist das Ergebnis der zweiten PCR-Reaktion, der Nested-PCR nach ANDREE et al. (1998), mit den verwendeten Primerpaaren (Tr 5–17, Tr 3–17). Im Falle eines positiven Ergebnisses ist die Bande entsprechend dem Amplifikat der *M. cerebralis*-DNA mit einer Länge von 415 bp (Basenpaaren) zu sehen. Die Größe der Marker-DNA-Fragmente ist links gekennzeichnet, Spur M: Größenstandard (1 kb-DNA-Leiter),

Bei der Untersuchung der Hautproben und der Schwanzflossenproben mittels konventioneller PCR waren zu den Zeitpunkten 1, 4 und 8 Stunden post expositionem die Proben aus Hautproben und Schwanzflossenproben von allen Fischen positiv.

Von Tag 8 bis zum 60. Tag ging die Anzahl der positiv getesteten Fische leicht zurück. Von den nach 16 Stunden entnommenen Fischproben wurden 19 von 20 (95 %) Schwanzflossen und 12 von 20 (60 %) Hautproben mittels konventioneller PCR positiv auf *M. cerebralis* getestet.

Ergebnisse

4.5.1 Nested-PCR Regenbogenforelle

Vom 1. Tag bis zum 3. Tag wurden immer weniger Hautproben positiv getestet (11 von 20 (55 %) positiv am Tag 1 post expositionem, 1 von 20 (15 %) am 3. Tag mittels Nested-PCR). Vom 4. Tag bis zum 20. Tag post expositionem wurde in der Haut bei keinem der untersuchten Fische mittels Nested-PCR *M. cerebralis*-DNA gefunden.

Tabelle 15: Nested-PCR-Ergebnisse von infizierten Regenbogenforellen

Entnahmezeit	Flossen	Haut	Kopfknochen
1h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
4h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
8h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
16h	95 % (19 von 20)	60 % (12 von 20)	nicht untersucht
1d	85 % (17 von 20)	55 % (11 von 20)	nicht untersucht
2d	60 % (12 von 20)	25 % (5 von 20)	nicht untersucht
3d	65 % (13 von 20)	5 % (1 von 20)	nicht untersucht
4d	50 % (10 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
6d	45 % (9 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
10d	55 % (11 von 20)	0 % (0 von 10)	nicht untersucht
20d	35 % (7 von 20)	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 20)
50d	20 % (4 von 20)	nicht untersucht	100 % (20 von 20)
60d	15 % (3 von 20)	nicht untersucht	100 % (20 von 20)
80d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	100 % (20 von 20)
120d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	100 % (10 von 10)
150d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	100 % (10 von 10)

Vom 2. bis zum 60. Tag post expositionem konnte ausschließlich in den untersuchten Schwanzflossen mittels Nested-PCR *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden.

Der letzte positive Nachweis aus Schwanzflossenproben trat bei den Regenbogenforellen 60 Tage post expositionem auf (3 von 20 (15%)) (Abbildung 30).

Diese Proben konnten nur mittels Nested-PCR positiv getestet werden und waren in der konventionellen PCR negativ.

Ergebnisse

Ab 50 Tage bis 150 Tage p. e. waren von entnommenen Kopfknochenproben positive Ergebnisse mittels Nested-PCR zu erhalten und somit die positiven histologischen Befunde bestätigt.

In der Tabelle 15 und Abbildung 29 sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (Nested-PCR) der Schwanzflossenproben, Hautproben und Kopfknochenproben dargestellt.

Nested-PCR-Ergebnisse aus Kopfknochen, Haut, Schwanzflossen bei den Regenbogenforellen

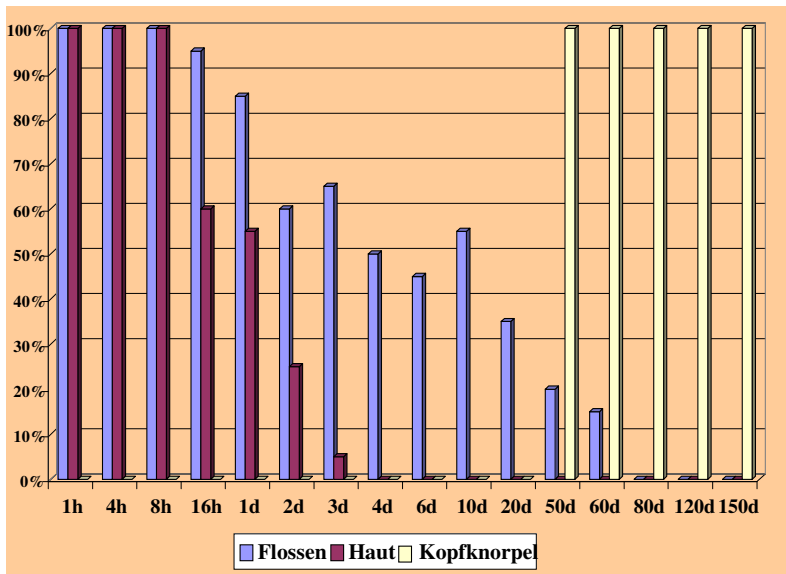


Abbildung 29: Positive Nested-PCR-Ergebnisse aus Hautproben, Kopfknochenproben Schwanzflossenproben, bei Regenbogenforellen

Ergebnisse

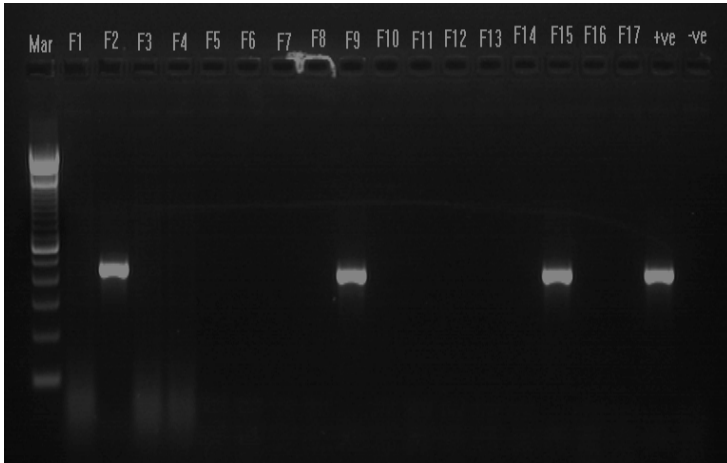


Abbildung 30: Ergebnisse der Nested-PCR von den Schwanzflossenproben 60 Tage post expositionem bei Regenbogenforellen

Spur 1 bis Spur 17: 5 µl DNA von Schwanzflossen 60 Tage post expositionem

Spur 2: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 9: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 15: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 18: Positivkontrolle(+ve) = nur als Ausgangs-*M. cerebralis*-DNA

Spur 19: Negativkontrolle(-ve) = nur Wasser als Ausgangs-DNA

Ergebnisse

4.5.2 Nested-PCR Karpfen

Auch hier konnte nach Untersuchung der Schwanzflossen und der Hautproben mittels konventioneller PCR nach 1, 4 und 8 Stunden post expositionem bei 20 von 20 (100 %) der Fischproben *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden. Nach 16 Stunden post expositionem waren 14 von 20 (70 %) in den Schwanzflossen und 12 von 20 (60 %) Fische in der Haut positiv getestet worden.

Tabelle 16: Nested-PCR-Ergebnisse bei infizierten Karpfen

Entnahmezeit	Schwanzflosse	Haut	Kopfknochen
1h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
4h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
8h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
16h	70 % (14 von 20)	60 % (12 von 20)	nicht untersucht
1d	35 % (7 von 20)	25 % (5 von 20)	nicht untersucht
2d	10 % (2 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
3d	5 % (1 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
4d	5 % (1 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
6d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
10d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 10)	nicht untersucht
20d	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)
50d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
60d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
80d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
120d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
150d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Am Tag 1 post expositionem wurden 7 von 20 (35 %) Proben der Schwanzflossen positiv und 5 von 20 (25 %) Proben der Haut erzielten ein positives PCR-Ergebnis. Am 2. Tag post expositionem wurden die Proben der Schwanzflosse mit der konventionellen PCR (One-Step) negativ getestet.

Ergebnisse

Nach Untersuchung mittels Nested-PCR waren hingegen 2 Proben der Schwanzflossen von 20 (10 %) positiv, keine jedoch von der Haut.

Nach 3 und 4 Tagen post expositionem konnte in den Schwanzflossen mit Hilfe der Nested-PCR nur bei einer Probe der Schwanzflossen *M. cerebralis*-DNA amplifiziert werden. Diese Probe war bei der konventionellen PCR negativ getestet worden.

Vom 6. bis zum 20. Tag post expositionem wurde in den Haut- und Schwanzflossenproben bei keinem untersuchten Fisch mittels Nested-PCR *M. cerebralis*-DNA gefunden. Bei keinem der untersuchten Fische wurde mittels Nested-PCR nach 50, 60 und 80 Tagen im Bereich vom Kopfknochen *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in 31 und Abbildung 32 und Tabelle 16 zusammengefasst.

Nested-PCR-Ergebnisse aus Kopfknochen, Haut, Schwanzflossen bei Karpfen

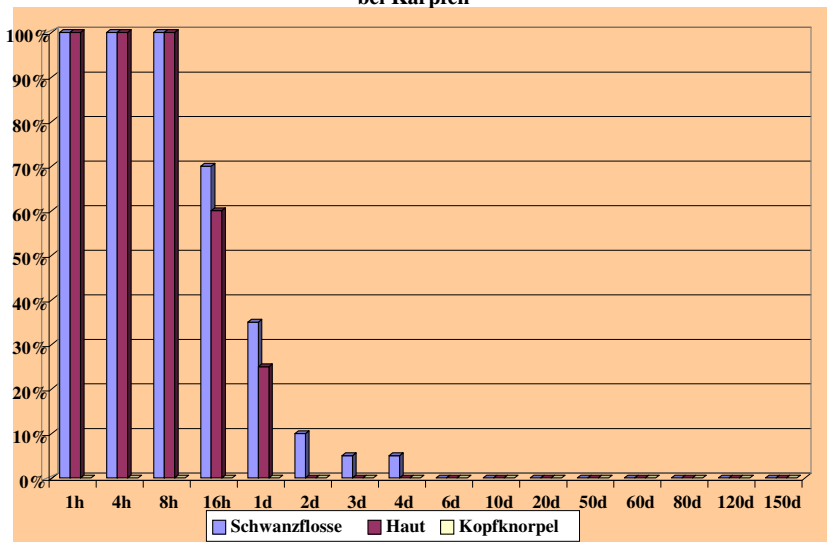


Abbildung 31: Positive PCR und Nested-PCR-Ergebnisse aus Kopfknochenproben, Schwanzflossenproben, Hautproben bei Karpfen

Ergebnisse

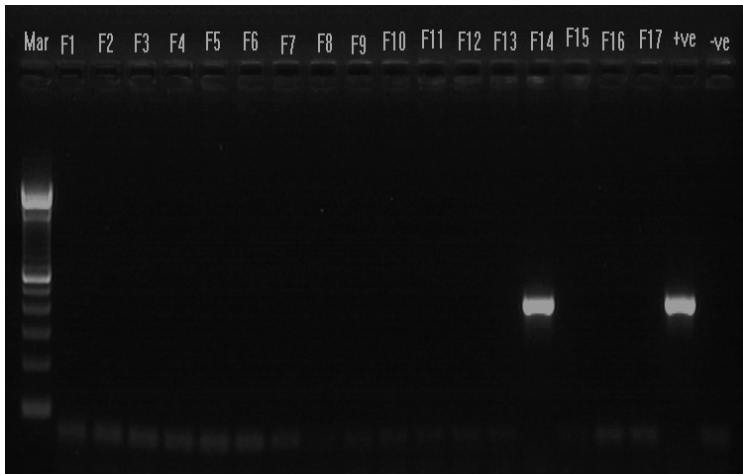


Abbildung 32: Ergebnisse der Nested-PCR von den Schwanzflossen 4 Tage post expositionem bei Karpfen

Spur 1 bis Spur 17: 5 µl DNA von Schwanzflossen 4 Tage post expositionem

Spur 14: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 18: Positivkontrolle(+ve) = nur als Ausgangs-*M. cerebralis*-DNA

Spur 19: Negativkontrolle(-ve) = nur Wasser als Ausgangs-DNA

Ergebnisse

4.5.3 Nested-PCR Koi-Karpfen

Bei der Untersuchung der Schwanzflossen und der Haut mittels one-step-PCR konnte 1, 4 und 8 Stunden post expositionem bei 20 von 20 (100 %) Fischproben *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden. Nach 16 Stunden post expositionem waren 11 von 20 (55 %) der Fische in den Schwanzflossen positiv und 9 von 20 (45 %) der Fische in der Haut positiv getestet worden.

Tabelle 17: Nested-PCR-Ergebnisse bei infizierten Koi-Karpfen

Entnahmezeit	Flossen	Haut	Kopfknochen
1h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
4h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
8h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
16h	55 % (11 von 20)	45 % (9 von 20)	nicht untersucht
1 d	35 % (7 von 20)	20 % (4 von 20)	nicht untersucht
2d	10 % (2 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
3 d	15 % (3 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
4d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
6d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
10 d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 10)	nicht untersucht
20 d	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)
50 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
60 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
80 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
120 d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
150d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Am Tag 1 post expositionem waren 7 von 20 (35 %) der Proben aus den Schwanzflossen positiv und 4 von 20 (20 %) der Proben aus der Haut erzielten ein positives PCR-Ergebnis.

Durch die Nested-PCR konnte am Tag 2 post expositionem in den Schwanzflossen *M. cerebralis*-DNA in zwei Fällen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Nach drei Tagen post expositionem konnten in den Schwanzflossen nur drei Proben positiv getestet werden, welche sich bei der konventionellen PCR als negativ erwiesen hatten. Vom 4. Tag bis zum 20. Tag post expositionem wurde mittels Nested-PCR in den Haut- und Schwanzflossenproben bei keinem untersuchten Fisch *Myxobolus*-DNA gefunden.

In keiner der 10 Proben aus dem Kopfknochen konnte nach 50, 60 und 80 Tagen mittels Nested-PCR *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden.

In Tabelle 17 und Abbildung 33 und Abbildung 34 sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (Nested-PCR) der Hautproben, Kopfknochenproben und Schwanzflossenproben dargestellt.

