

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. M. El-Matbouli

# **Untersuchungen zur Wirksamkeit von Chinin gegen die Ichthyophthiriose bei Karpfen**

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

von  
Ilka Vera Schumacher  
aus Braunschweig

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Die Untersuchungen wurden finanziell gefördert durch das Bayerische  
Staatsministerium für Ernährung, Forsten und Landwirtschaft aus der  
Fischereiabgabe des Freistaats Bayern.

*Meiner Familie gewidmet*



## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IV
<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
1. GESCHICHTE UND SYSTEMATIK VON <i>I. MULTIFILIIS</i> .....	2
2. LEBENSZYKLUS VON <i>I. MULTIFILIIS</i> .....	2
3. EPIDEMIOLOGIE UND BEDEUTUNG DER ICHTHYOPHTHIRIOSE .....	9
4. PATHOGENESE UND SYMPTOMATIK .....	11
5. THERAPIE DER ICHTHYOPHTHIRIOSE .....	12
5.1 Prävention .....	12
5.2 Therapie .....	14
5.2.1 Physikalische Methoden .....	14
5.2.2 Medikamentöse Behandlungen .....	14
5.2.2.1 Wirkung auf freischwimmende Stadien durch Badebehandlungen .....	14
5.2.2.2 Wirkung auf Trophonten durch orale Therapeutika .....	18
6. CHININ: EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNGSGEBIETE .....	19
<b>III FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....</b>	<b>22</b>
<b>IV MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
1. MATERIAL .....	23
1.1 Fische .....	23
1.1.1 Karpfen .....	23
1.1.2 Regenbogenforellen .....	23
1.2 Parasiten .....	24
1.3 Chemikalien .....	24
2. METHODEN .....	24
2.1 Versuchsvorbereitung .....	24
2.1.1 Etablierung des Laborzyklus von <i>I. multifiliis</i> .....	24
2.1.2 Herstellung des Medizinalfutters und Akzeptanzversuche .....	25
2.1.2.1 Prüfung der Akzeptanz .....	26
2.1.2.2 Herstellung der verschiedenen Varianten des Medizinalfutters .....	26
2.2 <i>In vitro</i> Versuche .....	29
2.2.1 Übersicht zum Versuchsablauf .....	29
2.2.2 Gewinnung der Parasitenstadien .....	30
2.2.2.1 <i>In vitro</i> Versuch mit Trophonten .....	31

2.2.2.2	<i>In vitro</i> Versuch mit Theronten.....	31
2.2.2.3	<i>In vitro</i> Versuch mit Tomonten.....	31
2.2.3	Zugabe der Versuchslösungen .....	32
2.2.4	Auswertung der Proben .....	32
2.3	<i>In vivo</i> Versuche .....	33
2.3.1	Infektion von Versuchsfischen.....	33
2.3.1.1	Infektion per Kohabitation mit infizierten Fischen.....	33
2.3.1.2	Infektion mit <i>in vitro</i> erzeugten Theronten.....	34
2.3.1.3	Kombination der beiden Verfahren.....	34
2.3.2	Nachweis des Ausmaßes der Infektion.....	35
2.3.3	Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber <i>I. multifiliis</i> .....	35
2.3.4	Fütterungsversuche.....	36
2.3.4.1	Therapeutische Wirksamkeit von Chinin.....	36
2.3.4.2	Prophylaktische Wirksamkeit von Chinin .....	37
2.3.5	Vorversuche zur oralen Verabreichung über eine Schlundsonde .....	39
2.3.6	Injektionsversuche .....	39
2.3.6.1	Toxizitätsversuche .....	40
2.3.6.2	Therapeutische Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation .....	40
2.4	<i>Statistische Auswertungen</i> .....	41
<b>V</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
1.	AKZEPTANZVERSUCHE.....	42
2.	INFEKTION UND VERGLEICH DER EMPFÄNGLICHKEIT ZWEIER KARPFFENLINIEN GEGENÜBER <i>I. MULTIFILIIS</i> .....	43
3.	<i>IN VITRO</i> VERSUCHE.....	45
3.1	<i>Wirkung von Chinin auf Trophonten</i> .....	45
3.2	<i>Wirkung von Chinin auf Theronten</i> .....	47
3.3	<i>Wirkung von Chinin auf Tomonten</i> .....	47
4.	<i>IN VIVO</i> VERSUCHE.....	50
4.1	<i>Fütterungsversuche</i> .....	50
4.1.1	Therapeutische Wirksamkeit von Chinin.....	50
4.1.2	Prophylaktische Wirksamkeit von Chinin .....	53
4.2	<i>Vorversuche zur oralen Verabreichung über eine Schlundsonde</i> .....	54
4.3	<i>Injektionsversuche</i> .....	54
4.3.1	Toxizitätsversuche .....	54
4.3.2	Therapeutische Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation....	56
<b>VI</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
1.	METHODENDISKUSSION.....	58
1.1	<i>Umgang mit I. multifiliis im Labor</i> .....	58

1.1.1	Etablierung des Laborzyklus.....	58
1.1.2	Durchführung der Infektion von Versuchsfischen.....	60
1.2	<i>In vitro</i> Versuche.....	62
1.3	<i>In vivo</i> Versuche.....	63
1.3.1	Herstellung des Medizinalfutters.....	63
1.3.2	Verwendete Chininkonzentrationen.....	64
1.3.3	Angewandte Applikationsmethoden.....	65
1.3.4	Auswahl der Applikationsdauer.....	66
1.3.5	Nachweis des Ausmaßes der Infektion.....	68
2.	ERGEBNISDISKUSSION.....	69
2.1	<i>In vitro</i> Versuche.....	69
2.2	<i>Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber I. multifiliis</i> .....	70
2.3	<i>Wirksamkeit von Chinin bei verschiedenen Applikationsarten</i> .....	71
2.4	<i>Anwendung von Chinin als Therapeutikum</i> .....	73
<b>VII</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>75</b>
<b>VIII</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>77</b>
<b>IX</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>79</b>
<b>X</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>91</b>
1.	ERGEBNISSE EINZELNER VERSUCHSREPLIKATE DER <i>IN VIVO</i> VERSUCHE.....	91
1.1	<i>Fütterungsversuche zur therapeutischen Wirksamkeit von Chinin</i> .....	91
1.2	<i>Fütterungsversuche zur prophylaktischen Wirksamkeit von Chinin</i> .....	93
1.3	<i>Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber I. multifiliis</i> .....	94
1.4	<i>Injektionsversuche zur therapeutischen Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation</i> .....	95
	DANKSAGUNG.....	96

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
° C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FDA	Fluorescein-Diacetat
g	Gramm
G	Gauge
i.m.	intramuskulär
<i>I. multifiliis</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MS 222	Tricain Methan-Sulfonat
n	Anzahl
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PI	Propidiumjodid
s.	siehe
S.E.	Standardfehler (engl.: standard error of the mean)
sp.	Spezies
SPF	spezifisch pathogenfrei
Tab.	Tabelle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
vs.	gegen (lat.: versus)



## **I Einleitung**

Die Ichthyophthiriose, auch als Weißpünktchenkrankheit oder Grießkörnchenkrankheit bezeichnet, wird durch den Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* verursacht und gehört zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Fischkrankheiten. Charakteristisch bei dieser Erkrankung ist das Auftreten von bereits makroskopisch erkennbaren weißen Punkten auf der Oberfläche der befallenen Fische. Bei starker Infektion kommt es zu hohen Mortalitäten. Bei Zierfischen kann die Parasitose mit einem breiten Spektrum an Medikamenten, insbesondere dem Malachitgrünoxalat, effektiv behandelt werden. Da dieser Wirkstoff jedoch kanzerogenes Potential hat, wurde die Anwendung bei Fischen, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, aus Gründen des Verbraucherschutzes verboten. Aufgrund des Mangels an zugelassenen Therapeutika besteht bei Nutzfischen ein großer Bedarf nach einer Alternative zur Behandlung der Ichthyophthiriose.

Chinin ist ein Medikament mit antiprotozoischer Wirkung, das seit langer Zeit zur Behandlung der Malaria eingesetzt wird. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirksamkeit dieser Substanz auf Stadien von *I. multifiliis* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Der Fokus wurde dabei aufgrund des vorliegenden Therapienotstands insbesondere auf die Behandlung der Ichthyophthiriose bei Nutzfischen, speziell Karpfen, gerichtet. Es sollte anhand von Fütterungsversuchen überprüft werden, ob über Medizinalfutter eine prophylaktische und therapeutische Wirkung von Chinin zu erzielen ist und zusätzlich bei parenteraler Applikation der Effekt auf die in der Fischhaut lokalisierten Stadien untersucht werden.

## II Literaturübersicht

### 1. Geschichte und Systematik von *I. multifiliis*

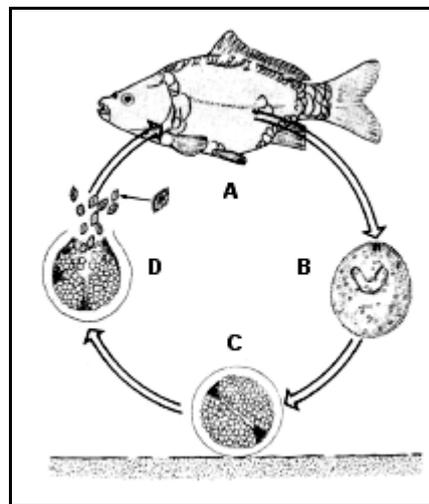
Benannt wurde der Erreger der Ichthyophthiriose im Jahre 1876 von dem Franzosen Fouquet (Nigrelli et al., 1976). Der Name für den Einzeller *Ichthyophthirius multifiliis*, welcher soviel bedeutet wie „Fischlaus mit vielen Kindern“, basiert auf seinem Fortpflanzungsverhalten, da eine große Anzahl an Tochterzellen aus einem Trophonten entstehen kann (Wahli-Moser, 1985; Buchmann et al., 2001; Matthews, 2005). Beschreibungen über das Auftreten der Ichthyophthiriose lagen jedoch bereits lange vor der Entdeckung und der näheren Beschreibung des Erregers durch Fouquet vor. In China gab es schon im 10. Jahrhundert Ausbrüche der Erkrankung (Hines & Spira, 1974a) und in Europa war die Weißpünktchenkrankheit, wie diese ektoparasitische Erkrankung auch genannt wird, schon im Mittelalter wohl bekannt und wurde wahrscheinlich durch aus Asien importierte Cypriniden eingeführt (Nigrelli et al., 1976; Matthews, 2005).

Der Protozoe *I. multifiliis* gehört zu den Ciliophora und wird in die Familie der Ichthyophthiriidae eingeordnet (Levine et al., 1980). Weitere Vertreter dieser Familie sind zum einen *Ichthyophthirioides browni*, welcher von Roque und De Puytorac (1968) bei Guppies gefunden wurde, und zum anderen *Neoichthyophthirius schlotfeldti*, beschrieben von Bauer und Yunchis (2001) bei tropischen Fischen. Von Nigrelli et al. (1976) wurde zudem die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es verschiedene Stämme von *I. multifiliis* geben könnte, welche unterschiedlich adäquat an verschiedene Temperaturen angepasst sind. Fundierte Beweise für das Vorkommen von verschiedenen Arten und Stämmen des Parasiten müssen jedoch noch erbracht werden (Matthews, 2005).

### 2. Lebenszyklus von *I. multifiliis*

Der Lebenszyklus von *I. multifiliis* ist immer direkt, d.h. er findet ohne Zwischenwirt statt, und umfasst eine Phase auf dem Wirt sowie eine Phase, in der sich Stadien des Parasiten freischwimmend im Wasser bewegen (Ewing & Kocan, 1992; Matthews, 2005). *I. multifiliis* durchläuft mehrere Stadien, deren

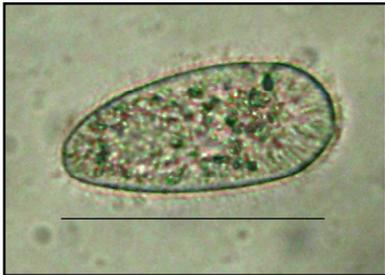
Benennung in der Literatur nicht immer einheitlich ist. Im Folgenden wird die Nomenklatur beschrieben, welche am häufigsten angewandt wird. Diese wird auch im weiteren Teil der vorliegenden Arbeit verwendet. Nach Schäperclaus (1954), Buchmann et al. (2001), Matthews (2005) und Dickerson (2006) gibt es vier Stadien von *I. multifiliis*. Wie in Abb. 1 dargestellt, ist das infektiöse Stadium der **Theront** oder **Schwärmer** (Abb. 1 D), welcher sich frei im Wasser befindet und schnell einen Wirt benötigt, da er nur für kurze Zeit infektiös ist. In der Epidermis des Wirtes wächst er zum **Trophonten** heran (Abb. 1 A und B), welcher das obligat auf dem Fisch befindliche Stadium des Parasiten darstellt. Sobald der Trophont herangereift ist, verlässt er aktiv den Fisch. Ab diesem Zeitpunkt wird er als **Tomont** (Abb. 1 B und C) bezeichnet und stellt das reproduktive Stadium von *I. multifiliis* dar. Der Tomont bildet eine Zystenwülle aus, innerhalb welcher es zu vielfachen Teilungen des Parasiten kommt (Abb. 1 C). Die gebildeten Tochterzellen werden als **Tomiten** (Abb. 1 C und D) bezeichnet. Sobald diese die Zystenwand durchbrochen haben, werden sie wiederum als Theronten oder Schwärmer bezeichnet, womit der Zyklus abgeschlossen ist.



**Abb. 1:** Entwicklungszyklus von *I. multifiliis* (nach Baur & Rapp, 2003). **A:** Mit *I. multifiliis* infizierter Fisch. **B:** Der reife Trophont verlässt den Fisch; der charakteristische hufeisenförmige Makronukleus ist zu erkennen. **C:** Der enzystierte Tomont am Gewässerboden. Es ist die gallertige Zystenwülle erkennbar; im Inneren befinden sich die Teilungsprodukte (Tomiten). **D:** Die Tomiten verlassen die Zyste und infizieren als Theronten wieder neue Fische.

Der Lebenszyklus des Parasiten ist stark abhängig von der Wassertemperatur und läuft bei wärmeren Temperaturen bedeutend schneller ab als bei kalten. So dauert der gesamte Zyklus bei 21° C ungefähr fünf Tage während er bei 9° C ca. drei Wochen dauert. Der Entwicklungszyklus des Parasiten findet generell in einem Temperaturbereich zwischen 4 und 28° C statt. Oberhalb oder unterhalb dieser Grenzen beobachtete Wahli-Moser (1985) in seinen Versuchen keine Reproduktion. Nigrelli et al. (1976) dagegen stellten fest, dass *I. multifiliis* auch bei einer Wassertemperatur zwischen 2 und 4° C zu Teilungen befähigt ist, welche jedoch sehr langsam ablaufen und somit über einen langen Zeitraum andauern. Zudem ist die Anzahl der entstehenden Teilungsprodukte dabei gering.

Der **Theront** oder **Schwärmer** (s. Abb. 2) ist von birnenförmiger oder elliptischer Gestalt und durchsichtig. Bis auf das Vorderende ist er komplett mit Zilien bedeckt (Buschkiel, 1910; Wahli-Moser, 1985). Am Hinterende des Theronten befindet sich eine Zilie, die zwei- bis dreimal so lang ist wie die restlichen und



**Abb. 2:** Theront (= Schwärmer) von *I. multifiliis*. Die Länge der eingefügten Linie entspricht 100 µm.

wahrscheinlich als eine Art Ruder zur Fortbewegung durch das Wasser genutzt wird (Kozel, 1986; Geisslinger, 1987). Das Vorderende ist leicht gespitzt und wird als Perforatorium (MacLennan, 1935; Canella & Rocchi-Canella, 1976; Ewing & Kocan, 1992) oder Bohrspitze (Schmitt, 1990) bezeichnet. Auch wenn der Theront sich noch nicht von Wirtszellen ernährt, besitzt er in seinem vorderen Abschnitt bereits ein kleines Zytostom, welches sich erst nach der

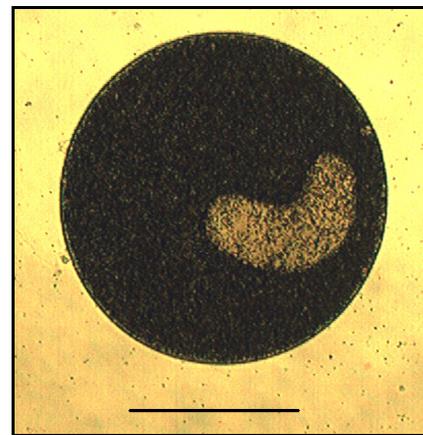
Einnistung im Wirt weiterentwickelt. Unterhalb dieses Zellmundes befindet sich das Lieberkühn'sche Organell, dessen Funktion noch nicht geklärt ist, aber vermutlich für phototaktische Eigenschaften verantwortlich sein könnte. Dieses Organell ist nur beim Theronten zu finden und löst sich mit der Entwicklung zum Trophonten auf (Ewing & Kocan, 1992; Matthews, 2005; Dickerson, 2006). Weiterhin besitzt der Theront sekretorische Mucozysten in seinem Vorderende sowie einen Makronukleus, Mikronukleus, Mitochondrien und verschiedene Vakuolen (Matthews, 2005). Abhängig von der Größe des Tomonten, aus

welchem sie entlassen wurden, liegt die Größe der Schwärmer im Bereich zwischen 20 und 60  $\mu\text{m}$  (Canella & Rocchi-Canella, 1976; Dickerson, 2006). Die Theronten sind nur für kurze Zeit überlebensfähig und begeben sich sofort nach dem Schlüpfen auf die Suche nach einem Wirt (Matthews, 2005). Die Zeitspanne, in welcher sie infektiös sind, hängt von der Wassertemperatur ab und ist bei warmen Temperaturen kürzer als bei kalten (Wahli-Moser, 1985). Laut Suzuki (1935) und McCallum (1982) überleben Schwärmer bei 20° C durchschnittlich 22,5 Stunden, nach 12 Stunden lässt ihre Vitalität jedoch bereits nach (McCallum, 1982). Bei 28° C dagegen beträgt die Lebensspanne nur 10 Stunden (Bauer, 1958). Die Mechanismen, wie die Schwärmer ihren Wirt finden, sind nicht vollständig geklärt. Wahli und Meier (1991) fanden heraus, dass sie positiv phototaktisch sind und sogar stärker durch Licht angezogen werden als durch die Anwesenheit eines Fisches. Andere Studien belegen die Anziehung von Theronten durch chemische Signale, die im Schleim und Serum von Fischen vorhanden sind (Haas et al., 1998; Buchmann & Nielsen, 1999). Haas et al. (1998) stellten jedoch fest, dass die Wahrnehmung dieser Signale nur über kurze Distanzen erfolgt. Insofern ist davon auszugehen, dass die Schwärmer nicht aktiv nach einem Fisch suchen, sondern ihren Wirt erst erkennen, wenn sie bereits in seiner Nähe sind.

Es ist noch ungeklärt, wie die Invasion der Theronten in den Fisch genau vonstatten geht. Dieser Prozess erfolgt sehr schnell, innerhalb von fünf Minuten, weshalb der Weg des eindringenden Schwärmers sehr schwer nachzuvollziehen ist (Ewing et al., 1985). Ewing et al. (1985) und Ewing und Kocan (1992) beschreiben, dass die sekretorischen Mucozysten aus dem Vorderende der Theronten entleert werden und diese freigesetzte Substanz bei der Festhaftung am Wirt eine Rolle zu spielen scheint. Geisslinger (1987) konnte dagegen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keinen Beweis hierfür finden und vertritt die Meinung, dass die Zilien der Schwärmer bei der Anheftung an den Fisch behilflich sind. Es ist bekannt, dass sich die Theronten mit ihrem Perforatorium unter rotierenden Bewegungen (Schäperclaus, 1990) zwischen zwei Epithelzellen in die Epidermis einbohren (Ewing et al., 1985; Kozel, 1986). Sie dringen im Gewebespalt zwischen den Zellen bis zur Basalmembran der Epidermis vor (Ewing & Kocan, 1992). Da *I. multifiliis* zwischen Ober- und

Unterhaut parasitiert, also eine endoparasitische Phase hat, handelt es sich nicht, wie allgemein hin bezeichnet, um einen reinen Ektoparasiten (Schäperclaus, 1954; McCallum, 1982; Kozel, 1986; Matthews, 2005). Die Parasiten bevölkern die Haut und Flossen, die Kiemen sowie bei schwerem Befall sogar die Kornea der Augen und das Oesophagusepithel (Wagner, 1960; Wahli-Moser, 1985; Schäperclaus, 1990).

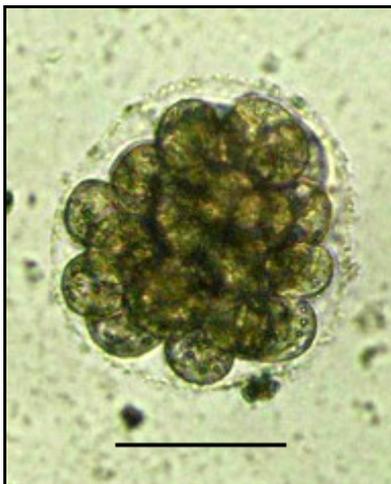
Theronten wandeln sich zu **Trophonten** (s. Abb. 3), indem die Bohrspitze stumpfer wird, sich der Zellmund vergrößert, das Lieberkühn'sche Organell verschwindet und sich der Parasit immer mehr kugelförmig abrundet (Schäperclaus, 1990; Ewing & Kocan, 1992; Dickerson, 2006). Die Trophonten nehmen an Volumen zu und sind in ständiger rotierender Bewegung (Schäperclaus, 1954; Dickerson, 2006). Der zunächst bohnenförmige Makronukleus wird im Laufe der Entwicklung immer gebogener, bis er beim reifen Trophonten schließlich die für *I. multifiliis* charakteristische Hufeisenform erlangt (Wahli-Moser, 1985; Dickerson, 2006). Die Trophonten können im Laufe ihrer Entwicklung eine Größe von bis zu 1,5 mm erreichen (Schäperclaus, 1954; Wagner, 1960). Sie wachsen in einem Epithelspalt unterhalb der Epidermis heran und sind makroskopisch als weißer Punkt auf der Oberfläche des infizierten Fisches zu erkennen (Dickerson, 2006). Stark befallene Fische sind mit unzähligen dieser weißen Punkte übersät, worauf sich der Name „Weißpüktchenkrankheit“ begründet. Der Trophont hat kugelförmige Gestalt (Schäperclaus, 1954; Wahli-Moser, 1985) und ist vollständig von Zilien bedeckt. Typisch sind der hufeisenförmige Makronukleus, der Mikronukleus, das Zytostom, sowie kontraktile Vakuolen und Granulakörner (Buschkiel, 1910; Schäperclaus, 1954; Wahli-Moser, 1985). Die Trophonten ernähren sich von Zell- und Blutbestandteilen des Wirtes (Schäperclaus, 1990; Ewing & Kocan, 1992) und



**Abb. 3:** Trophont von *I. multifiliis*. Der hufeisenförmige Makronukleus ist deutlich zu erkennen. Die Länge der eingefügten Linie entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

färben sich dadurch im Lauf der Zeit immer dunkler, so dass ältere Parasiten mikroskopisch undurchsichtig erscheinen (Schäperclaus, 1954). Im Laufe ihrer Entwicklung dringen die Trophonten an die Oberfläche der Epidermis vor. Die Zeit, bis die Parasiten den Wirt verlassen, ist abhängig von der Wassertemperatur. Nach Wahli-Moser (1985) und Noe und Dickerson (1995) dauert die Entwicklung des Theronten bis zum reifen Trophonten bei 25° C ca. 5 Tage, bei 19 bis 21° C ungefähr 7 Tage und bei 9° C eine Zeit von ca. 20 Tagen. Stirbt der Wirt vorzeitig, so verlässt der Trophont den Fisch wahrscheinlich aufgrund von Veränderungen des pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung im Gewebe (Dickerson, 2006). Er ist dennoch zur Enzystierung und weiteren Entwicklung befähigt, wenn er eine gewisse Zeit auf dem Wirt verbracht hat, in der er zumindest eine Größe von 95 µm erlangen konnte (MacLennan, 1942).

Sobald der Trophont die Nahrungsaufnahme eingestellt und den Fisch aktiv verlassen hat, wird er als **Tomont** (s. Abb. 4) bezeichnet (Dickerson, 2006).



**Abb. 4:** Tomont von *I. multifiliis*. Die gallertige Zysten­hülle ist deutlich erkennbar. Im Inneren befinden sich die Teilungsprodukte (Tomiten). Die Länge der eingefügten Linie entspricht 100 µm.

Dieser haftet sich an geeigneten Substraten, wie z.B. Wasserpflanzen, Steinen oder Schneckenschalen fest (Wagner, 1960; Schäperclaus, 1990). Selten können auch im Mucus von gestorbenen Fischen enzystierte Stadien von *I. multifiliis* gefunden werden (Buschkiel, 1910; Wahli-Moser, 1985; Dickerson, 2006). Es ist unklar, warum solche Stadien den Wirt nicht verlassen haben, bevor sie sich enzystierten. Der Tomont produziert aus den Mucozysten eine gallertige Zysten­hülle, welche aus zwei Schichten besteht (MacLennan, 1937; Ewing et al., 1983; Wahli-Moser, 1985). Innerhalb dieser Zysten­hülle beginnt der Teilungsprozess in Form von multiplen

Zweiteilungen, bei welchen die runden Tochterzellen entstehen, die als **Tomiten** (s. Abb. 4 und 5) bezeichnet werden. Bei warmen Temperaturen läuft der Teilungsprozess schneller ab. So dauert die Entwicklung bis zum Schlüpfen der

Schwärmer nach Wahli-Moser (1985) bei 4° C bis zu 18 Tagen. Bei 23° C ist die Entwicklung in ca. 18 bis 24 Stunden abgeschlossen (Dickerson, 2006) und bei 28° C schwärmen die ersten Theronten bereits nach 6 Stunden aus (Wahli-Moser, 1985). Nicht nur die Teilungsgeschwindigkeit sondern ebenfalls die Teilungsrate ist abhängig von der Wassertemperatur, so dass bei warmen Temperaturen mehr Tochterzellen entstehen als bei kalten. Die Anzahl kann schwanken zwischen weniger als 10 gebildeten Tomiten bis zu mehreren Tausend (Wagner, 1960; Buchmann et al., 2001). Dies ist sowohl abhängig von der Temperatur als auch von der ursprünglichen Größe des Tomonten (MacLennan, 1937; Nigrelli et al., 1976; Matthews, 2005).

Wie die Tomiten aus der Zyste freigesetzt werden, ist bisher nicht vollständig geklärt. MacLennan (1937) hält es für wahrscheinlich, dass die Tomiten in der Lage sind, die Zystenhülle zu durchbrechen und Ewing et al. (1983) beobachteten,



**Abb. 5:** Reifer Tomont von *I. multifiliis*. Im oberen Teil des Bildes sind freie Tomiten erkennbar, die den Tomonten bereits verlassen haben. Die Länge der eingefügten Linie entspricht 200 µm.

das die Zystenwand mit zunehmender Reife dünner zu werden scheint. Wenn die Tomiten die Zyste verlassen haben, suchen sie wieder einen Wirt und der Zyklus läuft erneut ab. In der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben zu der Unterscheidung zwischen Tomite und Theront zu finden. So bezeichnen z.B. Wahli-Moser (1985) und Geisslinger (1987) das infektiöse Stadium des Parasiten als Tomite, die Bezeichnung Theront kommt bei ihnen nicht vor. Bei Noe und Dickerson

(1995) hingegen wird die Bezeichnung Tomite nicht verwendet, so dass hier die entstehenden Tochterzellen des Parasiten sogleich Theronten genannt werden. Laut Dickerson (2006) erfolgt die Differenzierung der Tomiten in die freischwimmenden Theronten, indem sie eine längliche Form annehmen, den

Mundapparat und das Perforatorium ausbilden. Es wird nicht konkret erläutert, ob diese Differenzierung innerhalb oder außerhalb der Zyste erfolgt. In der vorliegenden Arbeit erschien es am sinnvollsten, die Teilungsprodukte solange sie sich innerhalb des Tomonten befinden als Tomiten und nach Verlassen der Zystenhülle als Theronten oder Schwärmer zu bezeichnen.