Nested-PCR-Ergebnisse aus Kopfknochen, Haut, Schwanzflossen bei Koi-Karpfen

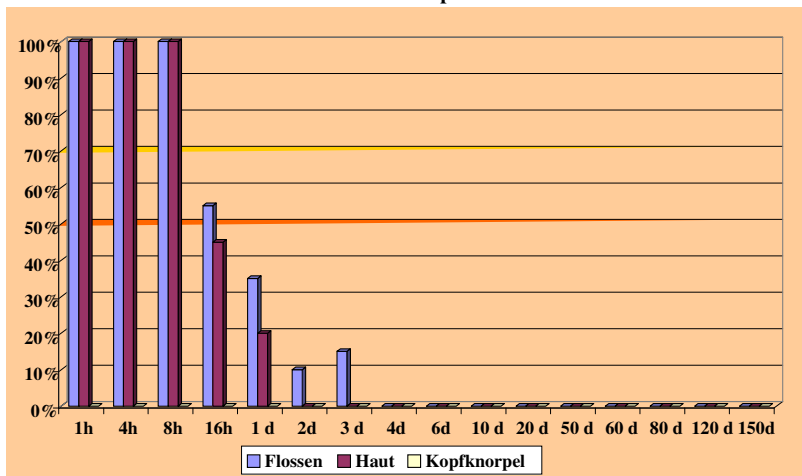


Abbildung 33: Positive PCR und Nested-PCR-Ergebnisse aus Kopfknochenproben, Hautproben, Schwanzflossenproben bei Koi-Karpfen

Ergebnisse

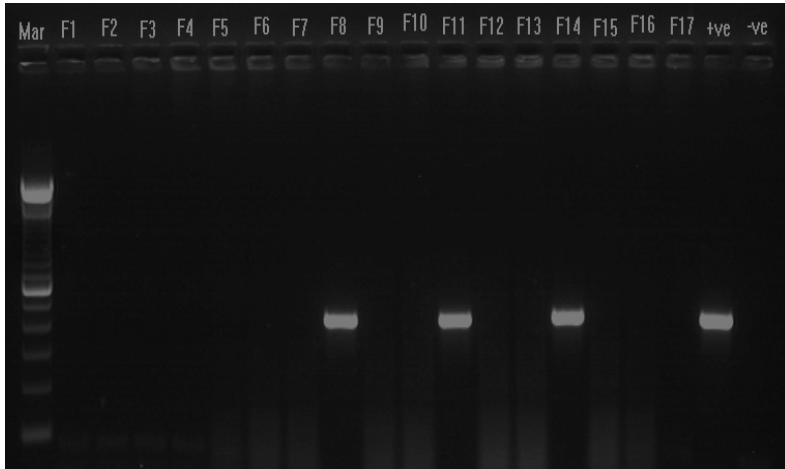


Abbildung 34: Ergebnisse der Nested-PCR der Schwanzflossen 3 Tage post expositionem bei Koi-Karpfen

Spur 1 bis Spur 17: 5 µl DNA von Schwanzflossen 3 Tage post expositionem

Spur 8: Genomäquivalente im Reaktionsansatz **Spur 11:** Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 14: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 18: Positivkontrolle(+ve) = nur als Ausgangs-*M. cerebralis* DNA

Spur 19: Negativkontrolle(-ve) = nur Wasser als Ausgangs-DNA

Ergebnisse

4.5.4 Nested-PCR Zebrabärblinge

Die Untersuchung der Schwanzflossen und der Haut mittels konventioneller PCR nach 1, 4 und 8 Stunden post expositionem zeigte bei 20 von 20 Fischen (100 %) spezifische Banden (415 bp).

Tabelle 18: Nested-PCR-Ergebnisse der infizierten Zebrabärblinge

Entnahmezeit	Schwanzflosse	Haut	Kopfknochen
1h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
4h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
8h	100 % (20 von 20)	100 % (20 von 20)	nicht untersucht
16h	55 % (11 von 20)	40 % (8 von 20)	nicht untersucht
1 d	30 % (6 von 20)	25 % (5 von 20)	nicht untersucht
2d	10 % (2 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
3 d	10 % (2 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
4d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
6d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
10 d	0 % (0 von 20)	0 % (0 von 20)	nicht untersucht
20 d	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)	0 % (0 von 10)
50 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
60 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
80 d	0 % (0 von 10)	nicht untersucht	0 % (0 von 10)
120 d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
150d	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Nach 16 Stunden p. e. waren Schwanzflossenproben bei 11 von 20 (55 %) Fischen positiv und 8 von 20 (60 %) Fische in der Haut positiv getestet worden. 6 von 20 (30 %) Proben aus den Schwanzflossen und 5 von 20 (25 %) Proben aus der Haut erzielten am 1. Tag post expositionem ein positives PCR-Ergebnis. Am Tag 2 post expositionem waren nur 2 Schwanzflossenproben der 20 Fische (10 %) infiziert. Dieselben Proben waren mittels der konventionellen PCR negativ getestet worden.

Ergebnisse

Nach Untersuchung mittels Nested-PCR ist es gelungen, am 3.Tag post expositionem bei 2 von 20 (10 %) Proben aus den Schwanzflossen *M. cerebralis*-DNA nachzuweisen, keine jedoch in der Haut. Diese zwei positiven Proben waren zuvor bei der konventionellen PCR negativ getestet worden. Vom 4. bis zum 20. Tag post expositionem wurde in Haut und Schwanzflossen bei keinem untersuchten Fisch mittels Nested-PCR *M. cerebralis*-DNA gefunden.

Bei den untersuchten Fischen wurde mittels Nested-PCR nach 50, 60 und 80 Tagen im Bereich vom Kopfknochen keine *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 35, Abbildung 36 und Tabelle 18 dargestellt.

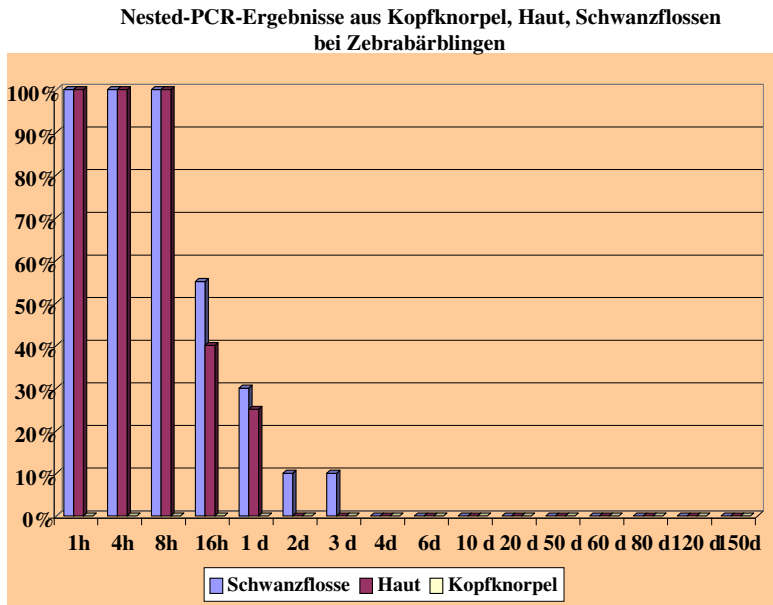


Abbildung 35: Positive PCR und Nested-PCR-Ergebnisse aus Schwanzflossenproben, Hautproben, Kopfknochenproben bei Zebrabärblingen

Ergebnisse

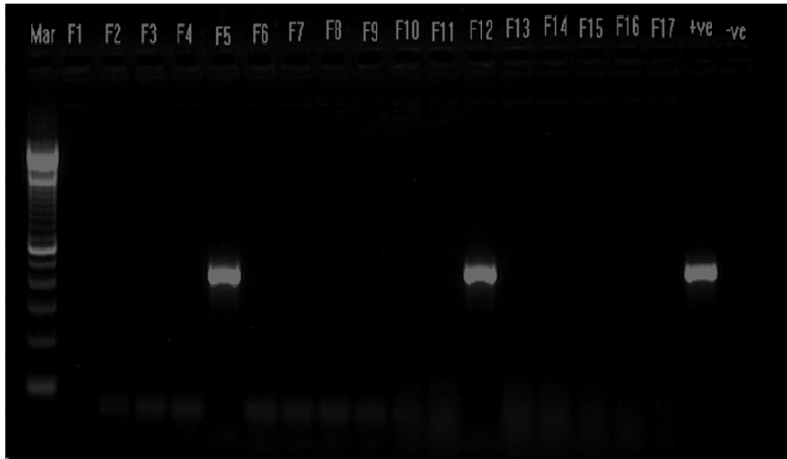


Abbildung 36: Ergebnisse der Nested-PCR der Schwanzflossen 3 Tage post positionem bei Zebrabärblingen

Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel.

Mar = Marker,

Spur 1 bis Spur 17: 5 µl DNA von Schwanzflossen 3 Tage post expositionem

Spur 5: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 12: Genomäquivalente im Reaktionsansatz

Spur 18: Positivkontrolle(+ve) = nur als Ausgangs-*M. cerebralis*-DNA

Spur 19: Negativkontrolle(-ve) = nur Wasser als Ausgangs-DNA

4.6 Überprüfung des Infektionserfolges der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbblingen und Regenbogenforellen mit *Triactinomyxon*-Sporen mittels Nested-PCR und histologischer Untersuchung

An formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten befruchteten Eiern von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbblingen und Regenbogenforellen sowie Gewebe von Regenbogenforellen wurde eine histologische Untersuchung durchgeführt. Zusätzlich wurden die frisch geschlüpften Fische von Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen mittels PCR untersucht. Von diesen Fischen stand kein Gewebe für eine histologische Untersuchung zur Verfügung.

Die optimale Besatzdichte für die frisch geschlüpften Regenbogenforellen lag unter kontrollierten Bedingungen (bei der Optimaltemperatur von 7 - 11°C) zwischen 40 und 100 Individuen/l. Die frisch geschlüpften Larven von Cyprinidenarten (Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbblingen) wurden bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C zur Beobachtung gehalten. Von den frisch geschlüpften Regenbogenforellen (1 Tag alt) stand genügend Gewebe für die Nested-PCR-Untersuchung und die histologische Untersuchung zur Verfügung.

Die histologische Untersuchung der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen verlief für alle Proben negativ.

Die 20 von 20 befruchteten Eiern von Karpfen, Koi-Karpfen, Regenbogenforellen und Zebraäbblinge wurden mittels Nested-PCR positiv getestet (Abbildung 37).

Die 20 von 20 frisch geschlüpften Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblinge und 20 von den 20 frisch geschlüpften Regenbogenforellen mit einem großen Dottersack (zum Entnahmezeitpunkt 10-20 mm groß) wurden mittels PCR positiv auf *M. cerebralis* getestet.

Bei der histologischen Auswertung der Regenbogenforellen konnten durchschnittlich 20 Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* auf einer Fläche von 1 cm² pro Hautstück (an der lateralen Seite) in der Epidermis der Flossen, der Haut und der Mundhöhle gefunden werden. Diese waren auf das gesamte Epithel verteilt, erreichten aber ihre höchste Dichte in den Flossenschnitten.

Die positiven Ergebnisse der PCR bei den untersuchten Regenbogenforellen entsprechen denen der histologischen Untersuchung. Von den untersuchten befruchteten Eiern der Regenbogenforellen (3,8 - 5,8 mm Durchmesser/Ei) wurden ebenfalls histologische Schnitte

Ergebnisse

angefertigt und ausgewertet. Bei keiner dieser Proben wurden Amöboidkeimzellen in der Eihaut gefunden.

In Abbildung 38 und Abbildung 39 sind die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der frisch geschlüpften Regenbogenforellen dargestellt.

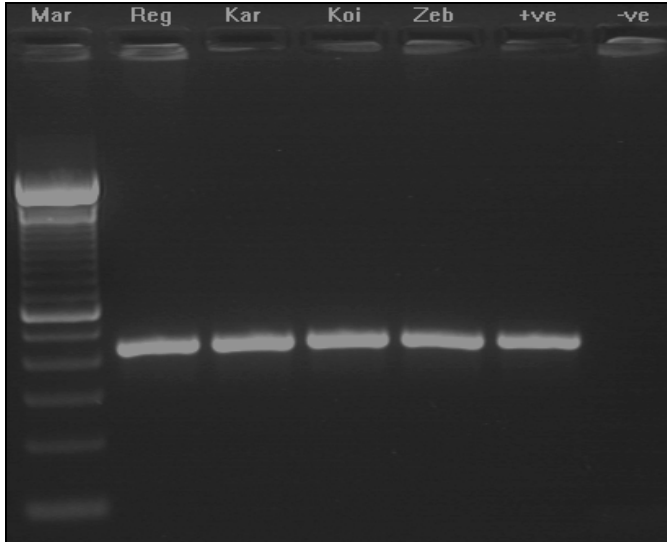


Abbildung 37: Positive PCR-Ergebnisse der infizierten, befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und Regenbogenforellen mit *Triactinomyxon*-Sporen

Zu sehen sind die für den verwendeten Primerpaar spezifischen *M. cerebralis*-DNA-Amplifikate als Banden mit einer Länge von 415 bp (Basenpaaren). Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel.

Mar = Marker,

Reg: befruchtete Eier Regenbogenforellen,

Kar: befruchtete Eier von Karpfen,

Koi: befruchtete Eier Koi-Karpfen,

Zeb: befruchtete Eier Zebrabärblinge;

+ve : Positivkontrolle,

-ve : Negativkontrolle.

Ergebnisse

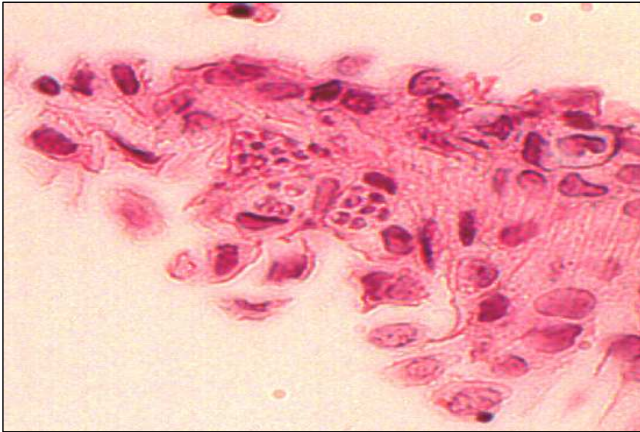


Abbildung 38: frisch geschlüpfte Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 3 Stunden nach der Exposition; 3 intakte Parasitenstadien liegen kompakt intrazellulär in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 1000-facher Vergrößerung



Abbildung 39: frisch geschlüpfte Regenbogenforelle; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 3 Stunden nach der Exposition; 5 intakte Parasitenstadien liegen dicht beieinander in den Epidermiszellen; HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung

4.7 Korrelation zwischen Nested-PCR, histologischer Untersuchung und dem Auftreten von Drehkrankheit-Symptomen bei Regenbogenforellen

4.7.1 50 Tage post expositionem

Ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Besiedlung im Bereich der Schädelknorpel mit *M. cerebralis*-Stadien, der Intensität des pathologischen Drehverhaltens und der Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels konnte festgestellt werden. Eine hohe Zahl an histologisch festgestellten Entwicklungsstadien ging immer mit zuvor beobachteten starken klinischen Symptomen einher. Durch die starke Infektion des das Rückenmark umschließenden Knorpels wird ein Druck auf die Schwanznervenbahnen ausgeübt, die die Verteilung der Pigmentzellen im kaudalen Bereich regulieren. Aufgrund dieses Prozesses treten im Schwanzbereich Schwarzfärbung sowie Verkrümmungen der Wirbelsäule auf.

Bei allen infizierten Regenbogenforellen waren äußerlich keine Skelettdeformationen zu erkennen. 6 von 20 klinisch auffälligen Fischen mit pathologischem Drehverhalten (Fluchtbewegung assoziiert mit einer kreisförmigen Bewegung (Schwanzjagen)) und Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels wiesen ein positives Ergebnis bei der Nested-PCR auf. Auch bei den 14 klinisch gesunden Fischen wurde ein 415 bp großes PCR-Produkt festgestellt. Die positiven Ergebnisse der Nested-PCR bei der Untersuchung der Schädelknorpel entsprechen denen der histologischen Untersuchung (siehe Tabelle 19).