### 3. Epidemiologie und Bedeutung der Ichthyophthiriose

Mit Ausnahme der arktischen Regionen kommt *I. multifiliis* praktisch weltweit in allen Süßgewässern vor (Nigrelli et al., 1976). Der Parasit ist nicht wirtsspezifisch und es wurde bisher keine Fischart aus dem Süßwasser gefunden, die komplett gegen die Erkrankung resistent ist (Ventura & Paperna, 1985; Wahli-Moser, 1985). Es liegen jedoch Hinweise auf unterschiedliche Empfänglichkeiten verschiedener Fischarten vor (Hoffman, 1967) sowie individuelle Unterschiede bei Fischen derselben Spezies (Ventura & Paperna, 1985). In Java wurde *I. multifiliis* nicht nur im Süß-, sondern auch im Brackwasser gefunden (Buschkiel, 1936) und Schäperclaus (1954) beschrieb das Vorkommen des Parasiten sogar bei Salzwasserfischen wie z.B. verschiedenen Korallenfischen, Kugelfischen, Mittelmeerbrassen und kleinen Haien. Die weite geographische Verbreitung dieses Protozoen ist wahrscheinlich auf seine geringe Wirtsspezifität, große Temperaturtoleranz und seinen direkten Lebenszyklus zurückzuführen (Matthews, 2005).

*I. multifiliis* ist zweifellos einer der gefährlichsten Krankheitserreger sowohl für Zier- als auch für Nutzfische (Schäperclaus, 1990). Der Parasit führt zu besonders starken Schäden, wenn viele Fische auf engem Raum gehalten werden (Schäperclaus, 1954), weshalb die Erkrankung durch die Intensivierung der Fischproduktion sehr zugenommen hat (Hines & Spira, 1973). Genaue Zahlen über den durch die Ichthyophthiriose verursachten wirtschaftlichen Schaden liegen nicht vor (Dickerson, 2006), aber *I. multifiliis* führt zu höheren Verlusten in der Aquakultur als irgendein anderer Einzeller (Matthews, 2005; Noe & Dickerson, 1995). Bei starkem Befall führt die Infektion mit dem Erreger zu hoher Mortalität in Fischkulturen (Butcher, 1947; Valtonen & Keränen, 1981;

Buchmann et al., 2001; Jorgensen et al., 2009). Bei Wildfischpopulationen tritt die Erkrankung aufgrund geringer Prävalenz des Parasiten seltener in Erscheinung (Ewing & Kocan, 1992), aber auch hier wurden Epidemien mit massiven Ausfällen beschrieben (Elser, 1955; Allison & Kelly, 1963; Wurtsbaugh & Tapia, 1988; Matthews, 2005). Für die finanziellen Schäden in Fischzuchten sind in erster Linie die massiven Ausfälle im Bestand maßgebend, aber auch verringertes Wachstum der Fische und eine dadurch herabgesetzte Produktionsleistung führen zu Einbußen. Bei Zierfischhaltungen sind nicht nur finanzielle Aspekte, sondern zusätzlich häufig emotionale Aspekte von Bedeutung, da einzelne Fische für den Fischhalter oft einen individuellen Wert besitzen.

Das Auftreten der Ichthyophthiriose ist saisonal bedingt. Zu Epidemien kommt es am häufigsten im Frühjahr und Frühsommer, wenn die Wassertemperaturen steigen (Wahli-Moser, 1985), doch es können Fälle der Weißpunktchenkrankheit das ganze Jahr über auftreten (Bauer, 1958). Zu Ausbrüchen der Erkrankung kommt es immer dann, wenn die Bedingungen für die schnelle Vervielfachung des Parasiten günstig sind und gleichzeitig die Abwehrmechanismen der Fische geschwächt sind. Ein wichtiges Kriterium ist die Wassertemperatur, da der Entwicklungszyklus hiervon entscheidend beeinflusst wird (MacLennan, 1937, 1942; Schäperclaus, 1954; Nigrelli et al., 1976; Wahli-Moser, 1985). Mit steigender Temperatur läuft zum einen der gesamte Entwicklungszyklus des Parasiten schneller ab und zum anderen finden mehr Teilungen innerhalb der Tomonten statt, so dass zusätzlich mehr Schwärmer entstehen als bei kalten Temperaturen (Wahli-Moser, 1985). Deshalb führt *I. multifiliis* besonders im Frühjahr zu schweren Problemen (Elser, 1955; Dickerson, 2006), da sich der Parasit durch das Ansteigen der Wassertemperatur nun innerhalb kürzester Zeit explosionsartig vermehrt und gleichzeitig noch keine Immunität bei den Fischen ausgebildet werden konnte. Die stark befallenen Fische sterben, während die schwächer infizierten Fische im Laufe der Infektion immun werden, so dass die Erkrankung nach einiger Zeit wieder nachlässt (Dickerson, 2006). Wie *I. multifiliis* zwischen den Ausbrüchen überlebt, ist nicht ganz klar (Dickerson, 2006), da es sich um einen obligaten Parasiten handelt, der auf einen Wirt angewiesen ist und freie Stadien bei Temperaturen unterhalb von 3° C abgetötet werden (Wahli-Moser, 1985). Die naheliegendste Theorie ist, dass eine geringe

Infektion in der Fischpopulation über den Winter erhalten bleibt (Dickerson, 2006), da die Entwicklungsgeschwindigkeit der Parasiten durch die kalten Wassertemperaturen sehr verlangsamt wird und sich die Phase, in welcher der Parasit unter der Epidermis geschützt ist, somit über einen langen Zeitraum erstrecken kann.

#### 4. Pathogenese und Symptomatik

Charakteristisches und sicheres Erkennungsmerkmal der Ichthyophthiriose ist das Auftreten weißer Punkte auf den Flossen und der gesamten Körperoberfläche der Fische (Dickerson, 2006). Dieses Krankheitsbild ist jedoch erst im fortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung zu finden. Zu Beginn sehen die Fische meist noch unverändert aus, zeigen jedoch Verhaltensauffälligkeiten (Hines & Spira, 1973; Dickerson, 2006). Die ersten Anzeichen sind generelle Unruhe und vermehrtes Scheuern der Fische am Boden oder Gegenständen, das sogenannte „Aufblitzen“ (Wahli-Moser, 1985). Diese Symptome sind auf den Juckreiz zurückzuführen, der durch die unter der Epidermis heranwachsenden Stadien verursacht wird. Im Verlauf der Erkrankung verschlechtert sich der Allgemeinzustand der Fische. Auf der Haut bildet sich eine vermehrte Schleimschicht als Abwehrreaktion gegen den Parasitenbefall (Hines & Spira, 1973) und häufig tritt sekundärer Befall mit Pilzen der Gattung *Saprolegnia* auf, welche durch die Vorschädigung der Haut durch *I. multifiliis* gute Wachstumsbedingungen erlangen (Dickerson, 2006). Durch die auf den Kiemen befindlichen Parasitenstadien kommt es aufgrund der Schädigung des Kiemenepithels zu Sauerstoffmangel (Schäperclaus, 1990). So werden die Fische im Verlauf der Erkrankung zunehmend apathisch, verweigern die Futteraufnahme und halten sich vorwiegend am Wasserzulauf auf, um an möglichst sauerstoffreiches Wasser zu gelangen (Wahli-Moser, 1985; Dickerson, 2006). Der Tod des Fisches tritt letztlich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren ein, wie die Beeinflussung des homöostatischen Gleichgewichtes, Sekundärinfektionen durch Bakterien und Pilze (Nigrelli et al., 1976; Kozel, 1986) und Sauerstoffmangel aufgrund der massiven Zerstörung des Kiemenepithels (Schäperclaus, 1990; Schmitt, 1990).

Hines und Spira (1973) zeigten, dass die Stärke der Symptomatik von der Anzahl an Theronten abhängt, mit welcher der Fisch konfrontiert wird. So führt das Vorhandensein von wenigen Schwärmern nur zu einer gering ausgeprägten Erkrankung, welche der Fisch überstehen kann. Nach dem Überwinden einer schwachen Infektion bildet der Fisch eine Immunität gegen *I. multifiliis* aus (Buschkiel, 1910; Butcher, 1947), welche je nach Schwere der Initialinfektion (Bauer, 1953) zwischen mehreren Monaten bis zu einem Jahr anhält (Hines & Spira, 1974b; Burkart et al., 1990). Die der Immunität zugrundeliegenden Mechanismen sind trotz zahlreicher Studien noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch nachgewiesen, dass sowohl unspezifische als auch spezifische Abwehrmechanismen daran beteiligt sind und zellassoziierte Mechanismen sowie gegen den Parasiten gebildete Antikörper eine Rolle spielen (Hines & Spira, 1974b; Buchmann et al., 2001; Maki & Dickerson, 2003; Dickerson, 2006).

## 5. Therapie der Ichthyophthiriose

Der Lebenszyklus des Parasiten macht die Therapie der Erkrankung sehr schwierig. Die Trophonten befinden sich unterhalb der Epidermis des Fisches, so dass sie von Therapeutika, die dem Wasser zugegeben werden, nicht erreicht werden (Cross, 1972). Auch die Tomonten am Boden sind innerhalb ihrer Zystenhülle weitgehend geschützt. Da es keine Behandlungsmethode gibt, mit welcher alle Stadien des Parasiten gleichzeitig eliminiert werden, flammt die Krankheit schnell wieder auf. Zusätzlich vermehrt sich *I. multifiliis* bei warmen Wassertemperaturen innerhalb kürzester Zeit explosionsartig, so dass binnen weniger Tage hohe Mortalitäten auftreten und somit jegliche Therapieversuche zu spät kommen. Aus diesem Grunde sind die Maßnahmen zur Prävention der Ichthyophthiriose von großer Bedeutung.

### 5.1 Prävention

Im Allgemeinen sollte immer ein gutes Management und die Durchführung von Hygienemaßnahmen zur Minimierung des Kontakts mit pathogenen Erregern und

damit die Vermeidung eines Ausbruchs von Infektionskrankheiten im Vordergrund stehen, anstatt zu versuchen, eine bereits bestehende Erkrankung zu therapieren (Dickerson, 2006). So sollte zunächst möglichst die Einschleppung von *I. multifiliis* verhindert werden, indem neu einzusetzende Fische zunächst in Quarantäne gehalten werden (Buschkiel, 1936; Schäperclaus, 1954; Wahli-Moser, 1985). Bei einer Temperatur von 24° C sollte eine Quarantänezeit von zwei bis drei Wochen gewährleistet werden, da in diesem Zeitraum mehrere Parasitenzyklen ablaufen können und eine geringgradig ausgeprägte Infektion der Fische in Erscheinung treten kann (Dickerson, 2006). Es sind allgemeine Hygienegrundsätze, wie die Durchführung von geeigneten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen einzuhalten, um die Verbreitung des Erregers innerhalb des Betriebes einzudämmen. Außerdem sollten Bedingungen geschaffen werden, die den Kontakt zwischen Wirt und Parasiten minimieren. Hierzu sollte die Besatzdichte der Fische möglichst gering gehalten werden (Negele, 1975; Wahli-Moser, 1985), zumal ein Überbesatz bei den Fischen Stress erzeugt, welcher das Immunsystem supprimiert und die Empfänglichkeit der Fische gegenüber dem Parasiten erhöht (Davis et al., 2002). Der Infektionsdruck auf die Fische kann zusätzlich verringert werden, indem die Wasserdurchlaufrate erhöht wird, da hierdurch Parasitenstadien aus dem Wasser entfernt werden (Shinn et al., 2005). Bodensteiner et al. (2000) gelang es, durch prophylaktische Erhöhung von Wasseraustauschrate und Wassergeschwindigkeit die durch *I. multifiliis* hervorgerufenen Ausfälle deutlich zu verringern. Shinn et al. (2005) stellten zudem fest, dass die Erzeugung von Wasserturbulenzen das Auffinden des Wirtes erschwert. Eine neue Methode zur Senkung des Infektionsdrucks ist die Entfernung von Tomonten mittels einer Vakuumpumpe, was als Unterstützung zur chemischen Therapie der Ichthyophthiriose eingesetzt werden kann (Shinn et al., 2009).

Eine weitere Methode zur Prävention der Erkrankung wäre die prophylaktische Immunisierung von Fischen gegen *I. multifiliis* per Impfung. Es ist seit langer Zeit bekannt, dass Fische eine Immunität gegen den Parasiten aufbauen, sofern sie die Infektion überstehen (Buschkiel, 1910; Butcher, 1947; Bauer, 1958; Hines & Spira, 1974b). Dies macht es theoretisch möglich, einen Impfstoff gegen die

Ichthyophthiriose zu entwickeln. Allerdings waren diese Bemühungen bisher nicht erfolgreich, so dass zurzeit noch keine geeigneten Vakzinen zur Immunisierung gegen die Ichthyophthiriose vorhanden sind (Dickerson, 2006).

## **5.2 Therapie**

### **5.2.1 Physikalische Methoden**

Es gibt Möglichkeiten, den Erreger ohne Anwendung von Chemikalien zu eliminieren. Bei Warmwasserfischen kann die Wassertemperatur für eine Woche auf 30° C erhöht werden, da die Parasiten bei diesen Temperaturen abgetötet werden (Cross, 1972; Dickerson, 2006). Bei Fischen, welche kalte Wassertemperaturen benötigen, ist diese Methode jedoch nicht anwendbar. Bei Aquarienfischen stellt außerdem das Umsetzen in verschiedene Becken eine effektive Möglichkeit zur Durchbrechung des Infektionszyklus dar (Buschkiel, 1936; Schäperclaus, 1954; Wahli-Moser, 1985). Dies ist allerdings arbeitsaufwendig, weil die Fische hierzu alle 12 Stunden in ein neues, parasitenfreies Aquarium verbracht werden müssen (Schäperclaus, 1954). Auch die Bestrahlung mit Ultraviolettlicht kann in Anlagen, in denen eine Rezirkulation des Wassers stattfindet, zur Kontrolle von Infektionen mit *I. multifiliis* genutzt werden (Gratzek et al., 1983).

### **5.2.2 Medikamentöse Behandlungen**

Bei den angewendeten Therapeutika muss unterschieden werden zwischen solchen, die dem Wasser zugesetzt werden und somit nur auf die frei befindlichen Stadien von *I. multifiliis*, nämlich die Theronten und Tomonten, einwirken und solchen, die in Form von oralen Behandlungen in den Fisch gelangen und somit gegen die Trophonten unter der Epidermis der Fische wirksam sind.

#### **5.2.2.1 Wirkung auf freischwimmende Stadien durch Badebehandlungen**

Bei Badebehandlungen wird das Medikament dem Wasser zugegeben und wirkt

gegen die freischwimmenden Theronten und Tomonten, wobei die meisten Medikamente gegen letztere aufgrund ihrer sie umgebenden Hülle nicht effektiv sind. Wenn das Therapeutikum so lange angewendet wird, bis alle Trophonten die Wirte verlassen und wiederum Theronten gebildet haben, kann die Infektion effektiv bekämpft werden.

Das Mittel der Wahl zur Therapie der Ichthyophthiriose ist **Malachitgrünoxalat**, welches im Bereich der Zierfischmedizin erfolgreich gegen *I. multifiliis* eingesetzt wird (Amlacher, 1961; Wahli-Moser, 1985; Schäperclaus, 1990). Dieses ist ein Salz des organischen Farbstoffs Malachitgrün und besitzt antifungizide und antiprotozoische Eigenschaften (Alderman, 1985). In Deutschland sind für Zierfische Malachitgrünoxalat enthaltende Arzneimittel zur Behandlung gegen Hautparasiten auf dem Markt. Der Wirkstoff ist jedoch potentiell kanzerogen (Meyer & Jorgenson, 1983; Dickerson, 2006; Heinecke & Buchmann, 2009), weshalb seine Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren in den EU-Mitgliedsstaaten verboten wurde. Das Verbot basiert auf der Grundlage der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 (Rintamäki-Kinnunen et al., 2005; Heinecke & Buchmann, 2009), die durch die Verordnung (EG) Nr. 470/2009 und die Verordnung (EU) Nr. 37/2010 abgelöst wurde. Da Malachitgrün nicht in der Tabelle 1 (zulässige Stoffe) der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 genannt ist, darf es bei Nutzfischen nicht mehr eingesetzt werden.

Durch das Anwendungsverbot von Malachitgrünoxalat stellt die Bekämpfung der Ichthyophthiriose heutzutage ein großes Problem dar. Insgesamt mangelt es in Deutschland an zugelassenen Arzneimitteln für Nutzfische. Es sind lediglich Formaldehyd (Formalin) und Natriumchlorid zur Anwendung im Wasser zugelassen ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de)). Wie nachfolgend beschrieben, besitzen diese Substanzen jedoch nur eine begrenzte Wirksamkeit gegen *I. multifiliis*, so dass es nach heutigen Einschätzungen zurzeit kein geeignetes Medikament zur Behandlung der Ichthyophthiriose bei Nutzfischen gibt (Matthews, 2005).

Die Effektivität von **Natriumchlorid** gegen Theronten von *I. multifiliis* wurde bereits von Stiles (1893) festgestellt. Allerdings ist die Anwendung aufgrund der großen Mengen, die zur Behandlung eines Teiches eingesetzt werden müssen, bei Fischzuchten nicht praktikabel. Die Wirksamkeit des Natriumchlorids ist zudem

nur begrenzt, so dass es zur eigentlichen Therapie der Erkrankung nicht geeignet ist (Matthews, 2005; Dickerson, 2006). Es trägt jedoch positiv zur Osmoregulation des Fisches bei, so dass es unterstützend zu anderen Therapeutika eingesetzt werden kann (Cross, 1972).

Momentan wird in Fischzuchten häufig **Formalin** zur Behandlung der Erkrankung verwendet (Heinecke & Buchmann, 2009; Shinn et al., 2009). Für Formalin (Formaldehyd-Lösung 36 % ad. us. vet.) besteht eine Standardzulassung. Es hat jedoch nur eine eingeschränkte Wirksamkeit (Schmitt, 1990; Shinn et al., 2009) und ist zur Therapie bei schweren Ausbrüchen der Ichthyophthiriose nicht geeignet (Matthews, 2005). Zudem ist es besonders in hohen Konzentrationen für Fische toxisch (Bills et al., 1977; Schmitt, 1990). Die Sicherheit beim Einsatz von Formalin hängt außerdem von der Wassertemperatur ab, da es bei warmem Wetter durch die Anwendung zu Algensterben kommen kann, was einen plötzlichen Sauerstoffabbau im Teich verursacht (Cross, 1972). Bei Temperaturen unterhalb von 8° C hingegen ist Formalin nicht mehr wirksam, so dass der Einsatz im Winter unmöglich ist (Baur & Rapp, 2003; Rowland et al., 2008). Der Gebrauch dieser Substanz birgt auch Risiken für den Anwender, da Formalin Gewebsirritationen hervorrufen kann und toxische und potentiell kanzerogene Eigenschaften besitzt (Pandey et al., 2000; Viegas et al., 2010).

Aufgrund des kanzerogenen Potentials von Malachitgrünnoxalat befassten sich viele Studien mit der Suche nach neuen Möglichkeiten zur Therapie der Erkrankung. Kürzlich untersuchten Straus und Meinelt (2009) die Wirksamkeit von **Peressigsäure** gegen Schwärmer von *I. multifiliis*. Diese Säure ist in Tabelle 1 der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 aufgenommen, so dass die Anwendung bei Nutzfischen generell erlaubt ist. Dabei zeigte sich, dass Peressigsäure zwar eine Wirksamkeit hat, aber die Anwendung unter Feldbedingungen nicht praktikabel ist, da für eine effektive Behandlung zu viele Applikationen der Substanz erforderlich wären.

Schmitt (1990) testete sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mehrere **antimikrobiell und antiprotozoisch wirksamen Stoffe** auf ihre Eignung zur Bekämpfung der Ichthyophthiriose. Amphotericin B und Chlortetrazyklin erwiesen sich in den *In*

*vitro* Versuchen als effektiv gegen den Parasiten. Die durchgeführten *In vivo* Versuche, in welchen die Wirksamkeit der Substanzen in Form von Badebehandlungen gegen Theronten untersucht wurde, führten jedoch zu dem Ergebnis, dass keine der getesteten Substanzen den Parasitenbefall so reduzieren konnte wie Malachitgrünoxalat (Schmitt, 1990; Wahli et al., 1993).

Cross und Hursey (1973) beschrieben die Wirksamkeit des **Desinfektionsmittels** Chloramin T zur Bekämpfung der Erkrankung, betonten dabei jedoch die Abhängigkeit der Dosierung von pH-Wert und Härte des Wassers. Van Duijn (1967) empfiehlt den Einsatz der Substanz nicht, da sie stark von organischem Material gebunden wird und zudem mit Metallen toxische Verbindungen bildet. Für Kupfersulfat konnte ebenfalls eine Wirksamkeit gegen die Ichthyophthiriose nachgewiesen werden (Schlenk et al., 1998); allerdings ist beim Einsatz besondere Vorsicht geboten, da die erforderlichen therapeutischen Konzentrationen sehr nahe an der Toxizitätsgrenze liegen (Schmitt, 1990). In den Studien von Buchmann et al. (2003) sowie von Heinecke und Buchmann (2009) wurde die Wirksamkeit von Natriumpercarbonat anhand von *In vitro* Versuchen überprüft. Es zeigte sich ein Effekt gegen Theronten, jedoch nur ein eingeschränkter Effekt auf Tomonten. Straus und Griffin (2001, 2002) stellten die Wirksamkeit von Kaliumpermanganat gegen Theronten fest. Die Effektivität einer Behandlung in Teichen wird jedoch durch die Detoxifikation des Kaliumpermanganats durch organische Substanzen im Wasser negativ beeinflusst. Zu beachten ist, dass vielen Mitteln aufgrund ökotoxikologischer Aspekte Grenzen gesetzt sind, wie z.B. für Kupfersulfat (Wassergefährdungsklasse 2).

**Pflanzliche Mittel** zur Behandlung der Ichthyophthiriose wurden von Buchmann et al. (2003) und Ekanem et al. (2004) untersucht. Ekanem et al. (2004) beschrieben, dass Extrakte der Juckbohne (*Mucuna pruriens*) und der Papaya (*Carica papaya*) eine Reduktion der Befallsstärke mit *I. multifiliis* um bis zu 90 % bewirken konnten. Von Buchmann et al. (2003) wurden Knoblauchextrakte untersucht, deren Wirkungseffekt jedoch nicht an den des Malachitgrünoxalates heranreichen konnte. Die Extrakte könnten jedoch zumindest zu einer Reduktion der Infektion beitragen, zumal ihre Anwendung mit einer guten Umweltverträglichkeit verbunden wäre.

### 5.2.2.2 Wirkung auf Trophonten durch orale Therapeutika

Es wurden bereits mehrere Versuche zur Entwicklung von oralen Therapeutika zur Bekämpfung der Erkrankung unternommen. Einige der von Schmitt (1990) bereits per Badebehandlung applizierten **antimikrobiell und antiprotozoisch wirksamen Stoffe** wurden ebenfalls auf ihre Eignung hin als orale Therapeutika zur Bekämpfung der im Fisch befindlichen Trophonten untersucht. Dies waren Chlortetrazyklin sowie die mittlerweile für Lebensmittel liefernde Tiere verbotenen Stoffe Furazolidon und Griseofulvin. Diese zeigten jedoch keine positiven Effekte auf den Verlauf der Ichthyophthiriose.

Tojo Rodriguez und Santamarina Fernandez (2001) überprüften die Wirksamkeit verschiedener oral verabreichter **Antiparasitika**, von denen nur wenige überhaupt eine Wirkung zeigten und leider keines die Entwicklung der Trophonten komplett verhindern konnte. Luzardo-Álvarez et al. (2003) testeten die Wirksamkeit des Antiparasitikums Triclabendazol, ein Benzimidazol, das als Komplex mit  $\beta$ -Cyclodextrin oral verabreicht wurde, und lieferten damit vielversprechende Ergebnisse für weitere Studien. So wurde durch diesen Wirkstoff sowohl eine Reduktion der gesamten Parasitenzahl als auch der Größe der vorhandenen Trophonten hervorgerufen. Shinn et al. (2003) überprüften verschiedene **Antiprotozoika** (Amprolium, Clopidol, Decoquinat, Monensin, Nicarbazin und Salinomycin-Natrium) auf ihre Wirksamkeit gegen die Ichthyophthiriose bei oraler Applikation. Von den untersuchten Substanzen hatten jedoch nur wenige einen Effekt auf den Parasiten und eine vollkommene Eliminierung konnte mit keinem der Stoffe erzielt werden.

Wahli et al. (1995) beschäftigten sich mit dem Einsatz von **Ascorbinsäure** (Vitamin C) zur Behandlung der Erkrankung. Sie stellten dabei eine Reduktion der Mortalität der behandelten Fische im Vergleich zur Kontrolle fest, ohne dass jedoch die Anzahl der Parasiten verringert wurde. Sie vermuteten, dass durch das Vitamin C der allgemeine Gesundheitsstatus der Fische gefördert wurde, so dass es zu einer verbesserten Abwehrlage gegenüber anderen umweltbedingten Stressoren kam.

Oral verabreichte **Probiotika** wurden von Pieters et al. (2008) auf ihre prophylaktische Wirksamkeit gegen die Ichthyophthiriose getestet. Die Mortalität

war in einer probiotisch behandelten Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrolle, bei welcher kein Fisch überlebte. Es wurde hier jedoch nur die Mortalitätsrate als Kriterium herangezogen und der Versuch wurde nur zweimal wiederholt, weshalb die Ergebnisse nicht statistisch abgesichert werden konnten.

Da die Bekämpfung der Ichthyophthiriose schwierig ist und es zurzeit keine Therapeutika mit zufriedenstellender Wirkung für Nutzfische gibt (Matthews, 2005; Dickerson, 2006), ist es notwendig, weitere Forschungsarbeiten auf dem Gebiet durchzuführen und nach geeigneten Methoden zur Behandlung der Erkrankung zu suchen.

## 6. Chinin: Eigenschaften und Anwendungsgebiete

Chinin ist ein Alkaloid (s. Abb. 6), das aus der Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*) gewonnen wird, welcher im westlichen Südamerika wächst (Hesse, 2000). Es ist ein weißes, wasserunlösliches, kristallines

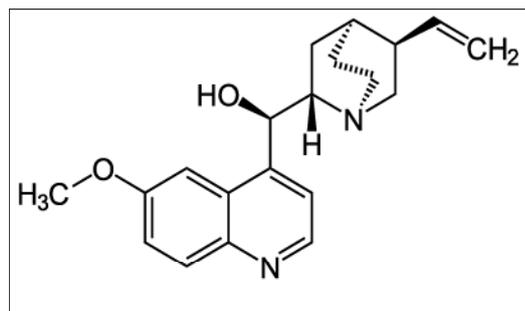


Abb. 6: Strukturformel von Chinin

Pulver mit einem charakteristisch bitteren Geschmack, weshalb es als Aromastoff in Lebensmitteln, insbesondere in Erfrischungsgetränken wie z.B. Bitterlimonaden, in Konzentrationen bis zu 85 mg/L eingesetzt wird (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2008).

In Form seiner Salze findet Chinin vor allem in Arzneimitteln Verwendung. Aufgrund seiner muskelrelaxierenden Eigenschaften, die auf einer anticholinergen Wirkung an der neuromuskulären Endplatte beruhen, findet Chinin u.a. Anwendung bei der Therapie von nächtlichen Wadenkrämpfen (Meibohm, 2001). Bereits seit dem 17. Jahrhundert wird Chinin als fiebersenkendes Medikament und als Therapeutikum gegen die Malaria angewendet (Hänsel & Pertz, 2009). Diese Erkrankung wird durch verschiedene Arten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen, bei welchen es sich wie bei *I. multifiliis* um einzellige Parasiten

handelt. Der Einsatz von Chinin wurde jedoch mit der Entwicklung synthetischer Malariamittel fast völlig zurückgedrängt, gewann aber durch das Auftreten resistenter Stämme von *Plasmodium falciparum* in den 60er Jahren wieder an Bedeutung (Stahlmann & Lode, 2001). Heute findet es bei der Therapie der Malaria Tropica insbesondere bei Chloroquin-resistenten bzw. multiresistenten Erregern Anwendung (Hesse, 2000; Hänsel & Pertz, 2009). Trotz seines langjährigen Einsatzes sind gegen Chinin bis heute noch keine Resistenzen bekannt (Gossauer, 2006).