Beim Nachweis von *M. cerebralis* wurden bei der histologischen Untersuchung des Kopfbereichs Veränderungen in Form von Knorpeldegeneration durch Vermehrung von Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* neben noch nicht zerstörten Bereichen aufgefunden. Im Schädelknorpel war 50 Tage post expositionem bei klinisch unauffälligen Fischen (ohne pathologischen Drehverhaltens und der Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels) eine Sporentwicklung festzustellen und es konnte *M. cerebralis*-DNA mittels Nested-PCR nachgewiesen werden.

Die Nested-PCR-Ergebnisse, die der histologischen Untersuchung und die Symptome, die während des Versuchs bei den infizierten Fischen auftraten, sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 19: Übersichtstabelle über die Ergebnisse der Nested-PCR im Vergleich zur klinischen und der histologischen Untersuchung

Fische Nummer	Klinische Symptome	Histologische Untersuchung der Schädelknorpel	Nested-PCR
1	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
2	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
3	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
4	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
5	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
6	schwarze Kaudalpartie und Drehverhalten	++	positiv
7	ohne Symptome	++	positiv
8	ohne Symptome	++	positiv
9	ohne Symptome	++	positiv
10	ohne Symptome	++	positiv
11	ohne Symptome	++	positiv
12	ohne Symptome	++	positiv
13	ohne Symptome	++	positiv
14	ohne Symptome	++	positiv
15	ohne Symptome	++	positiv
16	ohne Symptome	++	positiv
17	ohne Symptome	++	positiv
18	ohne Symptome	++	positiv
19	ohne Symptome	++	positiv
20	ohne Symptome	++	positiv

+++ hochgradig, ++ mittelgradig, + geringgradig, - nicht vorhanden,
 negativ: *M. cerebralis* wurde nicht nachgewiesen,
 positiv: *M. cerebralis* wurde nachgewiesen

4.7.2 150 Tage post expositionem

Von den klinisch auffälligen Fischen mit pathologischem Drehverhalten, Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels und Deformationen der Wirbelsäule wiesen alle ein Nested-PCR positives Ergebnis auf. Ebenso war bei allen betroffenen Regenbogenforellen (20 von 20 (100 %) die Skelettstruktur hoch beschädigt.

Je stärker die Besiedlung mit den *M. cerebralis*-Stadien im Bereich des Schädelknorpels war, umso früher und intensiver traten die Drehkrankheitsymptome auf. Die positiven Ergebnisse der Nested-PCR bei der Untersuchung der Schädelknorpel entsprechen denen der histologischen Untersuchung und stammten von klinisch auffälligen Fischen (siehe Tabelle 20).

Als am häufigsten und am dichtesten besiedelt erwies sich das Neurocranium. Dort konnten bei 100 % aller untersuchten Fische Stadien nachgewiesen werden. Beim Nachweis von *M. cerebralis* wurden bei der histologischen Untersuchung des Kopfbereichs Veränderungen in Form von Knorpeldegenerationen mit einer hochgradigen Besiedlung von reifen Sporen und Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* im stark lysierten Knorpel um Mesencephalon und Cerebellum aufgefunden.

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag bei allen Infektionsfischen bei 4 nach dem MacConnell-Baldwin Numerical Scale.

Die Nested-PCR-Ergebnisse, die Ergebnisse die Symptome und der histologischen Untersuchung, die während des Versuchs bei den infizierten Fischen auftraten, sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Ergebnisse

Tabelle 20: Übersichtstabelle über die Ergebnisse der Nested-PCR im Vergleich zur klinischen und der histologischen Untersuchung

Fische Nummer	Drehkrankheit –Symptome	Histologische Untersuchung der Schädelknorpel	Nested-PCR:
1	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
2	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
3	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
4	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
5	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
6	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
7	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
8	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
9	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
10	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
11	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
12	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
13	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
14	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
15	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
16	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
17	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
18	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
19	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv
20	Deformationen, schwarze Kaudalpartie	+++	positiv

+++ hochgradig, ++ mittelgradig, + geringgradig, - nicht vorhanden
 negativ: *M. cerebralis* wurde nicht nachgewiesen
 positiv: *M. cerebralis* wurde nachgewiesen

5. Diskussion

5.1 Histologische Untersuchung

Bei der histologischen Untersuchung wurden bei den Regenbogenforellen; Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen bereits fünf Minuten nach der Infektion zahlreiche eingedrungene Amöboidkeimzellen in der Schwanzflossenepidermis detektiert. In allen untersuchten Schnittpräparaten von Regenbogenforellen konnten vier Stunden nach Expositionsbeginn durchschnittlich 16 intakte Amöboidkeimzellen in der Epidermis der Schwanzflossen und der Haut gefunden werden. Diese Beobachtungen entsprechen denen von EL-MATBOULI et al. (1995), die die Entwicklung von *M. cerebralis*-Stadien bei infizierten Regenbogenforellen untersuchten.

Bei den Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen konnten fünf Minuten nach Expositionsbeginn bei je 30 Schnitten durchschnittlich acht eingedrungene, Amöboidkeimzellen in der Epidermis meist der Schwanzflosse, seltener in der Epidermis der Haut, gefunden werden. Bei der ersten Entnahme nach vier Stunden konnte immer noch kein häufigeres Eindringen von Amöboidkeimzellen in die Epidermis beobachtet werden. Während die Gesamtzahl der intakt erscheinenden Amöboidkeimzellen in der Schwanzflossenepidermis nach sechs Stunden mit durchschnittlich 11 Stadien bei den Regenbogenforellen leicht abgesunken war, war bei den Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbblingen keine große Veränderung der Anzahl eingedrungener Amöboidkeimzellen (durchschnittlich zwischen 1 und 4) zu erkennen. Bei den Regenbogenforellen acht Stunden nach Expositionsbeginn waren von insgesamt sieben Parasitenstadien im Teilungsprozess zu erkennen. Bei den Koi-Karpfen und Zebraäbblingen waren letztmalig nach acht Stunden post expositionem intakte Amöboidkeimzellen in der Epidermis der Schwanzflosse zu finden. Bei den Karpfen konnten noch 8 und 12 Stunden post expositionem in den entnommenen Proben intakte Stadien gefunden werden.

Diskussion

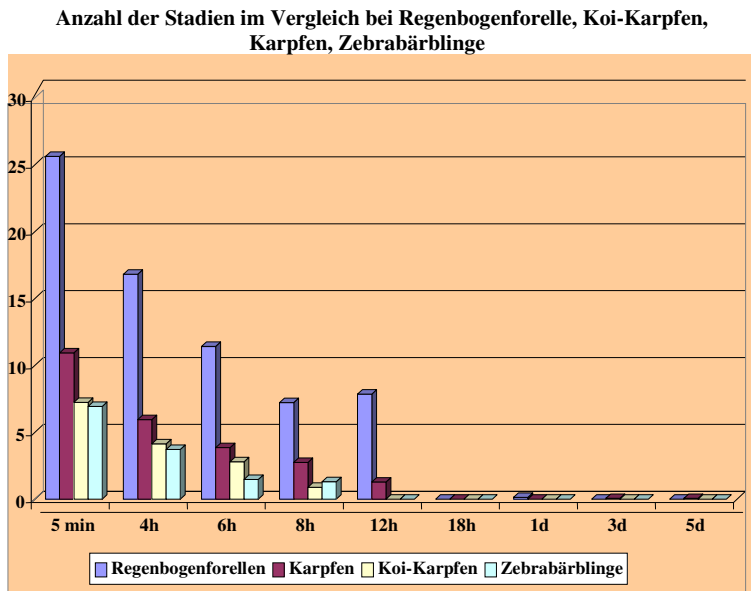


Abbildung 40: Durchschnittliche Anzahl von *M. cerebralis*-Stadien in der Schwanzflossenepidermis bei den einzelnen Fischarten zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme

18 Stunden post expositionem konnten auch nach histologischen Untersuchungen der Schwanzflossenepidermis der Regenbogenforellen und der Karpfen keine Spuren von intakten oder sich teilenden Amöboidkeimzellen gefunden werden.

Am Tag 1 post expositionem konnte nach Untersuchung von 30 Schnittpräparaten nur bei fünf Regenbogenforellen eine sehr geringe Anzahl von intakten Amöboidkeimzellen, gefunden werden. Es handelte sich um das letzte Amöboidkeimzellstadium, das man in der HE-Färbung vor seiner Wanderung in Dermis und Subcutis histologisch darstellen kann (EL-MATBOULI et al. 1995).

Trotz Untersuchung von Hunderten verschiedener Schnittebenen der Proben 3 und 5 Tage post expositionem gelang es von Proben aus wenigen untersuchten Karpfen in der Schwanzflossenepidermis nur wenige degenerierte, verklumpt erscheinende Parasitenzellen

Diskussion

(0,06) auf einer Fläche von 1 cm² zu finden, jedoch wurde kein weiteres Entwicklungsstadium in der Haut der Karpfen gefunden (Abbildung 40).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche der verschiedenen Cyprinidenarten (Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrlinge) mit 5.000 Triactinomyxon-Sporen zeigen in der histologischen Auswertung, dass die Amöboidkeime in der Lage sind in diese Cypriniden einzudringen, allerdings in wesentlich geringerer Zahl, verglichen mit den Regenbogenforellen.

Im Vergleich zur Regenbogenforelle sind die in der Cypriniden-Gruppe gefundenen Amöboidkeimzellen in der Schwanzflossenepidermis bei gleicher Infektionsdosis (5.000 Triactinomyxonsporen) zahlenmäßig schwächer vertreten (zwei Sporenstadien/Schnitt) im Vergleich zur Gruppe der Regenbogenforellen mit 25 Sporenstadien/Schnitt. Entsprechend konnten bei den Cypriniden im Vergleich zu den Forellen keine weiteren Epidermisstadien in der Schwanzflosse (ab 4 Tage) gefunden werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Cypriniden keinen geeigneten Wirt für *Myxobolus cerebralis* darstellen, da der Parasit in diesen nicht in der Lage ist in tiefere Hautschichten Nerven oder Knorpelgewebe zu gelangen und Sporen zu bilden.

Die Haut der getesteten Cypriniden stellte keine unüberwindbare Barriere gegen den Befall mit *M. cerebralis* dar, jedoch konnte, verglichen mit den Forellen, nur ein Bruchteil der Triactinomyxonsporen in die Epidermis gelangen. Der Vergleich der Amöboidkeimzahl pro Schnittpräparat in der Epidermis zeigte, dass die Regenbogenforellen deutlich mehr Sporenstadien pro Gewebeschnitt aufwiesen als die Cyprinidenarten. Die häufig beobachtete Degeneration der Parasitenstadien bei Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrlinge könnte dadurch erklärt werden, dass eine verstärkte Immunantwort in der Haut dieser Fischarten erfolgte. Durch die Traumatisierung der Haut beim Eindringen der Parasiten könnte durch einen Anstieg der Zahl neutrophiler Granulozyten, wie sie von IGER und ABRAHAM (1990) festgestellt wurde, eine verstärkte Immunantwort erfolgen.

DEMMELE (1999) beobachtete bei Regenbogenforellen ebenfalls einen Rückgang der in der Epidermis nachweisbaren Amöboidkeime, allerdings erst ab dem 24. bis 30. Tag. Wodurch dieser verursacht wird, konnte mit der Anwesenheit lymphoider Zellen und neutrophiler Granulozyten alleine nicht erklärt werden.

So wurden auch humorale Faktoren für den Rückgang der Infektionsintensität verantwortlich gemacht (DEMMELE, 1999). Analog wurde bei einem Befall mit *Gyrodactylus monogenea*, einem aussen anhaftenden, lebendgebärenden Hautwurm, ein Abfall der Parasitenzahlen nach

Diskussion

20 bis 30 Tagen festgestellt. Hier wurde vermutet, dass das adaptive Immunsystem eine Rolle spielen könnte (SIMON und JONES 2001).

Nach HOFFMANN et al. (1991) haben eingedrungene Amöboidkeimzellen eine antigene Wirkung: der Wirtskörper bildet nach gewisser Kontaktzeit spezifische Antikörper gegen sie aus. ELLIS (1981) konnte in der cuticulären Schicht der Epidermis älterer Regenbogenforellen eine höhere Anzahl von Immunglobulinen und Lysozymen finden.

Diese beschriebenen Immunreaktionen könnten bei Cypriniden schneller und gezielter erfolgen und es damit den *M. cerebralis*-Entwicklungsstadien unmöglich machen einzudringen und eine normale Entwicklung zu durchlaufen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den beobachteten Unterschied in der Anzahl der epidermalen Parasitenstadien wäre die Unfähigkeit des Parasiten im Gewebe der Cypriniden die notwendigen Signale für die Orientierung bei seiner Migration zu erhalten. Schließlich stellen Cypriniden Fehlwirte für *M. cerebralis* dar.

Dies würde auch erklären, dass 3 und 5 Tage post expositionem noch epidermale Stadien bei den Karpfen gefunden wurden, die offensichtlich nicht in der Lage waren, weiter im Wirtsgewebe zu wandern. Feinere Unterschiede in der Suszeptibilität der verschiedenen getesteten Cypriniden lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen nicht ableiten.

5.2 Klinische Symptomatik

Klinische Symptome traten ausschließlich bei Regenbogenforellen auf. Zebraäbrlinge, Karpfen und Koi-Karpfen blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes symptomfrei. Dies steht in direkter Korrelation zu den histologischen Ergebnissen und den PCR-Befunden. In der histologischen Untersuchung wurde deutlich, dass der Parasit in Cypriniden nicht in der Lage ist, in das Knorpelgewebe zu gelangen und Sporen zu bilden. Dieses Ergebnis wurde molekularbiologisch bestätigt; weder bei Karpfen, noch bei Koi-Karpfen oder Zebraäbrlingen konnte mittels Nested-PCR nach 50, 60 und 80 Tagen post expositionem im Bereich des Kopfknoorpels *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden. Da bei den Cypriniden der Parasit also über die Epidermis hinaus nicht weiter in das Gewebe vordringen kann, bleibt eine Infektion dieser Fische klinisch inapparent.

Bei infizierten Regenbogenforellen hingegen wurde am Tag 50 post expositionem das Symptom des pathologischen Schwimmverhaltens bei 30 % der Fische beobachtet. Dies lässt

Diskussion

sich damit erklären, dass der Erreger nach 6 - 14 Tagen im Rückenmark, nach 16 - 24 Tagen im Gehirn und nach 40 Tagen im benachbarten Knorpelgewebe angelangt ist (EL-MATBOULI et al. 1995). ROSE et al. (2000) sehen die Ursache für das pathologische Schwimmverhalten in der granulomatösen Entzündung, die als Immunantwort des Fisches auftritt und zu ringähnlichen Kompressionen des Rückenmarks und Deformationen der äußeren Hirnregionen führt. 30 % der infizierten Regenbogenforellen wiesen nach 50 Tagen eine Dunkelverfärbung des kaudalen Körperdrittels auf, deren Ursache nicht eindeutig geklärt ist.

Es wird angenommen, dass die Beeinträchtigung des Nervus sympathikus durch mechanischen Druck die Ursache der Schwarzverfärbung des Schwanzbereiches sein könnte. Die Sympathikusnerven versorgen die zu der entsprechenden Schwanzregion gehörenden Pigmentzellen, dadurch kommt es bei Schädigung dieses Nervs zu Farbveränderungen der kaudalen Körperpartien (SCHÄPERCLAUS 1990). Während die Drehbewegung und die Schwarzverfärbung zu diesem Zeitpunkt der Infektion schon sichtbar sind, treten die Deformationen der skelettalen Anteile von Kopf und Wirbelsäule erst später auf (PLEHN 1904; HOFFMAN et al. 1962). Diese Tatsache erklärt, warum am Tag 50 post expositionem bei keinem der Fische Deformationen im Schädel- bzw. Wirbelsäulenbereich beobachtet werden konnten (Abbildung 41). Erst am Tag 100 post expositionem zeigten 85 % der Regenbogenforellen derartige Symptome. Bei den Fischen waren die Kaudalpartien deformiert; zwei von den 20 Versuchstieren wiesen deutlich deformierte Kiemendeckel auf. Die massive Vermehrung von Entwicklungsstadien und die Sporenbildung von *M.cerebralis* führen zur Zerstörung der Knorpelgewebe und Strukturauflösung des Knorpels sowie zu Störungen der enchondralen Ossifikation, wodurch es zur Ausbildung eines „Mopskopfes“, verkürzten Kiemendeckeln, missgestalteten Kiefern und chronischen massiven Wirbelsäulenverkrümmungen kommt (HOFFMAN et al. 1962).

Zu diesem Untersuchungszeitpunkt konnte bei 85 % der Fische eine Schwarzverfärbung der Kaudalpartie und bei 45 % das pathologische Schwimmverhalten beobachtet werden. Während am Tag 150 post expositionem der prozentuale Anteil der Versuchsfische, die Deformationen und Schwarzverfärbungen aufwiesen, im Vergleich zum Tag 100 post expositionem unverändert bei 85 % blieb, ging der Anteil derjenigen Fische, bei denen das Drehverhalten beobachtet werden konnte, von 45 % (Tag 100) auf 30 % (Tag 150) zurück. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von PLEHN (1904) und HOFFMAN et al. (1962).

Diskussion

Die Symptome des Kreisschwimmens und des Jagens des eigenen Schwanzes wurden durch Licht als visuellem Stimulus ausgelöst. Die Schwarzverfärbungen können sich mit der Zeit wieder abschwächen oder ganz verschwinden. Im Gegensatz zur Schwarzfärbung der Schwanzregion sind die verkrüppelten Unterkiefer sowie die Wirbelsäulenverkrümmung als irreversibel zu bezeichnen (PLEHN, 1904; SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al. 1962).

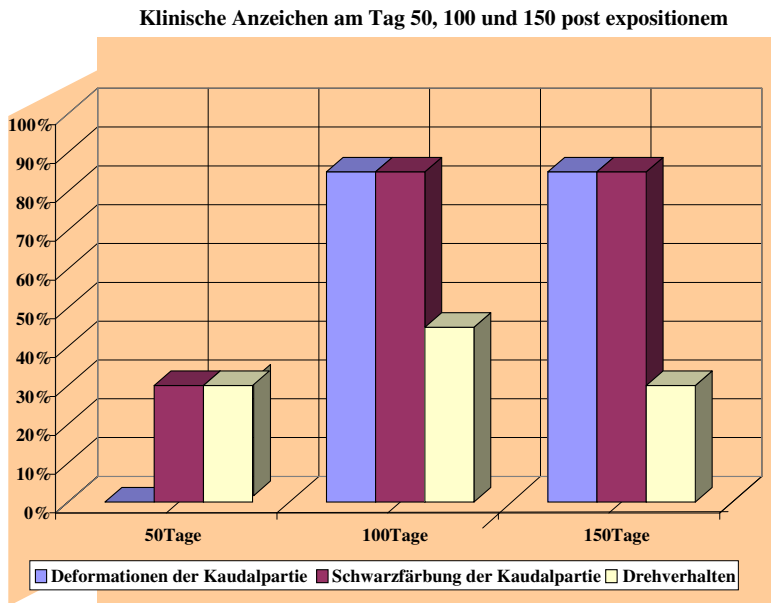


Abbildung 41: Übersicht über die klinische Symptomatik bei Regenbogenforellen am Tag 50, 100, 150 post expositionem

5.3 Molekularbiologische Untersuchung (Nested-PCR)

Für die molekularbiologische Auswertung dieser Arbeit wurde die von ANDREE et al. (1998) entwickelte Nested-PCR-Methode zum Nachweis von *M. cerebralis* 18s rDNA verwendet. Die hier verwendeten Primer amplifizieren ein Fragment von 415 bp.

Für alle untersuchten Fische (Regenbogenforellen, Zebra­bärblinge, Karpfen und Koi-Karpfen) wurden dieselben Primer verwendet. Die zusätzliche Verwendung einer molekularbiologischen Methode war vor allem wegen der mangelnden Sensitivität der histologischen Untersuchung zur Entdeckung von Epidermisstadien nach 12 Stunden post expositionem bei Regenbogenforellen und Cypriniden notwendig, da zu diesem Zeitpunkt die Amöboidkeimzellen nur schwer morphologisch zu erkennen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Koi-Karpfen und Zebra­bärblinge auf Infektion mit *M. cerebralis* getestet. EL-MATBOULI et al. (1999) untersuchten bereits nicht Salmoniden Fischarten (Goldfisch (*Carassius auratus*), Karpfen (*Cyprinus caprio*), Nase (*Chondrostoma nasus*) und Guppy (*Poecilia reticulata*)) auf ihre Anfälligkeit gegenüber der Drehkrankheit, indem sie die Fische Wasser mit TAM-Sporen aussetzten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Fische vergleichbare Reaktionen auf die Infektion mit *M. cerebralis* zeigen. Es stellte sich heraus, dass nur bei einem Guppy histologisch in die Haut eingedrungene Amöboidkeimzellen nachgewiesen werden konnten.

Die Wasseruntersuchung nach der Exposition ergab einen signifikant höheren Anteil an leeren *Triactinomyxon*-Sporen im Wasser (60 %) im Vergleich zur Sporensuspension ohne Fische, die als Kontrolle diente (25 bis 32 %). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Wasseruntersuchung (2-malige Auszählung) ergab im Vergleich zu den oben angeführten Autoren einen geringeren Anteil an leeren TAM-Sporen: bei den Regenbogenforellen 48 und 34 %, bei den Karpfen 35 und 46 %, bei den Koi- Karpfen zwischen 33 % und 39 %, sowie bei den Zebra­bärblingen zwischen 38 und 41 %. Es wurden aber keine morphologischen Veränderungen an den *Triactinomyxon*-Sporen festgestellt.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen mit Koi-Karpfen, Zebra­bärblingen, Karpfen und Regenbogenforellen wurden Unterschiede hinsichtlich des Krankheitsverlaufes, der Symptomatik und der Infektionsrate zwischen den drei Vertretern der Cypriniden und den Regenbogenforellen festgestellt. Den Beweis für die erfolgte Infektion mit *M.cerebralis* lieferten die klinischen und pathologischen Befunde, der

Diskussion

histologische Nachweis von Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* und die positiven Ergebnisse der Nested-PCR.

Bei allen infizierten Fischen jeder Gruppe konnten nach 1, 4 und 8 Stunden die Schwanzflossenproben in der Nested-PCR positiv getestet werden. Ebenso wurde bei diese Fischen ein gering- bis mittelgradiger Befall mit Parasitenstadien von *M. cerebralis* in der Haut (an der lateralen Seite) festgestellt. Nach 5 Minuten, 4, 6 und 8 Stunden konnte bei allen Fischen histologisch in der Schwanzflosse die höchste Dichte von eingedrungenen Amöboidkeimzellen diagnostiziert werden. Auch die molekularbiologische Untersuchung war positiv.

Ab vier Tagen post expositionem konnten histologisch in keiner der Hautproben von allen untersuchten Fischen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* nachgewiesen werden. In diesen Proben konnte auch mittels Nested-PCR keine *M. cerebralis*-DNA nachgewiesen werden.

ANDREE et al. (1998) konnten in einer histologischen Untersuchung bei infizierten Regenbogenforellen zwei Stunden post expositionem eingedrungene Amöboidkeimzellen in 2 von 5 (40 %) Gewebeproben finden, während mittels PCR 5 von 5 (100 %) der Proben positiv waren.

In einer anderen Studie von ANDREE et al. (1998) wurden Regenbogenforellen mit verschiedenen *Triactinomyxon*-Sporen-Anzahlen (100 bis 10.000/Fisch) infiziert und mittels PCR getestet. Alle untersuchten Proben aus den Flossen wurden positiv getestet. Entsprechend dazu zeigte der molekularbiologische Nachweis in der vorliegenden Arbeit eine höhere Sensitivität als die histologische Untersuchung. Zum Beispiel wurden einige der Schwanzflossenproben 3 Tage post expositionem mittels Nested-PCR positiv getestet, während sie histologisch negativ waren (Koi-Karpfen: histologisch negativ, positiv in der PCR 2 von 20 (10 %), Zebrabärblinge: histologisch negativ, positiv in der Nested-PCR 2 von 20 (10 %) (Abbildung 42, Abbildung 43).

Diskussion

Positive Nested-PCR-Ergebnisse aus Hautproben bei Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen und Regenbogenforellen

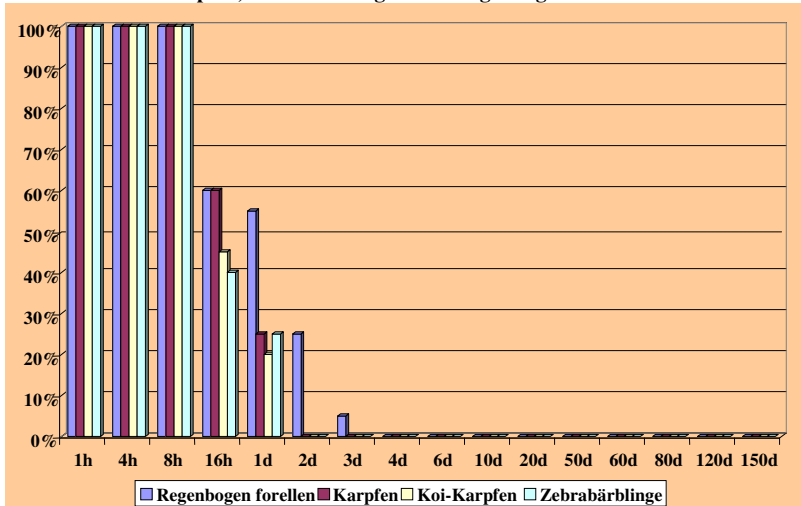


Abbildung 42: Positive Nested-PCR-Ergebnisse aus Hautproben bei Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen und Zebrabärblingen

Eine Untersuchung mittels Nested-PCR zum Nachweis von *M. cerebralis* wurde von SKIRPSTUNAS et al. (2006) durchgeführt. Dazu wurden zehn Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit 2000 Triactinomyxon-Sporen infiziert und zu jedem Entnahmepunkt (2, 6 Stunden, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 30, und 60 Tage) Schwanzflossenproben und Rückenflossenproben entnommen und mittels Nested-PCR untersucht.

Die Autoren verwendeten die Primerpaare von ANDREE et al. 1998. In den Schwanz- und Fettflossen der infizierten Fische wurden 2, 6 Stunden und 1, 2, 3 Tage danach alle Proben 100% positiv mittels Nested-PCR getestet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit überein.

Aus den gewonnenen Ergebnissen wird klar, dass sich die höchste Dichte von Amöboidkeimzellen in der gesamten Epidermis der Flossen (Rückenflossen, Schwanzflossen) befindet, während sie in der Haut eher verteilt vorkommen. In der Haut wurden zwischen 3 und 20 Tagen bei infizierten Koi-Karpfen, Zebrabärblingen, Karpfen und Regenbogenforellen während der gesamten Versuchsdauer keine Parasitenstadien gefunden.

Diskussion

EL-MATBOULI et al. (1995) beschrieben in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung, dass ab zwei bis vier Tage nach Exposition in der Subkutis interzellulär liegende Doppelzellstadien gefunden werden können. Danach erfolgt die Wanderung der Doppelzellstadien in das periphere Nervengewebe. Es schließt sich eine Migration zum Zentralnervensystem (ZNS) an.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich bei den Regenbogenforellen am 50., 100. und 150. Tag post expositionem im Knorpelgewebe hochgradige histopathologische Veränderungen mit zerstörter Knorpelarchitektur und umsäumenden Entzündungszellen sowie massenhaft reifen *M. cerebralis*-Sporen. Alle 20 untersuchten Regenbogenforellen erreichten Grad 3 bis Grad 4 der histopathologischen Veränderungen. Diese Beobachtungen entsprechen den Befunden in der Literatur (EL-MATBOULI et al. 1992a).

Bei allen am 150. Tag p.e. untersuchten Regenbogenforellen am 150. Tag post expositionem ergaben sich in der Nested-PCR positive Ergebnisse. Bei der histologischen Untersuchung konnten Entwicklungsstadien auch in allen Kopfknorpelproben nachgewiesen werden, das heißt die Sensitivität lag bei 100 %.

In einigen Fällen wurden bei den Regenbogenforellen in den Schwanzflossen 60 Tage nach Infektion auch bei 1000-facher Vergrößerung histologisch keine Entwicklungsstadien gefunden, obwohl die Nested-PCR ein positives Ergebnis ergeben hatte. Es ist wahrscheinlich, dass bei diesen Fischen morphologisch keine Parasitenstadien gefunden wurden, weil diese zum Zeitpunkt der Probenentnahme in diesem Organ bereits degeneriert waren.

Dass die Nested-PCR eine höhere Sensitivität als die histologische Untersuchung aufweist, kann in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bei histologisch negativen, aber mittels Nested-PCR positiv getesteten Proben besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um zerstörte Zellen bzw. nicht mehr erkennbare Zellen handelt. Offensichtlich können aber Relikte der Parasiten-DNA noch im Gewebe mittels PCR detektiert werden.

Man bezeichnet solche Vorgänge als phagozytoseartige Zerstörung und interpretiert sie als Erscheinung einer nicht näher definierten Parasit-Wirtszell-Interaktion (EL-MATBOULI 1996).

Bei den durchgeführten Infektionsversuchen mit Karpfen, Koi-Karpfen, Zebrabärblingen, und Regenbogenforellen wurden Unterschiede hinsichtlich des Krankheitsverlaufes, der Symptomatik und der Infektionsrate zwischen den drei Vertretern der Cypriniden und

Diskussion

Regenbogenforellen gegenüber diesen Krankheiten verglichen. Der nächste Schritt wird sein, den Resistenzmechanismus der Cypriniden gegenüber der Drehkrankheit zu untersuchen.

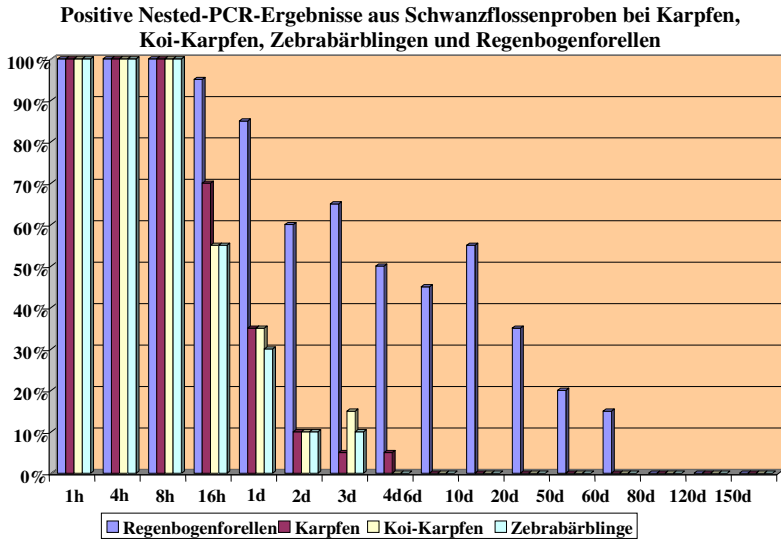


Abbildung 43: Positive Nested-PCR-Ergebnisse aus Schwanzflossenproben bei Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraabrlingen und Regenbogenforellen

5.4 Überprüfung des Infektionserfolges der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrblingen und Regenbogenforellen mit Triactinomyxon-Sporen mittels Nested-PCR und histologischer Untersuchung

Die Drehkrankheit ist eine wichtige parasitäre Erkrankung der Salmoniden. Durch Import von Regenbogenforellen wurde die Krankheit in vielen Ländern Europas und in Nordamerika sowohl in den Zuchtanlagen als auch in der Wildnis sehr stark verbreitet.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter kontrollierten Laborbedingungen die Empfänglichkeit von befruchteten Zebraäbrblingseiern, Karpfeneiern, Koi-Karpfeneiern und Regenbogenforelleneiern überprüft, indem versucht wurde Triactinomyxon-Sporen auf die Eier zu übertragen.