Die antiprotozoische Wirkung beruht vermutlich auf einer Wechselwirkung mit der DNA des Erregers, so dass die Replikation und Transkription gestört wird (Gossauer, 2006). Hierbei wird diskutiert, ob der Mechanismus auf Interkalation beruht, wobei sich das Chininmolekül zwischen die Basen der Parasiten-DNA einlagert und dadurch die Nukleinsäuresynthese hemmt. Chinin zeigt auch gegenüber anderen einzelligen Organismen (z.B. Bakterien und Hefen) sowie gegenüber Spermatozoen eine mehr oder weniger ausgeprägte abtötende Wirkung (Von Bruchhausen et al., 1993).

Pharmakokinetische Daten beim Menschen zeigen, dass Chinin nach oraler Gabe fast vollständig resorbiert wird, sich abgesehen vom Liquorraum gut in den verschiedenen Kompartimenten verteilt und einem ausgeprägten Metabolismus in der Leber unterliegt. Nur rund 5 % werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Bei saurem Harn-pH ist die Exkretion beschleunigt, bei alkalischem pH verlangsamt (Stahlmann & Lode, 2001).

Die Wirksamkeit von Chinin gegen *P. falciparum* diente als Grundlage für die Überlegung, dass auch eine Bekämpfung anderer endoparasitischer Organismen mit dieser Substanz möglich sein könnte. So konnte mit oral verabreichtem Chinin eine Eliminierung von *Henneguya sp.*, einem Parasiten aus der Familie der Myxobolidae, erzielt werden (Dohle et al., 2002). In einer Studie von Speare et al. (1998) wurde bei Regenbogenforellen der Einsatz von oral appliziertem Chinin zur Bekämpfung von *Loma salmonae*, einem zu den Microsporidien zählenden Kiemenparasiten untersucht und lieferte vielversprechende Resultate. Von Schäperclaus (1954) wurde bereits die Anwendung von Chininbädern speziell gegen die Ichthyophthiriose beschrieben. Hierbei wirkt das Chinin jedoch nur auf

die freien Stadien im Wasser und muss über einen längeren Zeitraum verabreicht werden, da die Parasiten in der Fischhaut durch das Bad nicht beeinflusst werden. Bei Zierfischen untersuchten Schmahl et al. (1996) die Wirksamkeit eines mit einer Chininkonzentration von 5 g/kg Futter versetzten Medikationsfutters gegen die Ichthyophthiriose. Zur Beurteilung des Effekts wurden die durch das Chinin verursachten Veränderungen der Trophonten elektronenmikroskopisch untersucht, sowie die auf den Fischen vorhandene Parasitenzahl ermittelt. Die Resultate waren sehr vielversprechend, wenn auch eine durch die Bitterkeit ausgelöste eingeschränkte Akzeptanz des Medizinalfutters zu Einschränkungen der Versuchsdurchführung bei einigen Fischarten führte. Außerdem wurden Langzeitfütterungen über 12 Wochen durchgeführt, um zu untersuchen, ob es durch orale Anwendung des Chinins zu toxischen Effekten kommt. Es traten keine klinischen Symptome bei den Fischen auf, allerdings wurde bei einigen Fischarten ein reduziertes Wachstum beobachtet (Schmahl et al., 1996).

### **III Fragestellungen der vorliegenden Arbeit**

Die Ergebnisse vorheriger Studien lassen darauf schließen, dass Chinin gegen *I. multifiliis* wirksam ist und als Therapeutikum gegen die Ichthyophthiriose in Frage kommt. Schäperclaus (1954) stellte bei Anwendung des Chinins in Form von Badebehandlungen die Wirksamkeit der Substanz gegen Theronten fest. Die Studie von Schmahl et al. (1996) lässt darauf schließen, dass mit Chinin in Form eines Medizinalfutters ein Effekt auf die Trophonten unterhalb der Epidermis der Fische zu erzielen ist. Diese Untersuchungen wurden mit verschiedenen Spezies von Zierfischen durchgeführt. Aufgrund des Mangels an zugelassenen Medikamenten besteht bei Fischen, die der Lebensmittelgewinnung dienen, ein großer Bedarf nach alternativen Therapeutika zur Behandlung der Ichthyophthiriose. Aus diesem Grunde sollte der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Anwendbarkeit von Chinin gegen die Erkrankung bei Nutzfischen gerichtet werden.

Zunächst galt es, den Laborzyklus des Parasiten zu etablieren und ein Verfahren zur Infektion von Versuchsfischen zu entwickeln. Anhand von *In vitro* Versuchen sollte die Wirksamkeit von Chinin gegen verschiedene Stadien von *I. multifiliis* untersucht werden. *In vivo* Untersuchungen bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) klärten die Frage, ob Chinin gegen die Stadien von *I. multifiliis*, insbesondere gegen die Trophonten in der Epidermis, bei oraler und parenteraler (intraperitonealer) Applikation wirksam ist. Im Hinblick auf die Praktikabilität der Arzneimittelverabreichung in Fischbeständen sollte anhand von Fütterungsversuchen überprüft werden, ob über Medizinalfutter eine prophylaktische und therapeutische Wirkung von Chinin zu erzielen ist.

## **IV Material und Methoden**

### **1. Material**

#### **1.1 Fische**

##### **1.1.1 Karpfen**

Für die *In vivo* Versuche wurden Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) verwendet. Sie wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen aus Eiern aufgezogen, d.h. sie waren noch niemals zuvor mit fischpathogenen Erregern, insbesondere *I. multifiliis*, in Kontakt gekommen. Es wurden zwei verschiedene Zuchtlinien an Karpfen eingesetzt. Die Bezugsquellen für die verwendeten Karpfen waren zum einen die Wageningen University, Animal Sciences (Wageningen, Niederlande) und zum anderen die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Außenstelle für Karpfenteichwirtschaft, Höchststadt an der Aisch. Während des Einsatzes in den Versuchen hatten die Karpfen ein Alter von 6 bis 11 Monaten, Körperlängen zwischen 4 und 9 cm und Gewichte zwischen ca. 3,5 – 15 g. Alle Karpfen wurden vor den Versuchen in 200-Liter Aquarien mit einem Durchfluss von Leitungswasser gehalten, der zweimal täglich zu einer vollständigen Wassererneuerung im Becken führte. Zusätzlich waren Filter angebracht und Kalksteinausströmer zur Sauerstoffanreicherung vorhanden. Die Wassertemperatur betrug ca. 18 +/- 1° C. Die Karpfen wurden zweimal täglich ihrem Energiebedarf entsprechend mit handelsüblichem Futter (Skretting, Trouw Nutrition Deutschland GmbH, Burgheim) gefüttert.

##### **1.1.2 Regenbogenforellen**

Für die Aufrechterhaltung des Laborzyklus von *I. multifiliis* und die Durchführung einiger Vorversuche zur Prüfung der Akzeptanz des Medizinalfutters wurden SPF Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) im Alter zwischen 10 Monaten und 3 Jahren, einer Größe von 8 - 17 cm und Gewichten von ungefähr 15 - 150 g verwendet. Sie wurden als Eier erworben (Troutlodge Inc., USA) und nach dem Schlupf unter SPF Bedingungen

aufgezogen. Die Forellen wurden in Rundbecken mit Leitungswasserdurchfluss und Kalksteinausströmern zur Sauerstoffanreicherung bei Wassertemperaturen von 15 +/- 2° C gehalten und mit handelsüblichem Forellenfutter (Skretting, Trouw Nutrition Deutschland GmbH, Burgheim) gefüttert.

## 1.2 Parasiten

Es wurden mit *I. multifiliis* infizierte Äschen (*Thymallus thymallus*) erworben (Landesfischzuchtanstalt Mauka, Massenhausen), der Parasit durch Kohabitation auf Regenbogenforellen transferiert und mittels Passage über neue Wirtsfische (Regenbogenforellen) erhalten, so dass *I. multifiliis* dauerhaft während der Versuche vorhanden war.

## 1.3 Chemikalien

Für alle Versuche wurde Chinindihydrochlorid (Summenformel:  $C_{20}H_{26}Cl_2N_2O_2$ ) verwendet (Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

Der Salzanteil des Präparats betrug 22,51 % und wurde bei den Dosierungsberechnungen berücksichtigt. Um die gewünschte Dosis an reinem Chinin zu erzielen, wurden entsprechend 22,51 % mehr von dem Präparat in das Medizinalfutter eingebracht bzw. injiziert. Die im Folgenden genannten Dosierungen beziehen sich somit immer auf reines Chinin ohne Salzanteil.

## 2. Methoden

### 2.1 Versuchsvorbereitung

#### 2.1.1 Etablierung des Laborzyklus von *I. multifiliis*

Nach Optimierung der Methodik im Rahmen von Vorversuchen erfolgte der Erhalt des Laborzyklus mittels laufender Passage des Parasiten über Regenbogenforellensetzlinge. Es wurden zwei Aquarien mit ca. 250 Liter

verwendet. Es waren in jedem Becken immer ungefähr 15 bis 20 Fische vorhanden, die mit *I. multifiliis* in unterschiedlichen Reifegraden infiziert waren. So kamen simultan alle Parasitenstadien in den Becken vor, und somit wurde gewährleistet, dass jederzeit reife Trophonten zur Durchführung von Versuchen gewonnen werden konnten. Die Wassertemperatur betrug  $16 \pm 2^\circ \text{C}$ . Es waren in jedem Becken zwei Kalksteinausströmer zur Sauerstoffversorgung vorhanden. Über Steuerung der Durchflussmenge an Leitungswasser konnte der Infektionsverlauf beeinflusst werden. Um überblicken zu können, wie lange sich die Fische in dem Becken befanden, wurde eine neu eingesetzte Gruppe an Fischen an der jeweils selben Stelle der Schwanzflosse markiert und das Datum festgehalten. Jeden zweiten Tag wurden Hautabstriche von mindestens einem Fisch pro Gruppe angefertigt und mikroskopisch (Leitz BioMed; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) die Intensität der Infektion beurteilt. In Abhängigkeit der Ergebnisse dieses Infektions-Monitorings wurde auf die relevanten Parameter eingewirkt. So wurde z.B. bei abnehmender Infektionsstärke die Wasserdurchlaufrate vermindert, um das Abschwemmen von Parasitenstadien zu vermindern und gleichzeitig die Besatzdichte in den Aquarien erhöht. Wenn bei einer Forellengruppe bereits ein oder mehrere Infektionszyklen abgelaufen waren und die Infektionsstärke daraufhin abnahm, so wurde diese Gruppe aus den Becken entnommen und gegen neue Forellen ausgetauscht. Gleichermaßen wurden neue Fische eingesetzt, wenn aufgrund von Mortalitäten die Anzahl der Fische in den Becken abnahm. Je nach gewünschtem Zeitpunkt von Versuchsdurchführungen wurden infizierte Forellen aus den Laborzyklusbecken entnommen und in das Infektionsbecken (s. IV 2.3.1) eingesetzt.

### **2.1.2 Herstellung des Medizinalfutters und Akzeptanzversuche**

Vor Beginn der Hauptversuche wurden zunächst Akzeptanzversuche durchgeführt, da aufgrund vorheriger Studien (Schmahl et al., 1996) Vermutungen darüber vorlagen, dass durch den bitteren Geschmacks des Chinins die Akzeptanz des Medizinalfutters eingeschränkt sein könnte. Im Verlauf dieser Versuche wurde deutlich, dass zunächst die Herstellungsweise des Futters optimiert werden musste, um die Aufnahme des Medizinalfutters zu verbessern. So wurden

nacheinander verschiedene Varianten zur Herstellung des chininhaltigen Futters angewandt und die Aufnahme des jeweiligen Medizinalfutters in Akzeptanzversuchen überprüft, bis diese zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führten, um die Hauptversuche durchführen zu können. Hierfür wurden Karpfen verwendet und später auch Regenbogenforellen, da vermutet wurde, dass das geringer ausgeprägte sensorische Empfinden dieser Raubfische zu einer besseren Aufnahme des Medizinalfutters führen würde.

### **2.1.2.1 Prüfung der Akzeptanz**

Die Karpfen (Gewichte ca. 4-7 g) wurden gruppenweise getrennt in 10-Liter Becken und die Forellen (Gewichte ca. 15-30 g) in 40-Liter Becken jeweils ohne Wasserdurchlauf gehalten. Es wurden täglich Wasserwechsel mit temperiertem Leitungswasser durchgeführt und Kalksteinausströmer sorgten für eine ausreichende Sauerstoffversorgung. Die Wassertemperatur betrug bei den Karpfen 18 +/- 2° C und bei den Forellen 16° +/- 2° C. Es wurde eine Eingewöhnungszeit von vier Tagen eingehalten bevor die Fütterung mit dem Medizinalfutter begann. Diese erfolgte über 14 Tage in einer Menge von 1 % des Körpergewichts, aufgeteilt auf zwei Fütterungen täglich. Die Fische wurden während der Fütterung aus einiger Entfernung beobachtet, so dass sie nicht in ihrem Fressverhalten gestört wurden, gleichzeitig jedoch festgestellt werden konnte, ob bei allen Fischen die Futteraufnahme erfolgte. Es wurden nacheinander die verschiedenen hergestellten Medizinalfutter getestet.

### **2.1.2.2 Herstellung der verschiedenen Varianten des Medizinalfutters**

#### Variante 1: Aufsprühen des Chinins

Zunächst wurde ein Granulatfutter (Dana Feed A/S, Horsens, DK) verwendet, bei welchem noch kein Coating mit Öl stattgefunden hatte. Es wurden jeweils 10 g Medizinalfutter mit Konzentrationen von 0 g, 5 g, und 10 g Chinin pro kg Futter hergestellt. Die jeweilige Menge an Chinin wurde mit einer Präzisionswaage (Sartorius BP 4105; Sartorius AG, Göttingen) abgewogen und in 2 ml Leitungswasser gelöst. Das Futter wurde auf einem Tablett ausgebreitet und die

Chininlösung zunächst zur Hälfte mit einem Zerstäuber aufgesprüht (Ecospray®; Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Nach kurzer Trocknungszeit wurde das Futter gewendet und die restliche Menge der Chininlösung aufgesprüht. Nach Trocknung über Nacht wurde das Futter mit 8 % Sonnenblumenöl überschichtet. Hierzu wurden Öl und Futter in ein Plastikgefäß gegeben und durch kräftiges Schütteln gleichmäßig miteinander vermischt. Das entsprechende Kontrollfutter wurde analog hergestellt, nur ohne Zusatz von Chinin.

Für die Durchführung der Akzeptanzversuche mit diesem Medizinalfutter gab es drei Behandlungsgruppen bestehend aus jeweils fünf Karpfen. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0 g/kg (Kontrolle), 5 g/kg und 10 g/kg. Es wurden anschließend auch Versuche mit Regenbogenforellen (s.o.) unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt.

#### Variante 2: Aufbringen zusätzlicher Substanzen zur Akzeptanzverbesserung

Es wurden verschiedene Substanzen auf das Futter aufgebracht, um den bitteren Geschmack des Chinins zu überdecken und die Akzeptanz zur Aufnahme des Medizinalfutters zu verbessern. Dabei kamen süße Substanzen (Zucker, D-Mannitol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Vanillinzucker), Fette (Lebertran und Fischöl), Aminosäuren (der Extrakt zerpresster roter Mückenlarven) und verschiedene kommerzielle Karpfenflavors zum Einsatz. Bei letzteren handelte es sich um XL Liquid Worm® und XL Liquid Pineapple® (Dynamite Baits, Nottinghamshire, UK) und DD Bait Mussel Meat Liquid Dip® (Svendsen Sport Deutschland, Hameln). Zuerst wurde das Futter nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Chinin überschichtet und getrocknet; daraufhin wurden die Substanzen mit dem Ecospray® (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) aufgesprüht, so dass das Futter gleichmäßig damit benetzt war, ohne jedoch dabei durchtränkt zu werden. Es wurde wiederum getrocknet und nun entweder mit Sonnenblumenöl oder Fischöl überschichtet. Auch Kombinationen der verschiedenen Substanzen wurden getestet. Das entsprechende Kontrollfutter wurde analog hergestellt, nur ohne Zusatz von Chinin.

Die Versuche zur Überprüfung der Futterakzeptanz erfolgten wie unter Variante 1 beschrieben.

### Variante 3: Vermischen des Chinins mit den Futtergrundkomponenten

Als nächstes wurde für die Versuche ein spezielles Karpfenfutter mit Hilfe der Technischen Universität München, Fachgebiet Tierernährung, Freising, hergestellt, in welches das Chinin bereits mit den Grundkomponenten des Futters (s. Tab. 1) eingemischt wurde. Das Medizinalfutter wurde in verschiedenen Gehalten angefertigt: Kontrolle (ohne Chininzusatz), 5 g/kg, 10 g/kg und 20 g/kg. Daraufhin wurde es pelletiert (Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik, Ludwig-Maximilians-Universität München) und der Karpfengröße entsprechend zerkleinert. Die Zusammensetzung des Basisfutters ist in Tab. 1 zusammengefasst. Für die Akzeptanzversuche wurden vier Behandlungsgruppen bestehend aus jeweils fünf Karpfen verwendet (Kontrolle, 5 g/kg, 10 g/kg und 20 g/kg). Zusätzlich wurde dieses Futter daraufhin mit den Substanzen überschichtet, mit denen in den vorherigen Versuchen eine geringe Verbesserung der Akzeptanz (s. V 1.) erzielt werden konnte (Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® und Fischöl) und die Akzeptanz wiederum in Versuchen getestet. Das auf diese Weise hergestellte Medizinalfutter wurde in den Hauptversuchen eingesetzt.

**Tab. 1:** Grundzusammensetzung des Ausgangsfutters für das Medizinalfutter in Prozent

<b>Bestandteil</b>	<b>Anteil (in Prozent)</b>
Fischmehl	40
Sojaproteinisolat	20
Maisquellstärke	15
Weizen	15
Fischöl	6
Vitamin- und Mineralstoffmischung	4

## 2.2 *In vitro* Versuche

Für die *In vitro* Versuche zur antiprotozoischen Wirkung von Chinin musste eine Quantifizierung von toten vs. lebenden Stadien von *I. multifiliis* erfolgen. Hierzu wurde eine Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Fluorescein-Diacetat (FDA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und Propidiumjodid (PI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) angewendet, welche dazu dient, lebende von toten Zellen zu differenzieren. Nur wenn eine Schädigung der Zellmembran vorliegt, kann das PI eindringen und die DNA der Zelle anfärben, so dass diese eine rote Fluoreszenz aufweist. Das FDA hingegen wird nur von lebendigen Zellen zu dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein umgewandelt. So sind intakte Parasitenstadien durch das Fluorescein als grün leuchtend zu erkennen, während geschädigte oder bereits tote Stadien rot fluoreszieren (Fletcher et al., 2009; Yokoyama et al., 2009; Zampolla et al., 2009). Zur Versuchsdurchführung wurde eine Arbeitslösung des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs angefertigt: 0,5 mg PI pro ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und 5 mg FDA pro ml Aceton (Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

### 2.2.1 Übersicht zum Versuchsablauf

Stadien von *I. multifiliis* wurden gleichmäßig auf vier Eppendorf Tubes (Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 ml; Eppendorf AG, Hamburg) mit 200 µl Leitungswasser aufgeteilt. Eines dieser vier Gefäße diente als Negativkontrolle, in die anderen wurden Chininlösungen in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten erfolgte die Zugabe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Proben am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2 RFCA; Olympus Optical Co. Ltd, Japan) ausgewertet. Der Versuchsablauf kann folgendermaßen zusammengefasst werden:

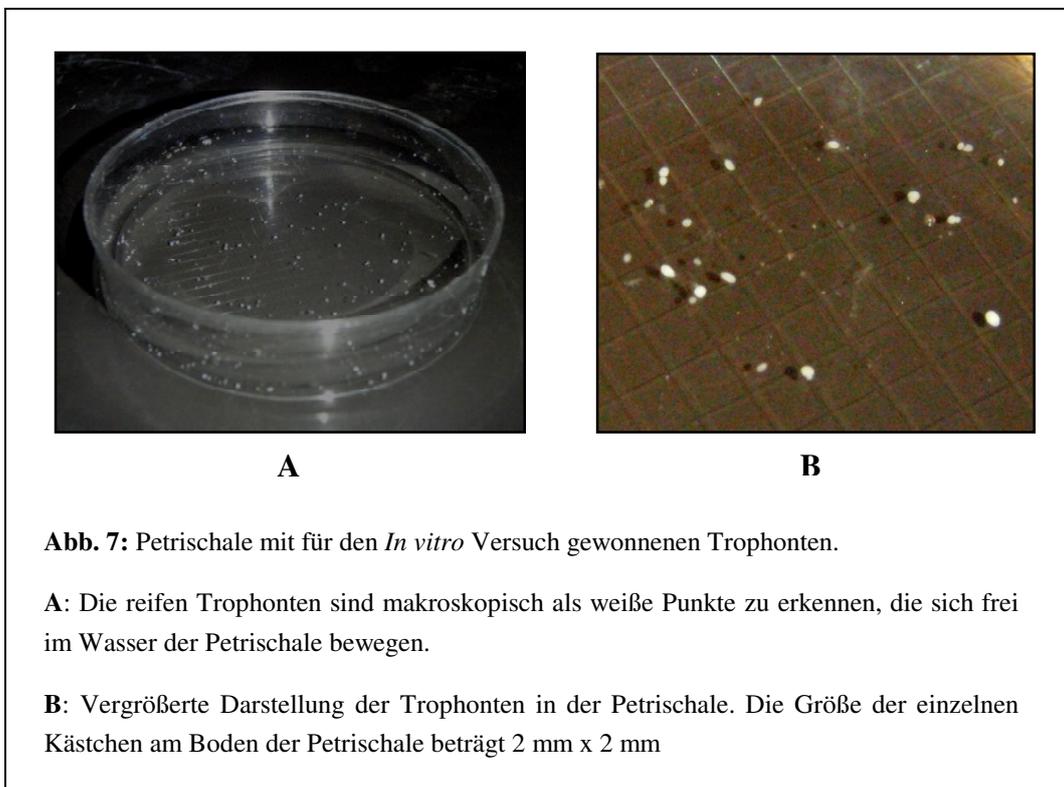
- Aufteilen der Stadien in 4 Eppendorf Tubes mit jeweils 200 µl Leitungswasser
- Zugabe von 20 µl der jeweiligen Chinin- oder Kontrolllösungen
- 30 Minuten Einwirkzeit
- Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe (2 µl der PI-Arbeitslösung und 1 µl der

FDA-Arbeitslösung)

- 30 Minuten Einwirkzeit
- Aufbringen auf Objektträger (Entnahme von jeweils 4 mal 40 µl pro Probe)
- Verblinden des Versuchs
- Differenzierung der Parasitenstadien am Fluoreszenzmikroskop

### 2.2.2 Gewinnung der Parasitenstadien

Für alle durchgeführten Versuche wurden zunächst Trophonten gewonnen. Hierzu wurden mit reifen Trophonten infizierte Forellen aus den Laborzyklusbecken verwendet. Nach dem Töten des Fisches wurde die Schleimschicht vorsichtig mit einem Deckglas in eine Petrischale (Tissue culture dish, Sarstedt Inc. Newton, USA) mit 10 ml Leitungswasser (16° C) abgestreift. Die makroskopisch erkennbaren Trophonten lösten sich nach einiger Zeit aus dem Schleim und schwammen frei in der Petrischale, so dass sie abpipettiert werden konnten. Mit den Trophonten wurde je nach Versuch wie folgt verfahren.



### **2.2.2.1 *In vitro* Versuch mit Trophonten**

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden die gewonnenen Trophonten mit einer feinen Pipette (10-100 µl Pipette; Eppendorf AG, Hamburg) aus den Petrischalen hinauspipettiert und in vier Eppendorf Tubes für den eigentlichen Versuch verbracht. Es wurden nur aktiv schwimmende Trophonten gewählt, so dass vermieden wurde, dass Stadien, die bereits durch den Abschabprozess geschädigt wurden, in den Versuch gelangten. Das Ziel war es, eine große Anzahl von Trophonten in einer möglichst geringen Menge Wasser zu erhalten, da es am Ende des Versuchs nur möglich war, einen kleinen Anteil der Probe zu mikroskopieren, in welchem jedoch eine ausreichende Zahl an Parasitenstadien zum Zählen vorhanden sein musste. Die Trophontendichte in den vier Eppendorf Tubes wurde erhöht, indem zwischen den sichtbaren Trophonten immer wieder Wasser hinauspipettiert wurde, so dass am Ende vier Versuchsgefäße mit 200 µl Trophontenlösung (ca. 100 freischwimmende Stadien) vorlagen.

### **2.2.2.2 *In vitro* Versuch mit Theronten**

Für den *In vitro* Versuch mit Theronten wurden die Trophonten in den Petrischalen belassen und der Schleim entfernt. Sie wurden bei 22-23° C für 20 bis 22 Stunden inkubiert, bis Theronten entstanden waren. Es musste darauf geachtet werden, dass die Schwärmerdichte in den Petrischalen sehr hoch war, da die Schwärmer im Gegensatz zu den makroskopisch sichtbaren Trophonten nicht nachträglich in den Eppendorf Tubes konzentriert werden konnten. Die Therontendichte wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 25; Carl Zeiss AG, Jena) überprüft. Es wurden jeweils 200 µl Schwärmerlösung in vier Eppendorf Tubes verbracht.

### **2.2.2.3 *In vitro* Versuch mit Tomonten**

Für den *In vitro* Versuch mit Tomonten wurde zunächst genauso verfahren wie für den Versuch mit Theronten. Jedoch wurde die Inkubationszeit und -temperatur der Petrischalen verringert (18 Stunden bei 14° C), so dass die Entwicklung langsamer ablief und die Parasiten im Tomontenstadium gewonnen werden

konnten. Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Zeiss STEMI SV8; Carl Zeiss AG, Jena) konnten die Tomonten in den Petrischalen ausgemacht werden und vorsichtig in die Eppendorf Tubes pipettiert werden. Die Parasitenstadien wurden auf vier Versuchsgefäße mit jeweils 200 µl Leitungswasser aufgeteilt. Da sich grundsätzlich nicht alle in den Petrischalen befindlichen Trophonten zu Tomonten entwickeln, konnte bei diesem Versuch keine so große Anzahl gewonnen werden wie bei den Trophonten und Schwärmern.

### **2.2.3 Zugabe der Versuchslösungen**

Für die Inkubation wurden neben einer Leitungswasserkontrolle drei ebenfalls mit Leitungswasser angesetzte Chininlösungen (Endkonzentration 1 g/L, 0,1 g/L und 0,01 g/L) verwendet. Nach Zugabe der Chininlösungen bzw. der Kontrolllösung wurden die Proben auf einem Rüttler (Vortex RFX 1R; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) vermischt und lichtgeschützt für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit das Chinin auf die Parasitenstadien einwirken konnte. Anschließend wurden die Arbeitslösungen der Fluoreszenzfarbstoffe (2 µl PI und 1 µl FDA) hinzugegeben, die Proben auf dem Rüttler vermischt und für weitere 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

### **2.2.4 Auswertung der Proben**

Es wurden pro Versuchsgefäß vier beschriftete Objektträger vorbereitet, auf welche jeweils 40 µl aufpipettiert und mit einem Deckgläschen versehen wurden. Anschließend wurde zur Verblindung des Versuchs die Beschriftung überklebt und den Objektträgern eine neue Nummerierung gegeben, so dass beim Auszählen nicht bekannt war, um welche Probe es sich handelte. Bei den Trophonten und Theronten wurden pro Probe jeweils 30 bis 50 Stadien und bei den Zysten 10 Stück mikroskopisch in lebende vs. tote Stadien differenziert. Die Versuche mit Trophonten und Theronten wurden sieben mal und mit Tomonten drei mal unter gleichen Bedingungen wiederholt.