Für Untersuchungen zum Eintritt von Triactinomyxon-Sporen wurden befruchtete Eier der genannten Fischarten drei Tage lang im Infektionsbad bei einer Wassertemperatur von 14°C mit Triactinomyxonsporen inkubiert. Die Expositionsexperimente mit Triactinomyxon-Sporen mit frisch geschlüpften Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrblingen und den Regenbogenforellen zeigte, dass nur bei der Regenbogenforelle histologisch in die Haut eingedrungene Amöboidkeimzellen nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis mittels Nested-PCR nach den drei Tagen Exposition ergab bei 20 von 20 frisch geschlüpften Karpfen, Koi-Karpfen und Zebraäbrblingen ein positives Ergebnis. Bei der histologischen Untersuchung der Eihaut der befruchteten Eier von Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbrblingen und den Regenbogenforellen konnten keine Amöboidkeimzellen gefunden werden.

20 der 20 frisch geschlüpften Regenbogenforellen mit Dottersack die zum Entnahmezeitpunkt einen Tag alt waren, wurden mittels PCR positiv auf *M. cerebralis*-Infektion getestet.

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit der Studie von MARKIW (1991) überein. Dort konnte zudem gezeigt werden, dass die im Dottersackstadium infizierten Forellen vier Monate später keine klinische Manifestation der Drehkrankheit aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass beim Handling mit Regenbogenforelleneiern und Eiern aller drei untersuchten Karpfen (*Cyprinus carpio*), Koi-Karpfen (*Cyprinus carpio koi*) und Zebraäbrblingen (*Danio rerio*) aus einem infizierten Gebiet keine Gefahr einer Übertragung von Triactinomyxon-Sporen besteht.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, die mögliche Empfänglichkeit von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Koi-Karpfen (*Cyprinus carpio koi*) und Zebrabärblingen (*Danio rerio*) gegenüber der Drehkrankheit mittels Nested-PCR und histologischen Untersuchungen zu klären. Zum Vergleich wurden Drehkrankheit-empfindliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit untersucht.

Für die Untersuchungen zum Eintritt von *Triactinomyxon*-Sporen wurden Regenbogenforellen, Karpfen, Koi-Karpfen und Zebrabärblinge exponiert und jeweils 5 Minuten, 4, 6, 8, 12 und 18 Stunden, 1, 2, 3 und 5 Tage nach der Exposition die Parasitenstadien in der Schwanzflosse und in der Haut (an der lateralen Seite) der Forellen gezählt.

Bei den Regenbogenforellen wurden in den Schwanzflossen nach fünf Minuten und vier Stunden Parasitenzahlen zwischen 16 bis 25 auf einer Fläche von 1 cm² pro Hautstück (an der lateralen Seite) gefunden, während bei allen drei untersuchten Cypriniden durchschnittlich 5 intakte eingedrungene Amöboidkeimzellen pro Fisch histologisch nachweisbar waren.

In der Schwanzflosse und in der Haut von Karpfen, Zebrabärblingen, Koi-Karpfen und Regenbogenforellen war zu den Untersuchungszeitpunkten 1, 4 und 8 Stunden p.e. DNA von *M. cerebralis* nachweisbar. Nach acht Stunden waren bei den Regenbogenforellen und bei allen drei untersuchten Cypriniden die Amöboidkeimzellen noch intakt. Außerdem war eine Abnahme der Anzahl an Parasitenstadien in der Haut nur bei den Regenbogenforellen zu detektieren. Ab 8 Stunden bis 60 Tage post expositionem konnte bei Regenbogenforellen in den Schwanzflossen ein Rückgang der Infektionsintensität festgestellt werden. In der Epidermis der Schwanzflossen war die durchschnittliche *Triactinomyxon*-Sporen-Dichte mit Abstand am höchsten. Es konnte jedoch zum Untersuchungszeitpunkt 60 Tage bei Regenbogenforellen Parasiten-DNA mittels Nested-PCR nachgewiesen werden, obwohl diese Fische bei der histologischen Untersuchung negativ getestet wurden.

Ab 50 Tage post expositionem waren nur bei den Regenbogenforellen im Kopfknochen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* und Veränderungen in Form von Degenerationen zu finden. Alle drei untersuchten Cypriniden wiesen im Kopfknochen keine Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* oder Schädigungen auf.

Zusammenfassung

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann somit vermutet werden, dass viele Sporoplasmen in die Epidermis der Cypriniden eindringen, aber den Knorpel nicht erreichen konnten. Der Beweis für die erfolgte Infektion des Schädelknorpels der Regenbogenforellen mit *M. cerebralis* wurde anhand der klinischen und histologischen Befunde durchgeführt, während in allen drei untersuchten Cyprinidenarten, der Parasit die Haut eindrang, aber nicht weiter entwickeln konnte. Die aus Hautproben, Schwanzflossen und Knorpelproben der infizierten Karpfen, Koi-Karpfen, Zebraäbblinge und Regenbogenforellen gewonnene DNA wurde mittels Nested-PCR amplifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Nested-PCR deutlich sensitiver war als die histologische Untersuchung mit Hämatoxylin- und Eosin-Färbung.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, um die Resistenzmechanismen der Cypriniden gegenüber der Drehkrankheit klären zu können.

7. Summary

The aim of the presented study was to compare the susceptibility of carp (*Cyprinus carpio*), Koi-carp (*Cyprinus carpio koi*) and zebrafish (*Danio rerio*) to the Whirling disease by means of nested PCR and histological examination (Haematoxylin and Eosin stain). In comparison, Whirling Disease susceptible rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated.

To get information about the entry of the triactinomyxon-spores rainbow trout, carp, koi-carp and zebrafish were infected by 5000 TAM / fish and parasite stages were counted in the caudal fin and the skin of the body side 5 min, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 18 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d and 5 d after infection.

In histological examination 20 to 22 parasite stages were counted in rainbow trout while only two stages were found in all three cyprinids. DNA of *M. cerebralis* was detected in rainbow trout, carp, koi-carp and zebrafish 1 h, 4 h, 8 h post-infection. After 8 h the developmental stages were still intact in rainbow trout and in all three investigated cyprinid species. Only in rainbow trout a decrease in parasite stages in the skin could be detected. From 8 h to 60 d a decrease of the infection intensity could be found in caudal fins of rainbow trout. The average spore density was highest in caudal fins. Parasite DNA was amplified by nested PCR 60 d post-infection. in rainbow trout, Although the histological examination gave a negative result. 50 days p.i. developmental stages of *M. cerebralis* associated with cartilage degeneration could only be found in the head cartilage of rainbow trout. None of the cyprinid species showed developmental stages or degenerations in the head cartilage. According to the results of the present study it can be assumed that not enough sporoplasms were able to enter the epidermis of the cyprinids to finally reach the cartilage. The infection of rainbow trout with *M. cerebralis* was proofed by the clinical symptoms, while all cyprinids were infected, without showing any clinical signs. The DNA extracted from skin, caudal fin and head cartilage was amplified by nested-PCR and it could be shown, that the PCR was more sensitive than the histological examination with Haematoxylin and Eosin stain.

Further studies will be required to investigate the mechanisms of the resistance of cyprinids against Whirling Disease.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Aqua. Dest.	Aqua destillata (Destilliertes Wasser)
AFS	American Fisheries Society
Bp	Nukleinsäurebasenpaare
°C	Grad Celsius
Cm	Zentimeter
°dH	Härtegrad
et al.	et altera
G	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ig	Immunglobuline
kV	Kilovolt
L	Liter
l/min	Liter pro Minute
<i>M.c.</i>	<i>Myxobolus cerebralis</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
o.A.	ohne Angaben
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.e.	post expositionem
SPF	spezifisch pathogenfrei
TAMs	Triactinomyxonspore(n)
µl	Mikroliter
Mm	Mikrometer
µv	Mikrovolt
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

9. Literaturverzeichnis

ALDERMAN, D. J. (1986)

Whirling disease chemotherapy.

Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **6** (2): 38-40

AKHMEROV, A. K. (1960)

Myxosporidia of fishes of the Amur River Basin. Rybnoe Khozyaistvo Vnutrikh Vodoemov Latviiskoi SSR, 5, 239–308 (In Russian).

ANDERSON, D. P. (1990)

Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. American Fisheries Society Symposium **8**: 38-50

ANDERSON, C. L., CANNING, E. U., SCHAFER, S. M., YOKOYAMA, H., OKAMURA B. (2000)

Molecular confirmation of the life cycle of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (*Myxozoa: Myxosporea*). Bull Eur Ass Fish Pathol 2000, **20**, 111–115.

ANDOLT, M. (1973)

Myxosoma cerebralis: isolation and concentration from fish skeletal elements-trypsin digestion method. J. Fish. Res. Bd Can., **30**, 1713-1716.

ANDREE, K. B., MacCONNELL, E., HEDRICK, R. P. (1998)

A polymerase chain reaction test for detection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in fish, and a comparison to existing detection techniques.

Disease of Aquatic Organisms **34** (2): 145-154

ANDREE, K. B., MacCONNELL, E., McDOWELL, T., GRESOVIAC S. J., HEDRICK, R. P. (1997a)

a new approach to *Myxobolus cerebralis* diagnostics. Proceedings Whirling Disease Symposium, Eccles Conference center Logan, Utah, March 6-8: 111-116

Literaturverzeichnis

ANDREE, K. B., HEDRICK, R. P., MacCONNELL, E.(2002)

A review of the approaches to detect *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. Am Fish Soc Symp 29:197–211.

ANTONIO, D. B., ANDREE, K. B., McDOWEL, T. S., HEDRICK, R. P. (1998)

Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete tissues by using a non radioactive *In situ* hybridization (ISH) protocol.

Journal of Aquatic Animal Health **10**: 338-347

ARNDT, R. E. u. WAGNER, E. J. (2004)

Rapid and slow sand filtration techniques and their efficacy at filtering triactinomyxons of *Myxobolus cerebralis* from contaminated water.

North American Journal of Aquaculture 666:261–270.

ASHLEY, L. M., HALVER, J. E., SMITH, R. R. (1975)

Ascorbic acid deficiency In rainbow trout and coho salmon and effects on wound healing.

In: Ribelin WE, Migaki G (eds) The pathology of fishes.

The University of Wisconsin Press, Madison.p: 769-789

**BALDWIN, T. J., PETERSON, J. E., MCGHEE, G. C, STAIGMILLER, K. D.,
MOTTERAM, E. S.,u. DOWNS, C.C. (1997)**

Distribution of whirling disease, caused by *Myxobolus cerebralis*, in salmonid fishes in Montana.
In: Whirling Disease Symposium:Expanding the Database.

Whirling Disease Foundation. pp. 19-26.

BALDWIN, T. J., VINCENT, R. E., SILFLOW, R. M., STANEK, D (2000)

Myxobolus cerebralis infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) exposed under natural stream conditions.

J Vet Diagn Invest 12:312–321

Literaturverzeichnis

BARTHOLOMEW, J. L., BALDWIN, T., HEDRICK, R., KATHMAN, D., McMAHON, T., MacCONNELL, B., MOFFITT, C., NEHRING, B., WINTON, J. (2001)

Standard protocols for whirling disease research, 1. Standardized Protocols Advisory Committee, Whirling Disease Foundation, and Fish Health Section, American Fisheries Society. Whirling Disease Foundation, Bozeman, Montana.

BARTHOLOMEW, J. L. u. RENO, P.W. (2002)

Review: The history and dissemination of whirling disease. Pp 3-24 in Bartholomew, J.L. and J.C. Wilson (Eds). Whirling Disease: reviews and current topics. American Fisheries Society Symposium 29, Bethesda, Maryland, USA.

BARTHOLOMEW, J. L., STEVENS, D.G., ROHOVEC, I. S., FRYER, J. L. (1992)

Ceratomyxosis is associated with an oligochaete and an actinosporean. NATO Advanced Research Workshops Program, International Workshop on Myxosporea, October 6-8, Ceske Budejovice, Czechoslovakia (Abstract)

BARTON, B. A. u IWAMA, G. K. (1991)

Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.

Annual Revue of Fish Diseases 1: 3-26

BEAUCHAMP, K. A., KATHMAN, R. D., MCDOWELL, T. S., HEDRICK, R. P. (2001)

Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). Mol. Phylogenet. Evol. 19(2): 216-24

BEAUCHAMP, K. A., GAY, M., KELLEY, G. O., EL-MATBOULI, M., KATHMAN, R. D., NEHRING, R.B., HEDRICK, R. P. (2002)

Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex*. Dis. Aquat. Organ. 51(2): 113-21

BEITINGER, T. L. u MC CAULEY, R. W. (1990)

Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes.

J of Greet Lakes Res 16:542-575

Literaturverzeichnis

BENAJIBA, M. M. u. MARQUÉS, A. (1993)

The alternation of actinomycidian and myxosporidian sporal forms in the developpement of *Myxidium giordi* (parasite of *Anquilla anguilla*) through oligochaetes.

Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 13: 100-103

BLÜM, V., u. BORCHARD, B.(1983)

Die Einwirkung von Stressoren auf den physiologischen Zustand von Nutzfischen .

Bundesministerium für Forschung und Technologie.,

Forschungsbericht M 83-002.

BOGDANOVA, E. A. (1968)

Modern data on the distribution and biology of *Myxosoma cerebraalis* (Protozoa:Cnidosporea) as the agent of Whirling disease of salmonids

Bulletin of International Epizootics 69:1499-1506

BOGDANOVA, E. A. (1970)

On the occurrence of whirling disease of salmonids in nature in USSR. Second International Congress of Parasitology. Abstract #719. September 6-12. Washington, DC Journal of Parasitology. 56 (Section II, PartI): 399.

BOGDANOVA, E. A. (1971)

Ox nachotschenii vobuiitelja vertescha u chariusa v basseine

scerviemoi Dvina. *Referaty dokladov synposium~ PO bo lesnjam i parasitui?~ ryb ledovitomorskoj provintshtii*, p. 23.

BONATH, K. (1977)

Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

BUSTOS, P., CALBUYAHUE,J., MONTANA, J., OPAZO, B., ENTRALA, P., SOLERVICENS, R. (1995)

First isolation of *Flexibacter psychrophilus* , as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile.

Bull Eur Ass Fish Pathol 15:162-164

Literaturverzeichnis

BUSTOS, P., POBLETE, A., NAVARRO, J., MONTANA, J. (1992)

Reportes de meningo-encefalitis asociado a transtornos conductuales por BKD (bacterial kidney disease) en salmon coho (*O. kisutch*) en la X y XII region, Chile.
XI11 Panamerican Congress of Veterinary Medicine, Santiago, p 366

BOUSTEAD, N. C. (1992)

Data from a survey to detect whirling disease in New Zealand.
New Zealand freshwater fisheries report 135: 1-15.

BRINKHURST, R. O. (1996)

On the role of tubificid oligochaetes in relation to fish disease with special reference to the Myxozoa. Annual Review of Fish Disease **6**: 29-40

BRUHL, L. (1926)

Bericht über die die Fischereitagung in Königsberg i. Pr. Von 2. Juli bis 1. August.
Fischereizeitung **29**: 813-815

BROWN, L. A. (1988)

Anesthesia in fish
Vet. Clin. North Am. (small anim. pract.) **18**: 317 - 330

BÜTSCHLI, O. (1881)

Myxosporidia. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs.
Protozoa 1, 590-603

CANNING, E. U., CURRY, A., FEIST, S. W., LONGSHAW, M., OKAMORA, B. (2000)

A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism), *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**: 456-468

CANNING, E. U., OKAMURA, B. (2004)

Biodiversity and Evolution of the Myxozoa,
Advances in Parasitology, **56**: 43-131

Literaturverzeichnis

CHEN, Q. L., MA, C. L. (1998)

Myxozoa: myxosporea (in Chinese with English summary). Science Press, Beijing

CHIWEYITE, EJIKE. u. SCHRECK, C. B. (1980)

Stress and Social Hierarchy Rank in Coho Salmon. Transactions of the American Fisheries Society ;Article: pp. 423–426

CONRAD, J. F., DeCEW, M. (1967)

Observations on deformed juvenile coho salmon.

Fish Comm Oregon Res Briefs 13:129

CONTOS, N. u. ROTHENBACHER, H. (1974)

An efficient concentration and purification method for the spores of *Myxosoma cerebralis*.

Progre Fish Cult. 36,101-102.

CORDERO-DEL-CAMPILLO, M. A., DIEZ, E., ALVAREZ-PELLITERO, M. P., ROJO VAZQUEZ, F. A. (1975)

Torneo de la trucha (Myxosomosis). Revisión. Suplemento Científico del Boletín Informativo Consejo General de Colegio Veterinarios de España, Madrid

CRAWSHAW, M. Z., SWEETING, R. A. (1986)

Myxobolus koi Kudo, 1919: a new record for Britain. *J. Fish Dis.* 9: 465–467

DEMMELE, E. (1999)

Untersuchungen zu Immunreaktionen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bei der Drehkrankheit der Salmoniden.

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München

DENSMORE, C. L., BLAZER, V. S., CARTWRIGHT, D. D., SCHILL, W. B., SCHACHTE, J. H., PETRIE, C. J., BATUR, M. V., WALDROP, T. B., MACK, A., POOLER, P. S. (2001)

A Comparison of Susceptibility to *Myxobolus cerebralis* among Strains of Rainbow Trout and Steelhead in Field and Laboratory Trials. *Journal of Aquatic Animal Health* 13 (3)

Literaturverzeichnis

DOFLEIN, F. (1898)

Studien zur Naturgeschichte der Protozoen.

111. Uber Myxosporidien. Zool. Jb. (Abt. Anat. Ontog.Tiere) 2: 281-350

DONEC, Z. S., SHULMAN, S. S.(1984)

Knidosporidii (Cnidosporidia).In: Key to the Parasites of Freshwater Fishes of the USSR, (Ed. O. N. Bauer). Nauka, Leningrad, 1: 88-251 (in Russian)

DYKOVÁ, I., u. LOM, J. (1984)

Intramuscular development and viriability of *Myxobolus cyprini* Doflein (Myxosporea) parasite of cyprinid fishes.J. Protozool. 31, 50A

DYKOVÁ, I. u. LOM, J. (1988)

Review of pathogenic myxosporeans in intensive culture of carp (*Cyprinus carpio*) in europe.Folia Parasitol. 35, 289-307

DYKOVÁ, I. , TOMÁS, T., FIALA, I. u. LOM, J. (2007)

New data on *Soricimyxum fegati* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence. FOLIA PARASITOLOGICA 54: 272–276

ELLIS, A. E., HASTINGS, T. S., MUNRO DAFS, A. L. S. (1981)

The role of *Aeromonas Salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis
Journal of Fish Diseases 4, 41-51

EI-MANSY A., MOLNÁR, K. (1997a)

Development of *Myxobolus hungaricus*. (Myxosporea:Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. Diseases of Aquatic Organisms. 31: 227-232

EL-MANSY, A., u. MOLNÁR, K. (1997b)

Development of *Myxobolus hungaricus* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts.*Dis. Aquat. Org.*, 31:227–232.

Literaturverzeichnis

EL-MATBOULI, M. (1988)

Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus. cotti*-Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde.

Diss. rer.nat., Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI, M. (1996)

Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* Hofer 1903 (Myxozoa). Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI, M., FISCHER-SCHERL, T., HOFFMANN, R. W. (1992a)

Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some *Myxosporea* spp. important for freshwater fish. Annual Review of Fish Diseases **3**: 367-402

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1989)

Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms. Parasitology Research **75** (6): 461-464

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1991a)

Transmissionsversuche mit *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus. pavlovskii* und ihre Entwicklung in Tubificiden. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde.

Zeitschrift für Fischereiforschung Rostock **29**: 70-75

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1991b)

Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Fumagillin.

Disease of Aquatic Organisms **10**: 109-113

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1991)

Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by Fumagillin.

Disease of Aquatic Organisms **10**:109-113

Literaturverzeichnis

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1992b)

Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores.

Journal of Aquatic Animal Health **3**: 260-262

EL-MATBOULI, M. u. HOFFMANN, R. W. (1993)

Myxobolus carassii Klokacewa, 1914 also requires an aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex* as intermediate host in its life cycle.

Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. **13**: 189-192

EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W., MANDOCK, C. (1995)

Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage.

Journal of Fish Biology **46**: 919-935

EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W., SCHOEL, H., McCONNEL, T. S., HEDRICK, R. P. (1999)

Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage.

Diseases of Aquatic Organisms **35**, 1-12

EL-MATBOULI, M., u. HOFFMANN, R. W. (1998)

Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*.

International Journal for Parasitology **28**: 195-217

EL-MABOULI, M., HOLSTEIN, T. W., HOFFMANN, R. W. (1998)

Determination of nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease.

Parasitology Research **84**: 694-699

Literaturverzeichnis

EI-MATBOULI, M., SOLIMAN, H. (2005)

Development of a rapid assay for diagnosis of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaetes using Loop-mediated isothermal amplification.

Journal of Fish Diseases 28: 549-557

ELSON, K. G. R. (1969)

Whirling disease in trout. Nature (London) 223:968.

ENGELKING, H. M. (2002)

Potential for introduction of *Myxobolus cerebralis* into the Deschutes River watershed in central Oregon from adult anadromous salmonids. In: *Whirling Disease: Reviews and Current Topics*, Bartholomew J and Wilson C (eds), Symposium 29, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 25–32.

ENTRALA, P., BUSTOS, P., MONTANA, J., OPAZO, B., CALBUYAHUE, J. (1996)

First isolation of *Cytophaga psychrophila* [F, psychrophilus] as a causative agent of nervous disorder in fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile.

Bull Eur Ass Fish Pathol

LULING, K. H. (1952)

Die Erreger der knotchen-baulen und drehkrankheit unserer fische.

Osterreichs Fischerei 5, 171–173.

FAWC (1996)

Report on the Welfare of Farmed Fish

FAWC (Farm Animal Welfare Council), Subiton, Surrey/England

GONZALEZ-LANZA, C. u. ALVAREZ-PELLITRO, P. (1984)

Myxobolus farionis n. sp. and *M. ibericus* n. sp. of *Salmo trutta f. fario* from the Duero basin (NW Spain). Description and population dynamics.

Angewandte Parasitologie, 25, 181-i89.

Literaturverzeichnis

GRAFF, D. R. (1996)

Whirling disease: the Midwest/Eastern experience. In: Proceedings of Whirling Disease Workshop –Where do we go from here? (ed. by E.P. Bergersen & B.A. Knoph), pp. 43–53. Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Fort Collins.

GRIFFIN, B. R u. DAVIS E. M. (1978)

Myxosoma cerebralis: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*salmo gairdneri*).

Journal of the Fisheries Research Board of Canada **35**: 1186-90

GROßHEIDER, G. u. KÖRTING, W. (1992)

First evidence that *Hoferellus cyprini* (Doflein, 1898) in transmitted by Nais sp.

Bull. Eur. Ass. Fish Path. **12**: 17-20

GRONOW, G. (1974)

Über die Anwendung des an Säugetieren erarbeiteten Begriffes „Stress“ auf Knochenfische

Zool. Anz. Jena **192**: 316 - 331

GUSTAFSON, D. L. (1997)

Ecological association of *Tubifex tubifex* in Montana waters. In: Whirling Disease Symposium: Expanding the Database. Whirling Disease Foundation. pp. 47-51.

HALLIDAY, M. M (1973a)

Studies of *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. I.

The diagnosis of infection. Nordisk Veterinaermedicin 25: 345-348

HALLIDAY, M. M. (1973b)

Studies of *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. **11**. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis*, in experimentally infected sainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures.

Nordisk Veterinaermedicin . 25:349-358.

Literaturverzeichnis

HALLIDAY, M. M. 1974

Studies on *Myxosoma cerebralis* a parasite of salmonids. IV. A preliminary immunofluorescent investigation of the spores of *Myxosoma cerebralis*.

Nordisk Veterinaermedicin 26:173179.

HALLIDAY, M. M (1976)

The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease in salmonids.

Journal of Fish Biology 9: 339-357

HAVELKA, J. and VOLF, F. (1970)

Whirling disease of Salmonids caused by *Myxosoma cerebralis* in Czechoslovakia. Second International Congress of Parasitology. Abstract #253, September 6-12, Washington,

DC. Journal of Parasitology. 56 (Section II, Part I): 137-138.

HEDRICK, R. P., GROFF, J. M., FOLEY, P., MCDOWELL, T (1988)

Oral administration of Fumagillin DCH protects chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* from experimentally induced proliferative kidney disease.

DIS, aquat. Org 4:165-168

HEDRICK, R. P., EL-MATBOULI, M., ADKINSON, M. A., MacCONNELL, E. (1998)

Whirling Disease: Re-emergence among wild trout.

Immunological revue 166: 365-376

HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., GAY, M., MARTY, G. D., GEORGIADIS, M. P., MACCONNELL, E (1999a)

Comparative susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease.

Diseases of Aquatic Organisms 37: 173-183

HEDRICK, R.P., MCDOWELL, T. S., MUKKATIRA, K., GEORGIADIS, M. P., MACCONNELL, E. (1999b)

Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease.

Journal of Aquatic Animal Health 11: 330-339

Literaturverzeichnis

HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., MARTY, G. D., MAKKATIRA, K., ANTONIO, D. B., ANDREE, K. B., BUKHARI, Z., CLANCY, T. (2000)

Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies.

Diseases of Aquatic Organisms 42, 53-59

HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., MUKKATIRA, K., GEORGIADIS, M. P., MACCONNELL, E (2001)

Susceptibility of three species of anadromous salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease.

Journal of Aquatic Animal Health 13:43-50.

HERMANN, W. u. KÖRTING, W. (1985)

Improved methods for detecting whirling disease (*Myxobolus cerebralis* infection) in rainbow trout. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 98: 126-129

HEWITT, G. C., u. LITTLE, R. W. (1972)

Whirling disease in New Zealand trout caused by *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) (Protozoa: Myxosporidia). New Zealand

Journal of Marine and Freshwater Research 6:110.

HINER, M., MOFFITT, C. M. (2002)

Modeling *Myxobolus cerebralis* in trout: associations with habitat variables. In: Bartholomew J.L., Wilson JC (eds) whirling disease: reviews and current topics.

Am Fish Soc Symp 29, Bethesda, MD: p 167-179

HNATH, J. G. (1970)

Whirling disease in the state of Michigan.

Journal of Parasitology 56:149-150

HNATH, J. G. (1988)

Whirling Disease in Michigan: a historical perspective. In: Whirling Disease Management in Northern America, an Emergency Conference, Denver CO, April 12-14

Literaturverzeichnis

HOFFER, B. (1903)

Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. Allgemeine Fischereizeitung **28**: 7-8

HOFFMAN, G. L. (1961)

Whirling disease (Myxosporidia: *Myxosoma*) of trout. Fishery Leaflet 508. US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC

HOFFMAN, G. L. (1962)

Whirling disease of trout. United states Departement of the Interior. Fishery Leaflet 508. Fish und Wildlife Service.

HOFFMAN, G. L. (1966)

Effects of whirling disease. The Progressive Fish -Culturist. **28**: 151.

HOFFMAN, G. L. (1974)

Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish Transactions of the American Fisheries Society **103**, 541-550

HOFFMAN, G. L. (1975)

Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): Control with ultraviolet irradiation and effect on fish. Journal of Wildlife Diseases **11**, 505-507

HOFFMAN, G. L. (1976)

Whirling disease of trout.
US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Fishery leaflet 47, Washington, DC.

HOFFMAN, G. L. (1990)

Myxosoma cerebralis, a worldwide cause of salmonid whirling disease
Journal of Aquatic Animal Health **2**, 30-37

HOFFMAN, G. L. u. DUNBAR, C. E. (1961)

Studies on *Myxosoma cerebralis* (Hofer) Plehn (Protozoa: Myxosporidea) the cause of whirling disease of Trout.
Journal of Parasitology **47** : 29 (Abstract)

Literaturverzeichnis

HOFFMAN, G. L., DUNBAR, C. E., BRADFORD, A. (1962)

Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report-Fisheries, **427**: 1-14

HOFFMAN, G. L. Sr., u. HOFFMAN, G. L. Jr. (1972)

Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). I. The effects of chemicals on spores in vitro, and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds.

Journal of Wildlife Diseases. **8**: 49-53

HOFFMAN, G. L., u. MARKIW, M. E. (1977)

Control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): Use of methylene blue staining as a possible indicator of effect on heart of spores.

Journal of Fish Biology. **10**:181-183.

HOFFMAN, G. L., u. O'GRODNICK, J. O. (1977)

Control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*):effects of drying and disinfection with hydrated lime or chlorine.

Journal of Fish Biology. **10**:175-179

HOFFMAN G.L. u. PUTZ R.E. (1969)

Host susceptbibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. The Progressive Fish Culturist **31**: 35-37

HOFFMAN, G. L., PUTZ, R. E., DUNBAR, C. E. (1965)

Sudies on *Myxosoma cartilaginis* n. sp. (Protozoa: Myxosporidia) of centrarchid fish and a synopsis of the *Myxosoma* of North American freshwater fish.

Journal of Protozoology **12**: 319-332

HOFFMANN, R. W. (1998)

A century of whirling disease in Europe. Proceedings Whirling Disease Symposium, Lory Student Center, Colorado State University Fort Collins, Colorado, February 19-21: 1-3

Literaturverzeichnis

HOFFMANN, R. W., EL-MATBOULI, M., HOFFMANN-FEZER, G (1991)

Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Fischkrankheiten (Hrsg.) Tagung Schmiedefeld/Thüringen, 14-16. 11. 1990: 135-139

HORSCH, C. M. (1987)

A case history of whirling disease in a drainage system: Battle Creek drainage of the upper Sacramento River basin, California, USA.
Journal of Fish Diseases. 10:

IGER, Y. u. ABRAHAM, M. (1990)

The process of skin healing in experimentally wounded carp.
Journal of Fish Biology 36: 421-437

IVERSEN, E. S. (1954)

A new myxosporidian, *Myxosoma squamalis*, parasite of some salmonid fishes.
Journal of Parasitology 40: 397-404.