### 2.3 *In vivo* Versuche

Während aller durchgeführten Versuche wurden die Karpfen nach der Infektion (s. IV 2.3.1) gruppenweise getrennt in 10-Liter Aquarien ohne Wasserdurchfluss gehalten. Es wurden täglich Wasserwechsel mit temperiertem Leitungswasser durchgeführt und Kalksteinausströmer sorgten für eine ausreichende Sauerstoffversorgung. Die Wassertemperatur betrug 18 +/- 1° C.

Das Anästhesieren und Töten von Versuchsfischen erfolgte in einer Betäubungslösung mit MS 222 (150 mg/L; Tricaine Methane Sulphonate; PharmaQ Ltd, Fordingbridge, UK). Für das Narkotisieren wurden die Fische aus dem Betäubungsbad entnommen, sobald der Augendrehreflex ausfiel. Zum Töten von Fischen wurden diese so lange in der Betäubungslösung belassen, bis die Atmung zum Stillstand kam. Zusätzlich wurde daraufhin ein Genickschnitt durchgeführt.

#### 2.3.1 Infektion von Versuchsfischen

Die Infektion von Versuchsfischen erfolgte nach zwei Methoden. Zunächst wurde die Methode evaluiert, *in vitro* Theronten zu erzeugen und die Fische durch Zugabe dieser in das Wasser zu infizieren (s. IV 2.3.1.2). Für die Fütterungsversuche wurde ein anderes Verfahren angewendet, in welchem die Infektion durch Kohabitation der Versuchsfische (s. IV 2.3.1.1) mit bereits an Ichthyophthiriose erkrankten Fischen erfolgte. Für die später durchgeführten Injektionsversuche wurden die beiden Verfahren kombiniert, wodurch der Infektionserfolg optimiert werden konnte.

##### 2.3.1.1 Infektion per Kohabitation mit infizierten Fischen

Als Infektionsbecken wurde ein 40-Liter Aquarium verwendet, bei welchem in der Mitte ein Gitter eingezogen war, so dass das Becken in zwei Kompartimente aufgeteilt wurde. Am hinteren Ende des Beckens befand sich der Wasserzulauf und am vorderen Ende der Ablauf, so dass die Flussrichtung vom hinteren zum vorderen Abschnitt verlief. Die zu infizierenden Karpfen wurden in das vordere

Kompartiment eingesetzt. Der hintere Abschnitt des Beckens wurde laufend mit infizierten Forellen aus den Laborzyklusbecken bestückt. Es wurden hierfür Forellen gewählt, bei denen bereits reife Trophonten vorhanden waren, so dass die daraus entstehenden Theronten nun für die Infektion der Versuchskarpfen zur Verfügung standen. Sie wurden durch die Flussrichtung des Wassers in den vorderen Abschnitt zu den Karpfen geschwemmt. In jedem Kompartiment war ein Kalksteinausströmer zur Sauerstoffanreicherung des Wassers vorhanden. Die Wassertemperatur betrug 16 +/- 2° C.

### **2.3.1.2 Infektion mit *in vitro* erzeugten Theronten**

Es wurden Trophonten gewonnen, indem mit reifen Stadien infizierte Forellen aus den Laborzyklusbecken mit MS 222 anästhesiert und die Schleimschicht mit einem Deckgläschen in eine Petrischale mit 10 ml temperiertem Leitungswasser abgestreift wurde. Nach ungefähr einer Stunde lösten sich die Trophonten aus dem Schleim. Dieser wurde möglichst vollständig entfernt. Die Schalen wurden bei einer Temperatur von 22 bis 23° C inkubiert, bis nach ca. 20 bis 22 Stunden die Theronten entlassen worden waren. Zur ungefähren Quantifizierung der Theronten wurden 10 Proben à 20 µl entnommen, auf einem Objektträger mit 5 µl Roti®-Histofix (4,5 %, säurefrei, phosphatgepuffert; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) fixiert und die darin enthaltenen Schwärmer mikroskopisch gezählt. Aus dem Mittelwert der 10 ausgezählten Proben ließ sich ermitteln, wie viele Schwärmer in der Gesamtlösung vorhanden waren. Die Infektion erfolgte, indem die Petrischalen mit den Theronten in das Wasser zu den zu infizierenden Fischen gegeben wurden. Pro Fisch wurden ca. 1000 Theronten eingesetzt.

### **2.3.1.3 Kombination der beiden Verfahren**

Die zu infizierenden Versuchskarpfen wurden in das vordere Kompartiment des Infektionsbeckens eingesetzt und dort für zwei Tage belassen. Während dieser Zeit wurden ein- oder zweimal *in vitro* erzeugte Theronten zur Verstärkung der Infektion ins Wasser gegeben. Zuvor wurde die Wassermenge auf die Hälfte reduziert und der Wasserdurchlauf für ca. drei Stunden ausgeschaltet.

### 2.3.2 Nachweis des Ausmaßes der Infektion

Am Ende der Versuche wurden alle Fische der Kontrollgruppen und der Chinin-behandelten Gruppen nacheinander und abwechselnd aus den verschiedenen Gruppen getötet. Es wurde die gesamte Schleimschicht beider Körperseiten mit einem Deckgläschen in jeweils eine Petrischale abgestreift, zur Fixierung mit 40 µl Roti®-Histofix und 40 µl Leitungswasser vermischt und ein Deckgläschen aufgebracht. Bei größeren Karpfen wurde der Schleim einer Körperseite auf zwei Schalen verteilt. Zur Erleichterung des mikroskopischen Zählens der Parasitenstadien wurden Petrischalen verwendet, welche an der Unterseite mit einem Raster versehen waren (Tissue culture dish; Sarstedt Inc., Newton, USA). Die Schalen hatten einen Durchmesser von 5 cm; die Größe der einzelnen Kästchen des Rasters betrug 2 mm x 2 mm.

Zur Verblindung des Versuchs wurde die Beschriftung der Petrischalen am Ende der Auswertung zugeklebt und die Schalen in eine neue Reihenfolge gebracht, so dass während des Zählens nicht bekannt war, zu welcher Gruppe der jeweilige Fisch gehörte. Es wurden alle Parasitenstadien jeder Petrischale am inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 25; Carl Zeiss AG, Jena) gezählt und so für jeden Fisch die Parasitenzahlen beider Körperseiten ermittelt. Für die Beurteilung des Behandlungserfolgs wurden die Gesamtzahlen pro Fisch (Summe beider Körperseiten) verwendet.

### 2.3.3 Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis*

In diesen Versuchen wurde die Empfänglichkeit gegenüber *I. multifiliis* zwischen den aus Wageningen und den aus Höchststadt stammenden Karpfen verglichen. Von beiden Zuchtlinien wurden jeweils fünf Karpfen gleichzeitig ins Infektionsbecken eingesetzt. Nach zwei Tagen wurden sie daraus entnommen und am darauf folgenden Tag fand die Auswertung nach dem beschriebenen Verfahren (s. IV 2.3.2) statt. Es wurde die Gesamtparasitenzahl der Körperoberfläche eines Fisches ermittelt und die Werte zwischen den beiden Gruppen verglichen.

### 2.3.4 Fütterungsversuche

In diesen Versuchen wurden die aus Wageningen bezogenen Karpfen eingesetzt. Die Körpergewichte wurden zum Zeitpunkt des Fütterungsbeginns erhoben und betragen zwischen 4 und 9 g. Die Gewichte waren innerhalb eines Versuchsdurchgangs einheitlich (Differenzen +/- 1 g) und schwankten nur zwischen den verschiedenen Replikaten. Um eine einheitliche Dosierung zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen zu erzielen, bezog sich die eingesetzte Menge an Medizinalfutter auf das Körpergewicht (Fütterung 1 % des KGW), für welches der Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe herangezogen wurde. Es wurde das Medizinalfutter verwendet, in welches das Chinin eingemischt war (s. IV 2.1.2, Variante 3). Zusätzlich wurde dieses gleichmäßig mit Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® und Fischöl überschichtet und vor der Verfütterung getrocknet.

#### 2.3.4.1 Therapeutische Wirksamkeit von Chinin

Zunächst sollte überprüft werden, ob Chinin eine Wirksamkeit auf bereits mit *I. multifiliis* infizierte Fische besitzt. Dazu wurden die Versuchskarpfen durch Kohabitation mit infizierten Forellen infiziert (s. IV 2.3.1.1). Pro Versuchsdurchlauf wurden 25 Karpfen verwendet (s. Tab. 2). Zusätzlich zu den 25 Versuchskarpfen wurden zwei Karpfen ins Infektionsbecken eingesetzt, von denen am folgenden Tag Hautabstriche angefertigt wurden, um einschätzen zu können, ob schon eine Infektion erfolgt war. Diese Karpfen wurden für den eigentlichen Versuch nicht mehr verwendet. Wenn auf diesen „Indikatorfischen“ eine ausreichende Anzahl an Schwärmern (mindestens 15 Stück pro Hautabstrich) vorhanden war, wurden die Versuchskarpfen gewogen (Kern KB 1000-2; Kern & Sohn GmbH, Balingen), um die genaue Futtermenge und Dosierungen berechnen zu können, und auf ihre Versuchsbecken aufgeteilt. Am darauf folgenden Tag wurde die Fütterung mit dem Medizinalfutter begonnen. Außerdem wurden die ersten fünf infizierten Karpfen ausgewertet, um den Parasitenbefall vor Fütterungsbeginn ermitteln zu können. Ziel dieser zusätzlichen Karpfen war es, einen Bezugspunkt zum Beginn des Versuchs zu haben, damit der Verlauf der Infektion während der Fütterungsphase beurteilt werden konnte.

Für den eigentlichen Versuch gab es vier Behandlungsgruppen bestehend aus jeweils fünf Fischen, die mit Medizinalfutter mit verschiedenen Gehalten an Chinin gefüttert wurden: 0 g Chinin/kg Futter (Kontrolle), 5 g/kg, 10 g/kg und 20 g/kg. Die Futtermenge betrug täglich 1 % des Körpergewichts, verteilt auf zwei Fütterungen täglich, und erfolgte in den ersten drei Versuchsreplikaten über 7, in den folgenden Durchgängen über drei Tage. Vor Beginn der Behandlung mit dem Medizinalfutter wurden alle Fische vier Tage lang nicht gefüttert, um die Aufnahme des Medizinalfutters zu verbessern. Am folgenden Tag nach der letzten Fütterung wurde der Versuch ausgewertet (s. IV 2.3.2). Es wurden drei Replikate des Versuchs mit Fütterung über 7 Tage und vier Replikate mit Fütterung über drei Tage durchgeführt.

**Tab. 2:** Anzahl der verwendeten Karpfen pro Versuchsdurchlauf zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von Chinin. Zwei „Indikatorfische“ dienen zum Abschätzen, ob eine ausreichende Infektion vorlag. Fünf Fische dienen zur Erhebung des Infektionsstatus zum Beginn der Fütterung mit dem Medizinalfutter. 20 Fische (5 pro Gruppe) wurden für den eigentlichen Versuch verwendet und erhielten Medizinalfutter mit verschiedenen Gehalten an Chinin über drei bzw. sieben Tage.

Zeitpunkt	1 Tag nach Infektion	Vor Versuchsbeginn	Versuchsgruppen			
			0g/kg	5g/kg	10g/kg	20g/kg
	„Indikatorfische“	Infektion zu Versuchsbeginn				
Anzahl Fische	2	5	5	5	5	5

#### 2.3.4.2 Prophylaktische Wirksamkeit von Chinin

Zusätzlich zur Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit wurde untersucht, ob Chinin eine prophylaktische Wirkung gegen *I. multifiliis* hat, d.h. ob das Eindringen der Theronten bzw. das Heranwachsen dieser durch vorangegangene Fütterung der Fische mit Chinin verhindert oder reduziert werden kann. Dazu

erhielten die Versuchsfische zuerst das Medizinalfutter und wurden erst danach mit *I. multifiliis* infiziert.

Verwendet wurden drei Gruppen bestehend aus jeweils fünf Karpfen, die Medizinalfutter mit verschiedenen Konzentrationen an Chinin erhielten: 0 g Chinin/kg Futter (Kontrolle), 5 g/kg und 10 g/kg (s. Tab. 3). Die Fütterung in den verschiedenen Behandlungsgruppen erfolgte über 14 Tage. Am folgenden Tag nach der letzten Fütterung wurden die Fische nach dem beschriebenen Verfahren (s. IV 2.3.1.1) infiziert. Nach zwei Tagen im Infektionsbecken wurden sie entnommen und in ein frisches 40-Liter Aquarium verbracht, wo sie ein bis zwei Tage verblieben. Hierdurch war gewährleistet, dass eventuell vorhandene Schwärmer, die aufgrund der Vorbehandlung nicht in die Haut eindringen konnten und sich nur lose am Fisch befanden, nicht versehentlich mitgezählt wurden. Außerdem konnten die bereits vorhandenen Stadien zu größeren Trophonten heranwachsen, welche bei der Zählung besser erkennbar waren. Die Versuchsauswertung erfolgte wie in Kapitel IV 2.3.2 beschrieben. Es wurden 6 Replikate des Versuchs durchgeführt.

**Tab. 3:** Anzahl der verwendeten Karpfen pro Versuchsdurchlauf zur Untersuchung der prophylaktischen Wirksamkeit von Chinin. Die Fische erhielten zunächst Medizinalfutter mit verschiedenen Gehalten an Chinin über 14 Tage und wurden daraufhin mit *I. multifiliis* infiziert. Pro Behandlungsgruppe wurden fünf Karpfen verwendet.

<b>Fütterung</b>	<b>Behandlungsgruppen</b>	<b>Anzahl Fische</b>
<b>über 14 Tage</b>	0 g/kg (Kontrolle)	5
	5 g/kg	5
	10 g/kg	5

### 2.3.5 Vorversuche zur oralen Verabreichung über eine Schlundsonde

Für diese Versuche wurden insgesamt 20 Karpfen mit Körperlängen von 8-10 cm verwendet. Vor dem Einführen der Schlundsonde wurden die Fische narkotisiert. Für die Herstellung einer geeigneten Sonde wurde das Endstück einer Ernährungssonde mit einem Durchmesser von 1,5 mm (No.1; Willy Rüschi GmbH, Kernen) in einer Länge von ca. 2 cm abgeschnitten und auf eine 10 µl Pipettenspitze fest aufgesteckt. Diese wurde auf eine Pipette (10-100 µl Pipette; Eppendorf AG, Hamburg) aufgesetzt, mit welcher 30 µl blaue Lebensmittelfarbe eingespritzt wurden, um den Erfolg der Sondierung beurteilen zu können. Die Karpfen wurden in ihre Aquarien zurückgesetzt und beobachtet. Die Hälfte der Fische wurde nach 30 Minuten wieder aus den Becken entnommen, getötet und sezziert, um den Verbleib der Lebensmittelfarbe feststellen zu können. Bei den verbliebenen 10 Karpfen wurde am folgenden Tag wieder eine Sondierung durchgeführt und die Fische danach beobachtet. Nach 30 Minuten wurden wiederum Sektionen der Fische durchgeführt.

### 2.3.6 Injektionsversuche

In den Versuchen zur parenteralen Wirksamkeit und Toxizität von Chinin wurden die aus Höchstadt bezogenen Karpfen mit Körperlängen von ungefähr 7-8 cm und Gewichten von ca. 11-13 g verwendet. Es erfolgte eine intraperitoneale (i.p.) Injektion. Die Injektionsstelle befand sich median, kranial der Bauchflossen mit leicht kraniodorsal gerichteter Nadel. Es wurde eine 1 ml Spritze (Braun Melsungen AG, Melsungen) mit einer 27 G Kanüle (BD Drogheda, UK) verwendet.

Die Injektionslösung setzte sich aus 2500 µl Wasser und 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel) als Lösungsvermittler zusammen, worin die jeweilige Menge an Chinin gegeben wurde. Die Herstellung der Injektionslösung für die Kontrollgruppe erfolgte analog nur ohne Hinzufügen von Chinin (Vehikelkontrolle). Pro Fisch wurde ein Volumen von 30 µl (ca. 2,5 ml/kg KGW) dieser Lösung injiziert. Um hierbei eine Dosierungsgenauigkeit zu erzielen, wurden die einzelnen Fische gewogen und der Mittelwert des Gewichtes

der gesamten Gruppe berechnet. Bei der Auswahl der Fische für den Versuch wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Körpergewichte möglichst einheitlich waren. Bemessen auf das durchschnittliche Gewicht und das Injektionsvolumen wurden die Chinin-Injektionslösungen in den entsprechenden Konzentrationen für jeden Versuchsdurchgang frisch angesetzt.

### **2.3.6.1 Toxizitätsversuche**

Die Chinindosierungen, welche in den Toxizitätsversuchen i.p. appliziert wurden, waren 200 mg, 100 mg, 80 mg und 60 mg Chinin pro kg KGW. Es gab für jede untersuchte Dosis eine Behandlungsgruppe und eine Kontrollgruppe bestehend aus jeweils fünf Karpfen. Eine Gruppe bekam das Vehikel, während die andere die Injektionslösung in der jeweiligen Chininkonzentration erhielt. Es erfolgten einmal täglich Injektionen über einen Zeitraum von ein bis drei Tagen. Das Verhalten der Fische wurde in den folgenden Stunden beobachtet und Sektionen von gestorbenen Fischen vorgenommen.

### **2.3.6.2 Therapeutische Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation**

Nachdem die Karpfen mittels Kombination der beiden Infektionsverfahren mit *I. multifiliis* infiziert worden waren (s. IV 2.3.1.3), wurden zwei Gruppen bestehend aus jeweils 6 Karpfen in zwei getrennten Becken gehalten. Die Injektionen erfolgten einen Tag nach Entnahme aus dem Infektionsbecken über drei Tage jeweils einmal täglich zur gleichen Uhrzeit. Eine Gruppe bekam das Vehikel, die andere erhielt Chinin in einer Dosis von 60 mg pro kg KGW. Die Auswertung erfolgte nach dem in Kapitel IV 2.3.2 beschriebenen Verfahren. Es wurden vier Wiederholungen des Versuchs unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Nicht nur die Gesamtzahl an Parasiten wurde ermittelt, sondern zusätzlich zwei Größenkategorien festgelegt, in welche die gezählten Trophonten eingeteilt wurden. Dabei wurden die Stadien bei einer Größe bis zu 120 µm als „Klein“ und bei einer Größe über diesem Wert als „Groß“ bezeichnet.

## 2.4 Statistische Auswertungen

Alle Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism V5 durchgeführt.

### In vitro Versuche

Bei den *In vitro* Versuchen wurde der Anteil an grün fluoreszierenden Stadien bei den verschiedenen Chininkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle getestet. Die Prozentwerte der vorhandenen grünen Stadien wurden arcus-sinus transformiert und mit dem Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's multiplen Vergleich ausgewählter Mittelwerte ausgewertet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei einem p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant gewertet.

### In vivo Versuche

Da die Zahlen der Parasiten auf den Fischen zwischen den einzelnen Replikaten durch Schwankungen beim Infektionserfolg stark variierten, wurden für die Auswertung der Daten der Fütterungsversuche und Injektionsversuche die Verhältniswerte der Parasitenzahl zwischen der Kontrolle und den behandelten Gruppen herangezogen. Da bei einer erfolgreichen Behandlung eine geringere Anzahl an Parasiten auf den behandelten Fischen als auf denen der Kontrollgruppe zu erwarten wäre, müsste in diesem Fall der Quotient aus der Parasitenzahl zwischen Kontrolle und behandelten Gruppen signifikant größer als 1 sein. Dieser Effekt wurde mittels Ein-Stichproben t-Test getestet. Ein Unterschied zwischen dem theoretischen und dem gemessenen Quotienten wurde bei einem p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant gewertet.

Zur Auswertung der Ergebnisse für die Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis* wurde ein Wilcoxon Rangsummentest für abhängige Stichproben angewendet, da es bei der Infektion im selben Infektionsbecken zu einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Gruppen kam. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei einem p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant gewertet.

## V Ergebnisse

### 1. Akzeptanzversuche

Bei Durchführung der Vorversuche mit dem aufgesprühtem Chinin (Herstellungsvariante 1) ergaben sich sowohl bei den Karpfen als auch bei den Regenbogenforellen ab einer Chininkonzentration von 10 g/kg Probleme bei der Akzeptanz des Futters. So ließ bereits ab dem zweiten Fütterungstag das Interesse am Futter nach. Es wurde entweder überhaupt nicht aufgenommen oder nach wenigen Sekunden wieder ausgespuckt. Bei den meisten der zur Überdeckung des bitteren Geschmacks angewendeten Substanzen (Herstellungsvariante 2) konnte kaum eine Verbesserung der Akzeptanz erzielt werden. Lediglich bei Zugabe des Karpfenflavors XL Liquid Pineapple® und Fischöl war eine Verbesserung zu verzeichnen, da bei der mit 10 g/kg gefütterten Gruppe in den ersten Tagen der Fütterung keine Unterschiede im Fressverhalten zu der Kontrollgruppe vorhanden waren. Ab dem vierten Tag ließ das Interesse am Futter jedoch wiederum nach.

Das Einmischen des Chinins statt des Aufsprühens (Herstellungsvariante 3) bewirkte eine deutliche Akzeptanzverbesserung (s. Übersicht Tab. 4). Bei Anwendung dieses Medizinalfutters war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit 5 g/kg und 10 g/kg gefütterten Behandlungsgruppen die Akzeptanz der Ration über die 14 Versuchstage gegeben. Jedoch ließ nach einigen Tagen Fütterung (zwischen 6. und 8. Tag) bei der mit einer Konzentration von 10 g/kg gefütterten Gruppe das Interesse am Futter bei einem Teil der Fische nach. Bei der Gruppe, welche Medizinalfutter in einer Konzentration von 20 g/kg erhielt, war meist ab dem vierten Tag eine herabgesetzte Akzeptanz des Medizinalfutters vorhanden und ab dem fünften oder sechsten Tag wurde kaum noch Futter aufgenommen. Nach weiterer Überschichtung der Pellets mit Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® und Fischöl wurde das Futter von der Kontrollgruppe und der mit 5 g/kg gefütterten Gruppe vollständig über die 14 Tage aufgenommen. Bei einer Konzentration von 10 g/kg wurde wiederum nach mehreren Tagen Fütterung (ungefähr ab dem 8. bis 9. Tag) bei manchen Fütterungen das Ausspucken des Futters bei einem Teil der Fische beobachtet, der Großteil der Ration wurde jedoch aufgenommen. Bei der Gruppe, die 20 g/kg erhielt, war auch nach

Aufbringen der verschiedenen Substanzen die Akzeptanz des Medizinalfutters nicht verbessert.

**Tab. 4:** Übersicht zu den Ergebnissen der Akzeptanzversuche bei auf verschiedene Weise hergestelltem Medizinalfutter.

<b>Grundfutter</b>	<b>Zusätzliche Substanzen</b>	<b>Akzeptanz</b>
Chinin aufgesprüht	Ohne Zusätze	schlecht
	Aufbringen verschiedener Stoffe: süße Substanzen, Fette, Aminosäuren, kommerzielle Karpfenflavors	schlecht bis mäßig
	Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® in Kombination mit Fischöl	leichte Verbesserung
Chinin eingemischt	ohne Zusätze	leichte Verbesserung
	Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® und Fischöl	deutliche Verbesserung

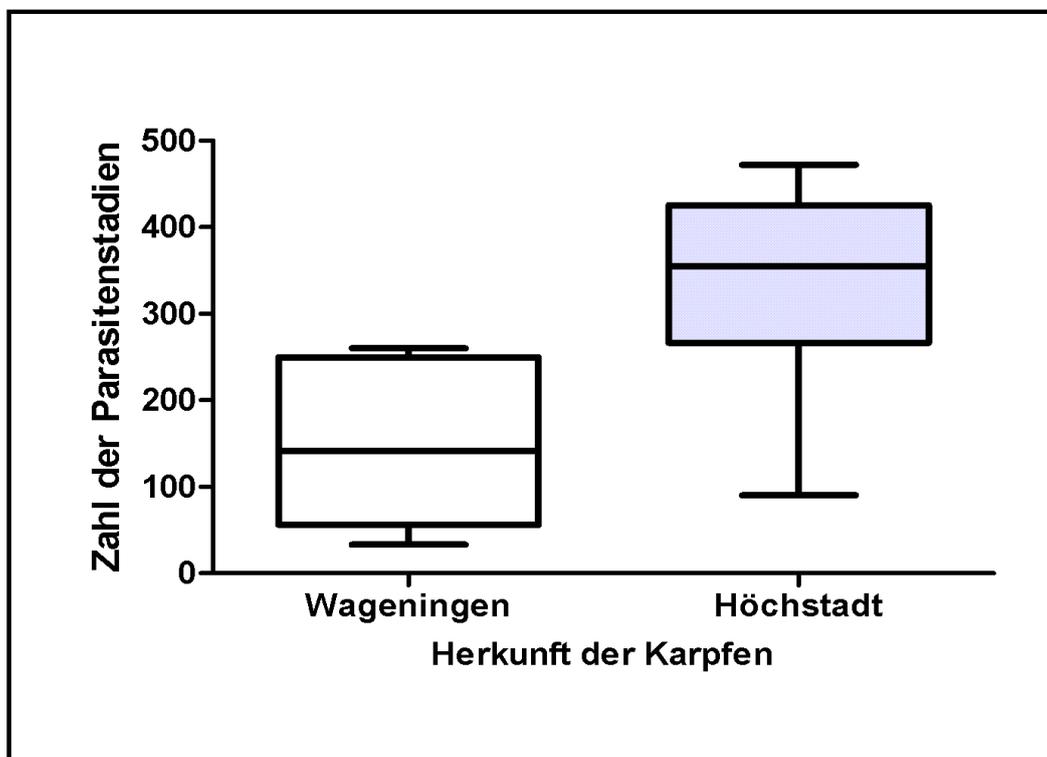
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Durchführung der Hauptversuche zur Untersuchung der oralen Wirksamkeit von Chinin das Medizinalfutter verwendet, bei welchem das Chinin bereits mit den Grundkomponenten vermischt wurde (Herstellungsvariante 3). Zusätzlich wurde dieses Futter mit Karpfenflavor XL Liquid Pineapple® und Fischöl überschichtet.

## **2. Infektion und Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis***

Einerseits mussten für die Durchführung der *In vivo* Versuche ausreichend hohe

Parasitenzahlen auf den Fischen vorhanden sein, damit ein Behandlungseffekt zwischen den Gruppen in Erscheinung treten konnte, andererseits galt es eine zu hohe Infektionsintensität zu vermeiden, da diese zu Mortalitäten der Versuchsfische geführt hätte. Durch das angewandte Infektionsverfahren (s. IV 2.3.1) konnte ein optimales Ausmaß der Infektion erreicht werden. Die erzielten Parasitenzahlen schwankten bei den Fütterungsversuchen in Bereichen zwischen ungefähr 100 und 300 Parasitenstadien und bei den Injektionsversuchen zwischen ca. 200 und 700 Stadien. Selbst bei diesen hohen Parasitenzahlen kam es zu keinerlei infektionsbedingten Mortalitäten, so dass die Versuchsdurchführung optimal verlaufen konnte.

Der Versuch zum Vergleich des Infektionsausmaßes zwischen zwei verschiedenen Karpfenzuchtlinien ergab signifikante Unterschiede (s. Abb. 8). Die Trophontenzahl war bei den aus Höchststadt stammenden Karpfen signifikant höher als bei den aus Wageningen bezogenen Karpfen ( $p < 0,05$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den einzelnen *In vivo* Versuchen zur Untersuchung der Wirksamkeit von Chinin stets Karpfen gleicher Herkunft verwendet.