JANISZEWSKA, J. (1955)

Actinomyxidida. Morphology, ecology, history of investigations, systematics, development. Acta parasitologica Pollonia 2: 405-443

JANISZEWSKKA, J. (1957)

Actinomyxidida II: New systematics, sexual cycle, description of new genera species.
Zool. Pol. 8, 3-34

KANO, T., FUKUI, H. (1982)

Studies on Pleistophora infection in eel. *Anguilla japonica* I. Experimental induction of microsporidiosis and fumagillin efficacy.
Fish Path. 16:193-200 (in Japanese)

Literaturverzeichnis

KATZNELSON, H., JAMIESON, C. A. (1952)

Control of *Nosema* disease of honey bees with fumagillin, Science 115: 70-71

KENT, M. L., ANDREE, K. B. , BARTHOLOMEW, J. L., M. EL-MATBOULI, S. DESSER , XIAO, C., DEVLIN, R. H., FEIST, S. W , HEDRICK, R. P., HOFFMANN, R. W., KHATTRA, L., HALLETT, S. L., LESTER , R. J. G., LONGSHAW, M., PALENZUELA, O., u. SIDDAL, M. (2001)

Recent advances in our knowledge of the Myxozoa.

Journal of Eukaryotic Microbiology 48:395-413.

KENT, M. L., GROFF, J. M., MORRISON, J. K; YASUKATE, W.T., HOLT, R. A. (1989)

Spiral swimming behaviour due to cranial and vertebral lesions associated with Cytophaga psychrophila infections in salmonid fishes.

Dis Aquat Org 6: 11-16

KENT, M. L., WHITAKER, D. J., MARGOLIS, L. (1993)

Transmission of *Myxobolus arcticus* Pugachev and Khokholov, 1979, a myxosporean parasite of pacific salmo, via a triactinomyxon from the aquatic oligochaete *Stylogrillus heringianus* (Lumbriculidae). Canadian Journal of Zoology **71**: 1207-1211

KERANS, B. L. and ZALE, A. V. (2002).

The ecology of *Myxobolus cerebralis*. Pages 145-166 in J. L. Bartholomew and J. C. Wilson, editors. Whirling disease: reviews and current topics. American Fisheries Society Symposium 29, Bethesda, Maryland.

KOWALSKI, D. A., BERGERSON, E. P. (2003)

The toxicity of Baylucide and TFM to Tubifex tubifex: implications for chemical control of the Oligochaete host of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of Whirling disease. N Am J Aquac 65(3):171-178

KÜPPERS, M. (2003)

Untersuchungen verschiedener Regenbogenforellenstämme auf ihre Empfänglichkeit für *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden.

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München

Literaturverzeichnis

KUDO, R. R. (1919)

Studies on Myxosporidia. III. Biol.Monogr. 5: 241–503.

LANDSBERG, J. H.,u. LOM, J. (1991)

Taxonomy of the genus *Myxobolus* (Myxobolidae: Myxosporea): current listing of species and revision of synonyms. Syst. Parasitol. 18: 165-186

LAUREN, D. J., WISHKOVSKY, A., GROFF, J. M., HEDRICK, R. P., HINTON, D. E. (1989)

Toxicity and pharmacokinetics of the antibiotic Fumagillin in yearling rainbow trout (*Salmo gairdner* l). Toxicol. appl. Pharmacol. 98. 444-453

LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B. M., LEEDALE, G. F., LOEBLICH, A. E., LOM, J., LYNN, D., MERINGFELD E. G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F. G. (1980)

A newly revised classification of the Protozoa.

Journal of Protozoology 27: 37-58

LEWIS, W. M.,u. C SUMMERFELT, R. (1964)

A Myxosporidan, *Myxobolus notemigoni* sp. n., parasit of the golden shiner .

Journal of Parasitology 50:386-389

LOM, J.u. DYKOVA, I. (1981)

Pathogenicity of some protozoan parasites of cyprinid fishes. In: Fish, Pathogens and Environment in European Polyculture (ed. By J. Oláh), pp:146-169.

Symposia Biologia Hungaria 23. Akadémiai Kiadó, Budapest.

LOM, J. (1987)

Myxosporea: a new look at long-known parasites of fish.

Parasitology Today 3 (11): 327-332

LOM, J. u. DYKOVA, I. (1992)

Protozoan Parasites of Fish. Volume 26. Elsevier, Amsterdam.

Literaturverzeichnis

LOM, J. u. HOFFMAN, G. L. (1971)

Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (HOFER, 1903) and *Myxobolus cartilaginis*.
Journal of Parasitology. 57, 1303-1308

LOM, J. u. MOLNÁR, K. (1983)

Myxobolus basilamellaris sp. n. (Myxozoa: Myxosporidia), a parasite of the gills of common carp
(*Cyprinus carpio* L.).

Folia Parasitol. 30: 1-3

LOM, J. u. NOBLE, E. R. (1984)

Revised classification of the class Myxosporidia Bütschli, 1881.

FOLIA PARASITOLOGICA (Prague) 31: 193-205

LOM, J. u. I. DYKOVÁ (2006)

Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic
Species.

FOLIA PARASITOLOGICA (Prague) 53: 1-36, 2006

LORZ, H. V. u. AMANDI, A. (1994)

Whirling disease of salmonids. In: Thoesen, J.C. (Ed.) Suggested procedures for the detection and
identification of certain finfish and shellfish pathogens. 4th Ed. Version 1.

Fish Health Section, American Fisheries Society. p.1-7.

LUTZ, U. (1992)

Bekämpfung der Drehkrankheit der Salmoniden mit dem Antibiotikum Fumagillin (DCH)
Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

MACCONNELL, E., QUINN, M., and WEISS, T. (1997)

Susceptibility of grayling, rainbow, and cutthroat trout to whirling disease by natural exposure to
Myxobolus cerebralis. 1997 Whirling Disease Symposium, Logan, UT.

MC-FARLAND, W. N. u. KLONTZ, G. W. (1969)

Anesthesia in fishes

Fed. Proc. 28: 1535 – 1540

Literaturverzeichnis

MACKINON, D. L. u. ADAM, D. I. (1924)

Notes Sporozoa parasitic in Tubifex. I. The life history of *Triactinomyxon stolic*.
Quart. J. microsc. Sci. 68: 187-209

MACLEAN, D.G. (1971)

A simplified procedure for detecting *Myxosoma cerebralis*(whirling disease) in large lots of fish.
Progressive Fisch-Culturist 33:203

MALONEY, R., CAWTHON, R. J., MARKIW, M. u GROMAN, D. (1991)

The occurrence of *Myxobolus neurobius* (Myxosporea) in wild young Atlantic salmon and arctic char in New foundland. Journal of Aquatic Animal Health 5:146147.

MANDOK, C. (1993)

Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

MARGARITOV, N. M. (1960)

Whirling disease of trout in DRS-Samokov. *Rubno saopunstvo*.N2, Sofia.

MARGOLIS, M. L., KENT, M. L. u. BUSTOS, P. (1996)

Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America.
Diseases of Aquatic Organisms 25:33-37

MARKIW, M. E. (1989a)

Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout.
Disease of Aquatic Organisms. 6: 7-10.

MARKIW, M. E. (1991)

Whirling disease: earliest susceptible age rainbow trout to the triactinomyxon-stage of *Myxobolus cerebralis*.
Aquaculture Magazine 92: 1-6

Literaturverzeichnis

MARKIW, M. E. (1992a)

Salmonid Whirling Disease. U.S. Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center, Leetown. National Fish Health Research Laboratory. Fish and Wildlife Leaflet **17**

MARKIW, M. E. u. WOLF, K. (1974a)

Myxosoma cerebralis: isolation and concentration from fish skeletal elements-sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation.

Journal of the Fisheries Research Board of Canada **31**: 15-20

MARKIW, M. E. u. WOLF, K. (1980)

Myxosoma cerebralis: trypsinization of plankton centrifuge harvests increases optical clarity and spore concentration.

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **37**: 2225-2227

MARQUÈS, A. (1984)

Contribution à la connaissance des Actinomyxidies: Ultrastructure, cycle biologique, systematique. Languedoc, Université des Sciences et techniques, Thèse de Doctorat d'Etat.

MATTHEWS, J. (1995)

"Chassing Our Tails". Trout, Spring 1995: 24

MODIN, J. (1998)

Whirling Disease in California: A Review of its History, Distribution and Impacts, 1965-1997, J Aquat. Anim Health **10**: 132-142

MOLNÁR, K. (1979)

Myxobolus pavlovskii (AKHMEROV 1954) (Myxosporidia) infection in the silver carp and bighead. Acta Veterinaria Academia Hungarica **27**: 207-216

MOLNÁR, K. (1979)

Protozoan parasites of fish species indigenous in Hungary. Parasit. Hung. **12**: 5-8

Literaturverzeichnis

MOLNÁR, K. (2000)

Myxobolus intrachondrealis sp. n. (Myxosporidia: Myxobolidae), a parasite of the gill cartilage of the common carp, *Cyprinus carpio*.

Folia Parasitol. 47: 167-171

MOLNÁR, K., EL-MANSY, A., SZEKELY, Cs., BASKA, F., (1999)

Development of *Myxobolus dispar* (Myxosporidia: myxobolidae) in an oligochaete alternate host, *Tubifex tubifex*.

Folia Parasitol. 46,15–21.

MOLNÁR, K. u. KOVÁCS-GAYER, É. (1985)

The pathogenicity and development within the fish host of *Myxobolus cyprini* Doflein, 1898.

Parasitology 90: 549-555

MOLES, A. u. HEIFETZ, J. (1998)

Effects of the brain parasite *Myxobolus arcticus* on sockeye salmon

Journal of Fish Biology 52: 146–151

MORRISON, N. D. u. PRATT, I. (1973)

Sphaeromyxa maiyai sp. n. (Protozoa: Myxosporidia), coelozoic parasite of the Pacific tomcod *Microgadus proximus*.

Journal of Protozool. 20:214–217.

NEHRING, R. B., THOMPSON, K. G., TAURMAN, K. A., ADKINSON, W. (2003)

Efficacy of passive sand filtration in reducing exposure of salmonids to the actinospore of *Myxobolus cerebralis*.

Dis Aquat Organ. 57: 77-83

NEHRING, R. B u. WALKER, P.G. (1996)

Whirling disease in the wild: the new reality in the intermountain west

Fisheries (Bethesda) 21(6):28–32

Literaturverzeichnis

NOGA, E. J. (1996)

Whirling Disease (Black Tail)

In: Fish Disease: Diagnosis and Treatment

Eds.: L. L. Duncan, M. Steube, B. J. Wilson, Mosby-Year Book Incorporation, 183-185

NOLAN, D. T., REILLY, P.u. WENDELAAR BONGA, S. E. (1999)

Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) induces stress-related effects in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 947-959.

O'GRODNICK, J. (1975)

Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. Journal of Wild life. Dis. 11: 54-57

O'GRODNICK, J. (1978a)

Susceptibility studies of various salmonids in whirling disease: Histological staining and spore concentration procedures.

Marine Fisheries Review. 40: 30-31.

O'GRODNICK, J. (1979)

Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*).

Trans American Fisheries Society 108: 187-190

O'GRODNICK, J. u. GUSTAFSON, C. C. (1973)

A study of the transmission, life history and control of whirling disease of trout. Pennsylvania Fish Commission, Federal Aid to Fish Restoration Progress Report, F-35-R-5;

OIDTMANN, B. (1994)

Untersuchungen zum Auftreten von Schäden und Veränderungen des Blutbilds bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in Teichhaltungen im Vergleich mit Wildforellen
Vet.-med. Diss., Universität München.

Literaturverzeichnis

OIDTMANN, B. u. HOFFMANN, R. W. (2001)

Schmerzen und Leiden bei Fischen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114: 277-282.

OKAMOURA, B., CURRY, A., WOOD, T. S., CANNING, E. U. (2002)

Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa,

Parasitology **124**: 215-223

PETERS, G. (1979)

Zur Interpretation des Begriffes "Stress" beim Fisch in: Reichenbach-Klinke, H.-H. (Hrsg.): Fisch und Tierschutz **7**: 29 – 32

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York

PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G., CHRISTIE, P. (1982)

Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time course study
J. Fish Biol. **41**: 229 – 244

PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G. (1989)

Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol. biochem. **7**, 253-258.

PLEHN, M. (1904)

Über die Drehkrankheit der Salmoniden *Lentospora cerebralis* (Hofer).

Archiv für Protistenkunde **5**: 145-166

PRASHER, J. B., TIDD, W. M. u. TUBB, R. A (1971)

Techniques for extracting and quantitatively study the spore stage of the protozoan parasite *Myxosoma cerebralis*.

The Progressive Fish-Culturist. **33**: 193-196.

PREUDHOMME, J. G. (1970)

Whirling disease of trout in Morocco. FAO Aquaculture Bulletin **2**:14

Literaturverzeichnis

PRUNESCU, C. C., PRUNESCU, P., PUCEK, Z. u. LOM, J. (2007)

The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha)
Folia Parasitologica 54: 159–164.

PUGACHEV, O. N., u. KHOKHLOV, P. P. (1979)

Myxosporidia of genus *Myxobolus*--parasites from central nervous system of salmoniformes fish.
Pages 137-139 in Systematics and Ecology of Fish from Continental Watersheds of Far East.
USSR Academy of Sciences Press, Vladivostok. [In Russian]

PUTZ, R. E. 1969

Experimental transmission of *Myxosoma cerebralis* (whirling disease) and effect of freezing on the spores. Progressive Sport Fish Research. 55-57.

RAMIREZ-MEDINA, A. (1962)

Generalidades sobre myxosporidios y enfermedades aue des arrollan en 10s peces de aqua duke.
Bol. Zootecn. Cordoba 18, 1269-1277.

REICHENBACH-KLINKE, H. H. (1987)

Fisch und Naturschutz. Tierärztl. Praxis 15: 99-106.

RICHARDS, R. H., ROBERTS, R. J. u. SCHIOTFELDT, H. J. (1985)

Bakterielle Erkrankungen der Knochenfische.

In: Roberts RJ & Schotfeldt HJ (Eds) (pp 174-220) Grundlagen der Fischpathologie. Verlag

ROSE, J. D., MARRS, G. S., LEWIS, C., SCHISLER, G. (1998)

A neurological interpretation of the behavioral effects of whirling disease and evidence for pathology of brainstem and spinal control of swimming. In: Whirling Disease Symposium: Research in Progress.

Whirling Disease Foundation. pp. 89-92.

Literaturverzeichnis

ROSE, J. D., MARRS, G.S., LEWIS, C., SCHISLER, G. (2000)

Whirling Disease Behavior and its Relation to Pathology of Brain Stem and Spinal Cord in Rainbow Trout.

Journal of Aquatic Animal Health **12**: 107-118

ROSS, L. G. u. ROSS, B. (1999)

Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals

Blackwell Science, Oxford/England

RUIDISCH, S., EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1991)

The role of tubificid worms as an intermediate host in the life cycle of *Myxobolus pavlovskii*

Achmerov, 1954. Parasitological Research. **77**: 663-667

RYCE, E., MACCONNELL, E., ZALE, A (1998)

U.S. Fish and Wildlife Service Bozeman Fish Technology Center and Montana State University.