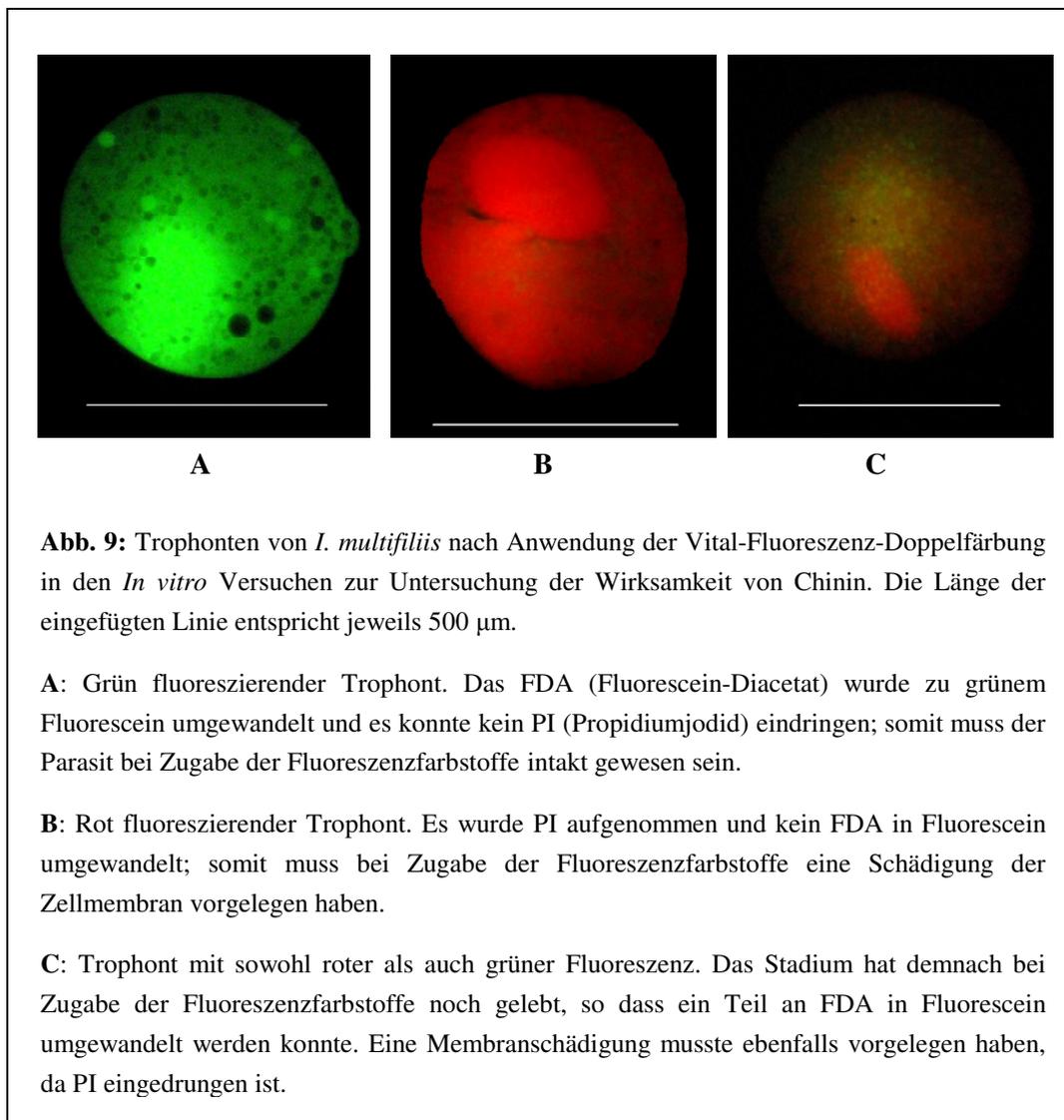


**Abb. 8:** Vergleich der Empfänglichkeit gegenüber *I. multifiliis* zwischen den aus Höchststadt und den aus Wageningen bezogenen Karpfen. Dargestellt sind Boxplots der Trophontenzahl pro Versuchsreplikat ( $n = 6$ ). Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen beiden Gruppen war signifikant ( $p < 0,05$ ).

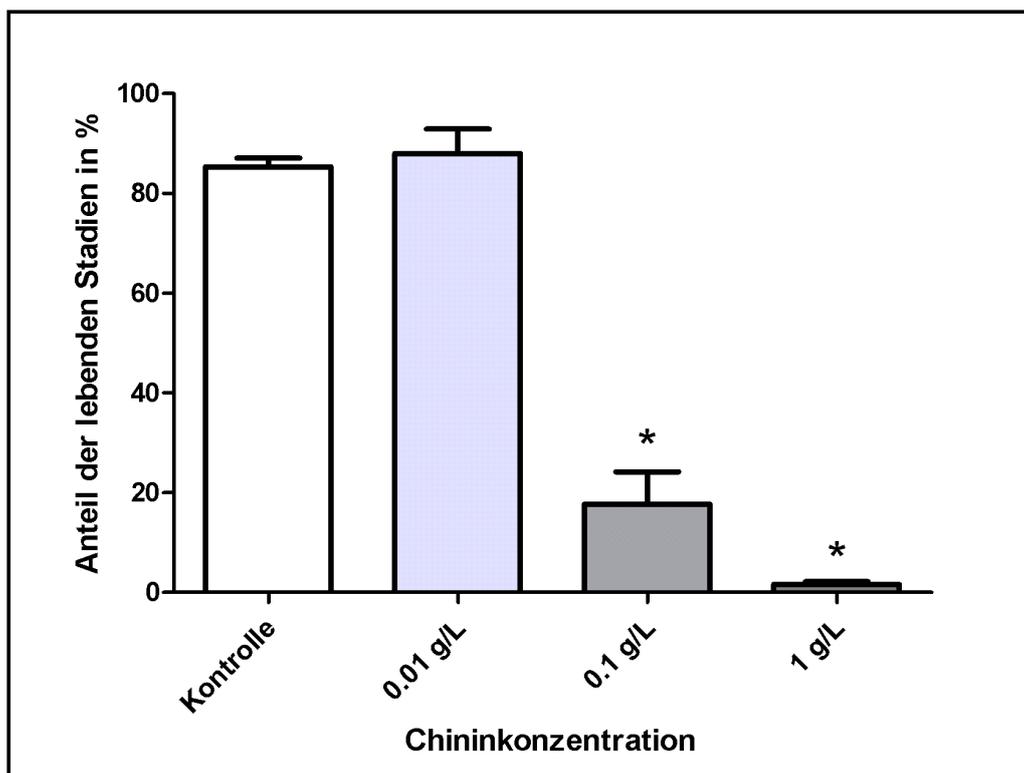
### 3. *In vitro* Versuche

#### 3.1 Wirkung von Chinin auf Trophonten

Die Anfärbung mittels Vital-Fluoreszenz-Doppel-Färbung ermöglichte die Unterscheidung zwischen den intakten grün fluoreszierenden (s. Abb. 9 A) und den geschädigten rot fluoreszierenden (s. Abb. 9 B) Trophonten. Neben rein grün oder rot fluoreszierenden Stadien gab es auch Mischformen, bei welchen im Inneren das rote PI und außen in der Zellmembran das grüne Fluorescein sichtbar waren (s. Abb. 9 C). Diese wurden als rote Stadien gewertet, weil von einer Vorschädigung der Trophonten ausgegangen werden musste.



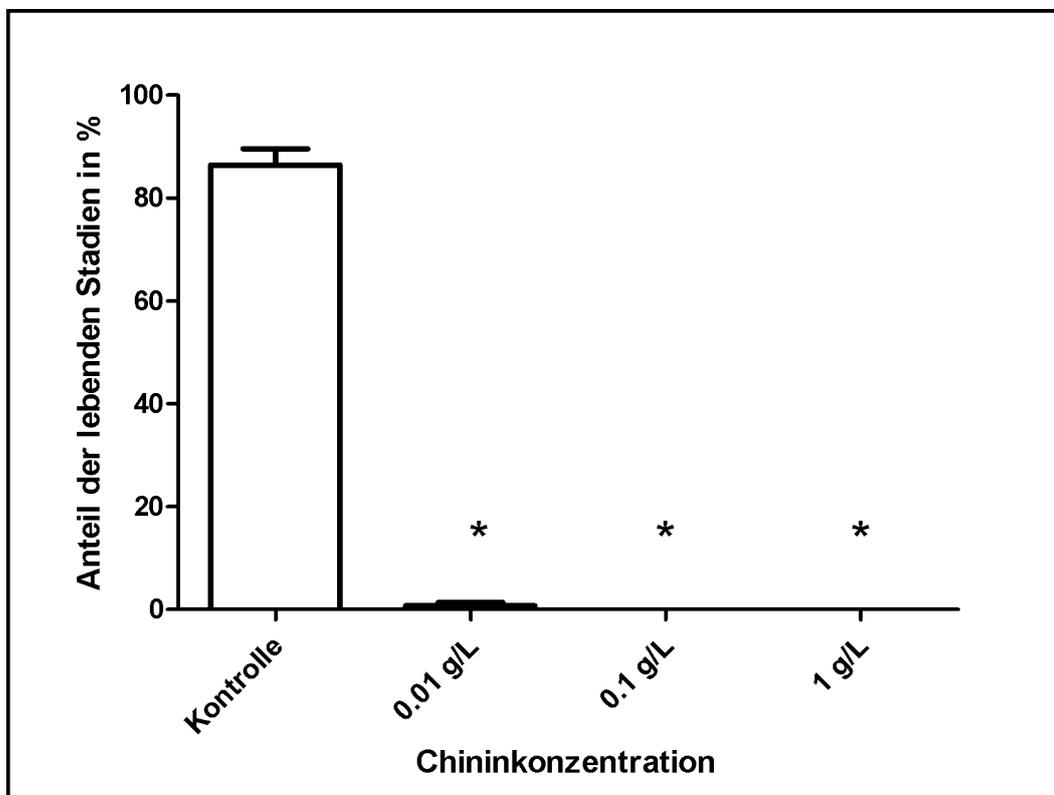
Bei der Kontrolle waren überwiegend grün fluoreszierende Stadien vorhanden, die sich zum Teil auch noch aktiv bewegten. Der Anteil dieser ungeschädigten Stadien betrug ca. 85 %. Bei den Chininkonzentrationen von 1 g/L und 0,1 g/L war die Anzahl der lebenden Stadien signifikant niedriger als bei der Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Bei der Konzentration von 1 g/L betrug der Anteil der grün fluoreszierenden Trophonten nur 1,58 % und bei der Konzentration von 0,1 g/L ergab sich ein Wert an ungeschädigten Stadien von 17,71 %. Bei der niedrigsten Konzentration an Chinin (0,01 g/L) überwogen wie bei der Negativkontrolle die grün fluoreszierenden Stadien, deren Anteil hier 88 % ausmachte, und sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Die Ergebnisse werden in Abb. 10 präsentiert.



**Abb. 10:** *In vitro* Fluoreszenzversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Chinin auf Trophonten ( $n = 7$ ). Dargestellt ist jeweils der Anteil an grün fluoreszierenden (= lebenden) Stadien für jede Chininkonzentration und der S.E. Das Sternchen zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Wirkung von Chinin auf Theronten

Bei der Kontrolle waren ca. 86 % der Theronten grün fluoreszierend. Bei den Konzentrationen 1 g/L und 0,1 g/L war bei 100 % der Stadien eine rote Fluoreszenz vorhanden, d.h. alle Parasiten waren bei der Zugabe der Färbelösungen geschädigt. Bei der geringsten Chininkonzentration (0,01 g/L) waren ca. 99 % der gezählten Stadien rot und nur 1 % fluoreszierte grün. Die Anzahl an lebenden Stadien war bei allen Konzentrationen signifikant niedriger als bei der Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

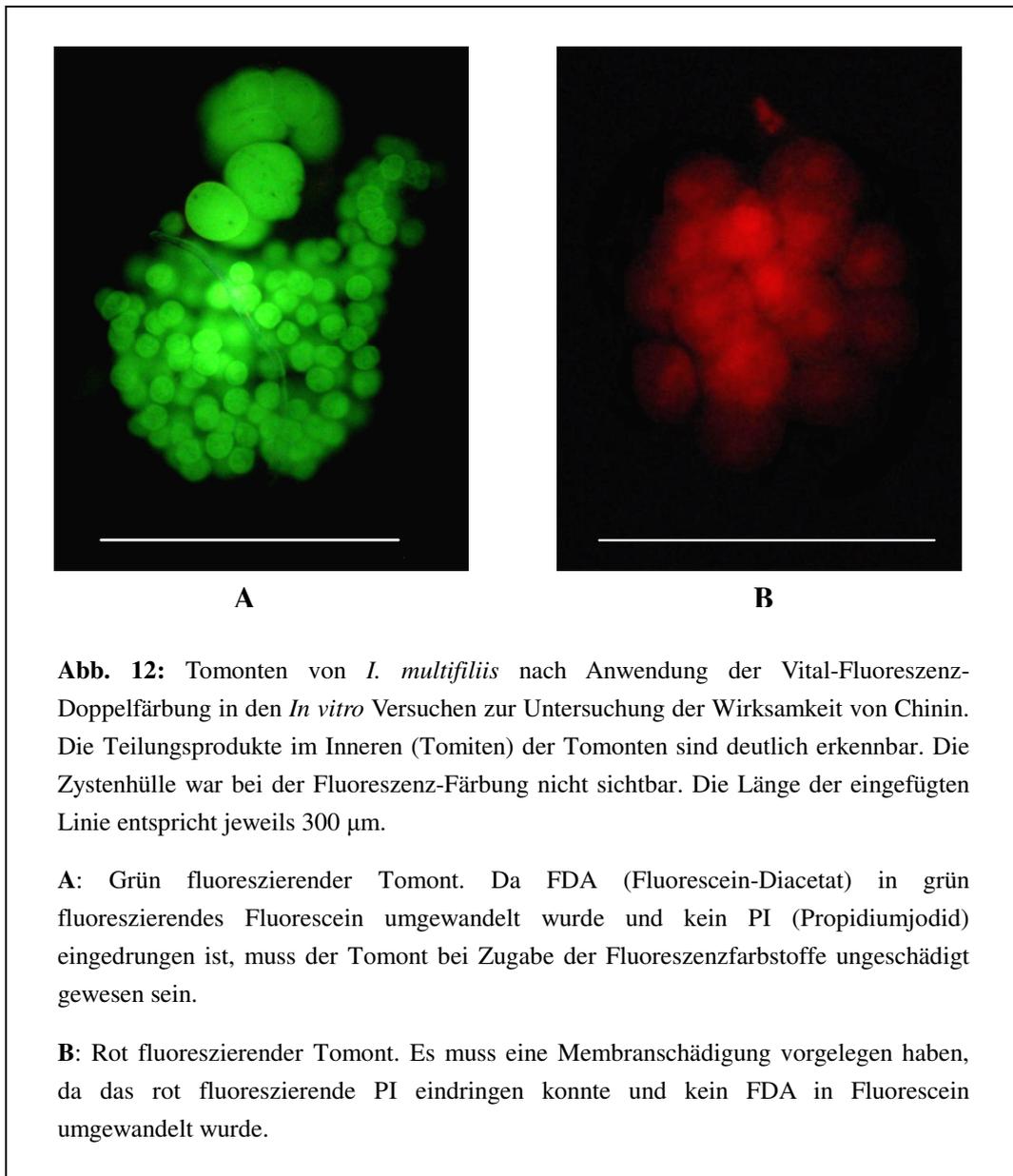


**Abb. 11:** *In vitro* Fluoreszenzversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Chinin auf Theronten ( $n = 7$ ). Dargestellt ist jeweils der Anteil an grün fluoreszierenden (= lebenden) Stadien für jede Chininkonzentration und der S.E.. Das Sternchen zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Wirkung von Chinin auf Tomonten

Bei der Kontrolle waren überwiegend intakte grüne Tomonten vorhanden (ca. 97 %), in deren Inneren die ebenfalls grün angefärbten Teilungsprodukte erkennbar

waren (Abb. 12 A). Geschlüpfte Tomiten schwammen oftmals frei umher und fluoreszierten ebenfalls grün. Wie bei den anderen Stadien gab es auch bei den Kontroll-Zysten einen geringen Anteil, der rot angefärbt war (ca. 3 %).

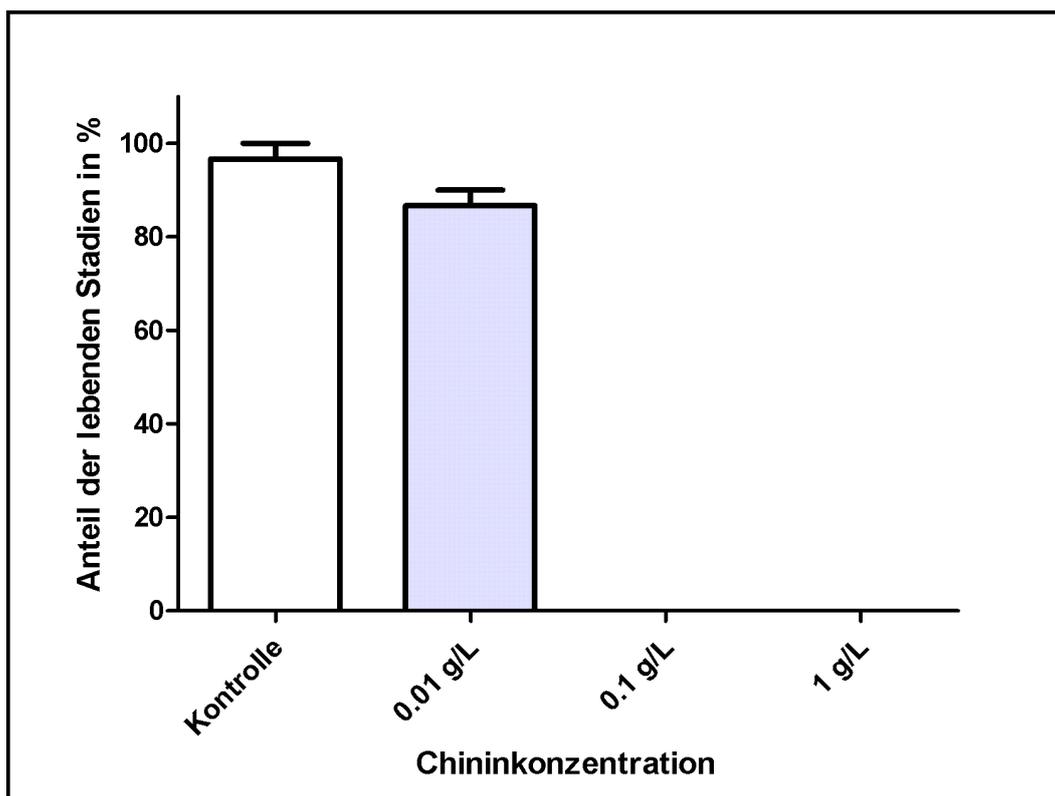


Bei der höchsten Chininkonzentration (1 g/L) und der ersten Verdünnungsstufe (Konzentration 0,1 g/L) waren 100 % der Tomonten rot fluoreszierend (s. Abb. 12 B) oder gemischt angefärbt und somit keine lebenden (grün fluoreszierenden) Tomonten vorhanden. Bewegungen der Tomiten innerhalb der Zysten waren

hierbei nicht zu erkennen. Wenn freie Tomiten außerhalb von Tomonten vorkamen, so waren sie ebenfalls immer rot angefärbt.

Bei der niedrigsten Chininkonzentration (0,01 g/L) waren ca. 87 % der Zysten grün angefärbt, und Bewegungen der Teilungsprodukte in ihrem Inneren ließen zusätzlich auf die Unversehrtheit dieser Stadien schließen. Frei vorkommende Tomiten fluoreszierten ebenfalls grün.

Statistische Unterschiede konnten wegen der geringen Stichprobenzahl ( $n = 3$ ) nicht nachgewiesen werden. Trotzdem sind die Unterschiede zwischen den beiden höchsten Konzentrationen und der Kontrolle bzw. der niedrigsten Chininkonzentration augenfällig und deuten klar auf eine Wirksamkeit der Substanz auf die Tomonten hin. Die Ergebnisse werden in Abb. 13 dargestellt.



**Abb. 13:** *In vitro* Fluoreszenzversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Chinin auf Tomonten. Dargestellt ist jeweils der Anteil an grün fluoreszierenden (= lebenden) Stadien für jede Chininkonzentration und der S.E.. Statistische Unterschiede konnten aufgrund der geringen Stichprobenzahl ( $n = 3$ ) nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt demonstrierten die Ergebnisse der *In vitro* Versuche eine signifikante Empfindlichkeit aller Stadien von *I. multifiliis* in den untersuchten Chininkonzentrationen von 1 g/L und 0,1 g/L. In der niedrigsten angewandten Konzentration von 0,01 g/L wurde hingegen eine signifikante Verminderung von lebenden Stadien bei Theronten, jedoch nicht bei Trophonten und Tomonten erzielt.

#### **4. *In vivo* Versuche**

Die Ergebnisse einzelner Versuchsdurchgänge der nachfolgend beschriebenen Versuche sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

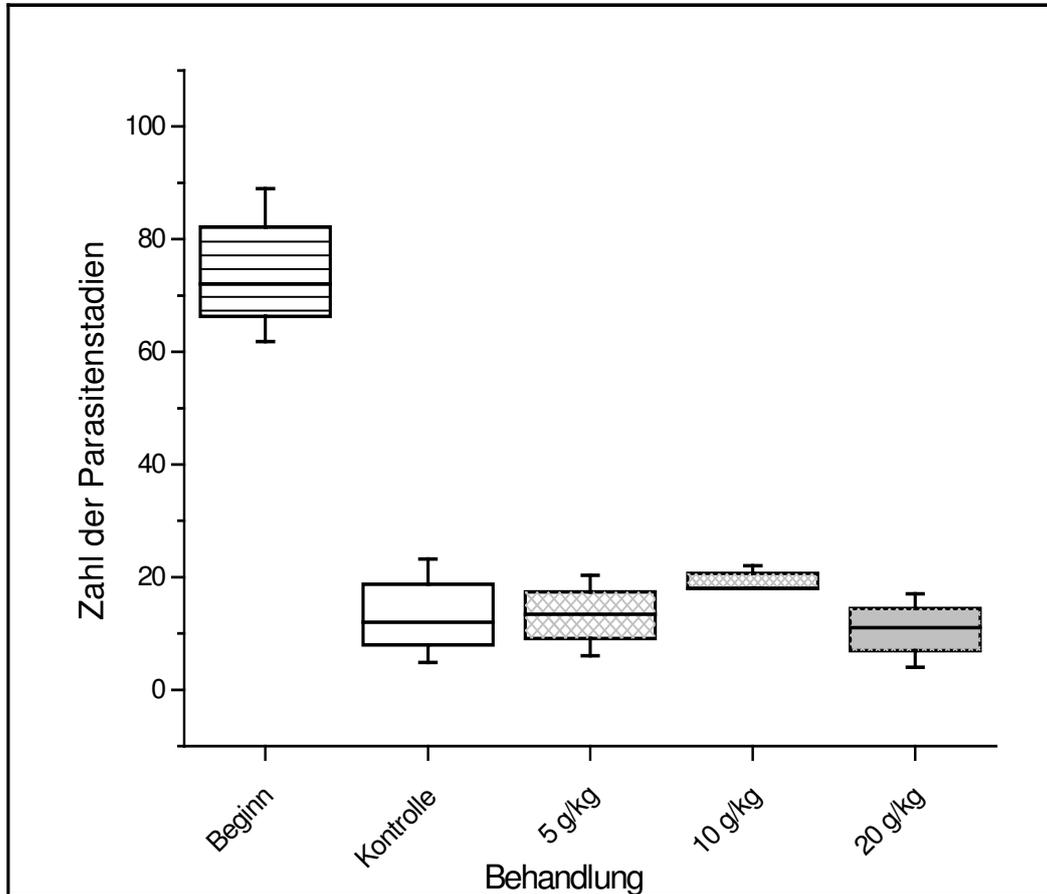
##### **4.1 Fütterungsversuche**

###### **4.1.1 Therapeutische Wirksamkeit von Chinin**

Nach der Infektion der Karpfen ließen sich für alle Versuchsdurchläufe bei den „Indikatorfischen“ (s. IV 2.3.4.1) mindestens 15 Theronten pro Hautabstrich nachweisen und die Infektionsintensität war somit ausreichend für die Durchführung des Versuchs.

In den ersten drei Versuchsdurchläufen, bei welchen die Fütterungszeit über 7 Tage erfolgte, war die Parasitenzahl (Trophontenstadium von *I. multifiliis*) bei der Auswertung in allen Behandlungsgruppen niedriger als zu Beginn des Versuchs (s. Abb. 14). Es wurde vermutet, dass bereits ein Abwandern der reifen Trophonten von den Fischen erfolgt war, so dass diese bei der Auswertung nicht mehr nachweisbar waren. Daher wurde in den folgenden Versuchsdurchläufen ein kürzeres Behandlungsintervall gewählt, so dass die Versuchsauswertung noch vor Vollendung der Trophontenreifung stattfand und somit ein Abwandern der Parasiten von den Fischen ausgeschlossen werden konnte. Nach Verkürzung der Fütterungszeit auf drei Tage zeigten sich somit keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle vs. vor Beginn des Fütterungsversuchs (s. Abb. 15). Für die

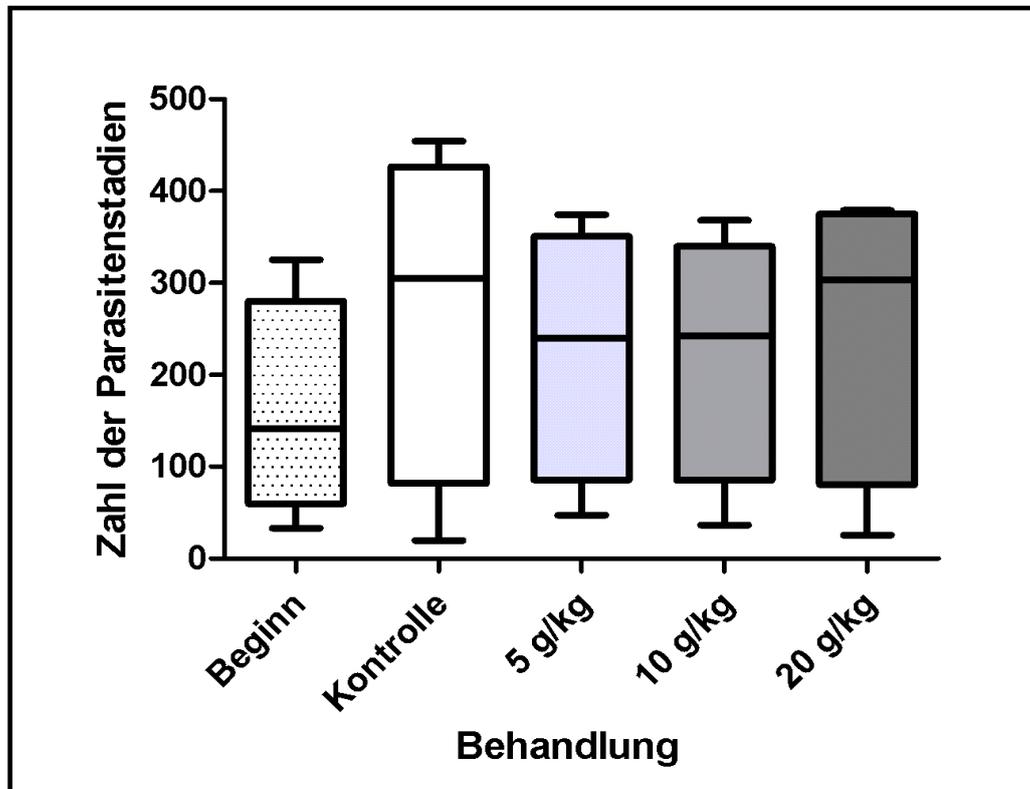
statistische Auswertung der Chinin-Effekte wurden deshalb nur die mit drei Tagen Fütterungszeit durchgeführten Versuchsdurchgänge herangezogen.



**Abb. 14:** Fütterungsversuche zur oralen therapeutischen Wirksamkeit des Chinins (5, 10 und 20 g pro kg Futter) über 7 Tage. Dargestellt sind Boxplots der Parasitenzahl (Trophontenstadium) in der Gruppe zu Beginn des Fütterungsversuchs (Beginn) und in den jeweiligen Behandlungsgruppen (jeweils 5 Karpfen) nach dem Behandlungszeitraum mit dem Medizinalfutter für alle Versuchsdurchläufe ( $n = 3$ ). Es ist erkennbar, dass die Parasitenzahl zu Beginn des Versuchs höher war als nach dem Behandlungszeitraum, was auf das Abwandern der reifen Trophonten von den Fischen zurückzuführen ist. Da nicht nachweisbar war, wie viele Trophonten vor dem Abwandern vorhanden waren, konnte ein möglicher Behandlungserfolg nicht in Erscheinung treten.

Die Verabreichung von Chinin bewirkte jedoch in keiner der gewählten Futterkonzentrationen eine Verminderung der Trophontenzahl. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, unterschieden sich die Parasitenzahlen der mit Chinin behandelten

Gruppen nicht deutlich von denen der Kontrollgruppe. Es konnte demnach kein signifikanter Effekt der Behandlung nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).



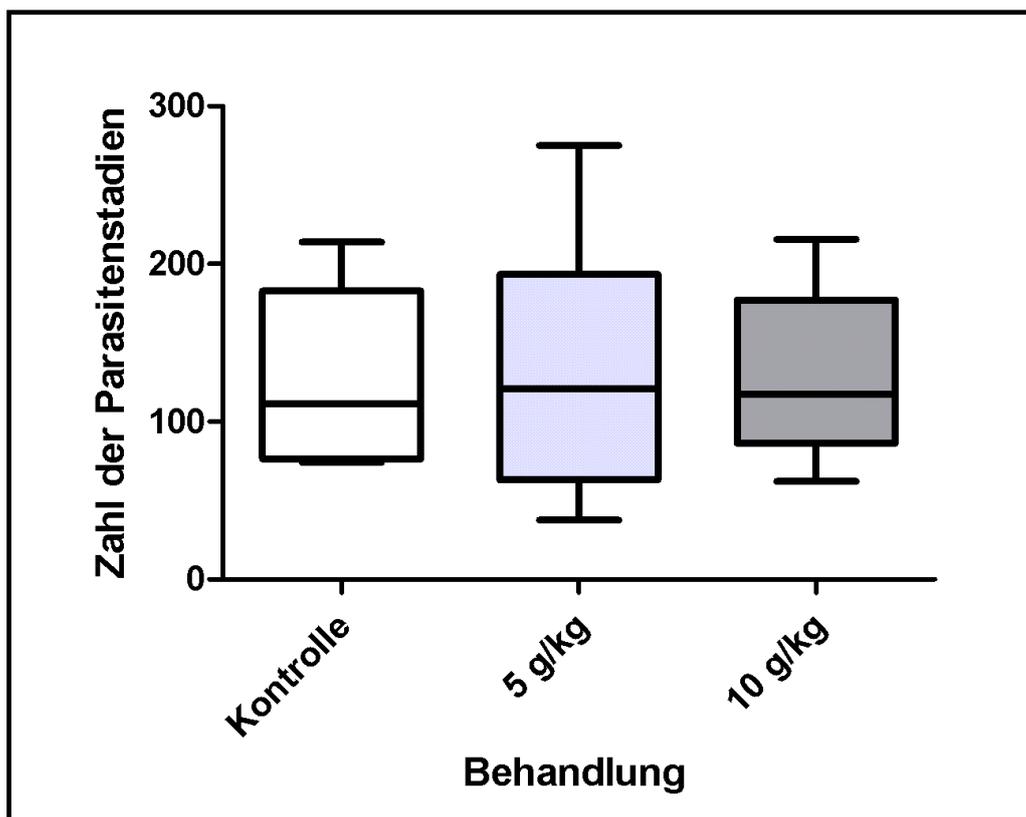
**Abb. 15:** Fütterungsversuche zur oralen therapeutischen Wirksamkeit des Chinins (5, 10 und 20 g pro kg Futter) über 3 Tage. Dargestellt sind Boxplots der Parasitenzahl (Trophontenstadium) in der Gruppe zu Beginn des Fütterungsversuchs (Beginn) und in den jeweiligen Behandlungsgruppen (jeweils 5 Karpfen) nach dem Behandlungszeitraum mit dem Medizinalfutter für alle Versuchsdurchläufe ( $n = 4$ ). Es konnte *kein* signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungs- und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

In den Versuchen zur oralen therapeutischen Wirksamkeit war die Akzeptanz des Medizinalfutters in der Kontrollgruppe und in den Behandlungsgruppen mit Chininkonzentrationen von 5 und 10 g/kg Futter über den gesamten Fütterungszeitraum gegeben. Bei der Gruppe, die Chinin in Gehalten von 20 g/kg Futter erhielt, wurde beobachtet, dass die Aufnahme des Medizinalfutters meist ab dem vierten Tag der Fütterung nachließ. Daher wurde im nachfolgend beschriebenen Versuch zur prophylaktischen Wirksamkeit nur Futter in den Konzentrationen von 5 und 10 g/kg getestet.

#### 4.1.2 Prophylaktische Wirksamkeit von Chinin

Da sich in den *In vitro* Versuchen eine starke Empfindlichkeit der Theronten gegenüber dem Chinin gezeigt hatte (s. V 3.2), wurde untersucht, ob eine prophylaktische Gabe des Medikaments zur Verminderung der Infektion führt. Hierbei wurden die Fische nach zweiwöchiger Vorbehandlung mit dem Medizinalfutter mit dem Parasiten infiziert.

Die Ergebnisse der 6 durchgeführten Versuchsreplikate (in Gruppen von jeweils 5 Karpfen) zur prophylaktischen Wirksamkeit des Chinins sind in Abb. 16 dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Parasitenzahl zwischen behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 16:** Fütterungsversuche zur oralen *prophylaktischen* Wirksamkeit des Chinins (5 und 10 g pro kg Futter) über 14 Tage. Dargestellt sind Boxplots der Parasitenzahl (Trophontenstadium) in der jeweiligen Behandlungsgruppe (jeweils 5 Karpfen) für alle Versuchsdurchläufe ( $n = 6$ ). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungs- und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

Eine vollständige Aufnahme des Medizinalfutters erfolgte in der Kontroll- und der mit 5 g/kg gefütterten Gruppe über den gesamten Fütterungszeitraum. Bei der Gruppe, die Futter mit einem Chiningehalt von 10 g/kg erhielt, zeigten einige der Fische besonders gegen Ende des Behandlungszeitraums (ab dem 8. bis 9. Tag) ein vermindertes Interesse am Futter, der Großteil des Medizinalfutters wurde jedoch stets aufgenommen.

## **4.2 Vorversuche zur oralen Verabreichung über eine Schlundsonde**

Da die orale Aufnahme des Chinins mit dem Futter mit einer gewissen Unsicherheit behaftet war, sollte ausgeschlossen werden, dass die mangelnde Wirksamkeit des Medikaments lediglich auf Akzeptanzproblemen beruht. Vorgesehen war daher eine orale Applikation über Schlundsonden. Die Sondierung der Versuchskarpfen erwies sich jedoch in Vorversuchen als sehr schwierig. Die Sonde musste tief eingeführt werden, damit die applizierte Farbflüssigkeit im Fisch verblieb. Wenn die Sonde nur bis auf Höhe des Kiemendeckelansatzes eingeführt wurde, konnte beim Zurücksetzen des Fisches ins Aquarium beobachtet werden, dass die blaue Flüssigkeit aus dem Maul oder den Kiemen austrat. Wenn die Sonde jedoch weiter eingeführt wurde, kam es zu Perforationen des kranialen Abschnitts des Verdauungskanals und zu Blutungen in der Leibeshöhle. Daher wurde statt einer oralen Gabe die intraperitoneale Injektion des Medikaments gewählt (s.u.).

## **4.3 Injektionsversuche**

### **4.3.1 Toxizitätsversuche**

Zur Ermittlung einer verträglichen Dosis für die Untersuchungen der parenteralen Wirksamkeit von Chinin gegen *I. multifiliis* wurden Versuche zur Toxizität vorangestellt. Eine Übersicht zu den Ergebnissen ist in Tab. 5 dargestellt.

Bei einer Dosierung von 200 mg Chinin pro kg KGW zeigten alle Fische (n = 5) innerhalb kürzester Zeit nach der ersten Injektion starke Symptome einer

Vergiftung wie taumelnde Schwimmbewegungen und zunehmend apathisches Verhalten. Innerhalb von drei Stunden nach der Injektion waren alle Fische gestorben. Bei der Sektion der Fische fiel auf, dass sich eine geringe Ansammlung von Blut in der Leibeshöhle befand und die Leber eine blasse Farbe hatte. Alle weiteren Organe waren ohne besonderen Befund.

Bei 100 mg/kg KGW überlebten alle Fische die erste Injektion. Sie zeigten zwar anfänglich die oben beschriebenen Symptome, erholten sich jedoch nach einigen Stunden wieder. Nach der zweiten Injektion starb einer der Fische. Nach der dritten Injektion starben wiederum zwei Fische, so dass am Ende des Versuchs noch zwei Fische vorhanden waren. Die Sektionsbefunde entsprachen denen der bei Anwendung von 200 mg/kg KGW beschriebenen Beobachtungen (s. o.).

Alle Fische überlebten die erste Injektion bei einer Dosis von 80 mg/kg KGW, zeigten jedoch ebenfalls taumelnde Schwimmbewegungen. Nach der zweiten und dritten Injektion starb jeweils ein Fisch über Nacht. Nach drei Injektionen überlebten bei dieser Dosierung somit drei der ursprünglich fünf Fische. Die Sektionsbefunde waren wiederum identisch mit den oben beschriebenen.

Bei der Dosierung von 60 mg/kg KGW überlebten alle Fische die drei Injektionen. Nach der jeweiligen Injektion waren die Fische etwas ruhiger als die Kontrollgruppe, was sich nach ungefähr zwei Stunden wieder legte, so dass bis zur nächsten Injektion keine Verhaltensauffälligkeiten auftraten.

**Tab. 5:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Letalität bei Karpfen nach intraperitonealer Applikation von Chinin. Pro Gruppe wurden fünf Karpfen eingesetzt.

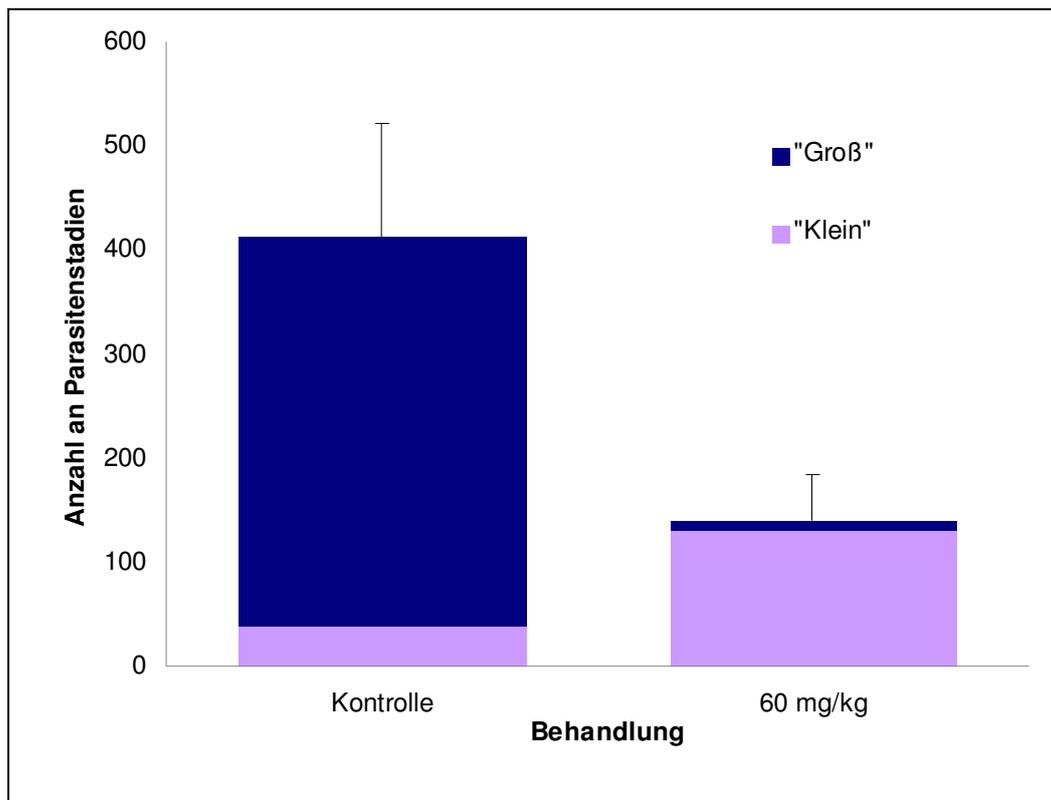
<b>Dosierung</b>	<b>Überlebende Fische nach 1 Injektion</b>	<b>Überlebende Fische nach 2 Injektionen</b>	<b>Überlebende Fische nach 3 Injektionen</b>
Kontrolle	5	5	5
200 mg/kg KGW	0		
100 mg/kg KGW	5	4	2
80 mg/kg KGW	5	4	3
60 mg/kg KGW	5	5	5

#### **4.3.2 Therapeutische Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation**

Chinin wurde einen Tag nach der Infektion der Karpfen in einer Dosis von 60 mg/kg KGW einmal täglich i.p. über drei Tage verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt i.p. Injektionen des Vehikels. Für die vier Versuchsdurchgänge wurden jeweils 6 Karpfen verwendet.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im Verhältnis der Parasitenzahl zwischen den mit Chinin behandelten Fischen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). So war bei der behandelten Gruppe eine deutlich geringere Anzahl an Parasiten zu verzeichnen. Außerdem fiel auf, dass die Trophonten bei der behandelten Gruppe auffallend kleiner waren als bei den Fischen der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse werden in Abb. 17 zusammenfassend dargestellt.

Beim dritten und vierten Versuchsdurchgang starben jeweils zwei der mit Chinin behandelten Fische. Hierbei waren keine Anzeichen für eine mechanische Verletzung von Organen vorhanden, so dass der Tod der Fische wahrscheinlich auf die toxische Wirkung des Chinins zurückzuführen ist.



**Abb. 17:** Injektionsversuche mit einer Chinin-Dosierung von 60 mg/kg KGW über 3 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der Parasitenzahl und die Standardfehler der Vehikelkontrolle und der Behandlungsgruppe (jeweils 6 Karpfen) aller Versuchsreplikate ( $n = 4$ ). Die Trophonten wurden in Kategorien „Groß“ ( $> 120 \mu\text{m}$ ) und „Klein“ ( $< 120 \mu\text{m}$ ) eingeteilt. Der Unterschied im Verhältnis der Parasitenzahl zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe war signifikant ( $p < 0,05$ ).

## VI Diskussion

### 1. Methodendiskussion

#### 1.1 Umgang mit *I. multifiliis* im Labor

##### 1.1.1 Etablierung des Laborzyklus

Ein entscheidender Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Laborzyklus von *I. multifiliis* zu etablieren, um jederzeit alle Parasitenstadien zur Durchführung der Versuche zur Verfügung zu haben. Der Erhalt des kompletten Lebenszyklus dieses obligat parasitären Ciliaten ist zurzeit noch nicht *in vitro* möglich (Noe & Dickerson, 1995; Dickerson, 2006), auch wenn es bereits das Ziel mehrerer Studien war, eine geeignete Methode hierfür zu entwickeln. Wahl-Moser (1985) untersuchte verschiedene Nährmedien und Zellkulturverfahren, von welchen manche die Überlebensdauer von Stadien des Parasiten verlängerten, jedoch keine weitere Entwicklung der Schwärmer ermöglichten. Auch Ekless und Matthews (1993) gelang es, die Lebensspanne von Theronten mit geeigneten Nährmedien zu verlängern und Nielsen und Buchmann (2000) versuchten, die Gegebenheiten unter der Fischhaut mittels Zellkulturmedien zu simulieren. Diese Studien liefern gute Anhaltspunkte für weitere Forschungsarbeiten. Da jedoch noch einige Zeit vergehen wird, bis es möglich ist, den Lebenszyklus komplett *in vitro* zu erhalten, kann die Verfügbarkeit des Parasiten bisher nur mittels seiner ständigen Passage über lebendige Wirtsfische erreicht werden. Aber auch dieses Verfahren kann einige Schwierigkeiten bereiten, da die erfolgreiche Entwicklung des Parasiten von verschiedenen Faktoren (z.B. Wassertemperatur, Wasserdurchlauftrate, Besatzdichte, Wasserqualität, Immunitätsausprägung der Fische, etc.) abhängt, welche sich in ihrem Zusammenspiel zum Teil nur schwer kontrollieren lassen. Matthews et al. (1996) bemerkten die Ironie, dass während in der Natur und in Fischzuchten die Übertragung von *I. multifiliis* so einfach vonstatten geht, der Erhalt des Parasiten im Labor über längere Zeit hinweg jedoch äußerst problematisch ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden anfangs Karpfen zur ständigen Passage von *I. multifiliis* verwendet, da die eigentlichen Versuche ebenfalls bei Fischen dieser

Art durchgeführt werden sollten. Es stellte sich jedoch heraus, dass SPF Regenbogenforellen besser zum Erhalt des Laborzyklus geeignet waren. Bei den Karpfen kam es vergleichsweise schneller zur Ausbildung einer Immunität und zusätzlich waren die Schwankungen in der Infektionsausprägung bei dieser Fischart höher als bei den Forellen. Da *I. multifiliis* keine hohe Wirtsspezifität aufweist (Ventura & Paperna, 1985; Matthews, 2005), ist es unerheblich, welche Wirtsfische zur Erhaltung des Parasiten genutzt werden. Wahli-Moser (1985) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass der Parasit problemlos von Cypriniden auf Salmoniden und umgekehrt übertragen werden konnte. Entsprechende Beobachtungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit gemacht.

Es traten zu Beginn der Arbeit verschiedene Schwierigkeiten beim Erhalt von *I. multifiliis* auf, da es einige Erfahrung erforderte, sowohl den Anforderungen der Parasiten und als auch denen ihrer Wirte gerecht zu werden. Es musste ein Gleichgewicht hergestellt werden, so dass ständig eine ausgeprägte Infektion vorhanden war, um genügend Parasitenstadien zur Versuchsdurchführung gewinnen zu können. Gleichzeitig durfte aber die Parasitenlast nicht überhand nehmen, da hohe Mortalitäten der Wirtsfische wiederum die Unterbrechung des Laborzyklus zur Folge gehabt hätten. Nach Optimierung der Methodik konnten die anfänglichen Schwierigkeiten überwunden und der Lebenszyklus des Parasiten im Labor dauerhaft etabliert werden. Mittels des entwickelten Systems mit Markierung neu eingesetzter Gruppen an Fischen und regelmäßiger Überwachung der Infektionsstärke konnte der Verlauf des Infektionsgeschehens in den Laborzyklusbecken gut nachvollzogen werden. Über Steuerung von Wasserdurchflussrate, Temperatur, Reinigungsintervallen, Besatzdichte etc. wurde auf die Parasitenentwicklung eingewirkt, damit letztlich eine kontinuierliche Durchführung der Versuche möglich war. In verschiedenen Studien wurde davon berichtet, dass die Infektiosität des Parasiten unter Laborbedingungen nach einer gewissen Anzahl an Passagen nachlässt (Houghton & Matthews, 1986; Noe & Dickerson, 1995). Dies wurde als Hinweis dafür gesehen, dass unter natürlichen Bedingungen bei *I. multifiliis* auch Phasen sexueller Reproduktion stattfinden (Matthews, 2005; Dickerson, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch derselbe „Stamm“ des Parasiten über einen Zeitraum von 1,5 Jahren erhalten werden, ohne dass die Infektiosität abnahm.

### 1.1.2 Durchführung der Infektion von Versuchsfischen

Wenn *In vivo* Versuche zur Therapie der Ichthyophthiriose durchgeführt werden sollen, muss zunächst eine reproduzierbare Methode zur Infektion der Versuchsfische vorhanden sein, um einen Behandlungserfolg nachweisen zu können. In Studien, die sich ebenfalls mit *I. multifiliis* befassten, sind verschiedene Methoden zur Infektion der Versuchsfische beschrieben worden.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde häufig mit infizierten Fischen aus dem Freiland gearbeitet (Ventura & Paperna, 1985; Luzardo-Álvarez et al., 2003). Dieses Verfahren erschien für die angestrebten Versuche der vorliegenden Arbeit als ungeeignet, da die Durchführung von vergleichbaren Replikaten so nicht möglich ist. Bei bereits erkrankten Fischen ist nicht bekannt, in welcher Infektionsphase sie sich befinden und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich schon während des Versuchzeitraums eine Immunität bei einigen Fischen ausbildet, was den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen sehr erschwert hätte.

Die Methode, Versuchsfische mit *I. multifiliis* durch Kohabitation mit bereits infizierten Fischen zu infizieren, wurde bei Rowland et al. (2008) erfolgreich durchgeführt. Pieters et al. (2008) leiteten das Parasitenstadien enthaltende Wasser aus Becken mit infizierten Fischen in die Aquarien der zu infizierenden Versuchsfische.

Die Infektion von Fischen mittels Zugabe von reifen Trophonten ins Wasser wurde von Hines und Spira (1973, 1974b) praktiziert. Die Intensität der resultierenden Infektion ist bei dieser Methode jedoch laut Wahli-Moser (1985) nicht so genau vorhersehbar wie bei Zugabe von *in vitro* produzierten Theronten. Letzteres Verfahren wurde auch in vielen weiteren Studien angewandt, in welchen jedoch die Anzahl der eingesetzten Theronten zwischen 1000 und 20000 pro Fisch variierte (Wahli-Moser, 1985; Clayton & Price, 1994; Wahli et al., 1995; Tojo Rodriguez & Santamarina Fernandez, 2001; Shinn et al., 2003). Dabei ist offensichtlich nicht nur die Anzahl der zur Verfügung stehenden Schwärmer von Bedeutung, sondern es sind ebenfalls Faktoren wie Wassertemperatur, Wasservolumen und Besatzdichte zu berücksichtigen (Wahli-Moser, 1985). Weiterhin ist bei den *in vitro* produzierten Theronten der richtige Zeitpunkt zur

Infektion von Bedeutung, da die Infektiosität der Schwärmer bald nach dem Schlüpfen rapide abnimmt (McCallum, 1982; Wahli-Moser, 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, eine Infektion durch Zugabe von *in vitro* erzeugten Theronten in das Wasser zu erzielen. Die Gewinnung der hierfür zunächst benötigten Trophonten erfolgte entsprechend der bei Wahli-Moser (1985) beschriebenen Methodik, wobei die Trophonten von anästhesierten Fischen vorsichtig abgestreift und in Petrischalen inkubiert wurden. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das zur Betäubung der Fische verwendete Anästhetikum MS 222 bei zur Fischanästhesie üblichen Konzentrationen (bis 150 mg/L) auf die weitere Entwicklungsfähigkeit der Parasitenstadien keinen Einfluss hat (Wahli-Moser, 1985; Xu et al., 2008). Wahli-Moser (1985) betonte ebenfalls die Notwendigkeit, den überschüssigen Schleim aus den Petrischalen zu entfernen, da dieser ein Nährboden für Bakterienwachstum ist und die weitere Entwicklung der Trophonten hemmt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls überprüft und es kann bestätigt werden, dass durch größere Mengen an Schleim die Enzystierung der Trophonten gehemmt wird. Jedoch gelang die *In vitro* Produktion von Theronten nicht immer zuverlässig. Trotz identischer Bedingungen fand oft nicht in allen Petrischalen eine Entwicklung der Schwärmer statt. Aus diesem Grund war es schwierig, eine genügend hohe Zahl an Theronten zu produzieren, um eine ausreichende Infektion aller Versuchsfische zu gewährleisten. Als geeigneter erwies sich die direkte Kohabitation der Versuchsfische mit infizierten Forellen. Die Kohabitationsmethode wurde zur Durchführung der Fütterungsversuche angewendet und führte zu ausreichenden Parasitenzahlen, um einen Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen vornehmen zu können. Bei den später durchgeführten Injektionsversuchen wurde die Infektionsmethode noch weiter optimiert, indem die beiden Verfahren der Kohabitation und das Einsetzen von *in vitro* produzierten Schwärmern kombiniert wurden, so dass die Infektionsintensität für die Versuchsdurchführung optimal war.

## 1.2 *In vitro* Versuche

In den *In vitro* Versuchen sollte überprüft werden, ob das Chinindihydrochlorid bei direkter Anwendung eine Wirksamkeit gegen Stadien von *I. multifiliis* besitzt. Um eine Schädigung der Parasiten nachweisen zu können, wurde die Methodik der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung angewendet, welche eine eindeutige Differenzierung zwischen intakten und geschädigten Zellen ermöglicht. Beschreibungen über Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zu Vitalitätsüberprüfungen liegen aus verschiedenen Studien vor (Yokoyama et al., 1997; Xu et al., 2005; Fletcher et al., 2009; Zampolla et al., 2009), so dass hier Anhaltspunkte für die Durchführung gewonnen werden konnten. Die Optimierung der Methodik speziell für die geplanten Versuche der vorliegenden Arbeit erfolgte durch experimentelle Vorarbeiten.

Es zeigte sich, dass sich die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung für die Vitalitätsprüfung bei allen Stadien von *I. multifiliis* gut eignete. Es waren die intakten, grün fluoreszierenden deutlich von den geschädigten, rot fluoreszierenden Parasiten zu unterscheiden. Neben rein grün oder rot fluoreszierenden Stadien gab es auch Mischformen, bei welchen im Inneren das rote PI und außen an der Zellmembran das grüne Fluorescein sichtbar waren. Diese Stadien waren grundsätzlich augenscheinlich tot, d.h. es war keinerlei Zilienbewegung zu erkennen. Bei diesen gemischt gefärbten Trophonten war davon auszugehen, dass sie zum Zeitpunkt der Zugabe der Farbstoffe noch gelebt hatten, da sie in der Zellmembran noch das FDA in das grüne Fluorescein umwandeln konnten. Es musste jedoch bereits eine Membranschädigung vorgelegen haben, so dass auch das PI eindringen konnte. Folglich ist es wahrscheinlich, dass sie sich gerade im Prozess des Sterbens befanden, als die Farbstoffe hinzugegeben wurden und sie wurden daher zusammen mit den komplett roten Stadien als geschädigt gewertet.

In den Studien von Yokoyama et al. (1997, 2009) wurde ein schnelles Verblässen der grünen Fluoreszenz beobachtet, was in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Die Intensität der Fluoreszenz ließ bis zum Ende der Auszählung nur so geringgradig nach, dass die Versuchsdurchführung dadurch nicht eingeschränkt wurde. Die unterschiedlichen Beobachtungen

begründen sich wahrscheinlich auf den Einsatz verschiedener Konzentrationen des Farbstoffs.

In der vorliegenden Arbeit wurden so viele Durchgänge der Versuche mit den Trophonten und Theronten von *I. multifiliis* durchgeführt, dass der Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen statistisch nachweisbar war. Bei den Tomonten erwies sich die Gewinnung von intakten Zysten als schwieriger, daher konnten lediglich drei Wiederholungen dieses Versuchs durchgeführt werden. Trotzdem waren die Ergebnisse bereits so deutlich, dass eine weitere Replikation des Versuchs nicht notwendig war.

### **1.3 *In vivo* Versuche**

#### **1.3.1 Herstellung des Medizinalfutters**

In den von Schmahl et al. (1996) durchgeführten Versuchen kam es zu Problemen mit der Akzeptanz des chininhaltigen Medizinalfutters. Bei den Behandlungsgruppen wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe nur die Hälfte der Futtermenge aufgenommen und bei einer Fischart ließ nach drei Tagen Fütterung das Interesse am Medizinalfutter stark nach. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit vor Beginn der geplanten Fütterungsversuche die Akzeptanz des Medizinalfutters in Vorversuchen getestet. Zunächst wurde das Chinin in Lösung gebracht, gleichmäßig auf das Futter aufgesprüht und dieses zum Schluss mit Öl überschichtet, um sicherzustellen, dass die Zugabe ins Wasser nicht zu einer Ablösung des Medikaments führte. Dies ist eine gängige Methode, Medikamente auf das Futter aufzubringen, und sie wurde auch in den Studien von Schmitt (1990) und Shinn et al. (2003) auf ähnliche Weise durchgeführt.

Das so hergestellte Medizinalfutter wurde jedoch von den Karpfen nur bei geringen Chininkonzentrationen aufgenommen, was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, dass sich die Substanz durch das Aufsprühen außen am Futter befand und der bittere Geschmack von den Fischen sogleich wahrgenommen wurde. Es wurden ebenfalls Akzeptanzversuche mit Forellen durchgeführt, da die Hoffnung bestand, dass das geringer ausgeprägte sensorische Empfinden dieser Raubfische

zu einer besseren Aufnahme des Medizinalfutters führen würde. Die Verweigerung der Futteraufnahme bei höheren Chiningehalten trat jedoch bei dieser Fischart gleichermaßen auf und bestätigte den Verdacht, dass es durch das Chinin zu einer erheblichen Geschmacksverschlechterung kommen muss. Selbst durch Aufbringen verschiedener Substanzen konnte der Bittergeschmack nicht ausreichend maskiert werden. Deshalb wurde eine andere Herstellungsmethode angewendet, so dass das Chinin bereits mit den Grundkomponenten des Futters vermischt wurde, wie es ebenfalls bei Schmahl et al. (1996), Dohle et al. (2002) und Luzardo-Álvarez et al. (2003) praktiziert worden war. Hierdurch wurde eine gleichmäßige Verteilung der bitteren Substanz im Futter gewährleistet, wodurch nun höhere Konzentrationen von den Fischen aufgenommen wurden und die Hauptversuche mit diesem Medizinalfutter durchgeführt werden konnten.

### 1.3.2 Verwendete Chininkonzentrationen

In der vorliegenden Arbeit wurde Chinindihydrochlorid zur Versuchsdurchführung verwendet, da dieses in vorhergehenden Studien ebenfalls für Therapieversuche bei Fischparasitosen eingesetzt wurde (Schmahl et al., 1996; Speare et al., 1998). Der therapeutisch wirksame Bestandteil ist jedoch das Chinin selbst, weshalb die Art des verwendeten Chininsalzes unerheblich ist (Schäperclaus, 1954). Für die Versuchsdurchführung wurde der Anteil des Salzes des Präparats berücksichtigt, so dass sich alle Konzentrationsangaben auf das reine Chinin beziehen.

Die in den Studien von Schmahl et al. (1996) und Dohle et al. (2002) eingesetzte Chininkonzentration von 5 g/kg Futter diente als Anhaltspunkt für die in den Fütterungsversuchen der vorliegenden Arbeit zu verwendenden Konzentrationen. In Vorversuchen wurde die Wirksamkeit dieser Chinindosis anhand bereits infizierter Fische überprüft, wodurch der Verdacht aufkam, dass diese für die Durchführung der Hauptversuche nicht ausreichen würde. Aus diesem Grund wurden in den Akzeptanz-Vorversuchen zusätzlich höhere Gehalte an Chinin eingesetzt, um die maximalen Konzentrationen herauszufinden, die von den Fischen im Futter akzeptiert werden. Dabei zeigte sich, dass mit dem optimierten

Medizinalfutter die Akzeptanz bis zu Konzentrationen von 10 g/kg Futter gegeben war, ab 20 g/kg jedoch nach einigen Tagen der Fütterung nachließ.

Für die Versuche zur prophylaktischen Wirksamkeit wurde Medizinalfutter mit Chiningehalten von 5 und 10 g/kg gewählt, da hierbei davon auszugehen war, dass das Futter über den gesamten Fütterungszeitraum von 14 Tagen aufgenommen werden würde. Für die Versuche zur therapeutischen Wirksamkeit wurde zusätzlich eine Konzentration von 20 g/kg Futter gefüttert, da die Versuche über kürzere Zeit stattfanden und in diesem Zeitraum noch zumindest der größte Teil des Futters gefressen wurde.

Für die einzusetzenden Chinindosierungen in den Injektionsversuchen wurde zunächst die höchste in den Fütterungsversuchen eingesetzte Menge gewählt. Diese entsprach bei einer Aufnahme des Medizinalfutters mit Konzentrationen von 20 g/kg Futter einer oralen Dosis von 200 mg/kg KGW. In den durchgeführten Toxizitätsversuchen wurde jedoch deutlich, dass diese Dosierung, die bei oraler Applikation keine toxischen Effekte hatte, bei Verabreichung per Injektion bereits letal für die Fische war. Somit wurden weitere Toxizitätsversuche durchgeführt, um die höchste Dosis zu ermitteln, bei welcher alle Fische die Injektionen überlebten. Diese Dosierung wurde zur Durchführung der Therapieversuche eingesetzt und betrug 60 mg/kg KGW. Dies entspricht ungefähr der in der Studie von Speare et al. (1998) bei Regenbogenforellen oral applizierten Menge an Chininhydrochlorid von 61 mg/kg KGW. Da die Toxizitätsuntersuchungen aus Aspekten des Tierschutzes nicht mehrfach wiederholt wurden, konnten die hierbei ermittelten Ergebnisse nicht abgesichert werden. So stellte sich bei der Durchführung der Therapieversuche heraus, dass bei Anwendung dieser Dosis, die sich in den Toxizitätsversuchen als nicht toxisch erwiesen hatte, dennoch Letalitäten bei einzelnen Fischen auftraten. Insofern wäre es in Folgearbeiten sinnvoll, die Wirksamkeit des Medikaments auch bei geringerer Dosierung des Chinins zu überprüfen.

### **1.3.3 Angewandte Applikationsmethoden**

Im Hinblick auf die Praktikabilität eignet sich in Nutzfischbeständen besonders

eine orale Verabreichung von Medikamenten über das Futter. Daher stand diese Applikationsmethode in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund. Zudem sollte jedoch auch ein Verfahren gefunden werden, höhere Konzentrationen an Chinin in sicherer Dosierung zu verabreichen, was durch orale Applikation aufgrund der eingeschränkten Akzeptanz des Medizinalfutters nicht möglich war. Somit wurde in Betracht gezogen, das in Lösung gebrachte Chinin mittels einer Ernährungssonde direkt in den Verdauungstrakt des Fisches einzubringen. Diese Methode wird von Schäperclaus (1990) als mögliche Applikationsmethode zur Verabreichung von Medikamenten bei Fischen genannt. Allerdings erwies sich das Verfahren bei den verwendeten Karpfen als nicht praktikabel. Es war ohne Verletzung des Fisches nicht möglich, die Sonde so tief einzuführen, dass das Medikament tatsächlich im Verdauungstrakt verblieb und nicht wieder über die Kiemen ausgeschieden wurde. Diese Problematik ist wahrscheinlich auf die geringe Größe der verwendeten Fische zurückzuführen und es ist denkbar, dass die Verwendung von größeren Fischen die erfolgreiche Durchführung dieser Applikationsmethode ermöglicht hätte. Allerdings wäre beim Einsatz von größeren Fischen auch die Anwendung einer anderen Methode zur Versuchsauswertung notwendig gewesen, da die Ermittlung der Parasitenzahl der gesamten Schleimschicht eines Fisches nur aufgrund der geringen Größe der Karpfen möglich war. Da sich jedoch diese Auswertungsmethode als sehr genau erwies und die Veränderung der Methodik die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den unterschiedlichen Versuchen erschwert hätte, wurde das Sondierungsverfahren nicht für weitere Versuche angewendet.

Die Verabreichung des Medikaments per i.p. Injektion ist eine zuverlässige Applikationsmethode, die bei Fischen häufig angewandt wird (Schäperclaus, 1990; Stoskopf, 1993). Sie eignete sich aufgrund der geringen Größe der Karpfen besser als die i.m. Injektion, da bei letzterer nur eine sehr geringe Menge an Flüssigkeit applizierbar ist.

#### **1.3.4 Auswahl der Applikationsdauer**

Die Versuche zur Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit bei bereits bestehender Infektion mittels oraler Applikation und Injektion des Chinins fanden

über drei Tage statt. Zunächst wurde bei den Fütterungsversuchen das Futter über 7 Tage verabreicht. Bei dieser Versuchsdauer war der erste Infektionszyklus des Parasiten zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung bereits beendet, so dass die reifen Trophonten die Fische verlassen hatten und somit nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Eine Alternative wäre gewesen, die Behandlung so lange durchzuführen, bis bereits eine Reinfektion der Fische stattgefunden hätte. Letzteres wurde in der Studie von Schmitt (1990) durchgeführt, so dass während der Behandlungszeit mit dem Medizinalfutter mehrere Infektionszyklen abliefen. In der vorliegenden Arbeit erschien es sinnvoller, die Behandlungszeit auf drei Tage zu verkürzen, so dass die Auswertung noch während des ersten Infektionszyklus stattfinden konnte. Dieses Vorgehen hatte den Vorteil, dass in dieser Zeitspanne die Akzeptanz des Medizinalfutters noch gegeben war. Zusätzlich sind bei Ablaufen mehrerer Infektionszyklen aufgrund unterschiedlicher Entwicklungsgeschwindigkeiten der einzelnen Parasiten verschiedene Größen an Stadien auf den Fischen zu finden. Bei der Auswertung des Versuchs noch während des ersten Infektionszyklus konnte hingegen der Unterschied in den Trophontengrößen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe, welcher bei den Injektionsversuchen ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Behandlungseffekts darstellte, durch das einheitliche Alter der Stadien deutlich zutage treten.

Bei den Prophylaxe-Versuchen fand die Fütterung mit dem Medizinalfutter über 14 Tage statt, da sichergestellt werden sollte, dass zum Infektionszeitpunkt eine ausreichende Menge an Chinin im Fisch vorhanden war. In anderen Studien wurden prophylaktische Fütterungen ebenfalls über längere Zeit vorgenommen, bevor die Fische dem Parasiten exponiert wurden. Bei Pieters et al. (2008) erfolgte die Fütterung mit dem probiotischen Futter über 14 Tage und bei Shinn et al. (2003) wurde das prophylaktische Medizinalfutter über 10 Tage verabreicht. Allerdings wurde während der Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass besonders gegen Ende des Fütterungszeitraums das Futter in der höheren Konzentration nicht immer vollständig aufgenommen wurde, weshalb eine Verkürzung der Fütterungsperiode hier sinnvoll gewesen wäre. Wenn jedoch ein Behandlungseffekt vorhanden gewesen wäre, hätte er auch unter diesen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden können, da der Großteil des Futters

immer aufgenommen wurde und in der Behandlungsgruppe mit der niedrigeren Konzentration von 5 g/kg das Medizinalfutter stets komplett gefressen wurde und bei dieser Gruppe ebenfalls keine Wirkung des Chinins nachweisbar war.

### 1.3.5 Nachweis des Ausmaßes der Infektion

Um die Infektionsrate zu beurteilen, wurden in vielen Studien lediglich Hautabstriche von einzelnen Hautpartien angefertigt (z.B. bei Tojo-Rodriguez & Santamarina Fernandez, 2001) oder nur die Mortalitätsrate der Fische (z.B. bei Pieters et al., 2008) als Kriterium für die Infektionsausprägung herangezogen. Letzteres ist jedoch problematisch, da niemals ganz sicher belegt werden kann, dass der Tod des Fisches tatsächlich auf die Erkrankung mit *I. multifiliis* zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit konnte die Stärke der Infektion zudem so gesteuert werden, dass es zu keinerlei infektionsbedingten Mortalitäten bei den Fischen kam und dennoch eine ausreichende Anzahl an Parasiten zur Versuchsauswertung vorhanden war. Die Vergleichbarkeit der Parasitenzahlen zwischen verschiedenen Fischen ist ebenfalls herabgesetzt, wenn nur Hautabstriche von definierten Stellen angefertigt werden, da die Verteilung der Parasiten auf der Oberfläche der Fische nicht gleichmäßig ist. Hines und Spira (1973) schilderten, dass die Parasitenzahlen an verschiedenen Körperstellen signifikante Unterschiede aufwiesen. Aus diesem Grunde wurde für die vorliegende Arbeit zur Versuchsauswertung die Gesamtparasitenzahl auf Haut und Flossen herangezogen, welche ermittelt wurde, indem die gesamte Schleimschicht jeder Körperseite abgestreift und die darin erhaltene Anzahl an Parasitenstadien gezählt wurde. Clayton und Price (1988) sehen die Erfassung aller Stadien der gesamten Hautoberfläche ebenfalls als die repräsentativste Methode an, um Infektionsstärken zwischen den Fischen zu vergleichen. Sie ermittelten jedoch nur die Parasitenzahlen einer Körperseite und verweisen zur Begründung auf die Arbeit von Bone (1983), in welcher gezeigt wurde, dass sich die Anzahl der Stadien von *I. multifiliis* zwischen den beiden Körperseiten eines Fisches nicht signifikant unterscheidet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entscheidung getroffen, dennoch die Zahlen beider Körperhälften für die Auswertung heranzuziehen, da teilweise große Schwankungen in der

Parasitenzahl zwischen den Körperseiten eines Fisches auftraten und somit die Sicherheit der Ergebnisse erhöht wurde.

## 2. Ergebnisdiskussion

### 2.1 *In vitro* Versuche

Anhand der *In vitro* Versuche konnte eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit des Chinins auf alle Stadien von *I. multifiliis* nachgewiesen werden. Bei der Kontrolllösung waren, wie erwartet, bei allen Stadien des Parasiten überwiegend grün fluoreszierende Stadien vorhanden. Dass auch jeweils ein geringer Anteil an roten und demnach geschädigten Stadien vorkam, ist sicherlich auf den Gewinnungsprozess der Proben zurückzuführen, da es nicht ausblieb, dass einige der Parasiten bereits durch den Pipettiervorgang und das Rütteln der Versuchsgefäße geschädigt wurden.

Konzentrationen an Chinin von 1 g/L und 0,1 g/L töteten innerhalb von einer Stunde den überwiegenden Anteil aller Stadien des Parasiten. In einer Konzentration von 0,01 g/L dagegen hatte die Substanz keinen Effekt mehr auf Trophonten und Zysten. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Schäperclaus (1954) erzielten überein. Hier tötete Chinin bei Konzentrationen von 1 g/L die Stadien von *I. multifiliis* innerhalb von 20 Minuten, bei 0,1 g/L in 45 Minuten und bei 0,01 g/L erst nach 7 Stunden. Es ist nicht ganz sicher, welche Stadien hierbei untersucht wurden; es ist von „losgelösten Ichthyophthirien“ die Rede, womit wahrscheinlich die Trophonten gemeint waren. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die *In vitro* Wirksamkeit von Chinin auf alle Stadien des Parasiten durch die Anwendung einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung untersucht. Interessanterweise hatte die niedrigste Chininkonzentration von 0,01 g/L keine Wirkung auf Trophonten und Tomonten, während sie für die Theronten (d.h. das infektiöse Stadium) hingegen toxisch war. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Stadien des Parasiten empfindlicher sind.

## 2.2 Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis*

Während der Durchführung von Vorversuchen zur *In vivo* Wirksamkeit von Chinin wurde deutlich, dass bei den beiden verwendeten Zuchtlinien der Karpfen ein Unterschied in ihrer Empfänglichkeit gegenüber dem Parasiten vorlag. Aufgrund der Beobachtungen wurden entsprechende Infektionsversuche durchgeführt. So war auf den aus Höchststadt bezogenen Karpfen eine signifikant höhere Anzahl an Parasitenstadien vorhanden als auf den in Wageningen erworbenen Karpfen. Da sie sich gleichzeitig im Infektionsbecken befanden und dort der selben Anzahl an Parasitenstadien exponiert wurden, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die aus Wageningen stammenden Karpfen resistenter gegenüber dem Parasiten waren als die in Höchststadt erworbenen Karpfen.

Es beschäftigten sich bereits mehrere Studien mit Untersuchungen zu Resistenzen bei Fischen gegen die Ichthyophthiriose. In einer Veröffentlichung von Price und Clayton (1999) wurden Zusammenhänge zwischen dem Schuppenmuster von Karpfen und ihrer Resistenzlage gegenüber der Erkrankung beschrieben. Bei den Karpfen in der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass die aus Höchststadt bezogenen Fische Streuschuppen aufwiesen, während die Schuppen der aus Wageningen stammenden Karpfen meist regelmäßiger in einer Linie angeordnet waren. Allerdings war der Hintergrund der Fische in der Studie von Price und Clayton (1999) ähnlich, so dass andere Faktoren, die ebenfalls mit der Resistenz in Zusammenhang zu bringen wären, weitgehend ausgeschlossen werden konnten, was in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Ventura und Paperna (1985) stellten ebenfalls unterschiedliche Infektionsstärken bei verschiedenen Fischlinien und Individuen derselben Spezies fest. Sie gehen davon aus, dass dies auf eine unterschiedliche Kondition der Fische zurückzuführen sei, da Parameter wie Stress, Ernährungszustand und schlechte Umweltbedingungen die Leistung des Immunsystems herabsetzen und es somit zu einer stärkeren Empfänglichkeit gegenüber Krankheitserregern kommen kann.

Für die vorliegende Arbeit lässt sich die genaue Ursache für die unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber der Erkrankung zwischen den aus Höchststadt und den

aus Wageningen bezogenen Karpfen aufgrund der unterschiedlichen Hintergründe der Fische nicht bestimmen. Die ermittelten Ergebnisse sind jedoch interessant und könnten Grundlagen für weitere Forschungsarbeiten liefern. Denkbar wäre es, bei der Zucht von Fischen auf Resistenz gegenüber *I. multifiliis* zu selektieren. Wenn bei den Fischen von vornherein nur eine schwache Infektion auftritt, so kann die Parasitenlast bewältigt und daraufhin eine Immunität ausgebildet werden. Somit könnten die durch die Erkrankung verursachten hohen Mortalitäten in Fischzuchten vermieden werden.

Für die Wirksamkeitsversuche der vorliegenden Arbeit hatte dieses Ergebnis zur Konsequenz, dass innerhalb der jeweiligen Versuche nur Gruppen von Karpfen derselben Herkunft verwendet wurden.

### **2.3 Wirksamkeit von Chinin bei verschiedenen Applikationsarten**

Die in den Fütterungsversuchen erzielten Ergebnisse zeigen, dass mit den eingesetzten Konzentrationen an Chinin mittels oraler Applikation keine Wirksamkeit gegen die Ichthyophthiriose erzielt werden konnte. Durch Verabreichung des Medizinalfutters konnte weder eine Infektion mit dem Parasiten verhindert, noch eine bereits bestehende Erkrankung therapiert werden. In der Studie von Schmahl et al. (1996) konnte hingegen bereits bei einer Konzentration von 5 g Chinin pro kg Futter eine Wirksamkeit gegen Trophonten von *I. multifiliis* bei verschiedenen Arten von Zierfischen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung, warum die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anders ausfielen, könnten Unterschiede in der Resorption des Medikaments aus dem Verdauungstrakt sein. So könnte die in den beiden Studien unterschiedliche Zusammensetzung des verwendeten Medizinalfutters eine Rolle gespielt haben, da die orale Bioverfügbarkeit eines Medikaments durch Interaktionen mit Futterbestandteilen herabgesetzt werden kann. Möglicherweise hatte auch die Wassertemperatur einen Einfluss, da die Karpfen der vorliegenden Arbeit bei ungefähr 18° C gehalten wurden, während die Versuchsdurchführung bei Schmahl et al. (1996) bei 25° C stattfand. Es wäre interessant, in weiteren Versuchen die Wirksamkeit von Chinin unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen zu

vergleichen.

Bei Applikation des Chinins per Injektion konnte bereits bei Verabreichung einer niedrigeren Dosis als in den Fütterungsversuchen eine signifikante Verringerung der Parasitenzahl bewirkt werden. Zusätzlich waren die Trophonten bei den behandelten Karpfen kleiner als bei der Kontrollgruppe, was darauf schließen lässt, dass das Chinin die Entwicklung der Parasiten hemmt. Da die Injektionen über drei Tage erfolgten, konnten die Parasiten bei der Kontrollgruppe in dieser Zeit normal weiterwachsen, während sie bei der mit Chinin behandelten Gruppe durch die Chinin-Injektionen getötet oder geschädigt wurden, so dass sie entweder vom Fisch abfielen oder ihre weitere Entwicklung ausblieb. Somit waren hier insgesamt weniger Parasiten vorhanden und die wenigen Stadien, die sich noch auf dem Fisch befanden, waren noch nicht so weit entwickelt wie die bei der Kontrollgruppe nachweisbaren Parasitenstadien. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Luzardo-Álvarez et al. (2003) überein, wo ebenfalls ein auf die Stadien innerhalb des Fisches gerichteter Wirkstoff (Triclabendazol) die Entwicklung der Parasiten hemmte, so dass hier bei der behandelten Gruppe kleinere Trophonten auffindbar waren als bei der Kontrollgruppe.

Es stellt sich die Frage, warum mit Chinin bei der Verabreichung per Injektion ein Effekt auf die Trophonten erzielt werden konnte, jedoch nicht bei oraler Applikation. Es könnte spekuliert werden, dass das Medikament bereits durch die Zugabe ins Aquarium aus dem Medizinalfutter herausgewaschen wurde. Obwohl das Futter in der Regel sofort von den Karpfen aufgenommen wurde und das Chinin gleichmäßig in das pelletierte Futter eingemischt war, kann dies nicht ganz ausgeschlossen werden. Naheliegend für die unterschiedliche Wirksamkeit bei verschiedener Applikation sind jedoch pharmakokinetische Gründe. Es ist bekannt, dass Chinin bei Säugetieren gut, wenn auch nicht vollständig, enteral resorbiert wird. Bei Fischen hingegen müssten weitere Forschungsarbeiten erfolgen, um zu untersuchen, ob die enterale Resorption hier aufgrund der physiologischen und anatomischen Unterschiede zum Säugetier nicht in dem selben Ausmaß geschieht. Schäperclaus (1990) beschreibt, dass es bei oraler Applikation von Medikamenten aufgrund der Leberpassage zu einer Abnahme der Wirksamkeit kommen kann, was bei der parenteralen Verabreichung umgangen

wird. Somit wären möglicherweise bei oraler Anwendung höhere Konzentrationen an Chinin nötig, damit die Distribution bis in die Epidermis erfolgen kann. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen stellten jedoch die maximale Grenze dar, die im Medizinalfutter noch von den Fischen akzeptiert wurde.

#### **2.4 Anwendung von Chinin als Therapeutikum**

Die Chinarinde (*Cinchonae cortex*) sowie standardisierte Extrakte und Zubereitungen daraus sind in Tabelle 1 der VO (EG) Nr. 37/2010 aufgeführt und dürfen somit bei Lebensmittel liefernden Tieren eingesetzt werden. Es lässt sich daraus nicht ablesen, ob dies ebenfalls für Chinin als Reinsubstanz zutrifft. Nach Auffassung des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (persönliche schriftliche Mitteilung vom 27.06.2007) wäre die Anwendung bei Nutzfischen möglich. Im Hinblick auf Überlegungen zur Verbrauchergefährdung durch Chininrückstände im Lebensmittel ist auch zu bedenken, dass Chininzusätze in limitierten Mengen in Erfrischungsgetränken erlaubt sind (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2008). Es ist nicht zu erwarten, dass durch die Therapie von Fischen mit chininhaltigen Therapeutika entsprechend hohe Mengen der Substanz im Muskelgewebe eingelagert werden, so dass hierdurch eine Verbrauchergefährdung entstehen könnte.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass mit intraperitonealer Injektion von Chinin ein Effekt gegen die von der Epidermis geschützten Trophonten von *I. multifiliis* zu erzielen ist. Die Applikation des Medikaments per Injektion einzelner Fische wäre für größere Fischbestände jedoch nicht praktikabel. Für die Anwendung bei Nutzfischen wäre besonders ein Fütterungsarzneimittel geeignet, da Behandlungen über Zugabe des Medikaments ins Teichwasser in Fischzuchten aufgrund der großen Wasservolumina oftmals nicht durchführbar sind. Im Gegensatz zur Anwendung als Badebehandlung hätte ein Therapeutikum gegen die Ichthyophthiriose in Form eines Medizinalfutters die Vorteile, dass die Applikation während der Fütterung einfach zu handhaben ist, eine geringere Umweltbelastung auftritt und es auf die Trophonten wirkt, welche durch

Therapeutika, die dem Wasser zugesetzt werden, nicht eliminiert werden können (Luzardo-Álvarez et al., 2003; Shinn et al., 2003). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf die Probleme, die es zu lösen gilt, um den Einsatz von Chinin als geeignetes Therapeutikum zu ermöglichen. Um höhere Konzentrationen der Substanz in das Futter einbringen zu können, müsste in Folgearbeiten nach weiteren Wegen gesucht werden, den bitteren Geschmack des Chinins zu maskieren. Ferner wäre zu überprüfen, ob bei höheren Konzentrationen eine Resorption über den Verdauungstrakt erfolgt und sich das Medikament somit auch für die orale Applikation eignet.

## VII Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirksamkeit von Chinin gegen die Ichthyophthiriose unter Anwendung verschiedener Applikationsmethoden. Aufgrund des vorliegenden Therapienotstands wurde der Fokus insbesondere auf die Überprüfung der Eignung dieser Substanz zum Einsatz als Therapeutikum bei Nutzfischen gerichtet.

Ein Großteil der Arbeit bestand zunächst darin, den Lebenszyklus des Parasiten im Labor zu etablieren. Nach Optimierung der Methodik gelang es, denselben „Stamm“ von *I. multifiliis* über den gesamten Versuchszeitraum zu erhalten, so dass zur Versuchsdurchführung immer ausreichend Parasitenstadien gewonnen werden konnten. Außerdem wurden erfolgreiche Verfahren zur experimentellen Infektion der Fische mit *I. multifiliis* entwickelt. In Infektionsversuchen erwiesen sich zwei verschiedene Karpfenzuchtlinien als unterschiedlich empfänglich gegenüber dem Parasiten.

Es wurden *In vitro* Versuche mit allen Stadien des Parasiten unter Anwendung einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt, welche die deutliche Unterscheidung zwischen intakten und geschädigten Parasitenstadien ermöglichte. Die Ergebnisse dieser Versuche ergaben eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit von Chinin gegen alle Stadien des Parasiten, wobei sich die Theronten (infektiöses Stadium) als empfindlicher erwiesen als die Trophonten und enzystierten Tomonten. So konnte bei Chininkonzentrationen von 1 g/L und 0,1 g/L bei einer Einwirkzeit von 60 Minuten bei allen Stadien ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden, während bei einer Konzentration von 0,01 g/L noch eine signifikante Wirksamkeit gegen Theronten, jedoch nicht gegen Trophonten und Tomonten gegeben war.

Bei den durchgeführten *In vivo* Versuchen wurde die Wirksamkeit von Chinin mittels oraler und parenteraler Applikation bei Karpfen untersucht. Es wurde in Fütterungsversuchen zum einen die therapeutische Wirksamkeit des Chinins bei bereits mit *I. multifiliis* infizierten Fischen und zum anderen die prophylaktische Wirksamkeit der Substanz zur Prävention der Erkrankung überprüft. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass infolge des bitteren Chiningeschmacks

keine ausreichende orale Aufnahme zu erwarten war. Um eine verbesserte Akzeptanz des Medizinalfutters in adäquaten Konzentrationen zu erzielen, wurde die Methode zur Herstellung des Medizinalfutters unter Zusätzen von Geschmackskorrigentien verändert. Hierüber konnte eine Akzeptanzverbesserung erzielt werden.

In den Versuchen zur Überprüfung der prophylaktischen Wirksamkeit des Medikaments war kein signifikanter Behandlungseffekt nachweisbar. Die Fütterung erfolgte hierbei über 14 Tage vor Infektion der Fische mit Konzentrationen von bis zu 10 g Chinin pro kg Futter. Bei den Versuchen zur Therapie einer bereits vorhandenen Infektion ließ sich nach drei Tagen Behandlung mit Konzentrationen von bis zu 20 g/kg ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen mit Chinin behandelten Gruppen und der Kontrolle nachweisen. Bei Applikation des Chinins per i.p. Injektion in einer Dosierung von 60 mg/kg KGW über drei Tage konnte hingegen eine signifikante Reduktion der Parasitenzahl im Vergleich zur Vehikelkontrolle erzielt werden. Außerdem waren die Trophonten in der mit Chinin behandelten Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe, was auf eine Substanz-bedingte Hemmung der Parasitenentwicklung hinweist.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das Chinin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Wirksamkeit gegen die in der Fischhaut befindlichen Trophonten von *I. multifiliis* hat. In Nutzfischbeständen wäre eine orale Medikation in Form eines Fütterungsarzneimittels aufgrund der einfachen Anwendung praktikabel. Um den bitteren Geschmack der Substanz zu maskieren und ein Medizinalfutter mit sicherer Akzeptanz zur Therapie der Ichthyophthiriose zu erhalten, bedarf es weiterer Entwicklungen.

## VIII Summary

### **“Investigations about the efficacy of quinine against ichthyophthiriasis in carp”**

The aim of this study was to examine the efficacy of quinine against ichthyophthiriasis by different routes of application. The focus was set on farmed fish, specifically carp, since there is a great need for an effective and legally authorized therapeutant for the treatment of this disease.

Before carrying out the main experiments, the life cycle of the parasite had to be established under controlled laboratory conditions. It was accomplished to maintain the same strain of *I. multifiliis* for the complete period of investigation. Different methods were tested to achieve a successful experimental infection of the fish used in the experiments. In the present work it could also be shown that a carp strain obtained from Höchststadt, Germany, was significantly more susceptible to *I. multifiliis* than another carp strain originated from Wageningen, Denmark.

*In vitro* trials were carried out using a fluorescent vital staining technique, which allowed a clear distinction between intact and damaged parasites. The results of these experiments proved quinine to be effective against all stages of the parasite. At concentrations of 1 g/l and 0.1 g/l there was a significant effect on all stages after an incubation time of 60 minutes, whereas at a concentration of 0.01 g/l quinine was still significantly effective against theronts but not against trophonts and tomites. Thus, it can be concluded that the theronts are more susceptible to quinine than the other two stages.

The effect of quinine was assessed *in vivo* by oral application and intra peritoneal injections. In-feed trials were carried out in carp to test quinine treatment as a preventive measure to subsequent theront infection and also as a cure for a present infection. Preliminary experiments showed a diminished acceptance of the medicinal food compared to the control food due to the bitter taste of the substance. In order to achieve an improved uptake of the food so that quinine concentrations could be raised, the production of the medicinal food was

optimized by adding several substances to enhance the palatability. Thereby, the acceptance of the medicinal food was improved.

From the results achieved in the *in vivo* trials it can be noted that there is a difference in the efficacy of quinine depending on the method of application. The number of trophonts were not significantly reduced when given a 14-day treatment at concentrations of up to 10 g quinine/kg food prior to theront exposure. When fed for three days at concentrations of up to 20 g/kg after infection, there was also no significant effect in trophont numbers between treatment and control groups. When quinine was administered via i.p. injection at a dosage of 60 mg/kg body weight, the number of trophonts were significantly lower in the treated group compared to the untreated control group. Additionally, the remaining trophonts were smaller than those of the control group, which indicates that quinine hampered the development of the parasites.

In conclusion, the present *in vivo* and *in vitro* data demonstrate that quinine is effective against the skin-inhabiting trophonts of *I. multifiliis*. Since an oral therapeutant is feasible for the treatment of farmed fish, further work will be required to improve the palatability in order to accomplish the production of a medicinal food suitable for treating ichthyophthiriasis.

## IX Literaturverzeichnis

- Alderman DJ (1985) Malachite green: a review. J Fish Dis 8: 289-298
- Allison R, Kelly HD (1963) An epizootic of *Ichthyophthirius multifiliis* in a river fish population. Progr Fish Cult 25: 149-150
- Amlacher E (1961) Die Wirkung des Malachitgrün auf Fische, Fischparasiten (*Ichthyophthirius*, *Trichodina*), Kleinkrebse und Wasserpflanzen. Dtsch Fischztg 8: 12-15
- Bauer ON (1953) Immunität der Fische bei Verseuchung mit *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. Dokl Akad Nauk SSSR 93: 377-379
- Bauer ON (1958) Biologie und Bekämpfung von *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. Zeitschr Fisch Hilfswissensch 7: 575-581
- Bauer ON, Yunchis ON (2001) A new genus of parasitic ciliata from tropical fishes. Parazitologia 35: 142-144
- Baur WH, Rapp J (2003) Gesunde Fische. Praktische Anleitung zum Vorbeugen, Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten. 2. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin
- Bills TD, Marking LL, Chandler JH (1977) Formalin: its toxicity to non-target aquatic organisms, persistence, and counteraction. Inv Fish Control 73: 1-7
- Bodensteiner LR, Sheehan RJ, Wills PS, Brandenburg AM, Lewis WM (2000) Flowing water: an effective treatment for ichthyophthiriasis. J Aquat Anim Health 12: 209-219
- Bone LM (1983) Genetic variation in resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) infection in teleosts. M Phil thesis, Plymouth Polytechnic

- Buchmann K, Nielsen ME (1999) Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. *Int J Parasitol* 29: 1415-1423
- Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M (2001) Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol* 100: 105-116
- Buchmann K, Jensen PB, Kruse KD (2003) Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *In vitro* experiments. *N Am J Aquacult* 65: 21-24
- Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR (2008) Aktualisierte Gesundheitliche Bewertung Nr. 020/2008 des BfR vom 17. Februar 2005, aktualisiert am 9. Mai 2008.  
[http://www.bfr.bund.de/cm/208/chinin\\_haltige\\_\\_getraenke\\_koennen\\_gesundheitlich\\_problematisch\\_sein.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/chinin_haltige__getraenke_koennen_gesundheitlich_problematisch_sein.pdf) (Datum des Zugriffs: 20.02.2010)
- Burkart MA, Clark TG, Dickerson HW (1990) Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): killed versus live vaccines. *J Fish Dis* 13: 401-410
- Buschkiel AL (1910) Beiträge zur Kenntnis des *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Arch Protistenkunde* 21: 62-102
- Buschkiel AL (1936) Neue Beiträge zur Kenntnis des *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *Arch Neerland Zool* 2: 178-224
- Butcher AD (1947) Ichthyophthiriasis in Australian trout hatchery. *Progr Fish Cult* 9: 21-26
- Canella MF, Rocchi-Canella I (1976) Biologie des Ophryoglenina (ciliés hyménostermes, histophages). *Ann Univ Ferrara* 3 (Suppl. 2): 1-510

- Clayton GM, Price DJ (1988) *Ichthyophthirius multifiliis*: standardization of the infection-response model in *Ameioba splendens* (Miller & Fitzsimons). J Fish Dis 11: 371-377
- Clayton GM, Price DJ (1994) Heterosis in resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* infections in poeciliid fish. J Fish Biol 44: 59-66
- Cross DG (1972) A review of methods to control ichthyophthiriasis. Progr Fish Cult 34: 165-170
- Cross DG, Hursey PA (1973) Chloramine T for control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). J Fish Biol 5: 789-798
- Davis KB, Griffin BR, Gray WL (2002) Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. Aquaculture 214: 55-66
- Dickerson HW (2006) *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In: Woo PTK (Ed.) Fish diseases and disorders, Vol. 1: Protozoan and Metazoan infections. 2. edition, Cab International, Oxfordshire: 116-153
- Dohle A, Schmahl G, Raether W, Schmidt H, Ritter G (2002) Effects of orally administered chemotherapeutics (quinine, salinomycin) against *Henneguya* sp. Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite in the tapir fish *Gnathonemus petersii* Gunther, 1862 (Teleostei). Parasitol Res 88: 861-867
- Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K (2004) Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res 92:361-366

- Ekless LM, Matthews RA (1993) *Ichthyophthirius multifiliis*: Axenic isolation and short-term maintenance in selected monophasic media. J Fish Dis 16: 437-447
- Elser HJ (1955) An epizootic of ichthyophthiriasis among fish in a large reservoir. Prog Fish Cult 17: 132-133
- Ewing MS, Kocan KM, Ewing SA (1983) *Ichthyophthirius multifiliis*: morphology of the cyst wall. Trans Am Micros Soc 102: 122-128
- Ewing MS, Kocan KM, Ewing SA (1985) *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium. J Protozool 32: 305-310
- Ewing MS, Kocan KM (1992) Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish. Parasitol Today 8: 204-208
- Fletcher TI, Wigg JL, Rolls PJ, de Vos AJ (2009) Viability assays of intracellular organisms using fluorescent dyes. Vet Parasitol 163: 144-147
- Geisslinger M (1987) Observations on the caudal cilium of the tomite of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876. J Protozool 34: 180-182
- Gossauer A (2006) Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: Eine Einführung in die organische Chemie. Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 495-496
- Gratzek JB, Gilbert JP, Lohr AL, Shotts EB, Brown J (1983) Ultraviolet light control of *Ichthyophthirius multifiliis* in a closed fish culture recirculation system. J Fish Dis 6: 145-153

- Haas W, Haberl B, Hofmann M, Kerschensteiner S, Ketzer U (1998) Theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. *Tokai J Exp Clin Med* 23: 329-331
- Hänsel R, Pertz H (2009) Alkaloide. In: Hänsel R, Sticher O (Hrsg.) *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. 9. Auflage, Springer Verlag, Berlin: 1332-1341
- Heinecke RD, Buchmann K (2009) Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. *Aquaculture* 288: 32-35
- Hesse M (2000) *Alkaloide: Fluch oder Segen der Natur?* Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 373-375
- Hines RS, Spira DT (1973) Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. I: Course of infection. *J Fish Biol* 5: 385-392
- Hines RS, Spira DT (1974a) Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. III: Pathology. *J Fish Biol* 6: 189-196
- Hines RS, Spira DT (1974b) Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. V: Acquired immunity. *J Fish Biol* 6: 373-378
- Hoffman GL (1967) *Parasites of North American freshwater fishes*. 1. edition, UC Press, Berkeley
- Houghton G, Matthews RA (1986) Immunosuppression of carp (*Cyprinus carpio* L.) to ichthyophthiriasis using the corticosteroid triamcinolone acetate. *Vet Immunol Immunopathol* 12: 413-419

- Jorgensen TR, Larsen TB, Buchmann K (2009) Parasite infections in recirculated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Aquaculture* 289: 91-94
- Kozel TR (1986) Scanning electron microscopy of theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*: their penetration into host tissue. *Trans Am Micros Soc* 105: 357-364
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27: 37-58
- Luzardo-Álvarez A, Martínez-Mazagatos J, Santamarina-Fernández MT, Otero-Espinar FJ, Blanco-Méndez J (2003) Oral pharmacological treatments for ichthyophthiriosis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 220: 15-25
- MacLennan RF (1935) Dedifferentiation and redifferentiation in *Ichthyophthirius multifiliis*. I. Neuromotor system. *Arch Protistenkunde* 86: 191-210
- MacLennan RF (1937) Growth in the ciliate *Ichthyophthirius*. I. Maturity and encystment. *J Exp Zool* 76: 423-440
- MacLennan RF (1942) Growth in the ciliate *Ichthyophthirius*. II. Volume. *J Exp Zool* 91: 1-13
- Maki JL, Dickerson HW (2003) Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 876-881
- Matthews RA, Matthews BF, Ekless LM (1996) *Ichthyophthirius multifiliis*: observations on the life-cycle and indications of a possible sexual phase. *Fol Parasitol* 43: 203-208

- Matthews RA (2005) *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in freshwater Teleosts. In: Baker JR, Muller R, Rollinson D (Eds.) Advances in Parasitology. Vol 59, Elsevier Science, Oxford: 159-220
- McCallum HI (1982) Infection dynamics of *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology 85: 475-488
- Meibohm, B (2001) Periphere Gefäßerkrankungen. In: Schneemann, H (Hrsg.) Angewandte Arzneimitteltherapie. Klinisch-pharmazeutische Betreuung in Fallbeispielen. Springer-Verlag, Berlin: 204-205
- Meyer FP, Jorgenson FA (1983) Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Trans Amer Fish Soc 112: 818-824
- Negele RD (1975) The stritty skin disease (ichthyophthiriasis). Die Grießkörnchenkrankheit. In: Reichenbach-Klinke H-H (Hrsg.) Fisch und Umwelt. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1: 59-69
- Nielsen CV, Buchmann K (2000) Prolonged *in vitro* cultivation of *Ichthyophthirius multifiliis* using an EPC cell line as substrate. Dis Aquat Org 42: 215-219
- Nigrelli RF, Pokorny KS, Ruggieri GD (1976) Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on fresh-water fishes, with some remarks on possible physiological races and species. Trans Am Microsc Soc 95: 607-613
- Noe JG, Dickerson HW (1995) Sustained growth of *Ichthyophthirius multifiliis* at low temperature in the laboratory. J Parasitol 81: 1022-1024
- Pandey CK, Agarwal A, Baronia A, Singh N (2000) Toxicity of ingested formalin and its management. Hum Exp Toxicol 19: 360-366

- Pieters N, Brunt J, Austin B, Lyndon AR (2008) Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Appl Microbiol 105: 723-732
- Price DJ, Clayton GM (1999) Genotype-environment interactions in the susceptibility of the common carp, *Cyprinus carpio*, to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. Aquaculture 173: 149-160
- Rintamäki-Kinnunen P, Rahkonen M, Mannermaa-Keränen AL, Suomalainen LR, Mykrä H, Valtonen ET (2005) Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Dis Aquat Org 64: 69-76
- Roque M, De Puytorac P (1968) Infraciliature d'un nouvel Ophyroglenidae *Ichthyophthirioides browni* n.g., n. sp. Protistologica 3: 465-473
- Rowland SJ, Mifsud C, Nixon M, Read P, Landos M (2008) Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). Aquac Res 40: 44-54
- Schäperclaus W (1954) Fischkrankheiten. 3. Auflage, Akademie-Verlag Berlin
- Schäperclaus W (1990) Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag Berlin
- Schlenk D, Gollon JL, Griffin BR (1998) Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. J Aquat Anim Health 10: 390-396
- Schmahl G, Schmidt H, Ritter G (1996) The control of ichthyophthiriasis by a medicated food containing quinine: efficacy tests and ultrastructure investigations. Parasitol Res 82: 697-705

- Schmitt M (1990) Ichthyophthiriasis bei der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss*. Evaluation einer Alternative zu Malachitgrün als Therapeutikum. Dissertation, Universität Bern
- Shinn AP, Wootten R, Cote I, Sommerville C (2003) Efficacy of selected oral chemotherapeutants against *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora: Ophryoglenidae) infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 55: 17-22
- Shinn AP, Taylor NGH, Wootten R (2005) Development of a management system for the control of *Ichthyophthirius multifiliis*. Trout News 40: 21-25
- Shinn AP, Picon-Camacho SM, Bawden R, Taylor NGH (2009) Mechanical control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora) in a rainbow trout hatchery. Aquac Eng 41: 152-157
- Speare DJ, Ritter G, Schmidt H (1998) Quinine hydrochloride treatment delays xenoma formation and dissolution in rainbow trout challenged with *Loma salmoneae*. J Comp Pathol 119: 459-465
- Stahlmann R, Lode H (2001) Antibiotika und Chemotherapeutika. Antiinfektiöse Therapie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München: 791-947
- Stiles CW (1893) Reports on a parasitic protozoan observed on fish in the aquarium. Bull U S F C 13: 173-190
- Stoskopf MK (1993) Fish medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Straus DL, Griffin BR (2001) Prevention of an initial infestation of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish and blue tilapia by potassium permanganate treatment. N Am J Aquacult 63: 11-16

- Straus DL, Griffin BR (2002) Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. *J Aquat Anim Health* 14: 145-148
- Straus DL, Meinelt T (2009) Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitol Res* 104: 1237-1241
- Suzuki J (1935) On the reproduction of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet in relation to water temperature. *Bull Jap Soc Sci Fish* 3: 265-272 (in Japanese with English summary)
- Tojo Rodriguez JL, Santamarina Fernandez MT (2001) Attempts at oral pharmacological treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 24: 249-252
- Valtonen ET, Keränen A (1981) Ichthyophthiriasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at the Montta Hatchery in Northern Finland in 1978–1979. *J Fish Dis* 4: 405-411
- Van Duijn C (1967) Diseases of fishes. Iliffe books Ltd., London
- Ventura MT, Paperna I (1985) Histopathology of *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fishes. *J Fish Biol* 27: 185-203
- Viegas S, Ladeira C, Nunes C, Malta-Vacas J, Gomes M, Brito M, Mendonca P, Prista J (2010) Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J Occup Med Toxicol* 5: 25 [Epub ahead of print]
- Von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Hänsel R, Holzgrabe U, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Surmann P, Wolf HU, Wurm G (1993) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin

- Wagner G (1960) Der Entwicklungszyklus von *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet und der Einfluss physikalischer und chemischer Außenfaktoren. Zeitschr Fisch 9: 425-443
- Wahli-Moser T (1985) Ichthyophthiriasis bei der Forelle (*Salmo* sp.). Dissertation, Universität Basel
- Wahli T, Meier W (1991) Affinity of *Ichthyophthirius multifiliis* theronts to light and/or fish. J Appl Ichthyol 7: 244-249
- Wahli T, Schmitt M, Meier W (1993) Evaluation of alternatives to malachite green oxalate as a therapeutant for ichthyophthiriosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J Appl Ichthyol 9: 237-249
- Wahli T, Frischknecht R, Schmitt M, Gabaudan J, Verlhac V, Meier W (1995) A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 18: 347-355
- Wurtsbaugh WA, Tapia RA (1988) Mass mortality of fishes in lake Titicaca (Peru-Bolivia) associated with the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Trans Amer Fish Soc 117: 213-217
- [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de) (Datum des Zugriffs 27.02.2010)
- Xu D-H, Klesius PH, Shoemaker CA (2005) Cutaneous antibodies from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) may induce apoptosis of Ich theronts. J Fish Dis 28: 213-220
- Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH (2008) Effect of tricaine methanesulfonate on survival and reproduction of the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res 103: 979-982

Yokoyama H, Danjo T, Ogawa K, Wakabayashi H (1997) A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. *J Fish Dis* 20: 281-286

Yokoyama H, Kageyama M, Yanagida T, Ogawa K (2009) Seawater survival of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) evaluated by *in vitro* and *in vivo* infectivity assays. *Fish Pathol* 44: 172-177

Zampolla T, Spikings E, Zhang T, Rawson DM (2009) Effect of methanol and Me<sub>2</sub>SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology* 59: 188-194

## X Anhang

### 1. Ergebnisse einzelner Versuchsreplikate der *In vivo* Versuche

#### 1.1 Fütterungsversuche zur therapeutischen Wirksamkeit von Chinin

Tab. 1: Parasitenzahlen der ersten drei Versuchsreplikate der *In vivo* Fütterungsversuche zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von Chinin. Dargestellt sind die Parasitenzahlen (Summe beider Körperseiten) jedes Fisches einer Gruppe (n = 5) sowie die Mittelwerte (kursiv und fett gedruckt) und die Mediane (fett gedruckt) jeder Behandlungsgruppe vor und nach der Behandlung mit Medizinalfutter über 7 Tage. Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen den Gruppen war *nicht* signifikant.

	<b>Beginn</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>5 g/kg</b>	<b>10 g/kg</b>	<b>20 g/kg</b>
<b>1</b>	35	1	11	16	9
	47	4	13	17	16
	51	6	21	19	18
	62	6	26	29	20
	114	7	29	29	22
	<b>61,8</b>	<b>4,8</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>17</b>
	<b>51</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	42	9	8	4	1
	55	15	20	18	3
	69	24	26	19	4
	82	31	5	21	6
	112	37	7	28	6
	<b>72</b>	<b>23,2</b>	<b>13,2</b>	<b>18</b>	<b>4</b>
	<b>69</b>	<b>24</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	69	4	1	3	1
	70	7	5	5	9
	81	7	6	14	10
	111	12	8	27	11
	114	30	10	41	24
	<b>89</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>11</b>
	<b>81</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>10</b>

Tab. 2: Parasitenzahlen der Versuchsreplikate 4 bis 7 der *In vivo* Fütterungsversuche zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von Chinin. Dargestellt sind die Parasitenzahlen (Summe beider Körperseiten) jedes Fisches einer Gruppe (n = 5) sowie die Mittelwerte (kursiv und fett gedruckt) und die Mediane (fett gedruckt) jeder Behandlungsgruppe vor und nach der Behandlung mit Medizinalfutter über 3 Tage. Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen den Gruppen war *nicht* signifikant.

	<b>Beginn</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>5 g/kg</b>	<b>10 g/kg</b>	<b>20 g/kg</b>
<b>4</b>	21	6	12	11	14
	23	8	32	31	16
	31	19	46	36	17
	38	21	68	37	19
	53	45	78	68	63
	<b>33,2</b>	<b>19,8</b>	<b>47,2</b>	<b>36,6</b>	<b>25,8</b>
	<b>31</b>	<b>19</b>	<b>46</b>	<b>36</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	90	106	42	54	127
	139	171	209	94	173
	139	221	237	160	216
	154	374	254	395	339
	197	467	263	455	367
	<b>143,8</b>	<b>267,8</b>	<b>201</b>	<b>231,6</b>	<b>244,4</b>
	<b>139</b>	<b>221</b>	<b>237</b>	<b>160</b>	<b>216</b>
<b>6</b>	92	160	128	182	279
	111	221	139	215	303
	145	358	207	229	306
	158	441	395	235	401
	188	531	528	410	526
	<b>138,8</b>	<b>342,2</b>	<b>279,4</b>	<b>254,2</b>	<b>363</b>
	<b>145</b>	<b>358</b>	<b>207</b>	<b>229</b>	<b>306</b>
<b>7</b>	188	263	275	294	249
	234	336	336	314	375
	250	471	408	316	378
	263	567	426	403	412
	296	635	427	514	481
	<b>246,2</b>	<b>454,4</b>	<b>374,4</b>	<b>368,2</b>	<b>379</b>
	<b>250</b>	<b>471</b>	<b>408</b>	<b>316</b>	<b>378</b>

## 1.2 Fütterungsversuche zur prophylaktischen Wirksamkeit von Chinin

Tab. 3: Parasitenzahlen aller durchgeführten Replikate (n = 6) der *In vivo* Fütterungsversuche zur Untersuchung der prophylaktischen Wirksamkeit von Chinin nach der Behandlung mit Medizinalfutter über 14 Tage und darauffolgender Infektion. Dargestellt sind die Parasitenzahlen (Summe beider Körperseiten) jedes Fisches einer Gruppe (n = 5) sowie die Mittelwerte (kursiv und fett gedruckt) und die Mediane (fett gedruckt) jeder Behandlungsgruppe. Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen den Gruppen war *nicht* signifikant.

	<b>Kontrolle</b>	<b>5 g/kg</b>	<b>10 g/kg</b>
<b>1</b>	49	42	62
	54	56	63
	63	60	82
	65	61	112
	139	139	153
	<b>74</b>	<b>71,6</b>	<b>94,4</b>
	<b>63</b>	<b>60</b>	<b>82</b>
<b>2</b>	36	22	39
	38	22	53
	48	28	63
	83	43	66
	181	73	90
	<b>77,2</b>	<b>37,6</b>	<b>62,2</b>
	<b>48</b>	<b>28</b>	<b>63</b>
<b>3</b>	49	117	70
	53	124	93
	91	131	141
	100	140	176
	133	277	189
	<b>85,2</b>	<b>157,8</b>	<b>133,8</b>
	<b>91</b>	<b>131</b>	<b>141</b>
<b>4</b>	30	55	66
	92	69	92
	99	78	100
	228	79	107
	238	139	143
	<b>137,4</b>	<b>84</b>	<b>101,6</b>
	<b>99</b>	<b>78</b>	<b>100</b>
<b>5</b>	130	81	91
	165	114	107
	184	190	145
	192	221	189
	192	225	289
	<b>172,6</b>	<b>166,2</b>	<b>164,2</b>
	<b>184</b>	<b>190</b>	<b>145</b>
<b>6</b>	112	168	185
	194	183	195
	244	273	205
	254	373	245
	265	379	248
	<b>213,8</b>	<b>275,2</b>	<b>215,6</b>
	<b>244</b>	<b>273</b>	<b>205</b>

### 1.3 Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis*

Tab. 4: Parasitenzahlen aller durchgeführten Replikate (n = 6) der Infektionsversuche zum Vergleich der Empfänglichkeit zweier Karpfenlinien gegenüber *I. multifiliis*. Dargestellt sind die Parasitenzahlen (Summe beider Körperseiten) jedes Fisches einer Gruppe (n = 5) sowie die Mittelwerte (kursiv und fett gedruckt) und die Mediane (fett gedruckt) jeder Gruppe. Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen den beiden Gruppen war *signifikant*.

	Höchststadt	Wageningen
1	274	22
	452	70
	462	72
	483	76
	691	79
	<b>472,4</b>	<b>63,8</b>
	<b>462</b>	<b>72</b>
2	48	21
	55	23
	67	31
	114	38
	167	53
	<b>90,2</b>	<b>33,2</b>
<b>67</b>	<b>31</b>	
3	124	90
	204	139
	433	139
	454	154
	524	197
	<b>347,8</b>	<b>143,8</b>
<b>433</b>	<b>139</b>	
4	319	92
	354	111
	378	145
	405	158
	594	188
	<b>410</b>	<b>138,8</b>
<b>378</b>	<b>145</b>	
5	148	188
	207	234
	227	250
	409	263
	636	296
	<b>325,4</b>	<b>246,2</b>
<b>227</b>	<b>250</b>	
6	145	93
	206	235
	285	273
	397	284
	778	416
	<b>362,2</b>	<b>260,2</b>
<b>285</b>	<b>273</b>	

#### 1.4 Injektionsversuche zur therapeutischen Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation

Tab. 5: Parasitenzahlen aller durchgeführten Replikate (n = 4) der Injektionsversuche zur therapeutischen Wirksamkeit von Chinin nach parenteraler Applikation. Dargestellt sind die Parasitenzahlen (Summe beider Körperseiten) jedes Fisches einer Gruppe (n = 6) sowie die Mittelwerte (kursiv und fett gedruckt) und die Mediane (fett gedruckt) jeder Gruppe. Der Unterschied in der Parasitenzahl zwischen den Gruppen war *signifikant*.

	<b>Kontrolle</b>	<b>60 ma/ka KGW</b>
<b>1</b>	113	31
	136	50
	139	61
	210	82
	326	107
	327	134
	<b><i>208,5</i></b>	<b><i>77,5</i></b>
	<b>174,5</b>	<b>71,5</b>
<b>2</b>	178	47
	267	84
	268	85
	277	89
	325	108
	345	118
	<b><i>276,7</i></b>	<b><i>88,5</i></b>
	<b>272,5</b>	<b>87</b>
<b>3</b>	296	82
	362	98
	466	141
	482	149
	485	-
	796	-
	<b><i>481,2</i></b>	<b><i>117,5</i></b>
	<b>474</b>	<b>119,5</b>
<b>4</b>	412	134
	535	183
	665	193
	890	582
	926	-
	<b><i>685,6</i></b>	<b><i>273</i></b>
	<b>665</b>	<b>188</b>

**Danksagung**

Herrn Prof. Dr. M. El-Matbouli danke ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stets gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Korbelt möchte ich für die großzügige Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten danken.

Ich bedanke mich beim Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Forsten und Landwirtschaft für die Projektfinanzierung aus der Fischereiabgabe des Freistaats Bayern.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Wedekind und allen Mitarbeitern der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Starnberg für die Finanzierung, die fachliche Beratung, die Bereitstellung von Fischen und Sachmitteln sowie der Möglichkeit dort praktische Erfahrungen in der Bestandsbetreuung sammeln zu können.

Für die Hilfe bei der Herstellung des Medizinalfutters danke ich Herrn Prof. Dr. F. J. Schwarz und den Mitarbeitern der Technischen Universität München, Fachgebiet Tierernährung, Freising. Für die Futterpelletierung danke ich Frau Prof. Dr. E. Kienzle, Frau E. Stadler, sowie den Tierpflegern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für die harmonische Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft möchte mich ganz herzlich bedanken bei meinen wissenschaftlichen Kollegen Gunnar Dembek, Dennis Kallert, Simone Keller, Vanessa Severin, Sho Shirakashi, Hatem Soliman und insbesondere bei Daniel Grabner für seine allzeit gewährte Hilfestellung und großartige Unterstützung.

Ich danke allen Klinikmitarbeitern, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere Martin Beyer für die Betreuung der Fische und Hilfe beim praktischen Teil der Arbeit. Den Tierpflegern der Auffangstation für Reptilien München e.V. danke ich für die Mithilfe bei der Betreuung der Fische. Dr. Philippe de Mendonça möchte ich für die Beantwortung zahlreicher fachlicher Fragen danken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Tante Frau Prof. Dr. Angelika Richter für ihre fachlichen Ratschläge und ihre große Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Stefan Effkemann bedanken, der mich vor allem in der Endphase der Arbeit sowohl fachlich als auch moralisch enorm unterstützt hat.

Abschließend danke ich meinen Eltern sowie Diana Löwel, Ute Rucker, Ulf Peter und Mahela Schmidt dafür, dass sie immer für mich da waren und mich bestärkt und aufgemuntert haben.