Effects of age, dose, and environmental stress on the development of whirling disease in rainbow trout. Whirling disease Symposium, Research in Progress Booklet, Feb. 19-21: 33-36

RYCE, E. K., ZALE, A. V., MACCONNELL, E. (2004)

Effects of fish age and parasite dose on the development of whirling disease in rainbow trout.

Dis Aquat Organ. **59**(3): 225-33

RYCE, E. K., ZALE, A. V., MACCONNELL, E., NELSON, M. (2005)

Effects of fish age versus size on the development of whirling disease of rainbow trout.

Diseases of Aquatic Organisms **63**: 69-76

RYDLO, M. (1971)

Nachweis von Sporen den *Myxosoma cerebralis* in verschiedenen Organen

drehkranker Regenbogenforellen. Zeitschr. ges. Fisch. **7**,97-99.

SCHÄPERCLAUS, W. (1931)

Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung.

Zeitschrift für Fischerei **29**: 521-567

Literaturverzeichnis

SCHÄPERCLAUS, W. (1954)

Fischkrankheiten. 708 pp. Berlin: Akademie-Verlag.

SCHÄPERCLAUS, W. (1986)

Fischkrankheiten. Vol. 2, IV Protozoonosen. Akademie-Verlag Berlin, 665-666

SCHÄPERCLAUS, W. (1990)

Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin

SCHÄPERCLAUS, W. (1991)

Fish diseases, Vol. 2. Akademie-Verlag, Berlin

SCHISLER, G. J., KEHMEIER, K. (2003)

Improved management practices in the Cache La Poudre River to control *Myxobolus cerebralis*
Source National Whirling Disease Symposium 2003 Salt Lake City, Utah

SCHOTT, A. (2002)

Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 im Rahmen
der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Diss.
Vet. Med. Ludwig-Maximilians-Universität München

SCHULZ, D. (1982)

Betäubung und Tötung von Süßwasserfischen
DTW Dtsch. Tierärztl. Wschr. **89**: 171 - 172

SCOLARI, C. (1954)

Sull'impiego dello stovarsolo nelle profilassi del 'capostan' o
'lentosporiasi' delle trote d'allevamento. La Clinica Veterinaria **77**: 50-53

SELYE, H. (1950)

The Physiology and Pathology of Exposure to Stress Acta Inc. Montreal.

SELYE, H. (1974)

Stress Piper Verlag, Hamburg

Literaturverzeichnis

SHULMAN, S. S. (1984)

[Parasitic protozoa.] Vol. I In: Bauer, O.N. (Ed.) /Key to parasites of freshwater fish of the USSR. Leningrad: Nauka, 428 pp. (In Russian).

SIINDERMANN, C. J. (1983)

An Examination of Some Relationships between Pollution and Disease.
Rapp. P-V. Reun. Cons. mt. Explor. Mer 182:37-43.

SIINDERMANN, C. J., (1984)

Fish and Environmental Impacts. Arch.
Fisch Wiss. 35:125-160

SIMON, R. M., JONES (2001)

The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish
Developmental and Comparative Immunology 25, 841-852

SKIRPSTUNAS, R., HERGERT, T. J., BALDWIN, T. J. (2006)

Detection of early stages of *Myxobolus cerebralis* in fin clips from rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*)
J Vet Diagn Invest 18:274–277

SMOTHERS, J. F., VON DOHLEN, C. D., SMITH, L. H. Jr., and SPALL, R. D. (1994)

Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. Science 265:1719-1721.

SZÉKELY, Cs., EL-MANSY, A., MOLNÁR, K. u. BASKA, F. 1998.

Development of *Thelohanellus hovorkai* and *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporidia: Myxozoa) in oligochaete alternate hosts.
Fish Pathol., 33:107–114.

SPALL, R. (1973)

Studies on the ultrastructure, ontogeny, and transmission of *Myxosoma pharyngens* and *Myxobolus cyprinid* (Protozoa: Myxosporidia). Oklahoma, State Univ., Diss.

Literaturverzeichnis

SPEARE, D. J., OSTLAND, V. E., FERGUSON, H. W. (1993)

Pathology associated with meningoencephalitis during bacterial kidney disease of salmonids.
Res Vet Sci 54:25-31

STATON, L., ERDAHL, D. u. EL-MATBOULI, M. (2002)

Efficacy of fumagillin and TNP-470 to prevent experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In: Whirling Disease: Reviews and Current Topics, Bartholomew J and Wilson C (eds), Symposium 29, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 239–247.

TACK, E. (1951)

Bekämpfung der Drehkrankheit mit Kalkstickstoff. Fishwirt. 1, 123-130.

TAYLOR, R. E. L., COLI, S. J., JUNELL, D. R. (1973)

Attempts to control whirling disease by continuous drug feeding.
Journal of Wildlife Diseases 9: 302-305

THOMPSON, K. G., NEHRING, R. B., BOWDEN, D. C. u. WYGANT, T. (1998)

Differential susceptibility of six species of salmonids held as sentinel fish and exposed to whirling disease in the Colorado River. In: Whirling Disease Symposium: Research in Progress. Whirling Disease Foundation. pp. 41-45.

THOMPSON, K. G., NEHRING, R. B., BOWDEN, D. C., u. WYGANT, T. (1999)

Field exposure of seven species or subspecies of salmonids to *Myxobolus cerebralis* in the Colorado River, Middle Park, Colorado.
The Journal Aquat Anim Health 11:312–329

TIMM, T. E. (1972)

Relation of geographic distribution of aquatic Oligochaeta to temperature. In: Vodnye maloshchetinkovye chervil. Materialy vtorogo vsesoyuzn. Simp. Borok. 1972, 124-12

TOMASEC, I. (1960)

Lutte contre les principales maladies infectieuses des poissons.
Bulletin of the Office International des Epizootics 54:55-57

Literaturverzeichnis

USPENSKAYA, A. V. (1955)

Biology, distribution and economic importance of *Myxosoma cerebralis*, the causative agent of whirling disease of trout. Lectures of the Academy of Science USSR **105**: 1132-1135

USPENSKAYA, A.V. (1957)

The ecology and spreading of the pathogen of trout whirling disease-*Myxosoma cerebralis* (HOFER 1903; PLEHN 1905) in the fish ponds of the Soviet Union. Pages 47-55 in GK Petrushevskii, editor. Parasites and diseases of fish.

Bulletin All-Union Institute of Freshwater Fisheries, Leningrad

USPENKAYA, A. (1995)

Alternation of Actinosporean and Myxosporean Phases in the Life Cycle of *Zschokkella* nova (Myxozoa), The Journal of Eukaryotic Microbiology, **42 (6)**: 665-668

VANCO, R. (1992)

Contribution a l'étude de La Pathologie des Alevins de la Truite. Paris: 92 Pp.

VINCENT, E. R. (1996)

Whirling disease and wild trout: the Montana experience. Fisheries 21 **(6)**: 32-33

VINCENT, D. (1997)

The susceptibility of five fish species and strains to whirling disease. In: Whirling Disease Symposium: Expanding the Database. Whirling Disease Foundation. pp. 77-78.

WAGNER, E. (2002)

Whirling disease prevention, control and management: a review. In: Bartholomew JL, Wilson JC (eds) Whirling disease: reviews and current topics.

American Fisheries Society, Bethesda, MD, p 217-225

WALKER, P. G. u. NEHRING, R.B. (1995)

An investigation to determine the cause(s) of the disappearance of young wild rainbow trout in the upper Colorado River in Middle Park, Colorado. Colorado Division of Wildlife Report, Denver. Colorado

Literaturverzeichnis

WEDEMEYER, G. A (1997)

Rearing conditions: effects on fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), Fish Stress and Health in Aquaculture. Soc. Exp. Biol. Seminar Series, vol. 62. University Press, Cambridge, pp. 35–71.

WEDEMEYER, G. A. u. McLEAY, D. J. (1981)

Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering, A.D. (Ed.), Stress in fish. Academic Press, London. pp. 247-275.

WOLF, K. (1957)

The first case of Whirling disease among our salmonid fish in our hatcheries.
Sbornik CSA V, Zivocisna Vyroba 30:425-428

WOLF, K. (1986)

Salmonid whirling disease: status in the United States, 1985.
Journal of Wildlife Diseases 22: 295-299

WOLF, K. u. MARKIW, M. E. (1981)

Salmonid Whirling Disease: status in the United States, 1985
Journal of wildlife diseases 22:295-299

WOLF, K., MARKIW, M. E. (1982)

Myxosoma cerebralis: inactivation of spores by hot smoking of infected trout
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39, 926-928

WOLF, K. u. MARKIW, M. E. (1984)

Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225: 1449-1452

WOLF, K., MARKIW M. E., HILTUNEN J. K. (1986)

Salmonid whirling disease: Tubifex tubifex (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle.
Journal of Fish Diseases 9: 83-85

Literaturverzeichnis

WOLF, K., MARKIW, M. E., CRUZ, M., GALHANO, M. H., EIRAS, J., HERMAN, R. L. (1981)

Non-myxosporidian blacktail of salmonids.

Journal of Fish Diseases **4**: 355-357

WOOD, J. W. (1968)

Diseases of Pacific Salmon: their Prevention and Treatment. State of Washington";

Department of Fisheries, Hatchery Division. Section D, p. 8.2. ;

WOODWARD, J. J. AND SMITH, L. S. (1985)

Exercise training and the stress response in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *I.*

Fish Biol. **26**, 435-447.

WYATT, E.J. u. PRATT, I. (1963)

Myxobolus insidiosus sp. n. a myxosporidian from the musculature of *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum).

Journal of Parasitology, 49: 951-955.

WYK, G. F. VAN. (1968)

Jonkershoek Hatchery, Division of Inland Fisheries, Department of Nature Conservation, Province of Good Hope, Republic of South Africa.

Ann. Rep.24, 1967, 1968

YASUTAKE, W.T. u. WOOD, E. M. (1957)

Some myxosporidia found in Pacific northwest salmonids.

Journal of Parasitology, 43, 633-642

YOKOHAMA, H., OGAWA K u WAKABAYASHI, H. (1991)

A new collection method of actinosporeans- a probable infective stage of myxosporeans to fishes- from tubificids and experimental infection of Goldfish with the actinosporean *Raabeia* sp.

Fish Pathology **26**: 133-138

Literaturverzeichnis

YOKOHAMA, H. (1997)

Transmission of *Thelohanellus hovorkai* Achmerrov, 1960 (Myxosporea: Myxozoa) to common carp, *cyprinus carpio*, through the alternate oligochaete host. Syst.

Parasitology **36**: 79-84

YOKOHAMA, H. (2003)

Areview: Gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes,

Fish Pathology **38 (4)**: 125-136

10. Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Rudolf Hoffmann für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für seine Geduld und Diskussionsbereitschaft. Ich möchte mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Hoffmann für die Ermöglichung meiner Promotion bedanken.

Ich danke dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die zweijährige finanzielle Unterstützung.

Frau Anke Bahrani danke ich für die Unterstützung, mein Stipendium zu erlangen und für Ihre ausgeprägte Hilfsbereitschaft dankbar

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. El-Matbouli für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und für die Gewährung eines zweijährigen Forschungsaufenthaltes in seinem Labor.

Meinen herzlichen Dank gilt Herrn Dr. Werner Hoedt für seine Freundschaft, Ratschläge, für die Korrektur und moralische Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank für Herrn Dr. Hatim Soliman für die praktischen Tipps, Gespräche und Ratschläge.

Herrn Daniel Grabner und Herrn Christoph Dörfler danke ich für die Korrektur und die kritische Auseinandersetzung mit dem Thema und für die neuen Argumente.

Bei den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. El-Matbouli bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Knaus , Herrn Dr. Gunnar Dembek, Herrn Christoph Dörfler, Frau Dr. Ute Rucker, Herrn Daniel Grabner, Herrn Dr Hamed Coulibaly, Herrn Dr. Amine Oucible, Frau Dr. Vanessa Severin, Frau Dr. Edit Eszterbauer, Herrn Dr. Dennis Kallert, Frau Nina Seel, Frau Simone Keller, Herrn Dr. Michael Meixner, Frau Dr. Marianne Mattes, Herrn Dr. Sho Shirakashi , Frau Ilka Schumacher und Herrn Martin Beyer.

Ich danke Frau Christine Kühnhauser-Vogt, Klinik für Fische und Reptilien, für die Einarbeitung in histologische Arbeitsmethoden.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Sheila Geiger, Frau Antoinette von Sigriz-Pesch, Herrn Christian Zenner und Frau Verena Ziemer für die Herstellung der histologischen Schnitte und für seine geduldige Einweisung in die molekularbiologischen Methoden.

Frau Gabi Joksch bin ich insbesondere für das prompte Korrekturlesen dieser Arbeit und für Ihre ausgeprägte Hilfsbereitschaft dankbar.

Dank auch an alle meine Freunde und Freundinnen, Kollegen und Kolleginnen, die mit Rat und Tat geholfen haben, insbesondere an Frau Dr. Friederike Weinzierl, Herrn André Michas, Frau Dr. Ilina Bühler, Herrn Thomas Türbl, Herrn Dr. Markus Baur, Herrn Tobias Friz, Frau Sabine Oefner, Frau Manuela Punz, Frau Diana Lewitzki, Frau Dr. Carmen Baldus, Frau Dr. Elisa Härtl, Herrn Rudolf Kubesch, Frau Isabel Grefen, Frau Natalie Steidele

Frau Johanna Foof danke ich für die freundliche Unterstützung, einen wunderschönen Aufenthalt in München zu finden. Das Zimmer war ein richtiges Zuhause für mich, die Angestellten sind freundlich und hilfsbereit.

Ich danke Frau Inna Minasarova, Frau Isabel Sender, Frau Annie Sender, Herrn Dr. Peter Steinbauer, Herrn Salah Al-Masri und Herrn Mohamed Abeddou für ihre Unterstützung und für die Ablenkung an geeigneter Stelle.

Ich möchte allen Personen danken, die auf die eine oder andere Weise das Gelingen und den Abschluss dieser Dissertation ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglichten, und bei meinem Bruder Dr. Mustapha Oumouna für die zahlreichen Ratschläge in allen Phasen dieser Arbeit bedanken. Ohne ihre Zuwendung und Förderung wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

11. Lebenslauf

Name: M'hamed Oumouna

Geburtsdatum: 19. Dezember 1970

Geburtsort: Cherchell/Algerien

Vater: Braham Oumouna

Mutter: Aicha Oumouna geb. djamoui

Schulausbildung:

1976 - 1983 Grundschule: Ecole Bendifala /Cherchell

1984 - 1988 Hauptschule: Moyen Benbadis /Cherchell

1986 - 1990 Gymnasium: Lyceé El-Ziania /Cherchell

Juli 1992: Abitur: Abiturstabschluss (Baccalauréat Science)

Studium:

1992 - 1997 Studium der Tiermedizin an der Universität de Blida

Juli 1997 Abschluß Tierarzt (docteur en médecine vétérinaire)

Praktikum Juni 2001-September 2001 am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät München, LMU München

Deutschkurse

Juni 2002 - September 2002 Grundstufe III Goethe Institut. Mannheim/
Deutschland

Stipendium

2002 – 2004 DAAD Stipendiat von Oktober 2002 bis 2004 am Institut für Zoologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

Promotionsstudium: Seit März 2005 Doktorand am Institut für Zoologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen

