

Aus dem Institut für  
Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. R. Hoffmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

Untersuchung der Resistenzmechanismen eines Regenbogenforellen-Stamms  
gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit\*

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

vorgelegt von  
Michael Joachim Meixner  
aus Ditzingen

München 2004

\*Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes "Resistant Trout" durch die Whirling  
Disease Foundation und den U.S. Fish and Wildlife Service (USA) gefördert.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Prof. Dr. M. El-Matbouli  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>3</b>
2.1	Myxozoa	3
2.2	Die Drehkrankheit der Salmoniden	4
2.2.1	Geschichte und Vorkommen der Drehkrankheit der Salmoniden	4
2.2.2	Ethiologie	6
2.2.3	Entwicklungszyklus	8
2.2.4	Klinische Symptomatik	9
2.2.5	Diagnose	10
2.2.6	Differentialdiagnosen	11
2.2.7	Therapie	11
2.2.8	Die Empfänglichkeit verschiedener Salmoniden gegenüber der Drehkrankheit	12
2.2.9	Die Erbllichkeit der Krankheitsresistenz bei Fischen	15
2.3	Faktoren, die die Empfänglichkeit eines mit <i>Myxobolus cerebralis</i> infizierten Fisches beeinflussen können	21
2.4	Die Haut als entscheidende Abwehrbarriere	23
2.4.1	Haut	23
2.4.2	Nerv	26
2.4.3	Knorpel	26
2.5	Die Rolle des unspezifischen Immunsystems bei der Abwehr einer Infektionskrankheit	27
2.5.1	Humorale Abwehrmechanismen	28
2.5.1.1	Das Komplementsystem	28
2.5.1.2	Zytokine	31
2.5.1.3	Transferrin	32
2.5.1.4	C-reaktives Protein (CRP)	33
2.5.1.5	Serum Amyloid A (SAA)	35
2.5.1.6	Alpha-2-Makroglobulin	36

2.5.1.7 Interferone	37
2.5.1.8 Lysozym	38
<b>2.5.2 Der zelluläre Teil des unspezifischen Immunsystems</b>	<b>42</b>
2.5.2.1 Die Monozyten	42
2.5.2.2 Die Granulozyten	43
2.5.2.3 Die Makrophagen und Melanomakrophagen	43
2.5.2.4 Die Phagozytosefähigkeit der Fischphagozyten	45
2.5.2.5 Die Migration der Leukozyten	46
2.5.2.6 Die Förderung der Phagozytose durch Opsonisierung	48
<b>3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>50</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>50</b>
<b>3.1.1 Regenbogenforellen zur Gewinnung von <i>Myxobolus cerebralis</i>-Sporen</b>	<b>50</b>
<b>3.1.2 Haltung der Tubificiden und Produktion der Triactinomyxon-Sporen</b>	<b>50</b>
<b>3.1.3 Regenbogenforellenbrütlinge für die Infektionsversuche</b>	<b>51</b>
<b>3.1.4 Haltung der Versuchsfische</b>	<b>51</b>
<b>3.1.5 Tierversuchsantrag</b>	<b>52</b>
<b>3.2 METHODEN</b>	<b>53</b>
<b>3.2.1. Gewinnung der <i>Myxobolus cerebralis</i>-Sporen</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2 Infektion der Oligochaeten</b>	<b>53</b>
<b>3.2.3 Gewinnung der Triactinomyxon-Sporen</b>	<b>53</b>
<b>3.2.4 Infektion der Forellenbrütlinge mit Triactinomyxon-Sporen</b>	<b>54</b>
<b>3.2.5 Versuchsübersicht</b>	<b>54</b>
3.2.5.1 Vergleich der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo (Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) und des Wildstamms S mit den Referenz-Stämmen Ho und TL	54
a) Laborversuch	54
b) Feldversuch	56
3.2.5.2 Histopathologische Untersuchungen	57
3.2.5.3 Bestimmung des Lysozyms im Fischschleim	57
<b>3.2.6 Untersuchungsmethoden</b>	<b>58</b>
3.2.6.1 Auszählung der <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen aus dem Kopfknochen	58
3.2.6.2 Histologische Untersuchungen	58

3.2.6.3 Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop	59
3.2.6.4 Bestimmung des Lysozymwerts im Mukus	60
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Kontrolle des Infektionserfolgs</b>	<b>62</b>
<b>4.2 Die Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) und des Wildstamms S bezüglich der Referenz-Stämme Ho und TL</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1 Vergleich der klinischen Symptomatik</b>	<b>63</b>
4.2.1.1 Tag 50 post expositionem des Laborversuchs	63
4.2.1.2 Tag 100 post expositionem des Laborversuchs	65
4.2.1.3 Tag 150 post expositionem des Laborversuchs	68
4.2.1.4 Klinische Anzeichen des Feldversuchs	74
<b>4.2.2 Vergleich der Endgrößen und –Gewichte</b>	<b>74</b>
4.2.2.1 Größen und Gewichte beim Laborversuch	74
4.2.2.2 Größen und Gewichte beim Feldversuch	77
<b>4.2.3 Infektionsprävalenz</b>	<b>77</b>
4.2.3.1 Infektionsprävalenz beim Laborversuch	77
4.2.3.2 Infektionsprävalenz beim Feldversuch	78
<b>4.2.4 Quantitative Erfassung der <i>Myxobolus cerebralis</i>-Sporen pro Kopf</b>	<b>78</b>
4.2.4.1 Mittlere Anzahl der <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen der Tiere des Laborversuchs	78
4.2.4.2 Mittlere Anzahl der <i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen der Tiere des Feldversuchs	80
<b>4.2.5 Pathohistologische Veränderungen</b>	<b>80</b>
4.2.5.1 Pathohistologische Veränderungen beim Laborversuch	80
4.2.5.2 Pathohistologische Veränderungen beim Feldversuch	87
<b>4.3 Histopathologische Untersuchungen</b>	<b>87</b>
<b>4.3.1 Anzahl der Parasitenstadien in der Haut in den ersten 12h nach erfolgter Infektion</b>	<b>87</b>
<b>4.3.2 Parasitenstadien im weiteren Verlauf der Infektion</b>	<b>98</b>
<b>4.4 Bestimmung des Lysozymspiegels im Hautschleim</b>	<b>100</b>
<b>4.4.1 Kontrolle des Infektionserfolgs</b>	<b>100</b>
<b>4.4.2 Vergleich der Lysozymspiegel</b>	<b>100</b>

<b>5.</b>	<b>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Infektion der Regenbogenforellen-Brütlinge mit der Drehkrankheit</b>	<b>103</b>
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF (Spermien) mit den „Elternstämmen“ Ho und TL</b>	<b>104</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Klinische Symptomatik</b>	<b>104</b>
a)	Klinische Symptomatik beim Laborversuch	104
b)	Klinische Symptomatik beim Feldversuch	105
<b>5.2.2</b>	<b>Endgrößen und –Gewichte</b>	<b>105</b>
a)	Endgrößen und –Gewichte beim Laborversuch	106
b)	Endgrößen beim Feldversuch	107
c)	Vergleich der Wachstumspotenz der Stämme Ho und TL	108
<b>5.2.3</b>	<b>Infektionsprävalenz</b>	<b>109</b>
a)	Infektionsprävalenz beim Laborversuch	109
b)	Infektionsprävalenz beim Feldversuch	109
<b>5.2.4</b>	<b><i>Myxobolus cerebralis</i>-Sporen-Zahlen pro Kopf</b>	<b>110</b>
a)	<i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen-Zahlen pro Kopf beim Laborversuch	110
b)	<i>Myxobolus cerebralis</i> -Sporen-Zahlen pro Kopf beim Feldversuch	110
<b>5.2.5</b>	<b>Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen</b>	<b>111</b>
a)	Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen beim Laborversuch	111
b)	Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen beim Feldversuch	112
<b>5.2.6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) im Vergleich mit den Referenz-Stämmen Ho und TL</b>	<b>113</b>
<b>5.3</b>	<b>Empfänglichkeit des Wildstamms S</b>	<b>115</b>
<b>5.4</b>	<b>Histopathologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen</b>	<b>116</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Anzahl der Parasitenstadien in der Haut in den ersten 12 Stunden nach erfolgter Infektion</b>	<b>117</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Die Parasitenstadien im Nervengewebe</b>	<b>120</b>
<b>5.5</b>	<b>Der Lysozymspiegel im Hautschleim</b>	<b>121</b>
<b>5.6</b>	<b>Zukunftsaussichten für die USA</b>	<b>124</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>126</b>

<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>128</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>130</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>157</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>159</b>

### 1. EINLEITUNG

Die Drehkrankheit der Salmoniden ist eine Parasitose, die hauptsächlich bei Forellen vorkommt und 1903 erstmals durch HOFER beschrieben wurde. Der Erreger, *Myxobolus cerebralis*, gelangt nach dem Eindringen in die Haut und einer Wanderung durch das Nervengewebe schließlich in den Knorpel heranwachsender Fische. Hier führt die starke Vermehrung und Sporenbildung zur Auflösung der Knorpelstruktur und zur Störung der Ossifikation, wodurch es zu Deformationen am gesamten Skelett der betroffenen Tiere kommt. Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartien und das Namen gebende schnelle horizontale Drehen um eine senkrechte Achse sind weitere wichtige Symptome, die nach einer Infektion auftreten können.

Die Krankheit trat ursprünglich in Europa auf und wurde wahrscheinlich durch den verstärkten internationalen Handel in den 50er Jahren in fast alle Forellen produzierenden Länder verbreitet.

Vor allem in den USA, wo der Fliegenfischtourismus eine große Rolle spielt, entstanden erhebliche wirtschaftliche Defizite. Während die Schäden in den Fischzuchten durch Optimierung der Haltungsbedingungen noch im Rahmen gehalten werden konnten, kam es in den großen Flüssen zu einer starken Dezimierung der dort heimischen Regenbogenforellen. Aus diesem Grund wurde, ausgehend von einer Bevölkerungsinitiative in den Vereinigten Staaten, im Jahre 1994 die „Whirling Disease Foundation“ gegründet.

Unter den Salmoniden gibt es erhebliche Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit. So erweisen sich die Regenbogenforellen als hochempfindliche Wirte, wohingegen die Bachforellen nur geringe Krankheitsausprägungen zeigen. Neue Studien zeigen jedoch, dass es auch unter den Regenbogenforellen-Stämmen Unterschiede in der Empfänglichkeit gibt. So erwies sich vor allem ein aus Deutschland stammender Regenbogenforellen-Zuchtstamm als resistent gegenüber der Infektion.

Momentan wird darüber diskutiert, die Situation in den USA durch das Aussetzen eines weniger empfänglichen Stammes zu entschärfen. Da beim Aussetzen eines Stammes in ein neues Ökosystem auch unvermeidlich Kreuzungen mit den dort heimischen empfänglichen Forellen-Stämmen stattfinden, ist es wichtig herauszufinden, wie die Resistenzlage bei diesen Tochtergenerationen ist. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden Kreuzungen aus empfänglichen und weniger empfänglichen Regenbogenforellen-Stämmen auf ihre Empfänglichkeit bezüglich einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion untersucht. Da für das

Überleben in der freien Natur auch die Genvielfalt eine Rolle spielt, um der Selektion Raum zu lassen, besteht das Ziel einen Wildstamm zu finden, der sich als ähnlich resistent gegenüber der Drehkrankheit erweist wie der bisher bekannte Zuchtstamm aus Deutschland. In dieser Arbeit wird ein bisher unbekannter Wildstamm aus der Schweiz auf seine Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit untersucht.

Die Mechanismen, die für die unterschiedlichen Empfänglichkeiten gegenüber der Drehkrankheit verantwortlich sind, sind bis dato unbekannt. Im zweiten Teil der Arbeit werden deswegen ein hoch und ein weniger empfindlicher Regenbogenforellen-Stamm mit *Triactinomyxon*-Sporen infiziert. Am ersten Tag post infectionem soll der Verlauf der Zahl der intakten und degenerierten Parasitenstadien in der Haut der Fische bei diesen beiden Stämmen vergleichend histologisch bestimmt werden. Außerdem werden die Parasiten elektronenmikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht.

Im dritten Teil der Arbeit werden bei diesen beiden unterschiedlich resistenten Stämmen die Lysozymwerte im Fischmucus 1 Tag, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate und 4 Monate nach einer Infektion mit 1000 *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch bestimmt.

## 2. LITERATUR

### 2.1 Myxozoa

*Myxobolus cerebralis*, der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, gehört zum Stamm Myxozoa Grassé, 1970. Die weitere Unterteilung erfolgte durch die International Commission on Protozoan Nomenclature (LEVINE et al., 1980) in die Klassen Myxosporea Bütschli, 1881 und Actinosporea Noble, 1980 (Tabelle 1). SMOTHERS et al. (1994) und SCHLEGEL et al. (1996) konnten durch molekularbiologische Untersuchungen zeigen, dass es sich bei beiden Klassen um mehrzellige Parasiten handelt, die mit den Bilateria verwandt sind. Im Gegensatz dazu schlugen SIDDAL et al. (1995) vor, die Myxozoa in den Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) einzubeziehen.

Alle Vertreter des Stammes Myxozoa Grassé sind obligate Parasiten, die charakteristische aus Schalenzellen, Polkapselzellen mit ausschleuderbaren Polfilamenten und infektiösem Amöboidkeim bestehende Sporen bilden.

LOM & DYKOVÁ (1995) berichteten über etwa 1350 Arten, die in 52 Gattungen unterteilt werden. Dabei handelt es sich zum großen Teil um Fischparasiten. Einige wichtige pathogene Vertreter sind neben *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, der Erreger der Proliferativen Nierenerkrankung der Salmoniden, die auf *Sphaerospora renicola* zurückzuführende Schwimmblasenentzündung der Karpfen sowie die durch *Hoferellus carassi* verursachte infektiöse Nierenvergrößerung beim Goldfisch. Besonders anfällig für diese Krankheiten sind Tiere mit geschwächtem Immunsystem (ELMATBOULI & HOFFMANN, 1986). Nur wenige Arten haben Reptilien, Amphibien oder Wirbellose zum Wirt.

Die Actinosporea werden von MARQUÈS (1984) in 44 Arten und 14 Gattungen unterteilt. Am Ende der Entwicklung im Darmepithel des Wirts bilden sie charakteristische Sporen, die in das Wasser freigelassen werden und somit die Übertragung auf einen anderen Wirt ermöglichen (JANISZEWSKA, 1955). Die Flotationsfähigkeit wird durch ihr besonderes Bauprinzip ermöglicht. So bestehen sie aus drei radialsymmetrisch angeordneten Schalenzellen, drei apikalen Polkapselzellen mit ausschleuderbaren Polfilamenten und dem infektiösem Amöboidkeim, der unterschiedliche Anzahlen an Kernen enthält. Die Schalenzellen bilden die charakteristischen Fortsätze, mit deren Hilfe die einzelnen Arten unterschieden werden können.

Es wird darüber diskutiert, die Taxonomie den aktuellen Forschungsarbeiten anzupassen. KENT et al. (1994) schlugen vor, die Klasse Actinosporea aufzulösen. Somit könnten alle Actinosporea als Kollektivgruppe behandelt werden und würden nicht mehr mit dem Gattungsnamen der Myxosporea konkurrieren. Diese neue Einteilung ist jedoch bis heute nicht erfolgt.

**Table 1:** Stellung von *Myxobolus cerebralis* in der systematischen Einteilung der Myxozoa nach LEVINE et al. (1980), LOM & NOBLE (1984) und LOM & DYKOVÁ (1992)

STAMM	Myxozoa Grassé, 1970
KLASSE	Myxosporea Bütschli, 1881
ORDNUNG	Bivalvulida Shulman, 1959
UNTERORDNUNG	Platysporina Kudo, 1919
FAMILIE	Myxobolidae Thélohan, 1892
GATTUNG	Myxobolus
ART	<i>Myxobolus cerebralis</i>

## 2.2 Die Drehkrankheit der Salmoniden

### 2.2.1 Geschichte und Vorkommen der Drehkrankheit der Salmoniden

Die Drehkrankheit der Salmoniden ist eine durch den Parasiten *Myxobolus cerebralis* verursachte Krankheit, die 1898 von Hofer zum ersten Mal in Deutschland beobachtet wurde (HOFER, 1903). In der Folgezeit wurde die Krankheit in zahlreichen weiteren Ländern nachgewiesen und kommt heute in fast allen Forellen produzierenden Ländern vor (HALLIDAY, 1976).

Während Südamerika wohl eines der wenigen *Myxobolus cerebralis* freien, intensiv Aquakultur betreibenden Gebiete darstellt (HEDRICK et al., 1998), erreichte die Drehkrankheit vor allem in den USA enorme Ausmaße und breitete sich in den vergangenen Jahren in 22 Bundesstaaten aus (VINCENT, 1996). Der Erreger gelangte wahrscheinlich über kontaminiertes Fischmaterial im anwachsenden Handel der 50er Jahre nach Amerika (HALLIDAY, 1976). HOFFMAN (1990) vermutet eine Einschleppung durch gefrorene

Forellenfilets aus Dänemark. 1956 konnte *Myxobolus cerebralis* zum ersten Mal in Pennsylvania auf der Benner Spring Fish Research Station und fast simultan in Nevada diagnostiziert werden. Dann wurde er im Jahre 1961 in Connecticut, 1965 in Virginia und 1966 in Kalifornien Massachusetts nachgewiesen (HOFFMAN, 1990). Viele der amerikanischen Salmonidenarten entpuppten sich als hochempfindlich. Die so entstandenen erheblichen wirtschaftlichen und ökologischen Schäden erregten die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit (WOODBURY, 1996).

WALKER & NEHRING (1995) zeigten in 1993 durchgeführten Untersuchungen die starke Dezimierung der drei vorhergehenden Regenbogenforellen-Jahrgänge. Die Flusssysteme Montanas wiesen in 8 von 21 untersuchten Fällen infizierte Salmoniden auf, bei denen die Infektionsraten zwischen 4 und 69% lagen (BALDWIN et al., 1997).

Die unterschiedlichen Befallsintensitäten der verschiedenen Gewässer konnten noch nicht begründet werden. Es wird aber vermutet, dass der Befall mit *Myxobolus cerebralis* und der Ausbruch der Krankheit multifaktorielle Geschehen darstellen. In diesem Zusammenhang genannte Stressoren sind Wasserqualität, Wassertemperatur, die im Wasser gelösten atmosphärischen Gase, die verfügbaren Nahrungsquellen, die Artzusammensetzung des Habitats und auch die Intensität menschlicher Einflüsse. Die am schwersten befallenen Flüsse scheinen gleichzeitig auch bevorzugte Ziele für die Fischerei zu sein und einem intensiven Management zu unterliegen (SCHISLER & BERGERSEN, 1998).

Es wurden im Laufe der Jahre verschiedene Versuche unternommen die Ausbreitung der Krankheit einzudämmen. So wurden in Kalifornien in den Jahren 1965 bis 1984 660.000 kg Fisch und fast 2.300.000 Brütlinge aus kontaminierten Zuchten vernichtet (MODIN, 1998). Im Staat Michigan wurden betroffene Zuchten unter Quarantäne gestellt. In den frühen Siebzigern desinfizierte man den nördlichen Teil des Tabacco River mit Chlorid (HNATH, 1988). HOFFMAN et al. (1962) berichteten von der radikalen Keulung aller Fische und der anschließenden Desinfektion der Gerätschaften in den betroffenen Zuchtstätten.

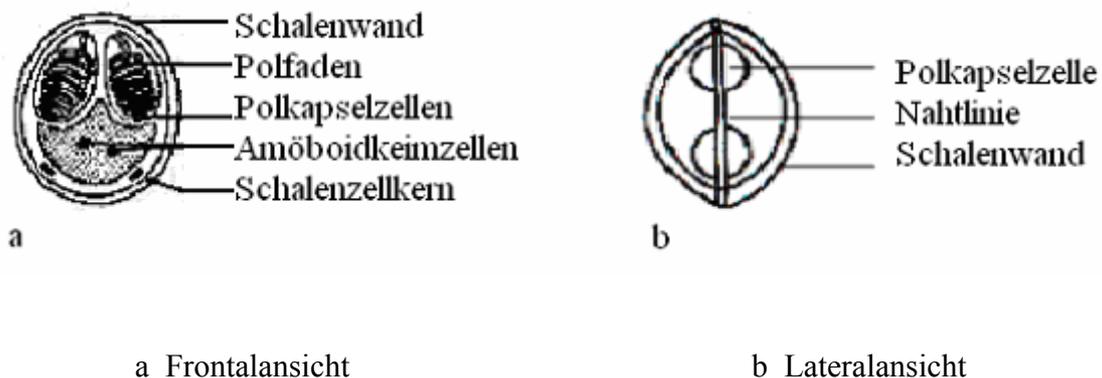
In jüngeren Jahren beschränkten sich die Eindämmungsversuche auf mildere Maßnahmen, die vor allem darauf abzielten die weitere Ausbreitung der Drehkrankheit zu verhindern. So betonierte man Wasserleitungen, desinfizierte Erdteiche und züchtete in sporenfreiem Wasser (NICKUM, 1999).

### 2.2.2 Ethiologie

Die Drehkrankheit der Salmoniden wird durch *Myxobolus cerebralis* verursacht. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um den für Fische am stärksten pathogenen Vertreter des Stammes der Myxozoa (LOM & DYVOKA, 1992).

Die *Myxobolus cerebralis*-Spore kommt im Knorpelmaterial des Wirts vor und hat in der Aufsicht ovale bis rundliche Gestalt. In der Seitenansicht ist sie in der Regel linsenförmig (Abbildung 1). Sie hat eine Länge von 7,4–9,7µm, eine Breite von 7,0–10,0µm und eine Höhe von 6,2–7,4µm. Jede Spore besteht aus je 2 Schalenzellen, 2 Polkapselzellen, in denen sich in fünf bis sechs Windungen aufspiralisierte Polfilamente befinden, und einem zweikernigen Amöboidkeim (LOM & HOFFMAN, 1971).

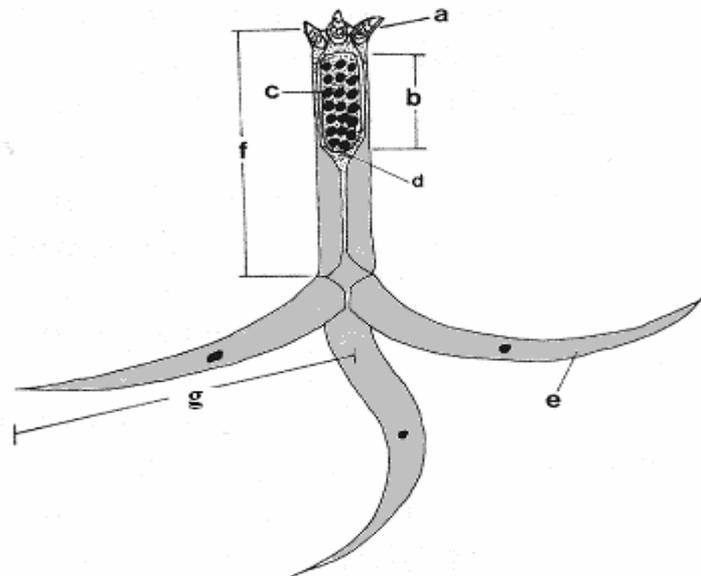
Die *Myxobolus cerebralis*-Sporen sind sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse. Im Flusssediment können sie bis zu 30 Jahre überdauern (HOFFMAN & PUTZ, 1969). Weder Temperaturen von -20°C über einen Zeitraum von 3 Monaten noch Wärmeeinfluß bis 66°C können die Infektiosität beeinträchtigen (HOFFMAN, 1977; WOLF & MARKIW, 1982). Die Sporen können den Verdauungstrakt von Hecht (*Esox lucius*) und Stockente (*Anas platyrhynchos*) intakt passieren (EL-MATBOULI & HOFFMAN, 1991).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung *Myxobolus cerebralis*-Spore (nach EL-MATBOULI, 1996)

Die Triactinomyxon-Sporen werden von infizierten Oligochaeten ausgeschieden und sind in der Lage im Wasser zu flotieren. Dies wird vor allem durch die drei 147,4–214,2µm langen Schwebefortsätze ermöglicht. Diese befinden sich an einem Stiel, der 135,2–155,8µm misst und in dem sich der bewegliche Amöboidkeim befindet (Abbildung 2). Der Amöboidkeim enthält 64 Zellen. Am apikalen Ende des Stiels liegen 3 Polkapseln (EL-MATBOULI et al., 1995).

Die Überlebenszeit der Triactinomyxon-Sporen ist mit 7 Tagen bei 7°C im Vergleich zu den widerstandsfähigen *Myxobolus cerebralis*-Sporen nur relativ gering (HEDRICK et al., 1998). MARKIW (1992a) beschrieb bei einer Wassertemperatur von 12,5°C nur eine Überlebenszeit von 3 bis 4 Tagen.



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

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung einer reifen, entfalteten Triactinomyxon-Spore (nach EL-MATBOULI et al., 1998)

### 2.2.3 Entwicklungszyklus

Die *Myxobolus cerebralis*-Sporen werden vor allem nach dem Tod der Salmoniden freigesetzt. Dies erfolgt entweder durch Verwesung der verendeten Tiere oder durch Ausscheidung der Sporen über den Kot von Raubtieren wie Vögeln und Raubfischen, die die erkrankten Forellen zuvor erbeutet haben. NEHRING et al. (2002) wiesen in neuen Untersuchungen bei der Bachforelle darauf hin, dass die Ausscheidung der Sporen bereits zu Lebzeiten der Fische kontinuierlich stattfindet. EL-MATBOULI (nicht veröffentlichte Daten) machte bei Regenbogenforellen ähnliche Beobachtungen.

Die freigesetzten *Myxobolus cerebralis*-Sporen werden dann vom Oligochaeten der Art *Tubifex tubifex* oral aufgenommen (WOLF et al., 1986; EL-MATBOULI & HOFFMANN, 1989).

Die Sporen gelangen mit dem Futter ins Darmlumen der Oligochaeten. Dort schleudern sie ihre Polfilamente aus und heften sich am Darmepithel fest. Nach einem komplexen Entwicklungszyklus, der bei einer Wassertemperatur von 15°C etwa 90 Tage andauert, werden die ersten Triactinomyxon-Sporen ausgeschieden (EL-MATBOULI & HOFFMANN, 1998).

Die charakteristische Ankerform der Sporen entwickelt sich osmotisch bedingt erst im Wasser (EL-MATBOULI & HOFFMANN, 1989). Die Ausscheidung der Triactinomyxon-Sporen kann über einen Zeitraum von einem Jahr anhalten (MARKIW, 1986).

EL-MATBOULI et al. (1995) zeigten den Eintritt der Triactinomyxon-Sporen über das Epithel von Haut und Flossen sowie die Maulhöhle und die Kiemen. Wahrscheinlich werden die Sporen chemotaktisch zu den sekretorischen Öffnungen der Epidermisschleimzellen und zum respiratorischen Epithel der Kiemen geleitet.

Nach Anheftung an vorbeischwimmenden Fischen mit Hilfe der Ausschleuderung der Polfilamente, wird der Amöboidkeim in das Epithel injiziert (EL-MATBOULI et al., 1992).

MANDOK (1993), EL-MATBOULI et al. (1995) und EL-MATBOULI (1996) beschrieben den weiteren Infektionsweg wie folgt:

Die Amöboidkeimzellen, die zunächst interepithelial liegen, wandern in die Epithelzellen ein. Nach mehrmaliger Teilung werden weiterentwickelte Stadien des Parasiten frei und befallen entweder wiederum andere Zellen oder wandern in tiefere Schichten der Dermis und Subcutis ein. Über die peripheren Nervenendigungen gelangen sie in das zentrale Nervensystem ihres Wirts, wo sie erstmals nach 4 Tagen nachweisbar sind. Nach Durchlaufen mehrerer weiterer Entwicklungsstufen können nach 90 Tagen post infectionem fertig ausgebildete *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Knorpelgewebe nachgewiesen werden.

#### 2.2.4 Klinische Symptomatik

Die drei Leitsymptome der Drehkrankheit sind Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie, wirbelartige Drehbewegungen und Deformationen des Wirbel- und Schädel skeletts.

Die eindeutige Klärung der Ursache für die Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie konnte noch nicht erbracht werden. Es wird jedoch angenommen, dass deformierte Knorpelanteile der Wirbelsäule Druck auf die im Sympathikus enthaltenen pigmentomotorischen Nervenzellen ausüben, die die Pigmentzellen des Schwanzes regulieren. Somit kann es durch Irritationen zu Farbänderungen in den kaudalen Körperpartien kommen (SCHÄPERCLAUS, 1990).

Die wirbelartigen Drehbewegungen, die erkrankte Tiere auf Stresssituationen zeigen, waren für die Drehkrankheit namensgebend. PLEHN (1904) und HOFFMAN et al. (1962) machten Knorpel- und Knochenwucherungen im Bereich des Vestibularorgans dafür verantwortlich, konnten aber keinen Zusammenhang zwischen Deformationsgrad und Ausmaß des pathologischen Schwimmverhaltens nachweisen.

Im Gegensatz dazu beobachteten ROSE et al. (2000), dass die Bewegungsmuster von Tieren mit geschädigten Vestibularorganen grundlegend von dem Verhalten drehkranker Fische abwichen. Sie beschrieben zum einen Tiere, die kopfüber auf der Stelle verharren und zum anderen Bewegungsabläufe, die von einer plötzlich eintretenden Starre unterbrochen wurden. Die betroffenen Forellen sanken zu Boden und führten nur noch Atembewegungen aus, bis die Starre nach gewisser Zeit wieder aufgehoben war. Histologisch fanden die Autoren eine ringartige Einengung des Rückenmarkkanals, die durch eine granulomatöse Entzündung hervorgerufen wird. Hier fanden sich degenerierte Faserzüge, Trophozoiten und eine kleine Anzahl an reifen *Myxobolus cerebralis*-Sporen. Die für die Drehkrankheit spezifischen Drehbewegungen werden wie folgt erklärt: Durch eine spontane Bewegung des Fisches wird das Rückenmark an der eingengten Stelle in seiner Position fixiert. Der so entstandene Zug an den im äußeren Bereich liegenden Axonen führt zu einer Flut von aufsteigenden Impulsen, die die retikulospinalen Neuronen aktivieren und somit zu einer erneuten Drehbewegung führen. Die Wiederholung dieser Ereignisse ergibt eine Kettenreaktion mit Drehbewegungen, die nur durch kompetitive Reize oder endogene neurale Ereignisse unterbrochen wird.

Die Deformationen des Schädel- und Wirbelskeletts resultieren aus unregelmäßigen Knorpel-Knochenwucherungen in der Folge einer massiven Vermehrung von Entwicklungsstadien und Bildung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Knorpelgewebe des infizierten Fisches. Die Auflösung der Knorpelstruktur und die Störung der enchondralen Ossifikation führen zu deformierten Schädeln (so genannte Mopsköpfe), missgestalteten Kiefern,

Kiemendeckelverkürzungen und Wirbelsäulenverkrümmungen. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Symptomen sind die Deformationen irreversibel (PLEHN, 1904; SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al., 1962).

Die Bewegungsstörungen und Deformationen führen zu einer verminderten Futteraufnahmefähigkeit. Siechtum und Tod sowie das zum Opfer fallen von Fressfeinden in der freien Natur bestimmen das weitere Schicksal der betroffenen Fische (PLEHN, 1904).

### 2.2.5 Diagnose

Eine Verdachtsdiagnose kann anhand der für die Krankheit relativ typischen Symptome ab Tag 60 post infectionem erfolgen (WOLF & MARKIW, 1975).

Die definitive Diagnose wird durch den Nachweis der *Myxobolus cerebralis*-Sporen gestellt. Es sind hierbei verschiedene Möglichkeiten gegeben:

Bei der routinemäßigen Nativuntersuchung wird ein Stück Knorpel zerkleinert und für die Lichtmikroskopie auf einem Objektträger mit etwas Wasser ausgestrichen (HOFFMAN et al., 1968).

Die Sporen können auch in mit Giemsa oder Methylenblau gefärbten Schnittpräparaten diagnostiziert werden (SCHÄPERCLAUS, 1931).

Eine Sporenanreicherung ist mit der Verdauungsmethode nach MARKIW und WOLF (1974) oder mit der Planktonzentrifugenmethode nach O'GRODNICK (1975) möglich. MARKIW und WOLF (1980) beschrieben eine Kombination beider Methoden.

Die Drehkrankheit kann sowohl durch Sporennachweis mittels indirekter Fluoreszenzantikörpertechnik (IFAT) (WOLF & MARKIW, 1975), als auch mittels serologischen Nachweises der Antikörper mit IFAT (GRIFFIN & DAVIS, 1978) und Immunperoxidasetechnik (HOFFMANN et al., 1991) nachgewiesen werden.

ANDREE et al. (1998) entwickelten eine verschachtelte (nested) PCR zum Nachweis der genomischen DNA von *Myxobolus cerebralis* bereits 2 Stunden nach der Infektion.

Eine in situ-Hybridisierungstechnik erlaubt das Sichtbarmachen der verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten im Gewebe des Fisch- und Oligochaeten-Wirts (ANTONIO, 1998).

### 2.2.6 Differentialdiagnosen

Abnormes Schwimmverhalten und Drehbewegungen treten auch bei Enteritiden (PLEHN, 1904), bei der Infektiösen Pankreasnekrose (IPN) und bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) auf (HALLIDAY, 1973a).

Skelettdeformationen und Schwarzverfärbungen des Schwanzes werden sowohl bei Tryptophan- oder Ascorbinsäuremangel (WOLF et al., 1981), als auch bei der Infektion mit dem Bakterium *Flexibacter psychrophila* beobachtet (MARGOLIS et al, 1996).

HALLIDAY (1973b) beschrieb Skelettdeformationen bei genetischen, nutritiven und haltungsbedingten Mängeln.

Beim Sporennachweis kann es zur Verwechslung mit *Myxobolus kisutchi*, *Myxobolus arcticus* und *Myxobolus insidiosus* kommen. Diese parasitieren zwar nicht im Knorpel, können aber in Gewebsausstrichen bei Nativuntersuchungen durch ihre Lokalisation im Nerven- und Muskelgewebe auch auf dem Objektträger zu finden sein (MARKIW, 1992).

### 2.2.7 Therapie

Die Ausbreitung der Drehkrankheit kann laut SCHÄPERCLAUS (1931) durch radikale Vernichtung und unschädliche Beseitigung aller infizierten Fische eingedämmt werden. Nach WOLF & MARKIW (1982) können betroffene Tiere auch geräuchert und anschließend verpeist werden, da die Sporen diese Behandlung nicht überleben.

Die Bruthäuser und verseuchten Teiche können mit verschiedenen basischen Substanzen behandelt und desinfiziert werden (Branntkalk: 10-15t pro Hektar in Pulverform in Teiche oder auf feuchte Teichböden; Chlorkalk: 200-300mg/l für 12 Stunden; Natronlauge: 2%ige NaOH-Lösung für minimal 40 Sekunden; Dosisangaben nach AMLACHER (1992)) (SCHÄPERCLAUS, 1931; HOFFMAN et al., 1962). Der Teichschlamm soll nach diesen Maßnahmen abtransportiert und der Teich abermals behandelt werden. Die basischen Substanzen bewirken ein Ausschleudern der Polfilamente aus den Polkapseln. Die Sporen verlieren dadurch ihre Infektiosität (PLEHN, 1904; HOFFMAN & HOFFMAN, 1972).

Das endemische Auftreten der Drehkrankheit in einem Betrieb kann also nur durch unschädliche Beseitigung aller infizierten Fische, gründliche Desinfektionsmaßnahmen sowie Wiederaufzucht mit spezifisch pathogenfreien Setzlingen erfolgreich bekämpft werden (NOGA, 1996).

Der Entwicklungszyklus des Parasiten kann durch Entzug der Lebensgrundlage der Tubificiden durch Betonieren der Erdteiche unterbrochen werden. Die Zufuhr von Triactinomyxon-Sporen durch den Zufluss der Anlagen ist allerdings auf diese Weise trotzdem nicht ausgeschlossen. Möglichkeiten zur Reinigung dieses Zuflußwassers mit Hilfe von Filtern und UV-Licht wurden von HOFFMAN (1974, 1975) und HEDRICK et al. (2000) beschrieben.

Untersuchungen mit den Antibiotika Fumagilin und TNP-470 ergaben eine niedrigere Infektionsprävalenz und geringere Sporenanzahlen im Kopfknochen der behandelten Tiere im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten Veränderungen der Schalenzellen sowie der Polkapseln und Amöboidkeime der reifenden Sporen. Die infolge der Behandlung auftretenden Leberveränderungen bei den Fischen waren reversibel (STATON et al., 2002).

### **2.2.8 Die Empfänglichkeit verschiedener Salmoniden gegenüber der Drehkrankheit**

Die Krankheit trat ursprünglich in Europa auf und wurde wahrscheinlich durch den verstärkten internationalen Handel in den 50er Jahren in fast alle Forellen produzierenden Länder verbreitet.

Vor allem in den USA, wo der Fliegenfischtourismus eine große Rolle spielt, entstanden erhebliche wirtschaftliche Defizite. Während die Schäden in den Fischzuchten durch Optimierung der Haltungsbedingungen noch im Rahmen gehalten werden konnten, kam es in den großen Flüssen zu einer starken Dezimierung der dort heimischen Regenbogenforellen.

Nachdem Anfang der 90er Jahre festgestellt wurde, dass die Drehkrankheit für die Dezimierung der Regenbogenforellen-Bestände in Colorado und Montana verantwortlich war, wurde die Whirling Disease Foundation gegründet. Im Rahmen dieser Organisation entstand im Jahre 2001 das Projekt "Resistant Trout", das aus zwei kolaborierenden Forschungsgruppen besteht. Die eine Gruppe arbeitet an der University of California in Davis (USA) und steht unter der Leitung von Prof. Dr. R.P. Hedrick. Die zweite Forschungsgruppe ist an der Ludwig-Maximilians-Universität in München tätig und steht unter der Leitung von Prof. Dr. M. El-Matbouli. Ziel der Whirling Disease Foundation ist es, das Problem der Drehkrankheit in den USA innerhalb eines 10-jährigen Projekts zu entschärfen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zuerst ein Regenbogenforellen-Stamm gesucht, der sich als resistent gegenüber der Erkrankung zeigt. Dieser wenig empfängliche Stamm soll eventuell später in den amerikanischen Gewässern ausgesetzt werden, um die für die Resistenz verantwortlichen

Gene in die dort heimischen Populationen einzukreuzen (WEIS, 2003). Ziel der vorliegenden Arbeit und anderen zukünftigen Studien soll es sein, die Empfänglichkeit von Kreuzungen dieser unempfindlichen mit empfindlichen Stämmen herauszufinden, die Resistenzmechanismen bei diesem unempfindlichen Stamm zu ergründen und die Empfänglichkeit dieses unempfindlichen Stammes gegenüber anderen Erkrankungen zu testen.

Zum Thema der unterschiedlichen Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit sollen im Folgenden wichtige bisherige Arbeiten vorgestellt werden:

HEDRICK et al. (1999a) zeigte erstmals in Laborversuchen, bei denen Fischalter, Fischgröße und Infektionsdosis bekannt waren und andere äußere Einflüsse ausgeschlossen werden konnten, dass die Bachforelle weniger empfänglich für die Drehkrankheit ist als die Regenbogenforelle. So zeigte diese in Europa einheimische Art signifikant geringere klinische Anzeichen und Sporenzahlen im Kopfknochen. Außerdem machten sich die Symptome bei der Bachforelle erst bei höheren Infektionsdosen (ab 1000 *Triactinomyxon*-Sporen) bemerkbar und hatten geringere Ausprägung wie bei der Regenbogenforelle. Die Autoren vermuteten, dass erst die hohen Infektionsdosen das Immunsystem der Bachforelle überwinden können. Unterschiede zur Regenbogenforelle ergaben sich auch darin, dass die Bachforelle zu keinem Zeitpunkt das Symptom „pathologisches Drehverhalten“ zeigte und kein proportionaler Anstieg der Sporenmenge im Kopfknochen im Verhältnis zur Infektionsdosis erkennbar war. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Empfänglichkeit nicht nur Spezies bedingt variiert, sondern auch dass verschiedene Individuen einer Population deutlich unterschiedliche Ausprägungen der Erkrankung nach der Exposition mit *Myxobolus cerebralis*-Sporen aufweisen (MARKIW, 1992).

EL-MATBOULI et al. (1999) führte Expositionsexperimente mit *Triactinomyxon*-Sporen mit verschiedenen nicht-Salmoniden (Goldfisch (*Carassius auratus*), Karpfen (*Cyprinus caprio*), Nase (*Chondrostoma nasus*) und Guppy (*Poecilia reticulata*)) im Vergleich mit der Regenbogenforelle durch. Nur bei der Regenbogenforelle (und bei einem Guppy) wurden histologisch in die Haut penetrierte Parasitenstadien nachgewiesen. Auch der prozentuale Anteil der leeren *Triactinomyxon*-Schalen im Wasser nach der Exposition war bei dieser Spezies signifikant höher (60% im Gegensatz zu 25 bis 32%). Es konnten aber keine morphologischen Veränderungen an den *Triactinomyxon*-Sporen festgestellt werden, wenn sie ausschließlich mit separierten Flossen oder mit Schleim der Regenbogenforellen in Kontakt kamen. Die Autoren vermuten deshalb, dass sowohl mechanische als auch chemische Reize eine Rolle bei der Spezifität der Infektion spielen.

HEDRICK et al. (1999b) verglichen 4 verschiedene Salmonidenspezies auf ihre Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit. Sie infizierten die Regenbogenforelle (*Onchorhynchus myciss*), die Stierforelle (*Salvelinus confluentus*), den Saibling (*Thymallus arcticus*) und zwei verschiedene Cutthroat Forellen (*O. clarki bouvieri* und *O. clarki lewisi*) mit zwei unterschiedlichen Infektionsdosen (100-200 und 1000-2000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch). Die Regenbogenforelle erwies sich als am empfindlichsten, aber auch die Cutthroat-Forellen und die Stierforelle waren empfänglich. Hingegen zeigte sich der Saibling in diesen Versuchen resistent gegenüber der Infektion..

DENSMORE et al. (2001) bewiesen erstmals in Labor- und Feldversuchen die unterschiedliche Empfänglichkeit von verschiedenen Regenbogenforellenstämmen und Stahlkopfforellen. Beim Feldversuch waren keinerlei klinische Anzeichen zu entdecken. Beim Laborversuch hingegen überwogen beim Regenbogenforellenstamm „Mt. Lassen“ die Symptome „pathologisches Drehverhalten“ und „Deformationen“ und beim Stamm „Cayuga-Lake“ die „Schwarzfärbungen der Kaudalpartien“. Ein besonders deutlicher Unterschied zwischen Stahlkopf- und Regenbogenforelle war in der Histologie des Kopfkorpels zu entdecken. So zeigten beide Regenbogenforellenstämme selbst bei niedrigen Infektionsdosen noch leichte bis deutliche Veränderungen, während die Stahlkopfforelle keine Anzeichen einer Entzündung erkennen ließ. Die Autoren begründen den größeren Unterschied bei den geringeren Infektionsdosen damit, dass bei resistenteren Arten die Immunantwort gegen eine geringe Anzahl von Erregern ausreicht eine Erkrankung abzuwehren, während bei hohen Dosen diese begrenzte Immunität zusammenbricht.

In neueren Untersuchungen zeigte KÜPPERS (2003) in Feld- und Laborversuchen die unterschiedlichen Empfänglichkeiten verschiedener Regenbogenforellenstämme im Vergleich mit der Bachforelle. Nach Infektion mit 10, 100, 1000 und 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch erwiesen sich 3 deutschen Stämme und im besonderem Maße der deutsche Zuchtstamm Ho als sehr widerstandsfähig. Die Autorin schätzte die Resistenzlage der deutschen Regenbogenforellenstämme als ähnlich gut wie bei der Bachforelle ein, während sich der amerikanische Stamm TL als hoch empfänglich erwies. Auch in Zusammenarbeit mit der University of California Davis konnte gezeigt werden, dass der amerikanische Stamm TL viel empfänglicher ist als der deutsche Stamm Ho. Beide Stämme wurden zu den Tagesgradaltern von 570 und 999 jeweils mit 10, 100, 1000, und 10000 Triactinomyxon-Sporen infiziert. Die Tiere wurden dann im Verlauf der ersten 5 Monate nach der Infektion auf klinische Anzeichen der Erkrankung beobachtet. Nach diesem Zeitraum wurde die Prävalenz der Infektion, die Sporenmenge im Kopfkorpel und die Schwere der

histologischen Veränderungen im Kopfknochen bestimmt und zwischen den beiden Stämmen verglichen. Neben schwereren klinischen Anzeichen der Erkrankung, einer höheren Infektionsprävalenz und schwereren histologischen Veränderungen, wurden beim amerikanischen Stamm TL bis zu 100mal höhere Sporenzahlen diagnostiziert wie beim deutschen Stamm (HEDRICK et al., 2003).

Beim Aussetzen eines Stamms in ein neues Ökosystem werden auch unvermeidlich Kreuzungen mit den dort heimischen Tieren stattfinden. Es ist somit wichtig die Resistenzlage solcher Kreuzungen von hoch und wenig empfänglichen Stämmen zu untersuchen (siehe vorliegende Arbeit). Außerdem muss untersucht werden, ob die auszusetzenden Regenbogenforellen vielleicht empfänglicher für andere Krankheiten sind. Unter der Leitung der Whirling Disease Foundation laufen momentan Arbeiten, die sich mit dieser Thematik beschäftigen. Da die reduzierte Genvielfalt eines Zuchtstamms (Stamm Ho) die Überlebensfähigkeit in der freien Natur einschränkt (BEHNKE, 2002), ist man momentan auf der Suche nach einem Wildstamm, der sich als ähnlich resistent gegenüber der Drehkrankheit erweist wie der Zuchtstamm Ho (siehe Wildstamm S aus der vorliegenden Arbeit). Des Weiteren sollen die Resistenzmechanismen bei der Drehkrankheit erforscht werden.

Eine Übersicht über das Vorkommen der Drehkrankheit bei verschiedenen Salmonidenarten ist in Tabelle 2 dargestellt. Dabei sind die jeweiligen Salmonidenarten in absteigender Reihenfolge ihrer Empfänglichkeit aufgelistet.

### **2.2.9 Die Erbllichkeit der Krankheitsresistenz bei Fischen**

Nach FJALESTAD et al. (1993) besteht ein großes Interesse die natürliche Krankheitsresistenz von Fischen in Fischzuchten zu erhöhen. Krankheitsausbrüche vermindern die Profitabilität der Betriebe. Somit ist es erstrebenswert, den Ausbruch von Krankheiten durch hohe Futterqualität, Vakzinen und Antibiotika zu minimieren. Jedoch muss bei letzterem beachtet werden, dass sich zunehmend Resistenzen entwickeln und Rückstände in den als Lebensmittel verwendeten Tieren und im Gewässer zurückbleiben. So können diese oben genannten Möglichkeiten nur schwer zu einer langfristigen Lösung des Problems führen. So bleibt als effektive Bekämpfungsmaßnahme vor allem die Entwicklung von natürlichen Krankheitsresistenzen. Bei den künstlichen Lebensbedingungen in Fischzuchten ist die direkte Selektion für bessere Überlebensfähigkeit der Fische aber nur gering. Die Messung der Krankheitsresistenz kann nach Meinung der Autoren auf 3

verschiedene Weisen erfolgen: 1) Die Selektion nach verbesserte Überlebensrate wird vor allem bei großen Populationen verwendet. Sie wird aber sehr durch andere Faktoren, wie andere Pathogene oder verschiedene Managementprobleme beeinflusst. 2) Laborinfektionsversuche werden mit kleineren Gruppengrößen durchgeführt und finden unter konstanten Bedingungen statt. Durch die Unterschiede zu den Bedingungen in der freien Natur ist die Effektivität dieser Versuche aber reduziert. 3) Als dritte Möglichkeit kann durch Messung von immunologischen Parametern wie Kortison, Lysozym, Transferrin, Antikörpern oder anderen erfolgen. Der Wert dieser Messungen in Zuchtprogrammen hängt von deren Erbllichkeit und der genetischen Korrelation zur Überlebensfähigkeit der Tiere ab. So zeigten Regenbogenforellen, die eine geringere Kortisonausschüttung auf Stressreize hatten, eine höhere Überlebensfähigkeit nach einer Konfrontation mit der Furunkulose (FEVOLDEN et al., 1992). CIPRIANO & HEARTWELL (1986) selektierten Bachforellen eine Generation nach hohen Werten von Hautschleimpräzipitinen gegen *Aeromonas salmonicida* und produzierten auf diese Weise Nachkommen, die resistenter gegen die Furunkulose waren.

Infektionsversuche mit verschiedenen Pathogenen zeigten signifikante genetische Variation bei der Sterblichkeitsrate zwischen verschiedenen Familien. Eine Verbesserung der Überlebensfähigkeit durch gezielte Zucht ist also möglich. Außerdem wurden in verschiedenen Studien Zusammenhänge zwischen der Wachstumsrate und der Überlebensfähigkeit bemerkt. Dies könnte nach FJALESTAD et al. (1993) damit zusammenhängen, dass die künstliche Zucht nach Wachstumsraten Fische hervorbringt, die dem Leben in Gefangenschaft besser angepasst und weniger stressempfindlich sind. So schätzten RYE et al. (1990) den genetischen Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Überlebensfähigkeit beim Atlantischen Lachs und bei der Regenbogenforelle auf 0,37 und 0,23. Auch GJEDREM et al. (1991) schätzten die genetische Korrelation dieser beiden Parameter bei der Furunkulose auf 0,3 ein. Wenn man also nach erhöhtem Wachstum selektiert, ist nach Meinung der Autoren auch eventuell eine bessere Überlebensfähigkeit gegeben. Auch signifikante Variationen bei immunologischen Parametern wurden gefunden. Aber man muss noch mehr über die Zusammenhänge dieser Parameter mit der Sterblichkeitsrate herausfinden, um eine indirekte Selektion realisieren zu können.

Es kann in Zukunft eventuell von Interesse sein, resistente Linien gegen bestimmte Krankheiten zu erzeugen und anschließend zu kreuzen, um Hybriden zu produzieren. So zeigten Kreuzungen zwischen verschiedenen Stämmen beim Karpfen Heterosis-Effekte für das Überleben (HINES et al., 1974). Kreuzungen bei Salmoniden gaben verschiedene Ergebnisse (KLUPP, 1979; AYLES & BAKER, 1983), so dass es nicht möglich ist die

Überlebensfähigkeit von Kreuzungen vorauszusagen. Es kann also keine generelle Antwort gegeben werden, ob Kreuzungen in Fischzuchten verwendet werden sollten, um die Überlebensrate zu steigern. So zeigten CHEVASSUS & DORSON (1990) zwar eine erhöhte Resistenz gegen bestimmte Krankheiten bei bestimmten Kreuzungen, aber die geringe Überlebensfähigkeit dieser Hybriden machten sie wenig interessant für die kommerzielle Zucht.

Die Autoren FJALESTAD et al. (1993) folgerten aus dem oben gesagten, dass die Selektion der beste Weg ist, die natürliche Resistenz bei Fischen zu erhöhen. Die Selektion sollte nach der Überlebensrate der verschiedenen Stämme erfolgen. Studien nach den Resistenzmechanismen sollen folgen, um das Basiswissen zu erhöhen und Faktoren zu finden, die mit der Resistenzlage korrelieren. Somit wäre es auch möglich eine indirekte Selektion nach diesen Faktoren durchzuführen. Die Gene, die für die Resistenzen gegen bestimmte Krankheiten verantwortlich sind, sind bis jetzt noch nicht identifiziert. Die Gentechnik wird es in Zukunft vielleicht erlauben, die Gene zu isolieren, die die Krankheitsresistenz regulieren (FJALESTAD et al., 1993).

IBARRA et al. (1994) untersuchten einen hochempfindlichen, einen wenig empfänglichen Regenbogenforellen-Stamm, die F1- und F2 -Generationen und die Rückkreuzung mit den Elternstämmen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion mit dem Parasiten *Ceratomyxa shasta*. Nach einer kurzen und einer langen Expositionszeit (7 beziehungsweise 120 Tage) wurden keine einfachen Mendel'schen Gesetze der Vererbung der Sterblichkeitsrate und der durchschnittlichen Zeit bis zum Tod gefunden. Dies ließ vermuten, dass beide Parameter von mehreren Genorten bestimmt werden. Die beiden Kreuzungen F1 und F2 lagen in der Empfänglichkeit in der Mitte ihrer Elternstämmen und die Rückkreuzungen lagen wiederum in der Mitte zwischen den F1- und F2-Generationen und der zugehörigen Elternstämmen. Der hoch empfindliche Regenbogenforellen-Stamm *Mt. Shasta* erkrankte nach der Infektion akut, während sich die Krankheit bei dem wenig empfindlichen Stamm *Pit River* chronisch entwickelte. Auch hier lagen die Kreuzungen wiederum in der Mitte zwischen den Elternstämmen. So entwickelten die F1- und F2-Generationen einen subakuten bis chronischen Krankheitsverlauf. Die Analysen der genetischen Komponenten beider gemessener Faktoren zeigten signifikante additive, dominante und digenetische Effekte sowie eine Dominanz der Allele des Stamms *Pit River* über die Allele des Stamms *Mt. Shasta*.

Laut BARTHOLOMEW (1998) gibt es bei der Empfänglichkeit der Salmoniden gegenüber einer Infektion mit *Ceratomyxa shasta* interspezifische und intraspezifische Unterschiede. Infektionen bei der Regenbogenforelle verlaufen schwer, während die Bachforelle nur leicht erkrankt. Aber auch zwischen verschiedenen Stämmen gibt es Unterschiede in der Empfänglichkeit (SCHAFER, 1968). So fanden ZINN et al. (1977) heraus, dass Stämme in Gegenden, wo die Ceratomyxose natürlich vorkommt geringere Mortalität (13%) nach einer artifiziellen Infektion zeigen als Stämme in Gegenden ohne natürliches Vorkommen (88-100%). Auch die Erbllichkeit der Resistenz gegenüber *C. shasta* wurde bei der Regenbogenforelle schon gezeigt. Hierbei erwiesen sich die Nachkommen von resistenten und empfänglichen Elternstämmen als intermediär in ihrer Empfänglichkeit. Hierbei war der Beitrag der männlichen und weiblichen Eltern für die Empfänglichkeit der Nachkommen jeweils gleich (IBARRA et al., 1992, 1994).

BEACHAM & EVELYN (1992) untersuchten die genetische Variation der Sterblichkeit und der mittleren Zeit bis zum Tod bei 3 verschiedenen Populationen von Chinook Salmoniden (*Oncorhynchus tshawytscha*) nach Infektion mit den Erregern der Vibriose (*Vibrio anguillarum*), der Furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) und der Bakteriellen Nierenerkrankung (*Renibacterium salmoninarum*). In jeder Population wurden die Nachkommen von 10 Männchen und 20 Weibchen auf ihre Empfänglichkeit bezüglich dieser Infektionen untersucht. Die Erbllichkeit der Mortalität wurde bei der Vibriose auf 0,00, bei der Furunkulose auf 0,00-0,34 und bei der Bakteriellen Nierenerkrankung auf 0,00-0,38 geschätzt, während die Erbllichkeit der mittleren Zeit bis zum Tod bei der Vibriose 0,00, bei der Furunkulose 0,00-0,02 und bei der Bakteriellen Nierenerkrankung 0,06-0,50 betrug. Bei der Erbllichkeit der Mortalität wurden maternale Effekte in 6 von 9 Schätzungen gefunden. Diese Resultate zeigen, dass vielleicht schon die Eier Faktoren beinhalten, die ein gewisses Maß an Krankheitsresistenz an die jungen Fische übertragen. Von den 3 verschiedenen Populationen erwies sich der Kitimat River Chinook Salmonide als am unempfindlichsten. Die Autoren vermuteten bei diesen Tieren ein nichtspezifisches Immunsystem, das den beiden anderen Populationen überlegen ist.

DORSON et al. (1995) initiierten ein Selektionsprogramm für die Resistenz gegen das VHS-Virus bei Regenbogen-Forellen. Hierbei wurden über drei Jahre die Nachkommen von verschiedenen Männchen mit einer VHS-Infektion konfrontiert. Die Mortalität reichte zu Beginn des Experiments zwischen 30% und 95%. Die 14 Männchen des Versuchsbeginns

wurden nach der Sterblichkeit ihrer Nachkommen sortiert. Die Erbllichkeit der Resistenz wurde auf  $0,63 \pm 0,26$  geschätzt. Aus den wenigsten empfindlichen Individuen wurden die folgenden Generationen weitergezüchtet. Dabei verbesserte sich die mittlere Resistenz gegenüber der Erkrankung. So war die Mortalität einiger weiblichen Nachkommen dieses Zuchtprogramms mit 0 bis 10% relativ gering, während die Kontrollfische zu 70 bis 90% verendeten. Auch die mittels Gynogenese entwickelten Nachkommen dieser oben erwähnten Weibchen zeigten eine Sterblichkeitsrate von unter 10%. Bei weiteren Infektionsversuchen wurden die Nachkommen des unempfindlichsten Männchens des ersten Versuchs mit anderen Nachkommen dieses Männchens gekreuzt. Hierbei lag die Sterblichkeit nach einer VHS-Infektion bei 21%, während die Mortalität der Kreuzungen aus Nachkommen dieses wenig empfindlichen Männchens mit empfindlichen Fischen bei knapp 40% lag. Kreuzungen, bei denen beide Elternteile als empfänglich galten, hatten im Vergleich eine Sterblichkeitsrate von 81,7%. So konnten die Autoren mit dieser Arbeit den starken genetischen Einfluss der Resistenz bei einer VHS-Infektion zeigen. Dies steht auch im Einklang mit anderen Arbeiten bei Salmoniden, bei denen eine starke genetische Variation der Resistenz gegen VHS beschrieben wurde (KAASTRUP et al., 1991). Die Erbllichkeit für die Resistenz wurde somit in den Arbeiten von DORSON et al. (1995) und KAASTRUP et al. (1991) sehr viel höher eingeschätzt, als in vorigen Studien. Dies könnte nach Meinung der Autoren ein viel versprechender Ansatz für zukünftige Zuchtprogramme sein. Außerdem wurde in letztgenannter Studie die wichtige Rolle der oberflächlichen Gewebe bei der Abwehr einer VHS-Infektion gezeigt. So vermehrten sich die Viren in den Flossen der resistenten Fische weit weniger als in den Flossen der empfänglichen.

GJEDREM et al. (1991) führten Untersuchungen mit der Furunkulose beim Atlantischen Lachs durch, die damals eine der schwersten Erkrankungen bei Salmoniden in Norwegen darstellte. Ein Einsatz von Antibiotika war nicht wünschenswert und Vakzinen lieferten keinen effektiven Schutz. Das Ziel ihrer Studie war es, die Größe des Einflusses der genetischen Variation auf die Sterblichkeitsrate nach einer experimentell ausgelösten Furunkulose-Erkrankung herauszufinden. Sie infizierten insgesamt 5000 über ein Jahr alte Fische per intraperitonealer Injektion mit *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. Die Tiere wurden individuell markiert und während des Versuchs gemeinsam in einer großen Tonne gehalten. Nach 11 Tagen post infectionem starben die ersten Fische und die höchste Todesrate war am Tag 12 bis 22 nach der Injektion zu erkennen. Hierbei zeigte sich eine Mortalität von 69%, wobei jeweils große Unterschiede zwischen den verschiedenen Familien zu erkennen

waren. Die Erbllichkeit der Sterblichkeitsrate war hoch und wurde auf 0,48 und 0,32 geschätzt. Die Autoren folgerten aus den Ergebnissen der hohen Erbllichkeit und der großen phänotypischen Varianz, dass das Problem der Furunkulose effektiv durch Zuchtprogramme verbessert werden kann. Die Frage nach den verantwortlichen Mechanismen für die genetischen Unterschiede in der Empfänglichkeit konnte in dieser Studie aber nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse stimmen auch mit den frühen Arbeiten von EMBODY & HAYFORD (1925) überein, die die Überlebensrate bei einer Population mit Furunkulose von 2% auf 69% innerhalb von 3 Generationen steigerten.

QUILLET et al. (2001) untersuchten in einer Studie die Virusreplikation des VHS-Virus im Flossengewebe von Regenbogenforellen als ein mögliches Kriterium, um die Resistenz von Gruppen oder Individuen vorauszusagen. Die Empfänglichkeit der Versuchsfische reichte von extrem empfindlich bis zu total resistent gegenüber einer VHS-Infektion. Hoch signifikante Übereinstimmungen zwischen der Virusreplikation und der Überlebensfähigkeit nach Kontakt zum VHS-Virus wurden gefunden. Bei einem weiteren Versuch, bei dem die Versuchstiere individuell markiert wurden, stellte sich heraus, dass der mittlere VHS-Replikationswert bei den resistenteren Fischen geringer war als bei den empfänglichen. Als die Autoren Klone für die Experimente einsetzten, wurde eine sehr hohe Korrelation zwischen der Überlebensfähigkeit und der Virusreplikation gefunden ( $R=0,96$ ). Dies war in der Literatur der erste Beweis einer starken Beziehung zwischen der Resistenz der Fische und anderen Faktoren. Außerdem zeigten die Autoren mit ihren Versuchen die Wichtigkeit der oberflächlichen Gewebe bei der Abwehr von Pathogenen. Obwohl diese Versuche unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt wurden und nur bedingt auf die freie Natur übertragbar sind, brachten die Autoren hiermit neues Licht in die Suche nach den verantwortlichen Resistenzmechanismen. Genanalysen der verschiedenen Gruppen, die in den Experimenten eingesetzt wurden, zeigten, dass das Ausmaß der Virusreplikation zu einem großen Teil genetisch festgelegt ist. Diese Ergebnisse ermutigen, dass das Problem der VHS vielleicht durch gezielte Zucht und Selektion verbessert werden kann.

### **2.3 Faktoren, die die Empfänglichkeit eines mit *Myxobolus cerebralis* infizierten Fisches beeinflussen können**

Die Ausprägung der Drehkrankheit beim Salmonidenwirt hängt im hohen Maße von verschiedenen Faktoren wie Fischalter, Fischart, Infektionsdruck und Umweltstressoren ab.

Schon SCHÄPERCLAUS (1931) beschrieb die starke Abhängigkeit der Empfänglichkeit des betroffenen Fisches vom Alter. Bei jungen Fischen ist der Knorpelanteil am Skelett viel höher als bei älteren Tieren, bei denen nach dem Ossifikationsprozess weniger Zielgewebe für den Parasiten zur Verfügung steht.

Auch zum späteren Zeitpunkt der Verknöcherung können die Parasiten noch Skelettdeformationen hervorrufen, die aber bei weitem nicht das Ausmaß erreichen wie bei Jungfischen. Man geht davon aus, dass sich etwa ab dem 6. Lebensmonat keine klinischen Anzeichen der Erkrankung mehr manifestieren (HALLIDAY, 1976).

Trotzdem kann eine Ausbreitung der Sporen durch diese symptomlosen Träger erfolgen (EL-MATBOULI et al., 1992).

Die Ausprägung der Drehkrankheit ist auch in starkem Maße vom Fischwirt abhängig. Nach einer Infektion mit *Myxobolus cerebralis* erkranken nahezu alle Salmoniden. Vergleichende Untersuchungen an Bach- und Regenbogenforellen aber zeigten, dass die Regenbogenforelle am stärksten befallen wird, während sich die Bachforelle (*Salmo trutta*) als relativ resistent erwiesen hat (HOFER, 1903; HOFFMAN & PUTZ, 1969).

Auch HOFFMAN et al. (1962) beschrieben eine Widerstandsfähigkeit der Bachforelle nach Exposition mit dem Parasiten. Die Autoren konnten bei dieser in Europa einheimischen Fischart zwar die Infektion nachweisen, die Tiere zeigten jedoch keine klinischen Anzeichen der Erkrankung.

Die Bachforelle wird deswegen als natürlicher Wirt und Träger des Parasiten angesehen und stellt somit ein Erregerreservoir dar (HOFFMAN, 1970).

HALLIDAY (1976) und O'GRODNICK (1979) zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Bachforelle nach Infektion mit der Drehkrankheit weniger Sporen produziert als die Regenbogenforelle.

Im Gegensatz dazu beschreiben neuere Untersuchungen im Westen der USA und in Deutschland Bachforellen, die die Symptome „Schwarzfärbungen der Kaudalpartien“ und

„Deformationen“ aufweisen (NEHRING, Colorado Division of Wildlife, MONTROSE, nicht publiziert; M. EL-MATBOULI, pers. Beobachtungen).

Weiteres siehe Kapitel 2.2.8.

**Tabelle 2:** Vorkommen der Drehkrankheit bei verschiedenen Salmonidenarten in absteigender Reihenfolge ihrer Empfänglichkeit nach O'GRODNICK (1979)

<b>Salmonidenart</b>	<b>Ursprung</b>
Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Pazifisches Becken
Huchen ( <i>Hucho hucho</i> )	Europa
Rotlachs ( <i>Oncorhynchus nerka</i> )	Pazifisches Becken
Bachsaibling ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )	Nordamerika
Königslachs ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )	Pazifisches Becken
Atlantischer Lachs ( <i>Salmo salar</i> )	Atlantik
Bachforelle ( <i>Salmo trutta</i> )	Eurasien
Silberlachs ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	Pazifisches Becken
Amerikanische Seeforelle ( <i>Salvelinus namaycush</i> )	Nordamerika

RYCE et al. (1998) beschrieben in ihren Untersuchungen eine Abhängigkeit zwischen Ausprägung der Drehkrankheit und Infektionsdosis. So entwickelten mit 1000 und 10000 Triactinomyxon-Sporen infizierte Forellen nach 6 bzw. 5 Wochen erste klinische Symptome, während die Tiere, die mit 100 Sporen infiziert worden waren, erst ab 7 Wochen auffällig wurden.

Fische sind sowohl unter natürlichen als auch unter künstlichen Haltungsbedingungen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, die Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung haben können. So spielen in der freien Natur vor allem Temperaturschwankungen und endogene Rhythmen wie das Laichen und das Abwandern der Salmoniden ins Meer eine Rolle. ANDERSON (1990) titulierte diese Faktoren als „natürliche Stressoren“.

ADAMS (1990) definierte akute Stressoren als einzelne oder mehrfache Exposition auf einen Reiz, während chronischer Stress eine Reaktion auf immer wiederkehrende, meist milde Ereignisse sei.

Akuter Stress tritt laut PICKERING et al. (1982) und FLOS et al. (1988) beim Umsetzen und Sortieren der Fische auf („handling stress“).

Chronischer Stress kommt häufig vor. Beispiele sind die Haltung bei schlechter Wasserqualität oder Überbesatz bei Tieren in Gefangenschaft. Folge solcher unzureichenden Lebensbedingungen sind erhöhte Kortisolwerte im Blut und daraus resultierende höhere Krankheitsanfälligkeit der Tiere (BOLLARD et al. 1993).

### **2.4 Die Haut als entscheidende Abwehrbarriere**

Wie aus den vorigen Kapiteln ersichtlich wird, weiß man zwar, dass es Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion gibt. Die Mechanismen, die dazu führen, sind allerdings noch weitgehend unbekannt. In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Faktoren, die bisher bei der Drehkrankheit bekannt sind besprochen. Untersuchungen, die zu diesem Thema bei anderen Krankheiten gemacht wurden, werden vorgestellt.

*Myxobolus cerebralis*, der Erreger der Drehkrankheit, wandert im Verlauf der Infektion des Salmonidenwirtes durch 3 verschiedene Gewebearten. Die Penetration der Triactinomyxon-Sporen erfolgt durch die Epidermis und das Kiemenepithel. In der Haut werden nur die ersten 2 Tage nach der Infektion Parasitenstadien gefunden. Diese wandern über die peripheren Nervenendigungen ins zentrale Nervensystem ab und können ab dem 20. Tag post infectionem im Knorpel des befallenen Fisches gefunden werden (EL-MATBOULI et al., 1995).

Im Folgenden werden die bisher bekannten Immunvorgänge der Haut, des Nerven-, und des Knorpelgewebes bei einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion vorgestellt.

#### **2.4.1 Haut**

Nach bisherigen Erkenntnissen stellt die Haut eine sehr wichtige Abwehrbarriere im Kampf gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern dar. Hierbei spielen sowohl immunologische Faktoren als auch die reine mechanische Abwehr eine Rolle (ANDERSON, 1974).

Schon die den Körper umhüllende, auf der Epidermis liegende Schleimschicht ist von großer Bedeutung. Durch die fortlaufende Produktion werden Zelltrümmer und Mikroorganismen von der Haut der Fische nach außen abtransportiert und dadurch abgewaschen. Auf diese Weise wird eine Anhaftung von Pathogenen erschwert. Es wird außerdem ein für Mikroorganismen ungünstiger pH-Wert des Schleims diskutiert (ANDERSON, 1974).

NILSON (1995) berichtete über eine Steigerung der Mukusproduktion als Reaktion auf chemische und physikalische Reize.

Es wurden von verschiedenen Autoren antimikrobiell wirksame Substanzen im Hautschleim von Fischen gefunden. So fanden FLETCHER und WHITE (1973) das Lysozym und HARRELL et al. (1976) Komplementfaktoren und akute Phase Proteine.

BRAUN et al. (1990) fanden beim Lachs (*Salmo salar L.*) Schleim sezernierende, dorsale Epithelzellen, die zur Unterstützung der unspezifischen Abwehr Trypsin enthalten.

INGRAM (1980) beschrieb eine erhöhte Hautschleimproduktion nach Stresssituationen.

Untersuchungen bei Ingern (*Eptatretus stoutii*) zeigten, dass zwei verschiedene Zelltypen nach Stresssituationen rupturieren und auf folgende Weise den Schleim erzeugen: Die aus den Fadendrüsenzellen freigesetzten Fäden entrollen sich und aggregieren mit den mucinhaltigen Substanzen aus den Vesikeln der Schleimdrüsenzellen. Die Aufgabe der Fäden besteht in der Modulation des Wassergehalts und der Viskosität des Schleims. Sie sichern gleichzeitig die Anhaftung an der Fischhaut (KOCH et al., 1991).

AL-HASSAN et al. (1986) beschrieben, dass sich der Kreuzwels (*Arius thalassinus*) bei Bedrohung oder Verletzung mit einer dicken Schicht proteinreichen Schleims umgibt, der sich vom in normalen Situationen produzierten Schleim deutlich in der Zusammensetzung unterscheidet. Dieser besondere Schleim verkürzt die Heilungsdauer von Hautwunden von Säugern um bis zu 60%. Außerdem wird die Blutgerinnung sowie die Hämolyse und Agglutination von Erythrozyten beschleunigt. Die Autoren beschrieben auch eine Vasokonstriktion.

Außer der Schleimschicht sind der geringe Verhornungsgrad und die Existenz vieler verschiedener Zelltypen charakteristisch für die Fischhaut. Die meisten der höheren Fische besitzen Schuppen, die die Haut vor äußeren Einflüssen schützen. Zwischen den Epidermiszellen kann man Makrophagen, die häufig Melaningranula enthalten, und neutrophile und eosinophile Granulozyten finden (ANDERSON, 1974; COOPER et al., 1990).

Untersuchungen bei Japan-Karpfen (*Oryzias latipes*) zeigten, dass nach Hautverletzungen eine verstärkte Wanderung von Leukozyten stattfand. Nach Entfernung einer Schuppe wurde

diese mit Tusche markiert und reimplantiert. Darauf wurden kohlenstoffbeladene Makrophagen beobachtet, die über die Hautoberfläche abgestoßen wurden (NAKAMURA et al., 1992).

Bei ähnlichen Untersuchungen von Sommerflundern (*Paralichthys olivaceus*) schlossen sich die eingewanderten Leukozyten zu Riesenzellen zusammen. KIKUCHI et al. (1990) vermuteten deswegen eine aktive Rolle der Haut bei der Elimination von Fremdkörpern.

In vitro-Untersuchungen zum Wanderungsverhalten der Epithelzellen von Salmoniden und ihrer Phagozytosefähigkeit lassen vermuten, dass diese Zellen aktiv am Prozess der Wundheilung teilnehmen und an der Lysis von Mikroorganismen teilnehmen (ÅSBAKK & DALMO, 1997).

NAKANISHI & OTOTAKE (1997) zeigten, dass die Antigenaufnahme in der Haut durch Makrophagen und Epithelzellen vor allem zelluläre Abwehrmechanismen stimuliert.

PELETEIRO & RICHARDS (1990) fanden in der Haut von Regenbogenforellen Zellen, die Phagosomen und Melanin enthielten und zur Phagozytose fähig waren. Sie konnten allerdings keine granulohaltigen, dentritenartig verzweigten Zellen finden, die den Langerhans-Zellen des Menschen entsprechen. Ihre Funktion besteht im Antigen-Trapping und Antigen-Presenting.

Bei der Drehkrankheit wurden bisher vor allem intrazellulär degenerierte Parasitenstadien gefunden. Dies spricht für eine Aufnahme durch zur Phagozytose befähigte Zellen und einem nachfolgenden enzymatischen Verdau (EL-MATBOULI et al., 1995). Es konnte jedoch keine Anhäufung solcher Zellen nach dem Eindringen der Amöboidkeime beobachtet werden (DEMMELE, 1999).

AMLACHER (1992) konnte neben den zellulären Abwehrmechanismen der Haut auch humorale Faktoren finden. Er entdeckte im Hautschleim, im Darmschleim und im Blut dem Ig-M der Säuger ähnliche Antikörper. Ob sie die Phagozytose bei der Drehkrankheit durch Opsonisierung verstärken können, ist momentan aber noch unklar.

EL-MATBOULI (persönliche Mitteilung) postuliert, dass die Entscheidung über die Manifestation einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion bereits in den frühen Hautphasen der Erkrankung fällt. Er vermutet einen Unterschied in der immunologischen Kompetenz dieses Gewebes bei resistenten und nicht resistenten Arten.

### **2.4.2 Nerv**

Schon ab dem 4. Tag nach der Infektion mit den *Triactinomyxon*-Sporen können erste Parasitenstadien im Nervengewebe festgestellt werden. Zwischen dem 6. und 14. Tag befinden sich die meisten Parasiten im Rückenmark, später im Verlauf der Infektion dann im Gehirn und den Kopfganglien (EL-MATBOULI et al., 1995). Das frühe Erscheinen des Parasiten im Nervengewebe weist auf einen ausgesprochenen Neurotropismus hin. Hierdurch wird nicht nur der kürzeste Weg zum Zielgewebe verfolgt, sondern auch die Flucht vor dem Immunsystem des Wirts spielt hier wohl eine wesentliche Rolle. Dieses Phänomen ist auch bei Herpes- und Rhabdovirusinfektionen der Säuger zu beobachten.

EL-MATBOULI und HOFFMANN (1993) konnten keine Immunreaktionen oder Entzündungsvorgänge im Nervengewebe der infizierten Regenbogenforelle feststellen.

HEDRICK et al. (1999a) fanden auch keine Immunreaktionen bei der Regenbogenforelle, hingegen zeigten sie bei späteren Untersuchungen Infiltrationen von eosinophilen Granulozyten ins Nervengewebe bei Bachforellen.

Über die Aufgabe der eosinophilen Granulozyten im Nervengewebe von Fischen ist bis heute nicht viel bekannt. Sie wurden bisher bei akuten Entzündungen von Darm und Kiemen angetroffen (POWELL et al. 1991, HOLLAND & ROWLEY 1998).

EL-MATBOULI (1996) schrieb diesen Zellen bei der Drehkrankheit eine Sporenanzahl limitierende Funktion zu.

### **2.4.3 Knorpel**

Ab dem 20. Tag nach der Infektion können die ersten Parasitenstadien im Knorpel festgestellt werden. Sie führen durch ihre vegetative Vermehrung schnell zu einer Auflösung der Knorpeltextur (HOFFMAN et al., 1962).

Nach HALLIDAY (1974) kommen zwei Mechanismen für die Knorpelerosion in Frage: Zum einen machte er Enzyme des Parasiten für diese Veränderungen verantwortlich. Bei dieser Form ist der Knorpel um das membranöse Labyrinth weitgehend zerstört und es finden sich neben Mengen degenerierten Knorpels Granulationsgewebe und zahlreiche Sporen. Zum anderen beschrieb er eine überschießende Entzündungsreaktion des Wirts, die für die Nekrose des Knorpels verantwortlich sein soll. In diesen Entzündungsherden finden sich vor allem Trophozoiten und Sporoblasten.

HEDRICK et al. (1999a) beobachteten, dass bei den relativ resistenten Bachforellen weniger Parasiten das Sporenstadium erreichten als bei den hoch empfindlichen Regenbogenforellen. Dieser Unterschied verstärkt sich bei höheren Infektionsdosen. Ein proportionaler Zusammenhang zwischen Sporenanzahl und Ausprägung der Knorpelläsion impliziert, dass die granulomatöse Entzündungsreaktion der Regenbogenforelle weniger effektiv in der Lage ist, die Vermehrung des Parasiten einzudämmen.

EL-MATBOULI (persönliche Mitteilung) vermutet, dass die Erkrankung nach Erreichen des Knorpels durch die Parasitenstadien schon manifestiert ist. Eine Einflussnahme durch das Immunsystem des Wirts auf den weiteren Verlauf der Erkrankung sei deswegen zu diesem Zeitpunkt nur noch begrenzt möglich. Die Immunmechanismen, die resistente Arten von den empfänglichen unterscheiden, müssten seiner Meinung nach also eher früher im Verlauf der Infektion greifen.

## **2.5 Die Rolle des unspezifischen Immunsystems bei der Abwehr einer Infektionskrankheit**

Das Immunsystem der Fische besteht aus einem spezifischen und einem unspezifischen Teil. Um die Problematik der Resistenzmechanismen weiter zu beleuchten, werden in den nachfolgenden Kapiteln verschiedene Bestandteile des unspezifischen Immunsystems beim Fisch vorgestellt. Hier werden insbesondere die jeweiligen Leistungen bei der Abwehr unterschiedlicher Erkrankungen besprochen. Das spezifische Immunsystem spielt in diesem Zusammenhang bei der Drehkrankheit wahrscheinlich keine Rolle (EL-MATBOULI, persönliche Mitteilung). Die Ausbildung des spezifischen Immunsystems erfolgt erst zu einem Zeitraum, bei dem die Erkrankung schon manifestiert ist. Die Reaktionszeit der spezifischen Immunantwort ist bei den herrschenden niedrigen Wassertemperaturen stark verlangsamt. Außerdem entfaltet dieser Teil des Immunsystems erst nach wiederholtem Kontakt mit dem betreffenden Antigen seine volle Wirkung (BALDO & FLETCHER, 1973). Auch die passive Immunisierung von jungen Forellen mit Serum, das *Myxobolus cerebralis*-Antikörper enthielt, zeigte nur minimale Wirkung (ADKINSON et al., 1997).

Der spezifische Teil des Immunsystems ist bei Fischen weniger gut entwickelt, als bei Säugetieren, weshalb dem angeborenen unspezifischen Mechanismen eine besondere Rolle zukommt (INGRAM, 1980).

## 2.5.1 Humorale Abwehrmechanismen

### 2.5.1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die im Serum verschiedener Tierarten vorkommen. Es stellt eine der Hauptkomponenten einer Entzündungsreaktion dar (WALPORT, 1991).

Bei allen Fischklassen konnte Komplementaktivität nachgewiesen werden. Hitzelabilität und Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen sind Grundeigenschaften der Komplementproteine, die sowohl beim Säuger als auch beim Fisch vorkommen. Im Gegensatz zum Säuger liegt das Temperaturoptimum des Fischkomplements bei 15-25°C. Es ist auch noch bei 0-4°C aktiv. Somit ist selbst bei kalten Wassertemperaturen eine Funktionsfähigkeit dieses Systems gegeben, wohingegen die adaptive Immunantwort bereits vermindert ist. Das Optimum des Säugetier-Komplements liegt mit 37°C möglichst nah an der durchschnittlichen Körpertemperatur. Die Inaktivierung erfolgt beim Kaltwasserfisch bei 40-45°C, beim Warmwasserfisch bei 45-54°C und beim Säuger bei 56°C (SAKAI, 1981).

Das Komplementsystem erhielt seinen Namen, weil es zuerst als ein hitzelabiler Bestandteil des Serums entdeckt wurde, das die Rolle der Antikörper bei der Bekämpfung von Bakterien unterstützt. Die meisten der Komplementproteine werden als inaktive Vorstufen synthetisiert. Die Aktivierung erfolgt kaskadenartig auf 3 verschiedenen Wegen. So konnten FUJII et al. (1992) und NONAKA (1985) auch beim Fisch den klassischen, den alternativen und den Lektin abhängigen Weg finden.

Der klassische Weg wurde als erstes entdeckt. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von Antikörpern an Zelloberflächen, durch akute-Phase-Proteine (z.B. das C-reaktive Protein) (AGRAWAL et al., 2001) oder direkt durch mit Bakterien oder Viren befallene Zellen (EBENBICHLER et al., 1991; SPILLER, 1998). Die Nummerierung der einzelnen Komplement-Komponenten wurde nach der Entdeckungszeit und nicht in der Abfolge der Aktivierung vorgenommen.

Im Gegensatz zum klassischen Weg wird der alternative Weg nur antikörperunabhängig durch Viren, Bakterien, Pilze und Tumorzellen aktiviert, sobald die Komplementkomponente C3b an Hydroxyl- oder Aminogruppen von Kohlenhydraten oder Proteinen der fremden Zelloberfläche bindet.

Der Lektin abhängige Weg wird durch Bindung eines Proteinkomplexes initiiert, der Mannose bindendes Lectin mit Protease 1 und 2 beinhaltet. So ist auch diese Form der Aktivierung Antikörper unabhängig.

Das Komplementsystem erfüllt vielseitige Aufgaben wie Zytolyse, Opsonisierung und Chemotaxis:

Verschiedene Studien konnten die bakteriziden Eigenschaften des Komplements zeigen (SAKAI, 1983; OURTH & WILSON, 1982; JENKINS & OURTH, 1990; BOESEN et al., 1999). Vor allem nichtvirulente gramnegative Bakterien sind hochempfindlich gegen den Angriff der Proteinkaskade, während virulente gramnegative und grampositive Bakterien weniger empfindlich sind. Dies resultiert aus Unterschieden im Membranaufbau. So konnten Untersuchungen zeigen, dass hohe Anteile an Sialinsäure (OURTH & BACHINSKY, 1987) und Lipopolysacchariden (LPS) (BOESEN et al., 1999; AMARO et al., 1997) die Aktivierung der Komplementproteine hemmen.

Auch bei der Bekämpfung von Viren und Parasiten spielt Komplement eine große Rolle. So konnten LORENZEN et al. (1999) die neutralisierende Wirkung von Regenbogenforellenserum auf das VHS (Virale Hämorrhagische Septikämie)- Virus zeigen. Der alternative Weg der Komplementaktivierung im Schleim und in der Haut von Regenbogenforellen wurde durch die Karbohydrat-reiche Außenschicht von *Gyrodactylus derjavini* in Gang gesetzt (BUCHMANN, 1998; HARRIS et al., 1998).

Die Opsonisierung von Fremdpartikeln durch Komplement hat eine verstärkte Aufnahme dieser Teilchen durch Phagozyten zur Folge. Dieser stimulierende Effekt des Komplements auf die Fresszellen konnte durch den Vergleich von hitzedeaktiviertem mit normalem Serum gezeigt werden. Die Aktivierung erfolgt über Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten. Komplement abhängige Opsonisierung wurde bei verschiedenen Fischarten beobachtet (MATSUYAMA et al., 1992; LAMMENS et al., 2000). Komplement scheint vor allem wenig virulente Mikroorganismen zu opsonisieren (IIDA & WAKABAYASHI, 1993). CLAIRE et al. (2002) schlossen daraus, dass die Virulenz der Pathogene mit der Fähigkeit verbunden ist, die Komplement-Aktivierung durch Verhinderung der Anheftung der Proteine an ihrer Oberfläche zu meiden. Die Regulationsmechanismen des Opsonisierungsvorgangs sind heute noch kaum verstanden.

Eine weitere Funktion des Komplementsystems ist die Markierung von Immunkomplexen. Diese werden in Leber und Niere abtransportiert und dort durch ortsständige Phagozyten aus der Zirkulation entfernt und abgebaut (PASCUAL & SCHIFFERLI, 1992).

Bei Entzündungsreaktionen werden außerdem chemotaktisch Leukozyten angelockt (GRIFFIN, 1984).

Bei Säugern sind verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten zu Komplementfaktor C3 gefunden worden. Sie kommen auf Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten vor und dienen der Regulation der Phagozytose und der Clearance von Immunkomplexen (NEOPMUCENO et al., 1999; NASH et al., 2001). Homologe sind auch bei niedrigeren Tieren wie Amphibien und Invertebraten gefunden worden (SEKIZAWA et al., 1984).

Das Komplementsystem ist eng mit den spezifischen Abwehrmechanismen verbunden. So ist die Aktivierung der Proteinkaskade durch Antigen-Antikörper Komplexe ein wichtiger Mechanismus der adaptiven Immunantwort. Auch kommt dem Komplementsystem eine wichtige Rolle beim Modellieren des adaptiven Immunsystems durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren auf Säuger Lymphozyten zu (CARROLL & PRODEUS, 1998; SAHU & LAMBRIS, 2001).

Obwohl die Erkenntnisse über die meisten Funktionen auf Beobachtungen bei Säugern beruhen, können Parallelen zu Fischen gezogen werden. Auch sie haben eine große Bandbreite an Komplementkomponenten. So existieren beim Faktor C3 mindestens 5 Isoformen bei einer einzigen Spezies (SUNYER et al., 1997; NAKAO et al., 2000).

SUNYER et al. (1998) vermuten, dass diese Bandbreite einer Erweiterung der Erkennung von Pathogenen dient.

Die Entwicklung des Komplementsystems erfolgte wahrscheinlich schon früh in der Evolutionsgeschichte. So wurden auch bei manchen Invertebraten schon Komplementproteine festgestellt (SMITH et al., 1999). Das Studium dieser Invertebraten könnte vielleicht dazu dienen herauszufinden, welche Teile des Komplementsystems ursprünglich sind und welche sich erst im Laufe der Zeit entwickelt haben (SUNYER & LAMBRIS, 1998).

Der Ammenhai (*Ginglymostoma cirratum*), ein Vertreter der Elasmobranchii, verfügt bereits über ein Komplementsystem, das aus 6 Komponenten besteht und auf klassischem Weg aktiviert werden kann (JENSEN et al., 1981).

Die Regenbogenforelle besitzt ein Komplementsystem, das antikörperabhängig sowie –unabhängig aktiviert werden kann und das dem System der Säuger sehr ähnlich ist (NONAKA et al., 1981b). Der Faktor C3, der aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten besteht, enthält eine charakteristische Thioesterbindung in der alpha-Kette

und besitzt Aminosäuresequenzen, die dem Säuger sehr ähnlich sind. Die beim Menschen in beiden Ketten häufig zu findenden stark Mannose-haltigen Zucker sind nur in der beta-Kette enthalten (NONAKA, 1985). Die Komponente C5 der Regenbogenforelle hat nach NONAKA et al. (1981a) eine Konzentration, die unter Berücksichtigung des Proteingehaltes um ein Vielfaches höher liegt als die des Säugers. Die Autoren beschrieben außerdem einen makromolekularen Komplex, der dem Membranangriffskomplex der Säuger sehr ähnlich ist. Beim quantitativen Vergleich des Komplementsystems von Karpfen und Säuger ergab sich, dass die Aktivitäten des klassischen Wegs sehr ähneln. Beim alternativen Weg hingegen lagen die Werte beim Karpfen wesentlich höher. Die beim klassischen Weg für die Aktivierung benötigten Antikörper können bei den niedrigen Temperaturen des Wassers nur vermindert produziert werden. Deswegen übernimmt hier möglicherweise der antikörperunabhängige, alternative Weg die führende Rolle in der Immunabwehr (MATSUYAMA et al., 1988). Fische zeigen genetisch bedingte Unterschiede in der Resistenz und Empfänglichkeit gegenüber bestimmten Krankheiten (CHEVASSUS & DORSON, 1990; GJEDREM et al., 1991). Dies könnte eventuell durch unterschiedliche Komplementaktivitäten begründet sein. So beschrieben RED et al. (1992) und WIEGERTJES et al. (1993) unterschiedliche Aktivitäten bei Familien vom Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) und Karpfen. Diverse Umwelteinflüsse, wie Überbesatz und Vitaminmangel, senken die Komplementaktivität beim Karpfen (YIN & SIN, 1995). Die direkte Messung des Levels bestimmter Komplementproteine ist derzeit noch nicht möglich. Die Potenz des Komplementsystems wird indirekt durch Messung der lytischen Aktivität des Serums und der Phagozytosefähigkeit der Fresszellen bestimmt. Fische können die Komplementaktivität als akute Phase Antwort in Folge einer Entzündung hochregulieren (BAYNE & GERWICK, 2001).

### 2.5.1.2 Zytokine

Es ist bekannt, dass proinflammatorische Zytokine bei der Initiation von Wirtsreaktionen eine zentrale Rolle spielen. So wurde von BUCHMANN et al. (1998) die Beteiligung solcher Zytokine bei der Abwehr von Gyrodactyliden beim Fisch gezeigt.

IL-1 $\beta$ , ein wichtiger Vertreter der Zytokine, wurde von PLEGUEZUELOS et al. (2000) in der Haut von Regenbogenforellen gefunden.

In aktuellen Studien infizierten LINDENSTRØM et al. (2003) junge Regenbogenforellen mit einem Vertreter der Monogenea, *Gyrodactylus derjavini* Mikailov. Nach der Infektion mit

diesem Ektoparasiten wurde die Haut der Fische auf spezifische Genexpression der vorinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und dem Typ II-IL-1 $\beta$ -Rezeptor untersucht. Die primäre Infektion erfolgte bei 3 Wochen alten, die sekundäre Infektion bei etwa 6 Wochen alten Tieren. Hierbei wurde die Zytokin-Expression jeweils mit einer semiquantitativen PCR-Technik bestimmt. In den nicht infizierten Kontrollfischen wurden nur geringe Level von spezifischen IL-1 $\beta$ 1-, IL-1 $\beta$ 2- und IL-1RII-Gentranskripten gefunden. Im Gegensatz dazu wurde vor allem während der Initialphase der primären Infektion eine klare Induktion der beiden IL-1 $\beta$ -Isoformen beobachtet. Die kurz nach der Genesung eingeleitete sekundäre Infektion hatte hingegen nur eine weniger offensichtliche Induktion der IL-1 $\beta$ -Expression zur Folge. Die Tiere, die einen Monat nach ihrer Genesung erneut infiziert wurden, hatten keinen höheren Level der Expression wie die Kontrollfische. Trotzdem haben Tiere bei wiederholtem Kontakt zu dem Ektoparasiten eine stärkere und effektivere Immunantwort als bei Erstkontakt. Die Autoren beobachteten außerdem eine wachsende Expression von IL-1RII im späteren Verlauf der primären Infektion. Diese könnte im Zusammenhang mit der beobachteten Herunterregulation vor allem der IL-1 $\beta$ 1-Isoform stehen. Die Arbeit war die erste Studie, die eine Zytokin-Genexpression beim Fisch in Folge einer ektoparasitären Erkrankung belegte. Der exakte zelluläre Ursprung dieser Expression ist bisher noch unklar. Es werden aber in diesem Zusammenhang Epithelzellen, Fibroblasten und infiltrierende Leukozyten diskutiert. So ist beim Menschen die Haut als Reservoir von IL-1 $\alpha$  bekannt (HAUSER et al., 1986)).

### 2.5.1.3 Transferrin

Transferrin ist ein bei Tieren und Pflanzen auftretendes Protein, das Eisen binden und transportieren kann. Es kommt im Serum aller Vertebraten vor. Außerdem wird es im Schleim, im Eialbumin und in der Milch gefunden. Die Wirkung des Transferrins beruht auf dem Entzug des für Mikroorganismen lebensnotwendigen Eisens, deren Wachstum somit wirkungsvoll gehemmt werden kann (PUTNAM, 1975; ALEXANDER, 1985).

Das Transferrin ist entwicklungsgeschichtlich wahrscheinlich ein alter Abwehrmechanismus. So kommt es schon bei Ingeren und Neunaugen, Vertretern der Cyclostomata, vor. Das Molekulargewicht des Ingertransferrins liegt bei etwa 44.000 Dalton und bindet pro Molekül ein Eisenatom. Es kann nicht in Untereinheiten aufgeteilt werden (PALMOUR & SUTTON, 1971).

Neunaugentransferrin hingegen kann durch Elektrophorese in fünf verschiedene Komponenten aufgeteilt werden und enthält im Gegensatz zu den meisten Wirbeltiertransferrinen keine Kieselsäure (BOFFA et al., 1967).

Untersuchungen beim Karpfen (*Cyprinus caprio*) ergaben, dass es verschiedene Transferrintypen gibt, die dominant vererbt werden. Dabei zeigten heterozygote Jungtiere eine höhere Überlebensrate als homozygote Fische (BALAKHNIN & GALAGAN, 1972).

Bei Regenbogenforellen wurde ein Abfall des freien Eisens im Serum nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) festgestellt, womit das Transferrin ein positives akute-Phase-Protein wäre. SCHREIBER et al. (1989) beschrieben das Transferrin von Ratten und Hasen als positives und das mancher anderer Säuger als negatives akute-Phase-Protein. Letzteres ist überraschend, da Transferrin das für Bakterien lebenswichtige Eisen entzieht.

Von immunologischer Bedeutung könnte die unterschiedliche Eisenaffinität verschiedener Transferrin-Genotypen sein. So haben experimentelle Infektionen von Coho Lachsen drei verschiedener Transferrin-Genotypen (AA, AC, CC) mit der bakteriellen Nierenerkrankung gezeigt, dass die AA Tiere am empfänglichsten und die CC Tiere am resistentsten waren. Eisengaben veränderten die Pathogenität des Erregers nicht. Erkrankte Fische hatten jedoch höhere Eisenwerte im Blutplasma und in der Leber. Diese Ergebnisse lassen aber keine Aussage darüber zu, ob der Transferrin-Genotyp für die höhere Krankheitsempfänglichkeit verantwortlich ist oder nur einen Marker für höhere Überlebensfähigkeit dieser Fische darstellt (SUZUMOTO et al., 1977; WINTER et al., 1980).

Weitere Untersuchungen mit Coho-Lachsen und Forellen, die mit dem Erreger *Vibrio anguillarum* infiziert wurden, bestätigten diese Ergebnisse nicht. So zeigte sich hier kein Zusammenhang zwischen Krankheitsempfänglichkeit und Transferrin-Genotyp. WINTER et al. (1980) vermuteten, dass bei chronischen Krankheiten wie der bakteriellen Nierenerkrankung genetische Faktoren eine größere Rolle spielen als bei akuten wie der Vibriosis.

### 2.5.1.4 C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP ist ein akute-Phase-Protein, das während der akuten Phase einer Infektion, Entzündung oder Gewebsverletzung im Serum von Säugern erscheint oder bis auf ein Vielfaches seiner Ausgangskonzentration ansteigt. Der Name des CRP beruht auf seiner Fähigkeit mit C-Polysacchariden in der Zellmembran von Pneumokokken zu reagieren. Außerdem stellen sie Liganden für Phosphorylcholine und ähnliche Strukturen dar, die auf

Mikroben und Oberflächen zerstörter eukaryontischer Zellen exprimiert werden. Die Funktion wird nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  ausgeführt (MURAI et al., 1990; MALE & ROITT, 1991). BALDO & FLETCHER (1973) beschrieben, dass das CRP das erste akute-Phase-Protein war, welches sowohl beim Säuger als auch beim Fisch entdeckt wurde. Sie vermuten außerdem eine enorme Bedeutung im Abwehrsystem der Fische. Schon bei Säugern ist das CRP eines der wichtigsten akute-Phase-Proteine. Bei Fischen ist die adaptive Immunantwort wegen der kalten Temperaturen sehr vermindert, so dass diesen primitiveren Vertebraten durch die Serumproteine wohl eine wichtige Abwehrbarriere gegen Parasiten und Mikroorganismen zur Verfügung steht.

RIJKERS (1982) beschrieb ein CRP ähnliches Protein, das bei vielen Fischarten vorkommt. Dieses Protein reagiert auch bei Fischen als ein akute-Phase-Protein. So führten bei Forellen verschiedene Reize wie experimentelle Infektion mit *Vibrio anguillarum*, die Immunisierung mit formalinabgetöteten *Vibrio anguillarum* und Terpetininjektion innerhalb 3 Tagen zu einer drei bis fünfzehnfachen Erhöhung der Bakterienagglutinationsaktivität. Dies sind klassische Indikatoren für akute-Phase-Proteine (KODOMA et al., 1989; MURAI et al., 1990; WINKELHAKE & CHANG, 1982).

Bei der Forelle war der Plasmalevel eines CRP ähnlichen Proteins 48 Stunden nach Injektion von verschiedenen Substanzen 10-20fach höher als vor Exposition. Die gleichzeitige Injektion des Blue Tongue Virus erhöhte diesen Wert nochmals zusätzlich, wohingegen die alleinige Verabreichung des Virus keinen Effekt auf den CRP Spiegel hatte. Man vermutete deshalb eine schützende Funktion des CRP vor toxischen Substanzen (WINKELHAKE et al., 1983).

GHOSH et al. (1992) beobachteten, dass der CRP Spiegel von unter natürlichen Bedingungen lebenden tropischen Frischwasserfischen anstieg, nachdem sie verschiedenen Chemikalien ausgesetzt wurden. Dies ergibt nach Meinung der Autoren vielleicht die Möglichkeit den Plasmalevel als Biomarker für eine Exposition zu verwenden.

NUNOMURA (1990) beschrieb allerdings, dass es erhebliche Unterschiede in den Serum Normalwerten zwischen verschiedenen Fischarten wie auch innerhalb einer Art gibt.

Bestimmungen bei der Regenbogenforelle ergaben einen zehnfach höheren CRP-Serumspiegel als bei Kaninchen. Die Autoren erklären den hohen Wert bei der Forelle dadurch, dass vielleicht auch schon Minimaltraumen in Gefangenschaft zu einem Anstieg führen könnten (WINKELHAKE & CHANG, 1982).

Die Vielseitigkeit von CRP wird durch dessen Fähigkeit illustriert als Oberflächenrezeptor auf zytotoxischen Zellen zu dienen. So konnten EDAGAWA et al. (1993) Forellen-Lymphozyten

mit Hilfe von Hasen Serum gegen Forellen CRP erkennen. Nach Behandlung dieser Zellen mit Antiserum und Komplement sank die Zytotoxizität gegen Myelomzellen.

Untersuchungen bei Buntbarschen (*Tilapia mossambica*) mit einem kommerziellen CRP-Testsystem ergaben einen positiven CRP-Nachweis nach einer nur leichten Flossenverletzung mit nachfolgender Entzündung und Gewebsnekrose. RAMOS & SMITH (1978) berichteten damit erstmals über ein Anwachsen oder Neuerscheinen eines Plasmaproteins nach Entzündungsreizen und sehen dadurch die Möglichkeit einer Früherkennung von Krankheitsausbrüchen in Fischbeständen.

NAKANISHI et al. (1991) zeigten in ihren Untersuchungen einige Wirkungen von Regenbogenforellen-CRP, die zu einer guten Resistenzlage des Tieres beitragen könnten. So vermehrt sich der Verbrauch von Komplementproteinen im Beisein von CRP-haltigem akute-Phase-Serum. Die Autoren deuteten aus diesen Ergebnissen, dass das CRP im Zusammenwirken mit noch anderen unbekanntem Faktoren aus dem akute-Phase-Serum das Komplementsystem aktivieren kann. Außerdem wurde das Wachstum von Bakterien (*Vibrio anguillarum*) durch Zugabe eines akute-Phase-Serums oder eines CRP-Komplexes gehemmt. Voraussetzung war allerdings die Anwesenheit von Komplement. So ist auch hier eine durch CRP ausgelöste Komplementaktivierung die wahrscheinlichste Ursache.

KODOMA et al. (1989) und NAKANISHI et al. (1991) beschrieben eine durch hohen CRP-Gehalt im Forellenserum gesteigerte Phagozytoserate von Bakterien. Somit wirkt CRP auch als Opsonin.

WINKELHAKE & CHANG (1982) beobachteten die Fähigkeit von CRP zur Partikelagglutination. Dies führt möglicherweise zur Elimination der Fremdkörper über Leber, Niere und Milz. Die Autoren schrieben dem CRP eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr der wechselwarmen Tiere zu, die den Zeitraum bis zur verzögerten spezifischen Abwehr im Vergleich zu den Säugern, mit anderen effektiven Mechanismen überbrücken müssen.

### 2.5.1.5 Serum Amyloid A (SAA)

Bei Säugern ist Serum Amyloid A eines der wichtigsten akute-Phase-Proteine. Es wurde auch bei nahezu allen anderen Vertebraten gefunden (UHLAR & WHITEHEAD, 1999).

Die Funktionen des SAA sind noch nicht vollständig aufgeklärt, scheinen aber sehr vielfältig zu sein. So wurde schon über dessen Aufgaben bei der Entzündungsmodulation und dem Lipidtransport berichtet. Außerdem wird über eine Funktion bei der Bekämpfung von

Mikroorganismen und bei der Reparatur von Gewebsschäden diskutiert (BERLINER et al., 1995; BANKA et al., 1995).

JENSEN et al. (1997) berichten von einem Anstieg des SAA während einer Septikämie beim Fisch. Die Autoren injizierten den Fischen lebende *Aeromonas salmonicida*, dem Auslöser der Furunkulose, und untersuchten anschließend auf das Vorkommen des Transkripts für SAA. Während bei den Negativkontrollen keine mRNA für SAA detektierbar war, konnte schon 48 Stunden post injectionem ein Spiegel festgestellt werden, der 120 Stunden nach der Infektion nochmals um das 40fache anstieg. Innerhalb dieses Zeitraums entwickelten die Fische auch klinische Anzeichen der Krankheit.

FUJIKI et al. (2000) stellten beim Karpfen (*Cyprinus caprio*) SAA als Antwort auf einen Entzündungsreiz durch die Gabe von Terpentin fest.

In neueren Studien wurde davon berichtet, dass die Transkription des SAA-Gens beim Fisch von ähnlichen Faktoren bestimmt wird wie beim Säuger. So stieg der Level von SAA-mRNA nach Gabe von humanen Zytokinen (Interleukin-6, Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-1-beta) und Lipopolysacchariden (LPS) deutlich an, wobei die größte Steigerung nach Gabe von LPS festzustellen war (JORGENSEN et al., 2000).

### 2.5.1.6 Alpha-2-Makroglobulin

Bei verschiedenen Fischarten wurde ein Protein gefunden, das als Homolog zum alpha-2-Makroglobulin des Menschen gilt. Es hat ein Molekulargewicht von 360kDa, während es bei allen anderen Wirbeltieren etwa doppelt so schwer ist. Es handelt sich um ein aus zwei Untereinheiten zusammengesetztes Glycoprotein. Es kommt in unterschiedlichen Konzentrationen im Fischserum vor. Bei der Scholle (*Pleuronectes platessa*) macht es 10% des Gesamtserumproteins aus (STARKEY & BARRETT, 1982a; STARKEY & BARRETT, 1982b).

Alpha-2-Makroglobulin hemmt die Aktivität von Trypsin, Thermolysin, Pankreaselastase und Papain (STARKEY et al., 1982) und ist somit die vielseitigste bekannte Anti-Protease. Nahezu alle Proteaseklassen können von ihr eingefangen und in der Aktivität gehemmt werden (SOTTRUP-JENSEN, 1989).

Die Immunantwort kann durch die Bindung und den Transport von Zytokinen beeinflusst werden. Bei manchen Säugetieren zählt das alpha-2-Makroglobulin zu den akute-Phase-Proteinen (JAMES, 1990; COUTINHO, 1999).

FREEDMAN (1991) vermutete nach seinen Untersuchungen, dass es die unterschiedliche Empfänglichkeit von Forellen auf bakterielle Pathogene begründen könne. Es scheint hier allerdings kein akute-Phase-Protein zu sein.

ELLIS et al. (1981) inkubierten fischtoxische Extrazellulärprodukte von *Aeromonas salmonicida* mit Regenbogenforellenserum, so dass die parenterale Gabe der sonst tödlichen Dosis keine Krankheitserscheinungen mehr hervorrief. Die Autoren machen für diesen Effekt das alpha-2-Makroglobulin im Serum verantwortlich. Wegen der hohen Letaldosis der *Aeromonas*-Toxine können sich pathologische Erscheinungen scheinbar erst zeigen, wenn die Reserven dieses Proteins ausgeschöpft sind.

### 2.5.1.7 Interferone

Interferone sind Proteine, die die intrazelluläre Phase des Wachstumszyklus von Viren durch die Störung der RNA-Translation und der Proteinsynthese in Zellen blockieren und somit die Virusreplikation wirksam hemmen (INGRAM, 1980).

Außerdem können sie die Aktivität des Immunsystems durch Beeinflussung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen erhöhen (ALEXANDER, 1985).

INGRAM (1980) zeigte in vitro die Synthese von Interferonmolekülen bei Fischen durch virale Infektion von Regenbogenforellen- und Elritzen (*Pimephales promelas*)-Gewebskulturen.

Untersuchungen an Fischinterferonen zeigten Ähnlichkeiten mit dem Interferon Typ I (alpha und beta) der Säugetiere sowohl im Molekulargewicht als auch in der Stabilität bei pH- und Temperaturänderungen. Die anderen beim Säuger vorkommenden Typ II und gamma-Interferone ähneln dem Typ I-Interferon nicht. Hinweise auf gamma-Interferon bei Regenbogenforellen lieferten Untersuchungen mit einem makrophagenaktivierenden Faktor, der nur von Ig-negativen Lymphozyten in Anwesenheit akzessorischer Zellen gebildet wurde und die Tiere vor der infektiösen Pankreasnekrose schützte. Wie gamma-Interferon war dieser Faktor empfindlich gegen hohe Temperaturen, niedrige pH-Werte und Trypsinbehandlung (GRAHAM & SECOMBES, 1990b).

DNA-Vergleiche des Regenbogenforellen- und menschlichen Typ I-Interferons zeigten deutliche Homologie (TENGESEN et al., 1991).

RIJKERS (1982) konnte Elritzenkulturen jedoch nicht mit interferonhaltigem Forellenserum vor einer Virusinfektion schützen. Die Kulturen von ebenso behandelten Forellen konnten aber gegen ein Rhabdovirus und gegen Viren der infektiösen Pankreasnekrose und der

infektiösen hämopoetischen Nekrose geschützt werden. Der Autor vermutete deshalb, dass Fischinterferon nicht virus- sondern artspezifisch ist.

Weitere Untersuchungen bei Regenbogenforellen *in vivo* zeigten die Wichtigkeit von Interferon bei der Infektion mit dem hämorrhagischen Septikämievirus und dem Virus der infektiösen Pankreasnekrose. So konnten sehr junge Forellen, denen zuvor interferonhaltiges Forellenserum injiziert wurde, vor dem Ausbruch der Krankheiten geschützt werden (DE KINKELIN et al., 1982).

### 2.5.1.7 Lysozym

Das Lysozym ist ein in der Natur häufig vorkommendes mukolytisches Enzym, das auch als Muramidase oder N-Acetylmuramid-Glucanohydrolase bezeichnet wird. Es ist in der Lage, beta-1-4-glycosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin, die in Bakterienzellwänden vorkommen, zu spalten (KARLSON, 1984).

Auf die oben beschriebene Weise werden vor allem apathogene Gram-positive Bakterien erfolgreich lysiert. Möglicherweise liegt aber gerade in der Empfindlichkeit gegenüber dem Lysozym ein Hauptgrund der Apathogenität dieser Bakterien. Gram-negative Bakterien werden durch das Lysozym nur unter der Mitbeteiligung des Komplementsystems oder von Antikörpern zerstört (INGRAM, 1980).

Es wurde auch von einem begrenzt schädigenden Einfluss des Lysozyms gegenüber Chitin in Pilzwänden und im Exoskelett vieler Invertebraten berichtet (FÄNGE et al., 1976; INGRAM, 1980).

Die Erkenntnisse über das Lysozym stammen vorwiegend aus Untersuchungen beim Säuger. So wurde gezeigt, dass dieses Enzym viele Aufgaben wie Bakteriolyse, Opsonisierung und Verdauungsfunktionen wahrnimmt. Außerdem wirkt es antiviral und antineoplastisch (JOLLES & JOLLES, 1984; DOBSON et al., 1984).

Aber auch beim Fisch konnte es in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. So zeigten sich hohe Aktivitäten im granulozytenreichen, hämatopoetischen Gewebe verschiedener Knochenfische. Lysozym konnte außerdem im Plasma und in der Lymphe einiger Teleostierspezies gefunden werden (FÄNGE et al., 1976; FÄNGE et al., 1980).

MURRAY (1976) konnte bei immunohistochemischen Untersuchungen bei der Scholle Lysozym in neutrophilen Granulozyten, Peritonealmakrophagen, Milz, Nieren, Haut und Hautschleim nachweisen.

Bei der Regenbogenforelle wurden Lysozymaktivitäten in abnehmender Reihenfolge in Niere, Verdauungstrakt, Milz, Hautschleim, Serum, Kiemen, Leber und Muskel gefunden. Da der Enzymlevel vor allem in leukozytenreichen Geweben hoch ist, vermutet man diese Zellen als Hauptquelle des Lysozyms. In der Niere traten außerdem zwei verschiedene Varianten mit 14500 Dalton oder 23000 Dalton auf, wobei der leichtere Isotyp eine höhere Aktivität aufwies. Beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) wurden nur geringe Lysozymspiegel gefunden. Die unterschiedliche Lysozymaktivität zweier Spezies kann durch verschiedene Konzentrationen des Enzyms, durch verschiedene Isoenzyme mit unterschiedlicher Aktivität oder einer Kombination dieser beiden Faktoren begründet sein. Man schreibt dem Lysozym eine Funktion bei der Abwehr von Infektionskrankheiten zu. So wurden bei hoher mikrobieller Invasion hohe Werte im Schleim, in den Kiemen und im Verdauungstrakt gemessen. Beim mit Vibriosis oder „Cold Water Disease“ infizierten Atlantischen Lachs, der für diese Krankheiten als hoch empfänglich gilt, wurden nur geringe Werte an Lysozym gemessen. Darin könnte die erhöhte Empfänglichkeit dieser Spezies begründet sein. Man konnte aber nicht ausschließen, dass die Krankheiten selbst eine depressive Wirkung auf die Lysozymspiegel hatten (OYSTEIN et al., 1989).

Das Lysozym des Hautschleims wird von spezifischen Epidermiszellen gebildet, während das Plasma-Lysozym vor allem in Leukozyten gebildet wird (FLETCHER & WHITE, 1973).

Die Suche nach Lysozym blieb bei manchen anderen Fischarten, wie zum Beispiel beim Kabeljau (*Gadus morhua* L.) erfolglos. Beim Schellfisch (*Melanogrammus aeglefinus*) konnte es lediglich in geringen Mengen nachgewiesen werden (FLETCHER & WHITE, 1973; FÄNGE et al., 1976).

LUKYANENKO (1965) fand in frühen Untersuchungen bei verschiedenen Fischarten nur geringe Lysozymaktivitäten vor. Er kam deshalb zu dem Schluss, dass das Enzym wohl nur eine geringe Bedeutung in der Abwehr dieser Tiere spielt.

STUDNICKA et al. (1986) zeigten in Untersuchungen beim Karpfen, dass der Lysozymspiegel mit der Wassertemperatur und dem Alter der Tiere ansteigt. Bei Fischen in der Fortpflanzungsphase konnten die höchsten Aktivitäten nachgewiesen werden. Außerdem machten sie die Beobachtung, dass die Serumlysozymwerte im Verlauf einer Protozoeninfektion mit *Eimeria subepithelialis* signifikant anstiegen.

FLETCHER & WHITE (1973) bestimmten das Molekulargewicht von Schollen-Lysozym mit 14000 bis 15000 Dalton. Es bewegt sich hiermit im Bereich des Hühnerei-Lysozyms. Im elektrischen Feld wandert das Fisch-Lysozym allerdings nur etwa halb so weit auf die Kathode zu. Dies lässt auf einen Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung schließen.

Das pH-Optimum liegt bei 5,4. Außerdem beschrieben sie, dass verschiedene Fischarten unterschiedliche Lysozymaktivitäten haben können.

Auch GRINDE (1989) beschrieb in seinen Untersuchungen, bei denen er Lysozymarten zweier verschiedener Fischarten mit Hühnerlysozym verglich, dass die Regenbogenforelle die höchsten Aktivitäten zeigt. Der Autor vermutet eine wichtige Rolle des Lysozyms in der Immunabwehr der Fische. So tötet das Lysozym Pathogene bereits in Mengen, in denen es physiologisch vorkommt. Da die Potenz des Enzyms *in vivo* durch andere Faktoren noch potenziert wird, unterschätzt man in Studien eher die Wichtigkeit des Lysozyms. Der Autor hofft, dass in Zukunft die Konzentration des endogenen natürlichen Lysozyms in einer Art mit geringer Aktivität durch Übertragung von strukturellen und regulatorischen Genen einer anderen mit hoher Aktivität gesteigert werden kann. So könnten gestresste und immunsupprimierte Tiere aus Gefangenschaft von der dort höheren bakteriellen Belastung geschützt werden.

Über das Ausmaß der Lysozymaktivitäten bei infizierten und nicht infizierten Tieren wurden bereits verschiedene Studien angefertigt. CRONIN et al. (2001) fanden keinen Zusammenhang zwischen einer Parasiteninfektion der flachen Auster (*Ostrea edulis* (L.)) und dem Lysozymspiegel. Sie beobachteten nur starke Schwankungen zwischen den Individuen, die sie aber nicht in einen Zusammenhang bringen konnten.

Bei anderen Studien mit drei verschiedenen Austerstämmen wurden die Versuchstiere mit einer Parasiteninfektion konfrontiert. Dabei zeigte sich der Stamm mit der höchsten Lysozymaktivität als am unempfindlichsten (HAWKINS et al., 1992).

CHU et al. (1993) infizierten Austern mit dem Parasiten *Perkinsus marinus* und beobachteten in der Folge aber keinen Zusammenhang zwischen Infektion und Lysozymaktivität. Sie beschrieben jedoch eine höhere Überlebensfähigkeit von Tieren mit hohen Enzymspiegeln.

Untersuchungen mit Salmoniden-Eiern zeigten die antibakteriellen Eigenschaften des Fischlysozyms. So wurden die Bakterien *Aeromonas hydrophila* und *Carnobacterium piscicola* schon durch relativ niedrige Konzentrationen (700 µg/ml) des Enzyms abgetötet, während *Renibacterium salmoninarum* auch bei höheren Konzentrationen (1900 µg/ml) seine Lebensfähigkeit nicht verlor. Die Autoren sahen hier vielleicht den Grund, dass die letztgenannte Bakterienart im Gegensatz zu den beiden anderen eine vertikal übertragbare Krankheit darstellt (YOUSIF et al., 1994), denn alle drei Bakterienarten überschreiten die für diesen Übertragungsweg erforderliche Höchstgröße nicht (COLLINS et al., 1990).

Obwohl in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, dass Lysozym ubiquitär bei verschiedenen Organismen vorkommt und hohe Wirksamkeit bei der Bekämpfung von Pathogenen hat,

erfüllten Behandlungen mit diesem Enzym auch in Kombination mit anderen Medikamenten die Erwartungen nicht. Da einige Substanzen unter natürlichen Bedingungen erst volle Effektivität als Dimer oder Polymer erreichen, untersuchte KICZKA (1994) das Verhalten eines dimerisierten Lysozyms. Es zeigte sich eine hohe Aktivität gegen Bakterien und Viren und eine geringe Toxizität. KICZKA et al. (1994) erklärten die immunstimulatorische Wirkung dieses Lysozymdimers durch Aktivierung der Phagozytose, Erhöhung der Interferonsynthese und der Modulation der TNF-Produktion.

Auch SIWICKI et al. (1998) untersuchten zum ersten Mal die Wirkung eines dimerisierten Lysozyms (KLP-602) auf das unspezifische Immunsystem der Regenbogenforelle bei einer *Aeromonas salmonicida*-Infektion. Die Mortalität der Versuchsfische sank von 85% bei der Kontrollgruppe auf 45% nach einmaliger Verabreichung und 25% nach zweimaliger intraperitonealer Injektion. Die unterschiedlichen Dosierungen von 10 oder 100µg/kg Lysozym brachten keine signifikanten Unterschiede. Da es sich bei dem dimerisierten Lysozym um ein natürliches Produkt handelt, wurde nach der Injektion keine Toxizität festgestellt. Die Autoren erhoffen sich eine Verringerung von Krankheitsausbrüchen durch die Verstärkung des unspezifischen Immunsystems durch Immunstimulantien. In zukünftigen Studien sollen die hierfür erforderlichen Dosen erforscht, Injektionsprotokolle erstellt und eine eventuelle orale Applikation untersucht werden.

PAULSEN et al. (2001) berichteten, dass die Produktion von Lysozym beim Atlantischen Lachs durch eine Makrophagenkultur am Tag 6 nach der Stimulierung mit LPS und beta-Glucan um den Faktor 5-6 mal höher war als bei der Kontrollgruppe. Dabei löste beta-Glucan eine lineare Steigerung zwischen 1 und 250µg/ml aus, während LPS ein Optimum bei 10µg/ml zeigte. Der Anstieg des Lysozymspiegels war kombiniert mit einem Anstieg der mRNA, was vermuten lässt, dass die induzierte erhöhte Lysozymsekretion aus einer erhöhten Gen-Transkription resultiert. Es wurde außerdem beobachtet, dass Makrophagen, die nach einer nicht tödlichen *Ichtyobodo necator*-Infektion gesammelt wurden, eine erhöhte Fähigkeit hatten nach Stimulierung mit beta-Glucan und LPS Lysozym zu bilden. Die Makrophagen von infizierten Fischen scheinen also eine sensibilisierte Lysozymantwort zu haben. Man vermutete als Ursache der Steigerung wie bei höheren Vertebraten eine Änderung der Differenzierungsstadien der Makrophagen (CROSS et al., 1988) oder eine direkte Aktivierung der Lysozym-Gen-Transkription der Makrophagen durch Polysaccharide (GOETHE & PHIVAN, 1998). Über die Mechanismen, die hinter der Lysozym-Regulation bei den Salmoniden stecken, kann man bisher nur spekulieren. Für die Regulation des Hühner-Lysozym-Genorts existiert bisher nur ein Modell (BONIFER, 1997). In diesem Modell wird vermutet, dass sich

das Chromatin des Lysozym-Gens in bestimmten Schritten reorganisieren muss. Dies hängt von der Entwicklungsstufe der Makrophagen ab. In den multipotenten Progenitorzellen ist das Lysozym-Gen inaktiv, während ein Silencer zu diesem Zeitpunkt aktiv ist. Während der Reifung werden Aktivatoren aktiv und die Hemmer inaktiv, was die Transkription des Lysozym-Gens erlaubt. Somit ist eine Bildung von hohen Mengen Lysozym nach einer LPS-Stimulierung möglich. Bei Salmoniden stehen ähnliche Untersuchungen noch aus.

Die Bestimmung der Lysozymaktivität kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. PARRY et al. (1965) beschrieben die Turbidimetrie, bei der nach Zugabe des Bakteriums *Micrococcus lysodeikticus* die Abnahme der Absorption mit einem Photometer bestimmt wird. Bei der Lysoplattebestimmung werden Zonen auf einer Agaroseplatte gemessen, die in Folge der Lysis von *Micrococcus lysodeikticus* entstehen (OSSERMANN et al., 1966). Bei der Elektrophorese, die von VIRELLA (1977) beschrieben wurde, wird die Lysozymaktivität als farblose Stelle auf einem gefärbten Hintergrund abgelesen.

### **2.5.2 Der zelluläre Teil des unspezifischen Immunsystems**

Den wichtigsten Teil des zellulären unspezifischen Immunsystems stellen die Phagozyten dar. Dies sind verschiedene Zellen, die Partikel in ihr Zytoplasma aufnehmen können. Bei diesem als Phagozytose bezeichnetem Vorgang lagert sich der Phagozyt, der auch als Fresszelle bezeichnet wird, beispielsweise an ein Bakterium an, bildet Pseudopodien aus, die zusammenfließen und das zu phagozytierende Teilchen in ein Phagosom einschließen. Durch die Vereinigung von Phagosom und Lysosom entsteht der Phagolysosom, in dem Erreger durch verschiedene mikrobiozide Mechanismen abgetötet und verdaut werden kann. Der Vorgang der Phagozytose findet bei Partikelgrößen von 1µm und mehr statt, während kleinere Teilchen und Flüssigkeitstropfen pinozytiert werden (MALE & ROITT, 1991).

#### **2.5.2.1 Die Monozyten**

Monozyten wurden schon bei allen Fischklassen gefunden und haben einen Anteil von 1 bis 8% an den Gesamtleukozyten. Sie kommen im peripheren Blut der Tiere vor. Die Struktur der Zellen ist speziesunabhängig relativ einheitlich. Der Durchmesser beträgt zwischen 7 und 14µm, kann aber nach Einverleibung von Teilchen auch höher sein. Für den Monozyten charakteristisch ist sein exzentrischer, hufeisen- bis nierenförmiger Kern, der nur wenig lockeres Chromatin enthält. Das Zytoplasma ist leicht basophil, nicht granuliert und enthält

rauhes endoplasmatisches Retikulum, einen Golgi-Apparat mit Vesikeln, eine Zentriole, Heterophagosomen und periphere pinozytotische Vesikel, wobei die beiden letzteren auf Phagozytoseaktivität hinweisen. Aktive Zellen können durch die im Ausstrich unscharfen oder gezackten Linien erkannt werden, die von den Protoplasmaausläufern herrühren. In Fischmonozyten wurde oft saure Phosphatase nachgewiesen. Bei Goldfischen (*Carassius auratus*) und beim Karpfen kommt Peroxidase vor (McCUMBER et al., 1982; ROWLY et al., 1988).

### 2.5.2.2 Die Granulozyten

Die vor allem im Blut vorkommenden Granulozyten können weiter in neutrophile, eosinophile und basophile Zellen unterteilt werden. Sie unterscheiden sich durch ihre Farbeigenschaften und ultrastrukturelle Charakteristika (ROWLEY et al., 1988).

Schon bei den Chondrichthyes finden sich unterschiedliche Granulozyten. Bei den meisten Spezies konnten neutrophile und eosinophile gefunden werden.

Bei den verschiedenen Osteichthyes-Spezies zeigt sich bei den Untersuchungen auch kein einheitliches Bild. Beim Karpfen und bei einigen anderen Arten wurden alle 3 Zelltypen (neutrophil, eosinophil und basophil) nachgewiesen, während beim Katzenwels, beim Inger und bei adulten Neunaugen bisher nur neutrophile Granulozyten gefunden wurden. Auffällig war auch, dass Ammocoeten (Larven) von *Lampetra* spp. noch eosinophile Zellen besaßen, die beim erwachsenen Tier nicht mehr vorgefunden werden konnten.

### 2.5.2.3 Die Makrophagen und Melanomakrophagen

Makrophagen sind Fresszellen, die im Gegensatz zu den Monozyten nicht im Blutstrom zirkulieren, sondern in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel der Haut, dem Bindegewebe, dem Herz, der Peritonealhöhle, den Blutgefäßen, der Niere sowie den meisten lymphomyeloiden Geweben, vorkommen. Auf Grund der ähnlichen Morphologie vermutet man aber, dass sie von den Monozyten abstammen.

In den Vakuolen der Fischmakrophagen sind teilweise Pigmente wie Lipofuscein, Hämosiderin und Melanin enthalten. Diese Zellen werden deshalb auch als Melanomakrophagen bezeichnet (FERGUSON, 1984; ROWLEY et al., 1988; ZELIKOFF et al., 1991).

ZAPATA & COOPER (1990) beschrieben bei ihren Untersuchungen, dass alle Fischarten Melanomakrophagen im hämatopoetischen Gewebe aufwiesen. Die Zellen sind jedoch bei den verschiedenen Fischklassen unterschiedlich verteilt und organisiert. So treten Melanomakrophagen bei den Cyclostomata und den Knorpelfischen als einzelne Zellen auf, während sie bei den Knochenfischen in den so genannten Melanomakrophagenzentren (MMZ) organisiert sind. Außerdem nimmt die in den Zellvakuolen enthaltene Pigmentmenge bei höher entwickelten Fischen zu. Die Autoren entdeckten erste Melanomakrophagen frühestens bei Fischen nach der ersten Futteraufnahme. Zunehmendes Alter, aber auch Hungerzustände und Krankheiten, die zu Gewebsuntergang führen, haben eine Zunahme der Anzahl dieser Zellen zur Folge.

AGIUS (1985) fand Melanomakrophagen bei Knorpel- und primitiven Knochenfischen hauptsächlich in der Leber vor. Bei höheren Fischen hingegen sind sie vor allem in Nieren und Milz lokalisiert. Der Autor konnte häufig einen Ring aus Lymphozyten um die Aggregate dieser Zellen beobachten. Das am häufigsten in den Melanomakrophagenzentren anzutreffende Pigment ist das Lipofuscein, das aus der Peroxidation der bei Fischen in großer Zahl vorkommenden ungesättigten Fettsäuren entsteht. Das häufig gleichzeitig vorkommende Melanin dient als Elektronenaustauscher und schützt die Zellen so vor freien Radikalen und toxischen Kationen. Das ähnlich wirkende Vitamin E spielt bei Fischen nur eine untergeordnete Rolle. Das aus Apoferritin und einer Eisenkomponente bestehende Hämosiderin ist bei Teleostiern hauptsächlich in den Melanomakrophagenzentren der Milz anzutreffen und entsteht aus dem Abbau degenerierter roter Blutkörperchen. Dieses als Speicherform für Eisen dienende Pigment konnte jedoch nicht bei den Elasmobranchii nachgewiesen werden.

Auch PAGE & ROWLEY (1984) fanden bei Flussneunaugen pigmenthaltige Zellen in Kiemen, Leber, Niere und im Supraneuralorgan.

Im Gegensatz zu den anderen Autoren fanden RAVAGLIA & MAGGESE (1995) Melanomakrophagenzentren auch im Stroma der Gonaden des Grubenaals (*Synbranchus marmoratus* Bloch). Sie vermuten eine Aufgabe dieser Zentren beim Abbau von Follikeln nach der Fortpflanzungsperiode.

Die pigmenthaltigen Zellen beim Goldfisch befinden sich im ganzen Nierengewebe gleichmäßig verteilt, während sie in der Milz vor allem in der unmittelbaren Nähe der Ellipsoide vorkommen. Auch an den Nervenendigungen sitzen die Melanomakrophagen. Die Fresszellen befinden sich in einem Geflecht aus Retikulärzellen, welches an manchen Stellen eine Kapsel bildet. Zelltrümmer aus Erythrozyten und Granulozyten sowie Pigmente sind im

Zytoplasma der Phagozyten enthalten. Die Autoren vermuten neben der Speicherung von Pigment noch andere Funktionen der Melanomakrophagen. So konnten Kohlepartikel, die Goldfischen injiziert wurden, nach einiger Zeit in den Melanomakrophagenzentren gefunden werden. Außerdem stieg die Anzahl der Zentren nach Immunisierung mit Schaferythrozyten stark an. Der Transport der roten Blutkörperchen in die Zentren erfolgte wahrscheinlich mit Hilfe von Milzmakrophagen und Retikulärzellen der Niere (HERRAEZ & ZAPATA, 1986).

Spätere Untersuchungen bei der Immunisierung mit Yersinien (*Yersinia ruckeri*) ergaben keine Mengen- oder Größenzunahme der Melanomakrophagenzentren. Es konnte aber teilweise Antigen-Trapping festgestellt werden. Die weniger ausgeprägte Reaktion wie bei den Schaferythrozyten wird von den Autoren durch die stärkere Antigenität der Bakterien erklärt, die dann von Makrophagen leicht aufgenommen werden können, ohne dass die Melanomakrophagenzentren eine besondere Rolle spielen müssen (HERRAEZ & ZAPATA, 1987).

#### 2.5.2.4 Die Phagozytosefähigkeit der Fischphagozyten

PARISH et al. (1985) beschrieben, dass die neutrophilen Granulozyten und Monozyten beim Hundshai (*Scyliorhinus canicula*), einem Vertreter der Knorpelfische, in vitro eine große Palette von Antigenen aufnahmen. Während Latex- und Kohlepartikel sowie xenogene Erythrozyten nur von Monozyten phagozytiert wurden, nahmen beide oben erwähnten Zellarten Hefe- und Bakterienzellen auf. Die Konzentration von zuvor injizierten Bakterien im Blut konnte aber nicht über einen längeren Zeitraum gesenkt werden. So sank die Anzahl der Bakterien anfangs rapide ab, blieb den folgenden Monat aber auf einem konstanten Niveau. Außerdem konnten nur tote Bakterien von den Phagozyten aufgenommen werden. Da der Hundshai aber in tiefen Gewässern bei kalten Temperaturen lebt, wo nur wenige Pathogene existieren, reichen vermutlich andere Mechanismen wie humorale Faktoren oder hohe Harnstoff- und Salzkonzentration im Blut aus die Mikroorganismen zu inaktivieren. Die Phagozyten haben in diesem Fall nur noch die Aufgabe des Beseitigens der toten Zellen.

In vivo und in vitro Untersuchungen beim Hornhecht (*Lepisosteus platyrhincus*) zeigten Monozyten und Makrophagen, die in der Lage waren, Bakterien, Hefen und Schaferythrozyten zu phagozytieren. Es wurde außerdem elektronenmikroskopisch die Zerstörung der aufgenommenen Mikroorganismen nachgewiesen (RIJKERS, 1982b).

McARTHUR et al. (1983) injizierten der Scholle, einem Vertreter der Teleostei, mit Chrom51 markierte Steinbuttererythrozyten. Nach 30 Minuten waren nur noch 10% der ursprünglichen

Zahl der fremden roten Blutkörperchen im Blut, während der überwiegende Anteil in den Phagozyten der Leber und der Milz zu finden waren.

Studien beim Karpfen zeigten die Phagozytose von Bakterien (*Bacillus megaterium*) durch Monozyten und neutrophile Granulozyten, während eosinophile und basophile Granulozyten die Mikroorganismen nur umflossen und nicht einverleibten. Eine große Anzahl leerer Vesikel spricht für eine Entleerung der Granula (TEMMINK & BAYNE, 1987).

BRAUN-NESJE et al. (1982) fanden in der Vorderniere von Regenbogenforellen 3 verschiedene Populationen von Makrophagen. Diese unterschieden sich in ihrer Morphologie, nicht aber in der Phagozytoseaktivität. Die Autoren konnten außerdem einen Gehalt an saurer Phosphatase in den Makrophagen feststellen.

FERGUSON (1984) beschrieb bei Regenbogenforellen ein renales Pfortadersystem, das als effektives Phagozytosefilter dient und dem Leberpfortadersystem der Säuger ähnlich ist. Die dort befindlichen Makrophagen nehmen Bakterien aktiv auf. Somit ist diesen Tieren ein Gefäßsystem gegeben, das ein effektives Antigen-Trapping ermöglicht.

### 2.5.2.5 Die Migration der Leukozyten

Nach einer Gewebsschädigung infolge von Traumen oder mikrobieller Infektion entsteht eine Entzündung, in deren Ablauf vermehrt weiße Blutkörperchen am Ort des Geschehens erscheinen. Die Richtung und Geschwindigkeit der Wanderung dieser Zellen wird durch chemische Faktoren bestimmt. Dabei unterscheidet man grundsätzlich 2 verschiedene Abläufe. Die Chemokinese ist eine verstärkte ungerichtete Wanderungsaktivität von Zellen, während die Chemotaxis eine gerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten verschiedener chemischer Faktoren darstellt. Beide Phänomene kommen auch bei Fischen vor (ROITT et al., 1991).

NEWTON et al. (1994) stimulierten granulozytenreiche Leukozytenfraktionen von Ingeren mit Säuger Komplementfaktor C5a oder mit LPS-aktiviertem Inger-Plasma. Die Zellen reagierten auf diesen Reiz mit chemotaktischer Migration. Die Autoren vermuteten deshalb, dass der Mechanismus im Verlaufe der Evolution relativ konstant geblieben ist, so dass sogar Säugerkomplementbestandteile an Ingerzellen binden können.

Bei in vitro Untersuchungen von neutrophilen Granulozyten aus der Niere einer Scholle, die Extrakten von Bakterien und Parasiten ausgesetzt wurden, ergab sich eine erhöhte Migration der Zellen. Da die Wanderung ungerichtet und nicht entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgte, vermuteten die Autoren eine Chemokinese (NASH et al., 1986).

SHARP et al. (1991) beschrieben eine ähnliche Reaktion bei Nierenleukozyten von Regenbogenforellen, die gegenüber Extrakten eines Cestodenplerocercoids getestet wurden.

Andere Studien bei der Regenbogenforelle ergaben eine Reaktion der Peritonealmakrophagen auf Formyl-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin (FMLP), einem aus Bakteriensekreten isolierten Peptid, sowohl mit Chemokinese als auch mit Chemotaxis. Dabei war die chemokinetische Reaktion bei Zellen von den Tieren 8 bis 10mal höher, die zuvor eine intraperitoneale Injektion mit LPS oder formalinabgetötetem *Aeromonas salmonicida* erhielten. Außerdem ergab sich eine Chemotaxis in Richtung der Komplementkomponente C5a in zymosan-aktiviertem Forellenserum. Man vermutete deshalb, dass ein Oberflächenrezeptor für diesen Komplementfaktor besteht (ZELIKOFF et al., 1991).

Die gerichtete Wanderung entlang eines Konzentrationsgefälles beobachtete GRIFFIN (1984) vor allem in Anwesenheit körpereigener Stoffe. Periphere Blutleukozyten der Regenbogenforelle wurden mit Forellenserum als Komplementquelle in eine Richtung gelockt, während dasselbe Experiment mit fetalem Kälberserum nicht funktionierte. Die Reaktion fand jedoch nur in Anwesenheit spezifischer Antikörper statt, so dass eine Komplementaktivierung auf dem klassischen Weg vermutet wurde.

Untersuchungen beim Ammenhai ergaben, dass die Leukozyten nach Stimulation mit LPS-aktiviertem Ammenhaiplasma nur mit Chemokinese reagieren, während sie durch LPS-aktiviertes Rattenserum chemotaktisch angelockt werden (OBENAUF & HYDER SMITH, 1985).

SHARP et al. (1991) zeigten, dass auch Eicosanoide die Wanderung der weißen Blutkörperchen beeinflussen können. Sie fanden eine deutliche chemotaktische Reaktion bei Vordernierenleukozyten von Regenbogenforellen nach Anlockung mit dem Überstand aus einer Ca-Ionophor A 23187 stimulierten Leukozytenkultur. Die Autoren vermuten die chemotaktische Wirkung bei Arachnidonsäureabkömmlingen, weil Leukotrien B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, C<sub>4</sub> und einige Lipoxide nach Ca-Stimulierung von Forellenleukozyten freigesetzt werden.

Die Lipoxide, die eine Klasse der Eicosanoide darstellen, werden von Regenbogenforellenmakrophagen synthetisiert, wobei vor allem das Lipoxin A<sub>4</sub> bei optimaler Konzentration einen deutlichen Einfluss auf die Migration ausübt. Man schreibt dem Lipoxin A<sub>4</sub> deshalb eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess von Regenbogenforellen zu (ROWLEY et al., 1990).

Untersuchungen bei mit Antigen immunisierten Karpfen ließen eine chemokinetische Aktivität von Lymphokinen vermuten. Leukozyten zeigten vermehrte Migration, nachdem sie mit den Überständen antigenstimulierter Vornierenzellkulturen in Kontakt gebracht wurden.

Bei den chemokinetischen Faktoren handelte es sich aber weder um Immunglobuline noch um Komplementfaktoren (HOWELL, 1987).

### 2.5.2.6 Die Förderung der Phagozytose durch Opsonisierung

Die Phagozytose von eingedrungenen Mikroorganismen kann durch die Anlagerung von Opsoninen gefördert werden. Beispiele für diese im Serum vorkommenden Faktoren sind Komplementbestandteile und Antikörper (MALE & ROITT, 1991).

Untersuchungen bei Katzenwelsleukozyten ergaben, dass verschiedene Bakterien (*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Micrococcus lueus*) nur in Anwesenheit von Serum phagozytiert wurden. Nach einer Hitzebehandlung des Serums und daraus resultierenden Komplementinaktivierung war dieser Effekt nicht mehr so stark ausgeprägt.

SAKAI (1984) berichtete, dass *Aeromonas salmonicida* durch Makrophagen und Granulozyten von Salmoniden kaum phagozytiert wurde. Die Zugabe von spezifischen Antikörpern änderte diese Tatsache nur wenig. Erst das Hinzufügen von Serum mit den darin enthaltenen Komplementfaktoren ließ eine deutliche Steigerung der Aufnahmerate erkennen. Der Autor vermutet daher auch beim Fisch Fc-Rezeptoren für Antikörper und C-Rezeptoren für Komplement wie auf der Oberfläche von Säugerleukozyten.

Im Gegensatz dazu gelang MICHEL et al. (1991) eine starke Stimulierung der Phagozytoserate durch Zugabe von spezifischen Antikörpern.

Untersuchungen beim Karpfen zeigten, dass eine Zugabe von Antikörpern die Aufnahme von Schaferythrozyten durch neutrophile Granulozyten nicht steigern konnte, während komplementhaltiges Serum eine deutlich stimulierende Wirkung hatte. Bei der Verabreichung von C3-freiem Serum war aber keine Steigerung zu beobachten. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Versuchsfische vorher mit Kaninchen-Anti-C3-Immunglobulin behandelt. Eine deutliche Reduktion der Phagozytoseaktivität war zu verzeichnen. In einem anderen Versuchsansatz wurden die Proteine auf den Granulozytenoberflächen mit Trypsin zerstört. Auch hier war eine verminderte Aufnahme die Folge. Man vermutete deswegen C3-Rezeptoren auf den Granulozytenoberflächen (MATSUYAMA et al., 1991).

NAKANISHI et al. (1991) konnten die Phagozytose von *Vibrio anguillarum* durch Makrophagen von Regenbogenforellen stimulieren, indem sie gereinigtes CRP oder hitzeinaktiviertes CRP-haltiges Serum zugaben. Die gesteigerte Phagozytose war auch durch

normales Serum zu erreichen, nicht aber durch hitzeinaktiviertes normales Serum, was wiederum auf die Opsonisierungsfähigkeit der Komplementfaktoren hinweist.

Die für die Opsonisierungserkennung durch die Leukozyten erforderlichen Oberflächenrezeptoren konnten erstmals von HAYNES et al. (1988) nachgewiesen werden. Sie beobachteten eine Rosettenbildung, nachdem sie Phagozyten des Ammenhais und des Menschen mit Hai-IgM beschichteten Erythrozyten zusammenbrachten. Eine Hemmung dieser Rosettenbildung war mit Hilfe einer Zugabe von gereinigtem IgM oder FC5-Fragmenten möglich, nicht aber durch Haitransferrin, Rinderserumalbumin oder fetalem Rinderserum. Die Autoren konnten außerdem weitere Eigenschaften eines Rezeptorverhaltens nachweisen, wie zum Beispiel Sättigung oder Reversibilität der Bindung und vermuteten deshalb einen spezifischen Oberflächenrezeptor für Opsonisine auf der Oberfläche der Fischphagozyten.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Makrophagen der Gelbschwanzmakrele (*Seriola quinqueradiata*) und Fremderythrozyten gemacht. Die Zugabe von Antikörpern gegen C3 und Immunglobuline hatten eine Hemmung der Rosettenbildung zur Folge, während nach der Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen andere Antigene kein solcher Effekt zu verzeichnen war. HAMAGUCHI & KUSUDA (1992) vermuten folglich auch, dass Rezeptoren für Komplement und Immunglobuline auf der Oberfläche der Makrophagen existieren.

Spätere Untersuchungen beim Karpfen lassen vermuten, dass sich die Rezeptoren in verschiedenen Organen unterscheiden. Die Makrophagen des Intestinums banden Immunglobulin und opsonisierten im Gegensatz zu den Zellen aus der Vorniere offensichtlich über Rezeptoren (KOUMANS-VAN DIEPEN et al., 1994).

### **3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 MATERIAL**

##### **3.1.1 Regenbogenforellen zur Gewinnung von *Myxobolus cerebralis*-Sporen**

Die Gewinnung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen erfolgte aus drehkranken, institutseigenen Regenbogenforellen. Die Tiere wurden in 100l fassenden Plastiktonnen bei konstant 12°C und permanentem Frischwasserzulauf von etwa 0,8l pro Minute gehalten. Kieselgurausströmer wurden zur Versorgung der Fische mit Luftsauerstoff angebracht. Für die Fütterung wurde pelletiertes Forellenfutter aus dem Handel verwendet.

##### **3.1.2 Haltung der Tubificiden und Produktion der Triactinomyxon-Sporen**

Die parasitenfreien Tubificiden der Gattung *Tubifex tubifex* stammen aus eigener Zucht und wurden in einer 200l Tonne mit permanenter Wasserzufuhr von 0,5l pro Minute und Sauerstoffzufuhr mittels Kieselgurausströmer bei konstant 12°C gehältert. Um für das Labor zu jedem Zeitpunkt Triactinomyxon-Sporen gewinnen zu können, wurden jeden Monat 20-30g der Oligochaeten mit einem Sieb entnommen, gereinigt und in vorbereitete 10l Becken verbracht, deren Boden mit einer ca. 3cm hohen Schicht hellen, keimfreien Sandes bedeckt waren. Anschließend wurden die Oligochaeten mit den zuvor gewonnenen *Myxobolus cerebralis*-Sporen infiziert (ca. 3000 bis 5000 Sporen pro *Tubifex tubifex*). Das Wasservolumen des Beckens wurde im Laufe einer Woche sukzessiv aufgefüllt. Die Becken wurden in einem Brutschrank der Firma Binder® bei konstant 15°C und Zufuhr von Luftsauerstoff durch einen Kieselgurausströmer gehalten. Nach wöchentlichem Wasserwechsel und Fütterung der Tubificiden mit Spirulina-Algen konnten erstmals nach drei Monaten Triactinomyxon-Sporen mittels Filtration durch einen Filter mit 12µm Porengröße gewonnen werden. Die gleichzeitige Haltung zirka zehn solcher Oligochaeten-Becken sollte zu jeder Zeit die ausreichende Gewinnung von Triactinomyxon-Sporen für die Infektion der Regenbogenforellen ermöglichen.

### **3.1.3 Regenbogenforellenbrütlinge für die Infektionsversuche**

Alle Versuche wurden mit Forellenstämmen durchgeführt, die als Eier im Eipunktstadium erhalten und in einem SPF-Raum (spezifisch-pathogen-frei) des Instituts zum Schlüpfen gebracht wurden.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden neben dem als relativ resistent bekannten deutschen Stamm Ho und dem als empfänglich geltenden amerikanischen Stamm TL die Kreuzungshybriden TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) verwendet. Da auch der institutseigene Stamm ZFF als empfänglich gegenüber der Drehkrankheit gilt, stellen beide Kreuzungen somit Hybriden aus jeweils einem als resistent und einem als empfänglich geltenden Stamm dar. Außerdem wurde der Wildstamm S aus der Schweiz in den Versuchen eingesetzt. Dieser Stamm S ist der bisher einzig bekannte selbst produzierende Regenbogenforellen-Stamm überhaupt und stammt aus dem Werdenberger Binnenkanal Höhe Buchs.

Voraussetzung für alle Versuche der vorliegenden Arbeit war die Infektion der Regenbogenforellen mit *Triactinomyxon*-Sporen. Da nicht genügend Sporen auf einmal aus den Oligochaeten-Becken gewonnen werden konnten, um alle Infektionen gleichzeitig durchzuführen, wurden die Versuche teilweise gestaffelt durchgeführt. Alter, Gewicht und Größe der Versuchstiere wurden soweit wie möglich aufeinander abgestimmt.

### **3.1.4 Haltung der Versuchsfische**

Alle Fische wurden in 70l Glasaquarien bei etwa 12°C und permanenter Sauerstoffzufuhr durch einen Kieselgurasströmer gehalten. Die Fütterung erfolgte einmal pro Tag mit handelsüblichem Forellenfutter. Die Frischwasserzufuhr mit entchlortem Münchener Leitungswasser der Härte 16,8°dH betrug ca. 1l pro Minute.

Zusätzlich zu den Laborversuchen wurde ein Feldversuch in einer Fischzucht bei Landsberg am Lech durchgeführt, in der die Drehkrankheit seit Jahren endemisch ist. Die Fische wurden in einem Behälter aus hochverdichtetem HDPE-Kunststoff gehalten. Die Einspeisung des Wassers erfolgte aus dem Abfluss eines darüber liegenden, 200m<sup>3</sup> Wasser fassenden Teiches. Der Fischbehälter hatte die Außenmaße von 300x80x60cm und war in 3 gleich große Kompartimente mit jeweils 216l Wasserinhalt aufgeteilt. Während das erste lediglich als Zulaufbecken genutzt wurde, befanden sich in den anderen je ca. 100 Versuchsfische der 2

verwendeten Stämme des Feldversuchs. Der Wasserstrom von 2l pro Sekunde erfolgte vom Zulaufbecken durch die löchrigen Gitterabtrennungen, die zur Trennung der Stämme eingebracht wurden, durch alle Kompartimente hindurch, um am anderen Ende des Behälters das Becken wieder zu verlassen. Zum Schutz vor Fressfeinden wurde ein Deckel angebracht. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Forellenfutter.

Eine Übersicht über alle verwendeten Stämme und Kreuzungen der vorliegenden Arbeit ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

**Tabelle 3:** Übersicht über alle verwendeten Stämme und Kreuzungen der vorliegenden Arbeit

**Versuch 1a: Vergleich der Empfänglichkeit beim Laborversuch**

Stamm	Schlupfdatum	Größe (cm)	Gewicht (g)	Tagesgradalter •
TLxHo	03.02.2002	2,7	0,3	852
HoxZFF	04.02.2002	4,2	0,7	840
S	05.03.2002	3,1	0,4	492
Ho	05.02.2002	3,3	0,4	828
TL	28.01.2002	3,6	0,5	924

**Versuch 1b: Vergleich der Empfänglichkeit beim Feldversuch**

Stamm	Schlupfdatum	Größe (cm)	Gewicht (g)	Tagesgradalter •
Ho	29.01.2002	3,1	0,4	852
TL	23.01.2002	3,2	0,4	924

**Versuch 2: Histopathologie**

Stamm	Schlupfdatum	Größe (cm)	Gewicht (g)	Tagesgradalter •
Ho	21.12.2002	3,0	0,3	360-528
TL	13.12.2002	3,1	0,3	324-492

**Versuch 3: Lysozymbestimmung**

Stamm	Schlupfdatum	Größe (cm)	Gewicht (g)	Tagesgradalter •
Ho	15.07.2002	2,7	0,1	240
TL	21.07.2002	2,2	0,1	196

- Das Tagesgradalter am Tage der Infektion (also zu Versuchsbeginn) errechnet sich aus dem Produkt des Alters der Fische in Tagen und der Wassertemperatur

### 3.1.5 Tierversuchsantrag

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden durch die Regierung von Oberbayern unter der Nr. 211-2531-37/ 2001 nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

## **3.2 METHODEN**

### **3.2.1 Gewinnung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen**

Es wurden durchschnittlich etwa 10 bis 15 drehkranke Regenbogenforellen zur Gewinnung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen verwendet. Nach Betäubung der Tiere mit MS 222 (0,007%) und anschließender Tötung durch einen Genickschnitt, wurde der Kopf mit einer Schere vom Körper abgetrennt, die Augen entfernt und das anhaftende Muskelfleisch grob entfernt. Die so präparierten Köpfe wurden mit etwas Wasser in einen Mixer der Firma Moulinex® gegeben und bei höchster Stufe 10 Minuten homogenisiert. Grobe Bestandteile wurden mit Hilfe einer Gaze herausgefiltert.

Die weitere Behandlung erfolgte nach der Planktonzentrifugemethode nach O'GRODNICK (1975).

Die so erhaltene sporenhaltige Suspension wurde auf 100ml aufgefüllt. Die Gesamtzahl der erhaltenen *Myxobolus cerebralis*-Sporen wurde nach Auszählung von 50µl bei 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop auf das Ausgangsvolumen hochgerechnet.

### **3.2.2 Infektion der Oligochaeten**

Pro Infektionsversuch wurden ca. 20 bis 30g Oligochaeten mit einem Sieb separiert und in die mit einer ca. 3cm dicken, keimfreien Sandschicht befüllten Plastikbecken verbracht. Daraufhin wurde die Sporensuspension gleichmäßig auf den Tubificiden verteilt. Das Wasservolumen wurde nur langsam innerhalb einer Woche auf das Gesamtvolumen aufgefüllt, um eine hohe Sporenkonzentration und somit eine erfolgreiche Infektion zu gewährleisten. Die erste Fütterung erfolgte erst nach ca. 3 Wochen, damit die Sporen als bis dahin einzige Nahrungsquelle gut und in hohen Zahlen oral von den Oligochaeten aufgenommen werden konnten.

### **3.2.3 Gewinnung der *Triactinomyxon*-Sporen**

Nach etwa 4 Monaten konnten die infizierten Oligochaeten erstmals zur Gewinnung der *Triactinomyxon*-Sporen herangezogen werden. Hierfür wurde das Wasser mit einem Schlauch abgelassen und durch einen Filter mit der Maschenweite 12µm geschickt. Die im Filter hängen gebliebenen Sporen wurden mit Leitungswasser in ein Gefäß gespült. Die

Zählung erfolgte im Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Die erhaltene Anzahl der intakten Sporen in 50µl wurde auf das Ausgangsvolumen hochgerechnet.

### **3.2.4 Infektion der Forellenbrütlinge mit Triactinomyxon-Sporen**

Voraussetzung jedes Versuchs dieser Arbeit war die Infektion von Forellenbrütlingen mit Triactinomyxon-Sporen. Die Abzählung und Aufteilung der nötigen Sporenmengen erfolgte gruppenweise, z.B. wurden für eine 30 köpfige Gruppe (bei einer Infektionsdosis von 1000 Sporen pro Fisch) 30000 Sporen abgezählt und in ein 500ml Aquarium verbracht. Nachdem anschließend das Wasservolumen aufgefüllt wurde, sind alle Versuchsfische einer Gruppe mit einem Käscher gleichzeitig ohne weiteren Wasserzusatz in das Infektionsbecken verbracht worden. Erst nach einer halben Stunde erfolgte Sauerstoffzugabe mit einem Kieselgurausströmer, um die Infektionsfähigkeit der Sporen in den ersten wichtigen Minuten der Infektion nicht zu beeinträchtigen. Nach einer Zeit von 3 Stunden wurden die Tiere inklusive des Sporenwassers in die vorbereiteten 70l Glasaquarien geschüttet, in denen die Haltung während des gesamten Versuchszeitraums erfolgte. Die Zufuhr von Luftsauerstoff erfolgte mit Hilfe von Kieselgurausströmern. Es war kontinuierlicher Wasserzulauf von ca. 1l pro Minute gegeben. Die Temperatur betrug während des Versuchszeitraums zwischen 11 und 13°C. Das verwendete Münchener Leitungswasser der Härte 16,8°dH wurde durch eine Entchlorungsanlage vorbehandelt.

### **3.2.5 Versuchsübersicht**

3.2.5.1 Vergleich der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) und des Wildstamms S mit den Referenz-Stämmen Ho und TL

#### a) Laborversuch

Für die Untersuchung der Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit wurden die Kreuzungsprodukte TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) und der selbst produzierende Wildstamm S aus der Schweiz jeweils mit 100, 1000 und 5000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch infiziert. Dabei dienten der als hoch empfänglich geltende Stamm TL aus den USA und der als wenig empfänglich geltende Stamm Ho aus Deutschland

als Referenzstämme (siehe Tabelle 4). Gleichzeitig wurde jeweils eine nicht infizierte Kontrollgruppe gehalten. Nach 1 und 4 Stunden wurden Fische aus jeder Gruppe in Formalin eingelegt, um einen histologischen Infektionsnachweis zu gewährleisten.

**Tabelle 4:** Übersicht über die Gruppengrößen und die Anzahl der entnommenen Fische für die Histologie nach 1 Stunde und 4 Stunden

Stamm	Infektionsdosis*	Ausgangsmenge	Entnahmen
<b>TLxHo</b>	100	40	12
	1000	40	12
	5000	40	12
<b>HoxZFF</b>	100	20	6
	1000	20	6
	5000	20	6
<b>S</b>	100	25	6
	1000	25	6
	5000	25	6
<b>Ho</b>	100	40	12
	1000	40	12
	5000	40	12
<b>TL</b>	100	40	12
	1000	40	12
	5000	40	12

\* Triactinomyxon-Sporen/Fisch

Nach Auftreten der ersten Symptome wurden die Versuchsfische täglich auf die klinischen Anzeichen pathologisches Drehverhalten, Schwarzfärbung der kaudalen Partien und Deformationen beobachtet. Das Untersuchungsergebnis sowie die Gesamtzahl der jeweils verbleibenden Fische pro Aquarium wurden tabellarisch festgehalten.

Nach einem Zeitraum von 5 Monaten wurden die Versuchsfische mit MS 222 (0,007%) betäubt und mit einem Genickschnitt getötet. Mit einem Scherenschnitt kranial der Rückenflosse wurde der Kopf inklusive eines Teils der Wirbelsäule von den kaudalen Körperpartien getrennt. Anschließend erfolgte mit einem sagitalen Skalpellschnitt die Zerteilung des Kopfes in zwei annähernd gleich große Stücke. Die eine Hälfte wurde sofort in Formalin fixiert und diente später für die histologische Beurteilung des Kopfknoorpels und des Entzündungsgeschehens. Die andere Hälfte wurde für die Sporenzählung verwendet.

Von jeder Probe wurden mindestens 2 Schnitte angefertigt und in dem Gradierungsschema der MacConnell-Baldwin Numerical Scale beurteilt. Diese histologische Beurteilungsmethode ist in eine Skala von Grad null bis fünf gegliedert und findet sich im Standard Protocol for

Whirling Disease Research (BARTHOLOMEW et al. 2001). Sie orientiert sich an der Qualität und Quantität der Wirtsreaktion wie folgt:

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

### b) Feldversuch

Für den Feldversuch wurden die Regenbogenforellen-Stämme Ho und TL verwendet, von denen jeweils etwa 100 Tiere in den Plastikbehälter eingesetzt wurden. Die Infektion mit den *Triactinomyxon*-Sporen erfolgte kontinuierlich und quantitativ nicht bestimmbar mit dem Zustrom des Teichwassers. Für die Dauer von 5 Monaten wurden alle 2 Wochen die Versuchsgruppen auf klinische Symptome der Krankheit beobachtet. Das Ergebnis wurde tabellarisch festgehalten. Die Präparation der Tiere für die Histologie und die Sporenzählung erfolgte analog 3.2.5.1 a).

### 3.2.5.2 Histopathologische Untersuchungen

Für die histopathologischen Untersuchungen wurde ein als hoch (TL) und ein als wenig empfänglicher (Ho) geltender Stamm verwendet.

Es erfolgte zum einen der quantitative Vergleich auf Parasitenstadien in der Haut der Testfische im Verlauf der ersten 12 Stunden (nach 4 Stunden, 6 Stunden, 8 Stunden, 10 Stunden und 12 Stunden, 24 Stunden) post infectionem. Zu jedem Zeitpunkt wurde auch das Verhältnis von „intakten“ und „nicht intakten“ Parasitenstadien festgehalten. Außerdem wurde die Wirtsreaktion beobachtet. Zum anderen wurden im weiteren Verlauf der Infektion alle 3 Tage bis zum 21. Tag post infectionem Fische entnommen (Tag 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 post infectionem) und auf Parasiten und Wirtsreaktionen im Nervengewebe untersucht.

Die Infektion der Fische erfolgte zuerst mit einer Dosis von 1000 beziehungsweise 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch. Da daraufhin kaum Parasitenstadien in der Haut gefunden wurden, wurde der Versuch abermals mit einer Infektionsdosis von 20000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch durchgeführt. Hierbei sind zwar bei beiden Stämmen einige Parasitenstadien gefunden worden, aber für einen statistisch aussagefähigeren Vergleich der beiden Stämme wurde die Infektionsdosis schließlich auf 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch erhöht. Da die hohe Sporenmenge nicht auf einmal gewonnen werden konnte, wurden die Fische jedes Stammes innerhalb des Zeitraums von 2 Wochen gestaffelt infiziert.

Zu jedem Entnahmezeitpunkt wurden je zwei Tiere jeder Gruppe entnommen und mit MS 222 (0,007%) euthanasiert. Ein Fisch wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle für die Histologie in Formalin fixiert, der zweite wurde für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Probenstücke mit ca. 2mm Kantenlänge zerteilt und in 6,25%iges Glutaraldehyd eingelegt.

Das weitere Procedere kann Abschnitt 3.2.6 entnommen werden.

### 3.2.5.3 Bestimmung des Lysozyms im Fischschleim

Für die Bestimmung des Lysozyms im Fischschleim wurde der als hochempfindlich geltende Stamm TL und der als weniger empfindlich geltende Stamm Ho verwendet.

Jeweils 100 Tiere jedes Stamms wurden mit 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch infiziert. Als Kontrollgruppen wurde die gleiche Anzahl an Fischen ohne Sporenexposition eingesetzt. Die Gewinnung des Fischschleims erfolgte 1 Tag, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate und 4 Monate nach der Infektion. Hierfür wurden pro Gruppe jeweils 9 Fische entnommen und

mittels Genickschlag getötet, um eine eventuelle Interaktion des Tötungsbads mit der Aktivität des Lysozyms zu verhindern. Die Schleimentnahme erfolgte durch Abstreifung mit sterilen Skalpellklingen von den Seitenflächen kaudal der Kiemendeckel. Da die gewonnenen Schleimmengen relativ gering waren, wurde der Schleim von jeweils 3 Fischen in einer Sammelprobe zusammengefasst. Nach dem Abwiegen wurden die Proben mit 100µl Aqua destilatum verdünnt und mit einem Vortex-Gerät der Firma Heidolph® geschüttelt, um eine gute Vermengung zu gewährleisten. Anschließend wurde der Schleim (Überstand) von Verunreinigungen und zellulären Bestandteilen durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute separiert und konnte dann mit einer Pipette in ein frisches Gefäß abgehoben werden. Die Aufbewahrung bis zur Messung erfolgte in einem Tiefkühlschrank bei -22°C.

### 3.2.6 Untersuchungsmethoden

#### 3.2.6.1 Auszählung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen aus dem Kopfnorpel

Jeweils 20 Fische des Feldversuchs und 10 Fische des Laborversuchs wurden zur Sporenzählung verwendet.

Nach Tötung der Tiere wurde der Kopf kranial der Rückenflosse vom Körper abgetrennt und danach mit einem Skalpell in der Mitte in einer senkrechten Linie in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde zur Sporenzählung herangezogen.

Bei der Verdauungsmethode nach MARKIW und WOLF (1974; 1980) wird zunächst der Knorpel von den anderen Geweben separiert. Dies erfolgt nach Inkubation des Kopfes im warmen Wasserbad und anschließendem Schütteln mit 3 Glaskugeln. Das Knorpelmaterial wird nacheinander von den Enzymen Pepsin und Trypsin verdaut, so dass schließlich eine reine Sporensuspension übrig bleibt. Die Auszählung erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

#### 3.2.6.2 Histologische Untersuchungen

Die mindestens 48 Stunden lang in Formalin fixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der Einbettung in Paraffin wurden an einem Mikrotom der Firma Reichert-Jung®, Modell 1140/Autocut 4µm dicke Paraffinschnitte

angefertigt. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin–Eosin (HE), die Eindeckelung mit Eukitt® und die Trocknung bei ca. 60°C im Trockenschrank. Die Beurteilung der so vorbereiteten Proben erfolgte an einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss®.

### 3.2.6.3 Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop

Die bei den histopathologischen Untersuchungen am Lichtmikroskop erlangten Ergebnisse sollten am Elektronenmikroskop bestätigt werden. Die für die Untersuchung relevanten Organe (v.a. Haut und Rückenmark) wurden in Stücke von ca. 2mm Kantenlänge zerteilt und in 6,25%iges Glutaraldehyd eingelegt. Nach 3 Stunden erfolgte die Pufferung mit Sörensen-Saccharose-Puffer mit Methionin. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte im Kühlschrank bei 6°C.

Die Proben wurden zur Nachfixierung für 2 Stunden in eine Osmiumtetroxidlösung nach Caulfield verbracht. Anschließend erfolgte erneut eine dreimalige Pufferung mit Sörensen-Saccharose-Puffer mit Methionin. Die so fixierten Proben wurden zunächst für 20 Minuten in 75%iges Aceton, dann für abermals 20 Minuten in 95%iges Aceton und schließlich dreimal für je 20 Minuten in absolutes Aceton (Methode nach Sitte) verbracht. Nach jeweils 10-minütigem Aufenthalt in aufsteigenden Aceton-Epon Gemischen (2:1, 1:1, 1:2) erfolgte die Einbettung mit Hilfe von Gelatine kapseln in reinem Epon XX 812. Die Kapseln wurden zur Polymerisation für 4 Tage in einen Trockenschrank bei 60°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Gelatine kapseln mit heißem Wasser entfernt. Die Blöcke wurden auf dem Trimmgerät TM 60 der Firma Reichert–Jung® getrimmt. An einem Porter Blum® MT-1-Ultramikrotom wurden Semidünnschnitte mit der Dicke von 1µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern bei 60°C getrocknet und für 4 Minuten bei 180°C hitzefixiert. Die Beurteilung der Semidünnschnitte erfolgte nach Färbung mit Toluidinblau am Lichtmikroskop. Nach Entfernung des überschüssigen Materials am Trimmgerät wurden an einem Ultracut der Firma Reichert-Jung® Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 0,5-1,0µm angefertigt. Die anschließende Kontrastierung erfolgte für 10 Minuten in einer Uranylacetatlösung und für 1-2 Minuten in einer Bleiacetatlösung.

Die so vorbereiteten Präparate konnten mit einem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ EM 109 der Firma Zeiss® bei 60 bzw. 80kV betrachtet werden.

### 3.2.6.4 Bestimmung des Lysozymwerts im Mukus

Die Methodik der Lysozymwert-Bestimmung wurde erstmals von PARRY et al. (1965) beschrieben und beruht auf einem Abfall der Absorption von Licht durch die Lysierung des grampositiven Bakteriums *Mikrokokkus lysodeikticus* durch das Lysozym. Für eigene Zwecke wurde der Test geringfügig modifiziert.

Für die Durchführung des Tests wurden außer den Schleimproben (Gewinnung siehe 3.2.5.3) noch folgende Reagentien verwendet:

- Phosphatpuffer nach SÖRENSEN mit dem pH-Wert 6,2

Herstellung: 6,59g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
22,49g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000ml Aqua destilatum

- Aqua destilatum

- 64er ELISA-Rundlochplatte

- Photometer der Firma Asys Hitech® mit der Wellenlänge 495nm

- *Mikrokokkus lysodeikticus* Suspension der Konzentration 1000µg pro ml

- Lysozymstammlösung der Konzentration 0,1 Unit (U) pro µl

Herstellung: 100mg Lysozymfestsubstanz mit der Konzentration 23500 U pro mg  
ad 2350µl Aqua dest.

ergibt Lysozymlösung der Konzentration 1000 U pro µl

Eingefrierung in 50µl Portionen

Auftauen einer Portion vor der Messung

Weiterverdünnung auf 0,1 U pro µl Lysozymstammlösung

Durchführung einer Messung:

Die ELISA-Rundlochplatten wurden wie folgt für die photometrische Messung vorbereitet:

- Negativkontrolle: 100µl Phosphatpuffer

- Lysozymverdünnungsreihe: aufsteigende Aktivitätsreihe mit 1U, 2U, 4U, 6U, 8U und 10U;  
hergestellt aus der Stammlösung und mit Phosphatpuffer auf 100µl aufgefüllt

- Proben: Doppelbestimmung von je 20µl der Dreiersammelproben, die mit Phosphatpuffer auf 100µl aufgefüllt wurden

Die Negativkontrolle, die Lysozymverdünnungsreihe und die Proben wurden vor der Messung mit je 200µl der Mikrokokken-Lösung beschickt. Die Absorption wurde nach 0

## Eigene Untersuchungen

---

Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden und 5 Stunden gemessen. Danach konnte der Absorptionsabfall der Proben und des Standards bestimmt werden. Aus dem Abfall des Lysozymstandards wurde eine Eichgerade erstellt, anhand der die Lysozymaktivitäten der Proben bestimmt werden konnten.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Kontrolle des Infektionserfolgs**

Um den Infektionserfolg vor Ablauf der Inkubationszeit beurteilen zu können, wurden beim Laborexperiment verschiedene Parameter wie das Zucken beim Einsetzen in das Infektionsbad, die Anzahl der freien Amöboidkeimzellen und der histologische Nachweis der penetrierten Parasitenstadien in der Haut untersucht.

Das charakteristische Zucken, das die Tiere teilweise beim Einsetzen in das Triactinomyxon-Sporen Infektionsbad zeigen, entsteht wahrscheinlich bei der Penetration der Parasiten in die Haut und wurde nur in den beiden Infektionsgruppen mit hoher Sporenanzahl pro Fisch beobachtet. Während bei den 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppen nur leichte Anzeichen zu erkennen waren, zeigten die mit 5000 Triactinomyxon-Sporen infizierten Fische deutliche Anzeichen für das Zucken. Unterschiede zwischen den verschiedenen Regenbogenforellenstämmen waren nicht zu entdecken.

Die Untersuchung des Infektionsbads nach 3-stündiger Expositionszeit der Parasiten mit den Fischen kann den Anteil der Sporen aufzeigen, die ihre Amöboidkeime ausgeschleudert haben. Dies ist zwar nicht automatisch gleichzusetzen mit einer erfolgreichen Infektion, aber es könnte eine nicht erfolgte Infektion erkannt werden. In der vorliegenden Arbeit hatten durchschnittlich 71% der Sporen ihre Amöboidkeimzellen und Polkapseln verloren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsdosen und Stämmen erkannt werden.

Nach einstündiger Expositionszeit wurden aus jeder Gruppe Fische entnommen und histologisch auf das Vorkommen von Parasitenstadien in der Haut untersucht. Während bei der niedrigen Infektionsdosis keine Parasiten gefunden werden konnten, waren bei den beiden hohen Infektionsdosen jeweils Parasiten anzutreffen. Da die Parasiten vermehrt in der Epidermis der Flossen zu finden sind, ist die Anzahl stark von der jeweiligen Schnittebene abhängig. Für eine genaue Darstellung sind deshalb höhere Infektionsdosen und Vergleichszahlen erforderlich (siehe Versuch „Histopathologische Untersuchungen“, Kapitel 4.2).

Beim Feldversuch wurde wegen der geringen Sporenzahlen kein Infektionsnachweis durchgeführt.

## **4.2 Die Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) und des Wildstamms S bezüglich der Referenz-Stämme Ho und TL**

### **4.2.1 Vergleich der klinischen Symptomatik**

Die Darstellung der klinischen Symptomatik erfolgt zwecks Übersichtlichkeit zu den Zeitpunkten 50 Tage, 100 Tage und 150 Tage post expositionem beim Laborversuch, beziehungsweise am Tag 50, 100 und 120 beim Feldversuch.

Da bei den Kontrollgruppen kein Tier ein Symptom der Drehkrankheit zeigte, werden sie im Nachfolgenden nicht gesondert aufgeführt.

Die Abbildungen 3 bis 7 zeigen die klinische Symptomatik bei den Kreuzungen und den Stämmen des Laborversuchs.

#### 4.2.1.1 Tag 50 post expositionem des Laborversuchs

Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 50 post expositionem aus dem Laborexperiment gibt Tabelle 5.

##### *Expositionsdosis 100 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Nur Tiere des als empfindlich geltenden Referenz-Stamms TL zeigten zu diesem frühen Zeitpunkt klinische Anzeichen der Infektion. So zeigten jeweils 2 von 28 Tieren pathologisches Schwimmverhalten bzw. Schwarzverfärbung der Kaudalpartien.

##### *Expositionsdosis 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Die Symptome pathologisches Drehverhalten und Deformationen traten 50 Tage nach der Infektion bei keiner Forelle dieser Infektionsgruppe auf.

Bei dem Wildstamm S und den Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) wiesen jeweils 1 von 8 Tieren, 2 von 28 Tieren und 1 von 14 Tieren Schwarzfärbungen der Kaudalpartien auf.

Beim unempfindlichen Referenz-Stamm Ho waren in dieser Gruppe keine Anzeichen für klinische Symptome der Drehkrankheit zu verzeichnen.

Beim empfindlichen Stamm TL wurden 3 von 28 Tieren durch Dunkelfärbung der kaudalen Körperpartien auffällig.

### *Expositionsdosis 5000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Bei der höchsten Infektionsdosis konnten zu diesem Zeitpunkt keine Deformationen gefunden werden.

Bei der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) konnten 4 von 28 Tieren mit Schwarzfärbungen der Kaudalpartien und ein sich drehender Fisch entdeckt werden.

Kein Versuchstier des Hybrids Ho(Eier)xZFF(Spermien) wies Symptome einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion auf.

Bei 9 von 17 Tieren des Wildstammes S war die hintere Körperpartie dunkel gefärbt. Ein Tier von 17 zeigte pathologisches Drehverhalten.

Das Symptom pathologisches Drehverhalten konnte bei einer von 28 Regenbogenforellen des Referenz-Stammes TL provoziert werden. 4 Tiere wurden durch dunkle Kaudalpartien klinisch auffällig.

Beim als unempfindlich geltenden Stamm Ho wurden zu diesem Zeitpunkt auch bei der höchsten Infektionsdosis keine Symptome der Drehkrankheit entdeckt.

**Tabelle 5:** Übersicht über die klinischen Anzeichen des Laborversuchs am Tag 50 post expositionem

100 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	0(14)	0(14)	0(14)
HoxZFF	0(28)	0(28)	0(28)
S	0(13)	0(13)	0(13)
Ho	0(28)	0(28)	0(28)
TL	0(28)	2(28)	0(28)

1000 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	0(28)	2(28)	0(28)
HoxZFF	0(14)	1(14)	0(14)
S	0(8)	1(8)	0(8)
Ho	0(28)	0(28)	0(28)
TL	0(28)	3(28)	1(28)

5000 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	1(28)	4(28)	0(28)
HoxZFF	0(14)	0(14)	0(14)
S	1(17)	9(17)	0(17)
Ho	0(28)	0(28)	0(28)
TL	1(28)	4(28)	0(28)

#### 4.2.1.2 Tag 100 post expositionem des Laborversuchs

Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 100 post expositionem aus dem Laborexperiment gibt Tabelle 6.

##### *Expositionsdosis 100 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Keines der 24 Tiere der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) ließ sich stimulieren, drehende Schwimmbewegungen auszuführen. 2 Fische hatten schwarz gefärbte Kaudalpartien und ein Tier zeigte Deformationen im Schädelbereich.

Bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) war eine von 14 Forellen durch stressinduziertes Drehverhalten und 2 Versuchstiere durch Schwarzfärbung der Schwanzbereiche auffällig, während Deformationen in dieser Gruppe nicht zu beobachten waren.

Beim Wildstamm S drehte sich zu diesem Zeitpunkt eine von 12 Regenbogenforellen bei Einfluss von äußeren Reizen, während 2 Tiere dunkel gefärbte Schwanzbereiche hatten. Ein Tier von 12 wies deformierte Kiemendeckel auf.

Auch am 100. Tag nach der Exposition mit 100 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch waren beim Referenz-Stamm Ho noch keine klinischen Anzeichen der Infektion zu erkennen.

7 von 24 Fischen des als empfindlich bekannten Stammes TL zeigten bei Stresssituationen pathologisches Schwimmverhalten, während jeweils 10 Vertreter dieser Gruppe durch Schwarzfärbung der Kaudalpartien beziehungsweise Deformationen auffällig wurden.

### *Expositions dosis 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Am Tag 100 nach der Exposition war in der 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) ein Tier von 15 mit pathologischem Drehverhalten, 7 Tiere mit schwarzen Schwänzen und 2 Tiere mit Deformationen zu entdecken.

Jeweils ein von 9 Vertretern der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) zeigte kreisende Schwimmbewegungen beziehungsweise dunkle kaudale Körperdrittel. Deformationen konnten bei 2 Versuchsfischen beobachtet werden.

Beim Wildstamm S konnten 3 von 8 Tieren bei Drehbewegungen beobachtet werden. Bei 5 Forellen waren dunkel gefärbte Kaudalpartien und 4 Deformationen zu erkennen.

Bei der mit 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch Gruppe zeigte jeweils ein Vertreter des Referenz-Stammes Ho pathologisches Drehverhalten beziehungsweise Deformationen, während 4 Tiere schwarze Kaudalpartien hatten.

Beim Vergleichs-Stamm TL ließen sich 6 von 17 Fischen durch Klopfen an die Aquarienscheibe zu drehenden Bewegungen stimulieren und 8 der Vertreter dieser Gruppe wurden durch Deformationen auffällig. Schwarze Schwanzbereiche waren bei 16 der 17 Tiere zu sehen.

### *Expositions dosis 5000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

3 von 14 Fischen der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) zeigten stressbedingte Kreisbewegungen, 7 Tiere hatten Schwarzverfärbungen und 2 litten an Deformationen.

In der 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) war eine Forelle wegen der fortlaufenden Kreisbewegungen und jeweils 2 Tiere wegen der beiden anderen Kardinalsymptome der Krankheit auffällig.

## Ergebnisse

Beim Wildstamm S konnten 6 von 16 Tieren bei pathologischem Schwimmverhalten, 13 mit schwarzen Schwänzen und 11 mit Deformationen entdeckt werden.

Bei der höchsten Expositionsdosis waren beim als unempfindlich geltenden Stamm Ho keine Deformationen zu sehen. Eins von 9 Tieren wurde bei Drehbewegungen und 2 von 9 Tieren wurden mit dunkel verfärbten hinteren Körperabschnitten beobachtet.

9 von 23 Fischen des Referenz-Stamms TL konnten durch äußere Stimuli zu kreisenden Bewegungen veranlasst werden. 22 Vertreter dieser Gruppe wiesen dunkle Kaudalpartien auf und das Skelett von 11 Salmoniden war deformiert.

**Tabelle 6:** Übersicht über die klinischen Anzeichen des Laborversuchs am Tag 100 post expositionem

100 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	0(24)	2(24)	1(24)
HoxZFF	1(14)	2(14)	0(14)
S	1(12)	2(12)	1(12)
Ho	0(22)	0(22)	0(22)
TL	7(24)	10(24)	10(24)

1000 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	1(15)	7(15)	2(15)
HoxZFF	1(9)	1(9)	2(9)
S	3(8)	5(8)	4(8)
Ho	1(20)	4(20)	1(20)
TL	6(17)	16(17)	8(17)

5000 TAMs/Fisch	Drehverhalten	Schwarzfärbung	Deformationen
TLxHo	3(14)	7(14)	2(14)
HoxZFF	1(11)	2(11)	2(11)
S	6(16)	13(16)	11(16)
Ho	1(9)	2(9)	0(9)
TL	9(23)	22(23)	11(23)

#### 4.2.1.3 Tag 150 post expositionem des Laborversuchs

Eine Übersicht über die klinischen Anzeichen der Drehkrankheit am Tag 150 post expositionem aus dem Laborexperiment gibt Tabelle 7.

##### *Expositionsdosis 100 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Stressinduziertes Drehverhalten und Deformationen konnten bei jeweils einem von 20 Tieren der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) beobachtet werden. Kein Tier wies das dritte Kardinalsymptom Schwarzfärbung der Kaudalpartien der Krankheit auf.

Bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) waren bei 14 Tieren keine dunkel verfärbten Schwänze zu sehen, aber jeweils ein Tier litt an Kreisbewegungen beziehungsweise an Deformationen.

Jeweils eins von 11 Tieren des Wildstamms S war durch die Symptome Schwarzfärbung des hinteren Körperabschnitts und Kreisbewegungen auffällig. 5 Regenbogenforellen dieses Stamms waren deformiert.

Auch nach 150 Tagen zeigten die mit 100 Triactinomyxon-Sporen infizierten Tiere des Vergleichs-Stamms Ho keine Anzeichen für klinische Symptome der Krankheit.

Beim Referenz-Stamm TL zeigten zu diesem Zeitpunkt 13 von 22 Fischen das Symptom pathologisches Drehverhalten, 21 Forellen eine Schwarzfärbung der Kaudalpartien und alle Vertreter dieser Gruppe litten an Deformationen.

##### *Expositionsdosis 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Am Ende der Versuchszeit war bei der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) kein sich drehender Fisch mehr zu finden. Sowohl Schwarzfärbung der Kaudalpartien als auch Deformationen zeigten sich bei 3 von 14 Tieren.

Bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) war nach 150 Tagen kein Anzeichen für pathologisches Schwimmverhalten mehr zu erkennen. Ein Vertreter der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe wurde durch eine dunkle hintere Körperpartie auffällig, 2 andere litten an Deformationen.

Ungerichtete Schwimmbewegungen waren bei 2 von 6 Tieren des Wildstamms S zu beobachten. Die Schwänze von 4 Fischen dieses Stamms waren dunkel verfärbt. Es fielen 5 Tiere durch Deformationen auf.

Bei der mittleren Infektionsdosis zeigte keine Forelle des als wenig empfindlich geltenden Stamms Ho pathologisches Drehverhalten nach Stimulation. Bei 3 von 18 Tieren wurde eine Schwarzfärbung des hinteren Körperdrittels sichtbar. Das knorpel-knöchrige Skelett eines Tieres war deformiert.

7 von 16 Tieren des Vergleichs-Stamms TL zeigten unkontrollierte Kreisbewegungen und 15 von 16 der Salmoniden hatten dunkle Kaudalpartien. Alle Vertreter dieser Gruppe waren deformiert.

### *Expositions-dosis 5000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch*

Keiner der Fische der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) wurde zu diesem Zeitpunkt durch pathologisches Drehverhalten auffällig. Es konnten jeweils 2 der Tiere mit dunklen Schwänzen beziehungsweise mit Deformationen beobachtet werden.

Bei der höchsten Infektionsdosis litt kein Vertreter der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) an den stressinduzierten Kreisbewegungen. Ein Salmonide dieser Gruppe war im Kaudalbereich dunkel verfärbt und 2 Tiere waren deformiert.

Beim Wildstamm S zeigten von 13 Fischen 3 unkoordinierte Kreisbewegungen, 11 dunkle Kaudalpartien und alle 13 deformierte Skelettanteile.

Bei der höchsten Infektionsdosis des Referenz-Stamms Ho war bei keiner Regenbogenforelle pathologisches Drehverhalten zu beobachten. Während eine von 8 Fischen im Schwanzbereich dunkel verfärbt war, litten 2 Tiere an Deformationen.

Unkontrollierte Schwimmbewegungen waren bei 9 von 21 Vertretern des als empfindlich geltenden Stamms TL zu vermerken. Jeweils 20 der Tiere wurden durch dunkle Schwänze beziehungsweise Deformationen auffällig.

**Tabelle 7:** Übersicht über die klinischen Anzeichen des Laborversuchs am Tag 150 post expositionem

<b>100 TAMs/Fisch</b>	<b>Drehverhalten</b>	<b>Schwarzfärbung</b>	<b>Deformationen</b>
<b>TLxHo</b>	1(20)	0(20)	1(20)
<b>HoxZFF</b>	1(14)	0(14)	1(14)
<b>S</b>	1(11)	1(11)	5(11)
<b>Ho</b>	0(22)	0(22)	0(22)
<b>TL</b>	13(22)	21(22)	22(22)

<b>1000 TAMs/Fisch</b>	<b>Drehverhalten</b>	<b>Schwarzfärbung</b>	<b>Deformationen</b>
<b>TLxHo</b>	0(14)	3(14)	3(14)
<b>HoxZFF</b>	0(8)	1(8)	2(8)
<b>S</b>	2(6)	4(6)	5(6)
<b>Ho</b>	0(18)	3(18)	1(18)
<b>TL</b>	7(16)	15(16)	16(16)

<b>5000 TAMs/Fisch</b>	<b>Drehverhalten</b>	<b>Schwarzfärbung</b>	<b>Deformationen</b>
<b>TLxHo</b>	0(11)	2(11)	2(11)
<b>HoxZFF</b>	0(11)	1(11)	2(11)
<b>S</b>	3(13)	11(13)	13(13)
<b>Ho</b>	0(8)	1(8)	2(8)
<b>TL</b>	9(21)	20(21)	20(21)



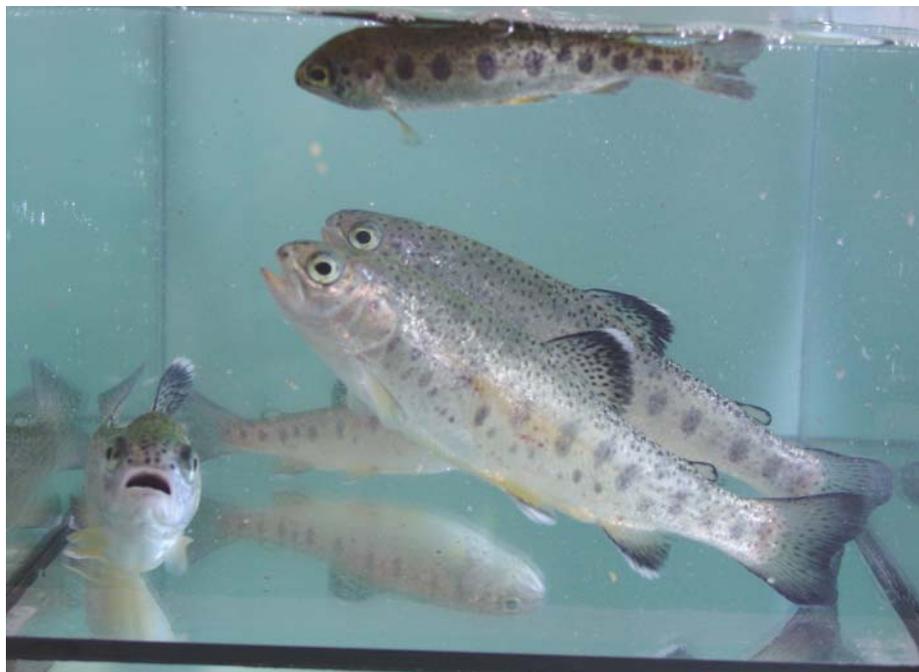
**Abbildung 3:** Klinische Anzeichen beim Hybrid TL(Eier)xHo(Spermien) (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch); dunkle Kaudalpartien mit Deformationen und Tiere Gleichgewichtsstörungen; teilweise klinisch gesunde Tiere



**Abbildung 4:** Klinische Anzeichen beim Hybrid Ho(Eier)xZFF(Spermien) (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch); ein Tier mit dunkler Kaudalpartie; heterogene Größe und Gewicht; leicht verformter Kopfbereich; teilweise gesunde Tiere



**Abbildung 5:** Klinische Anzeichen beim Wildstamm S (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch); schwarz verfärbte Kaudalpartien, Deformationen, Tiere liegen müde auf dem Boden



**Abbildung 6:** Klinische Anzeichen beim Stamm Ho (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch); überwiegend gesunde Regenbogenforellen; ein Tier dunkel verfärbt und im Wachstum zurückgeblieben



**Abbildung 7:** Klinische Anzeichen beim Stamm TL (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch); deformierte Tiere mit teilweise schwarzen Kaudalpartien; Orientierungslosigkeit und Müdigkeit; Tiere liegen erschöpft auf dem Beckengrund

### 4.2.1.4 Klinische Anzeichen des Feldversuchs

Über den kompletten Zeitraum des Feldversuchs wurden bei keinem der beiden verwendeten Stämme Anzeichen für die Symptome Deformationen und Dunkelfärbung der Kaudalpartien gefunden.

Am Tag 50 post expositionem wurden keine Tiere mit pathologischem Drehverhalten verzeichnet.

Stamm Ho zeigte auch am Ende des Versuchs keinerlei Symptome der Drehkrankheit.

Am Tag 100 post expositionem wurden 60 von 100 Tieren bei Stamm TL durch Stress induzierte Drehbewegungen auffällig.

Am Tag 120 post infectionem wiesen 60 von 100 Fischen bei Stamm TL das pathologische Schwimmverhalten auf.

### 4.2.2 Vergleich der Endgrößen und -Gewichte

Es wurden aus jeder Versuchsgruppe 10 heterogene Vertreter entnommen und die jeweiligen Mittelwerte bei Größe und Gewicht bestimmt. Außerdem wurde die Standardabweichung errechnet.

Die durchschnittlichen Größen des Laborversuchs finden sich in Abbildung 8, die mittleren Gewichte in Abbildung 9.

#### 4.2.2.1 Größen und Gewichte beim Laborversuch

Hinsichtlich Größe und Gewicht übertrafen die Vertreter der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe des Hybrids TL(Eier)xHo(Spermien) die Tiere der beiden anderen Infektionsgruppen 100 und 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch. Auch die größten Abweichungen vom durchschnittlichen Gewicht gab es in dieser Gruppe, wohingegen die größte Standardabweichung bei der Größe in der mittleren Infektionsgruppe errechnet wurde. Die mit 1000 Sporen infizierten Tiere des Hybrids Ho(Eier)xZFF(Spermien) waren am größten und schwersten. Die größten Abweichungen vom Mittelwert kamen bei der höchsten Infektionsdosis vor.

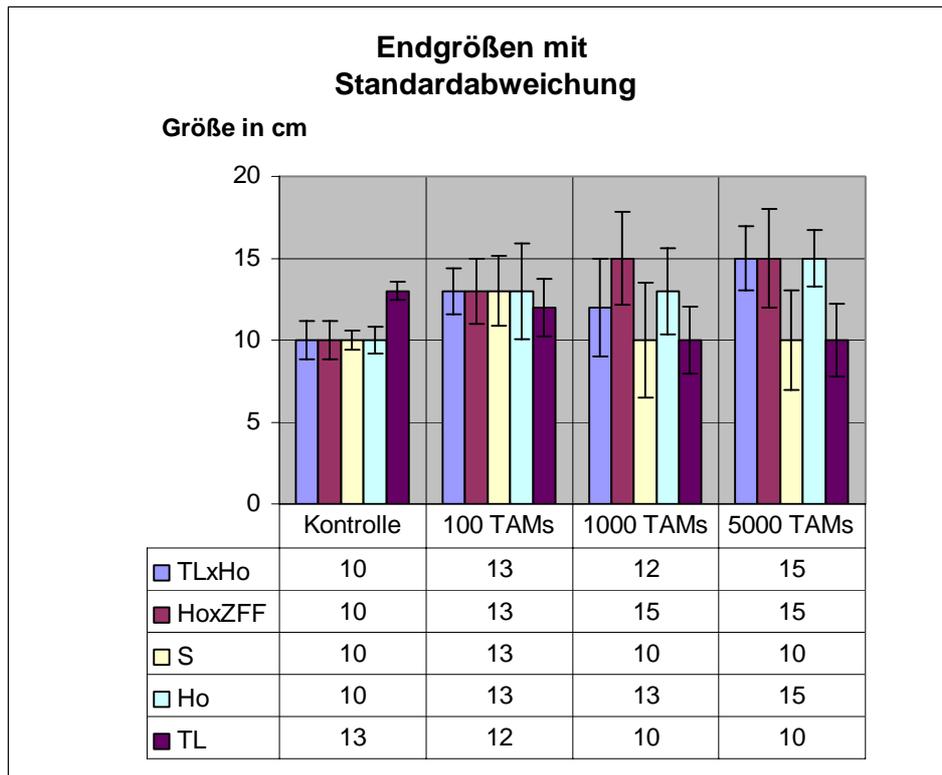
Bei Wildstamm S waren die Tiere bei der niedrigsten Infektionsdosis am größten und schwersten, während die größten Abweichungen vom Mittelwert bei der mittleren Infektionsdosis vorkamen.

## Ergebnisse

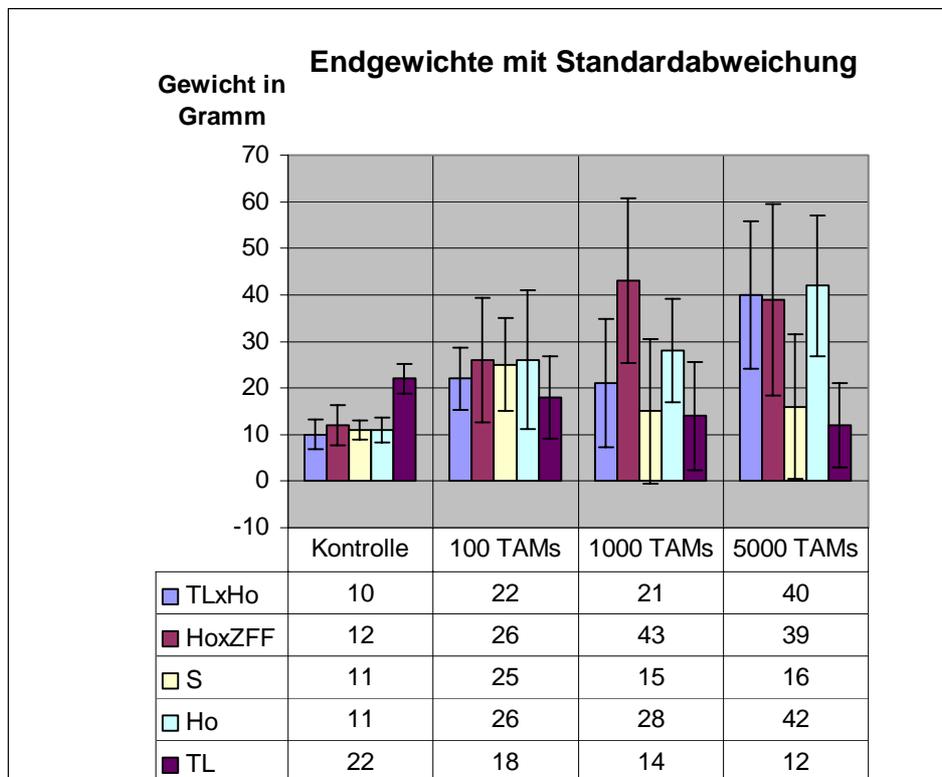
---

Beim Referenz-Stamm Ho waren durchschnittlich die schwersten und größten Tiere am Ende des Versuchs in der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe zu finden. Die größten Abweichungen vom Mittelwert beim Gewicht gab es auch in der höchsten Infektionsgruppe, bei der Größe in der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe.

Die Tiere der Kontrollgruppe des als hoch empfänglich geltenden Stamms TL waren nach 150 Tagen größer und schwerer als die infizierten Vergleichsfische. Die größte Standardabweichung war bei der Größe bei den mit 5000 Triactinomyxon-Sporen und beim Gewicht bei den mit 1000 Triactinomyxon-Sporen infizierten Forellen zu verzeichnen.



**Abbildung 8:** Endgrößen aus dem Laborversuch; Mittelwerte aus 10 Einzelwerten mit Standardabweichung



**Abbildung 9:** Endgewichte aus dem Laborversuch; Mittelwerte aus 10 Einzelwerten mit Standardabweichung

### 4.2.2.2 Größen und Gewichte beim Feldversuch

Da alle Tiere des Feldversuchs kurz vor Ende der Versuchszeit durch eine Unterbrechung in der Frischwasserzufuhr verstarben und erst nach Einsetzen der Verwesung eingesammelt werden konnten, wurde auf eine Bestimmung des Endgewichts verzichtet. Es konnten aber jeweils 10 Kadaver zur Größenbestimmung herangezogen werden.

Die größeren Fische im Feldversuch waren bei Stamm Ho (Ho: 9,9cm und TL: 8,9cm) zu finden. Dieser Stamm wies auch die höheren Abweichungen vom Mittelwert auf.

### 4.2.3 Infektionsprävalenz

Die Infektionsprävalenz gibt die Prozentzahl der untersuchten Fische jeder einzelnen Infektionsgruppe an, bei denen Sporen im Kopfknochen mit der Verdauungsmethode gefunden werden konnten. Bei keinem der Kontrollfische konnten *Myxobolus cerebralis*-Sporen gefunden werden.

#### 4.2.3.1 Infektionsprävalenz beim Laborversuch

Die Infektionsprävalenz beim Hybrid TL(Eier)xHo(Spermien) lag bei 80% in der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe, bei 90% in der 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe und bei 100% in der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe (Tabelle 8).

Bei der niedrigen Infektionsdosis (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) des Hybrids Ho(Eier)xZFF(Spermien) wurden bei 70% der untersuchten Fische Sporen detektiert. Bei der 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe waren alle Tiere dieses Stammes positiv bei der Sporensuche. Die Infektionsprävalenz der höchsten Infektionsgruppe lag bei 90%.

Beim Wildstamm S waren wie beim Stamm TL unabhängig von der Infektionsdosis bei allen der untersuchten Regenbogenforellen Sporen im Kopfknochen zu finden.

Die Infektionsprävalenz betrug beim Vergleichs-Stamm TL in allen 3 Infektionsgruppen 100%. Beim als wenig empfänglich bekannten Stamm Ho wurden bei der mittleren Infektionsdosis (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) 80% und bei der hohen (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) und niedrigen (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) Infektionsdosis jeweils 70% der Tiere als *Myxobolus cerebralis* positiv befundet.

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der Infektionsprävalenz der Versuchsfische aus dem Laborversuch (Angaben in %)

TAMs/Fisch	TLxHo	HoxZFF	S	Ho	TL
100	80	70	100	70	100
1000	90	100	100	80	100
5000	100	90	100	70	100

#### 4.2.3.2 Infektionsprävalenz beim Feldversuch

Beim Stamm Ho wiesen 20% der im Feldversuch untersuchten Tiere *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Kopfknochen auf.

100% der Fische des Stamms TL waren beim Feldversuch infiziert.

#### 4.2.4 Quantitative Erfassung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen pro Kopf

##### 4.2.4.1 Mittlere Anzahl der *Myxobolus cerebralis*-Sporen der Tiere des Laborversuchs

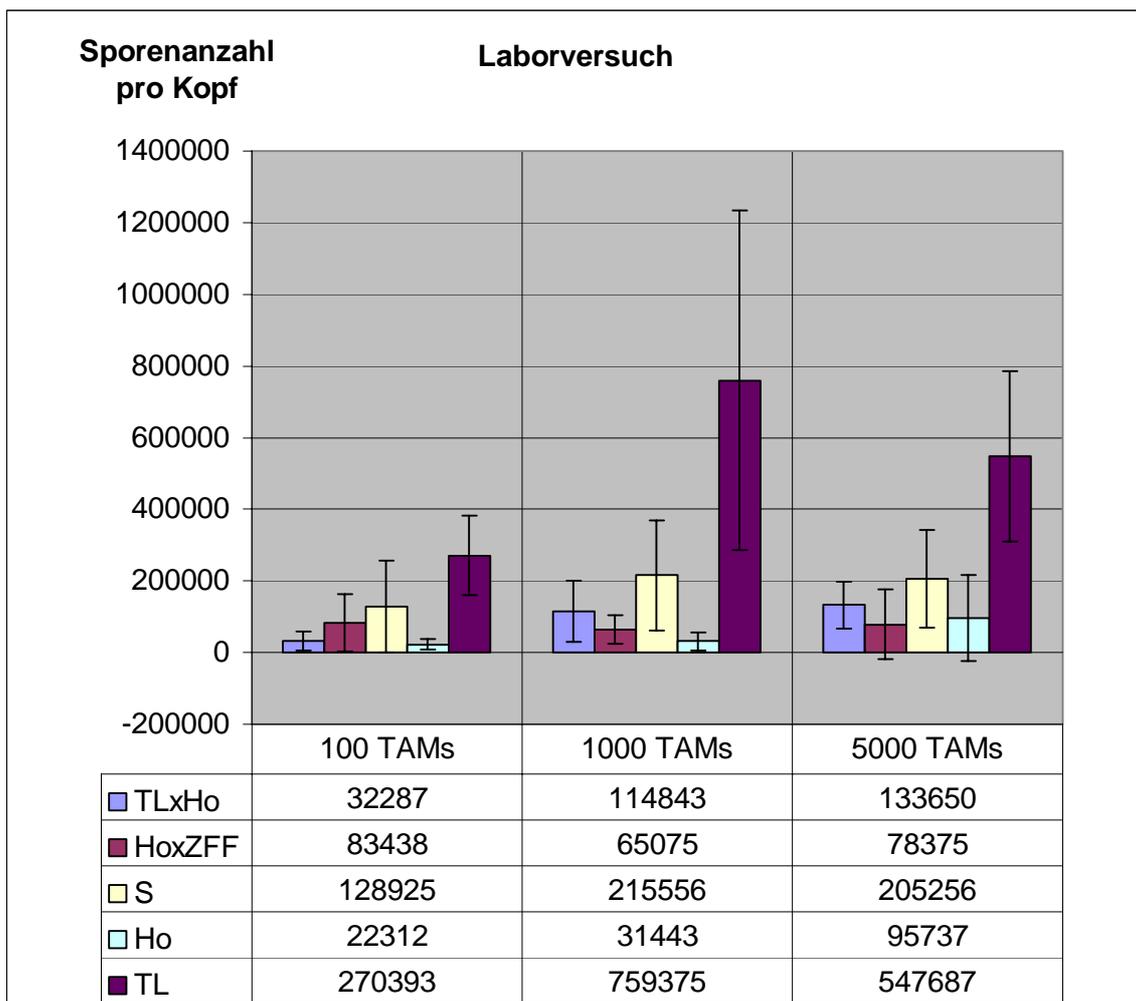
Die Gruppe des Hybrids TL(Eier)xHo(Spermien), die mit der niedrigsten Triactinomyxon-Sporen-Dosis (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) infiziert wurde, hatte eine mittlere *Myxobolus cerebralis*-Sporenanzahl von 32.287. Die Tiere der 1000 Triactinomyxon-Sporen-Gruppe wiesen durchschnittlich 114.843 Sporen im Kopf auf. Bei der höchsten Infektionsdosis (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) wurden im Schnitt 133.650 Sporen detektiert.

Bei den mit 100 Triactinomyxon-Sporen infizierten Regenbogenforellen des Hybrids Ho(Eier)xZFF(Spermien) entwickelten sich im Mittel 83.438, bei den mit 1000 Triactinomyxon-Sporen infizierten Tieren 65.075 und bei den Fischen der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe durchschnittlich 78.375 *Myxobolus cerebralis*-Sporen. Beim Wildstamm S lag die mittlere Sporenanzahl pro Kopf wie folgt: Bei der niedrigsten Infektionsdosis wurden 128.925 Sporen, bei der mittleren 215.556 Sporen und bei der höchsten 205.256 Sporen aus dem Kopfknochen ausgezählt (Abbildung 10).

Bei den mit 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch infizierten Tieren des Referenz-Stamms Ho entwickelten sich im Schnitt 22.312 *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Kopfknochen. Bei der nächst höheren Infektionsdosis (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) konnten durchschnittlich 31.443 Sporen detektiert werden. Die Sporenanzahl in der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe lag bei 95.737.

## Ergebnisse

Bei der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe des empfänglichen Vergleichs-Stamms TL entwickelten sich im Mittel 270.393 *Myxobolus cerebralis*-Sporen. Bei der mittleren Infektionsdosis (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) wurden 759.375 Sporen nach der Verdauung des Kopfkorpels ausgezählt. Bei der Gruppe mit der höchsten Infektionsdosis (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) wurden 547.687 Sporen gefunden (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Quantitative Erfassung der *Myxobolus cerebralis*-Sporenmenge pro Kopf nach der Verdauungsmethode bei steigender Infektionsdosis; Mittelwerte aus 10 Einzelwerten mit Standardabweichung

#### 4.2.4.2 Mittlere Anzahl der *Myxobolus cerebralis*-Sporen der Tiere des Feldversuchs

Die mittlere Sporenanzahl pro Kopf beim Stamm Ho lag im Feldversuch bei 3.750, während die Regenbogenforellen des Stamms TL durchschnittlich 107.340 Sporen aufwiesen.

#### 4.2.5 Pathohistologische Veränderungen

Die pathohistologische Beurteilung von 10 Tieren aus jeder Gruppe wurde nach dem Schema von MacConnell Baldwin durchgeführt. Die Einteilung erfolgt in Grad 0 bis Grad 5, wobei aufsteigende Grade auch größere histopathologische Veränderungen widerspiegeln. Die Definitionen der einzelnen Grade findet sich in Abschnitt 3.2.5.

##### 4.2.5.1 Pathohistologische Veränderungen beim Laborversuch

Der Grad der histopathologischen Veränderungen beim Hybrid TL(Eier)xHo(Spermien) in der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe lag bei 1,0. Die mittleren Werte der beiden höheren Infektionsgruppen (1000 und 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) lagen bei jeweils 1,6.

Die Einteilung der Tiere der niedrigsten Infektionsgruppe (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) des Hybrids Ho(Eier)xZFF(Spermien) nach der MacConnell Baldwin Numerical Scale erfolgte durchschnittlich auf Grad 1,3. Die 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe wurde auf Grad 1,1 und die höchste Infektionsgruppe auf Grad 1,2 befundet.

Der mittlere Grad der histopathologischen Veränderungen bei der niedrigsten Infektionsdosis (100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) des Wildstammes S war 1,4, bei der 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe 2,2 und bei der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe 3,0 (Abbildung 11).

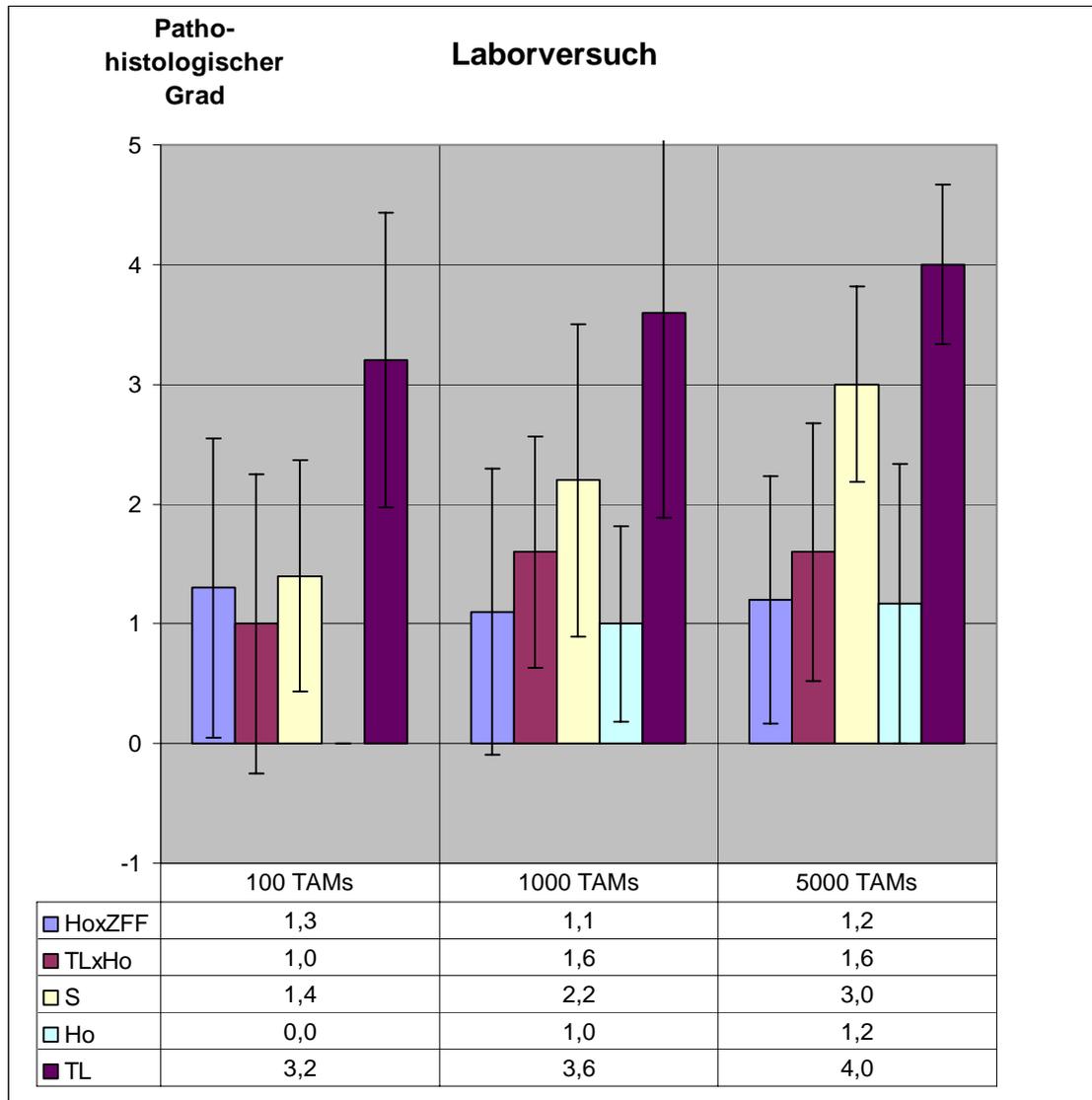
Der als wenig empfindlich geltende Vergleichs-Stamm Ho zeigte in der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe keine Anzeichen von histopathologischen Veränderungen. In der mittleren Infektionsgruppe (1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) dieses Stammes war der Mittelwert der Veränderungen Grad 1. Bei der höchsten Infektionsdosis (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) war ein durchschnittlicher Grad von 1,2 zu verzeichnen.

Die Einstufung der Regenbogenforellen des Referenz-Stammes TL nach der MacConnell Baldwin Numerical Scale erfolgte bei der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe auf Grad 3,2. Die beiden höheren Infektionsgruppen erreichten die Mittelwerte 3,6 bei der mittleren

## Ergebnisse

(1000 Triactinomyxon-Sporen /Fisch) beziehungsweise 4,0 bei der höchsten (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) Infektionsdosis.

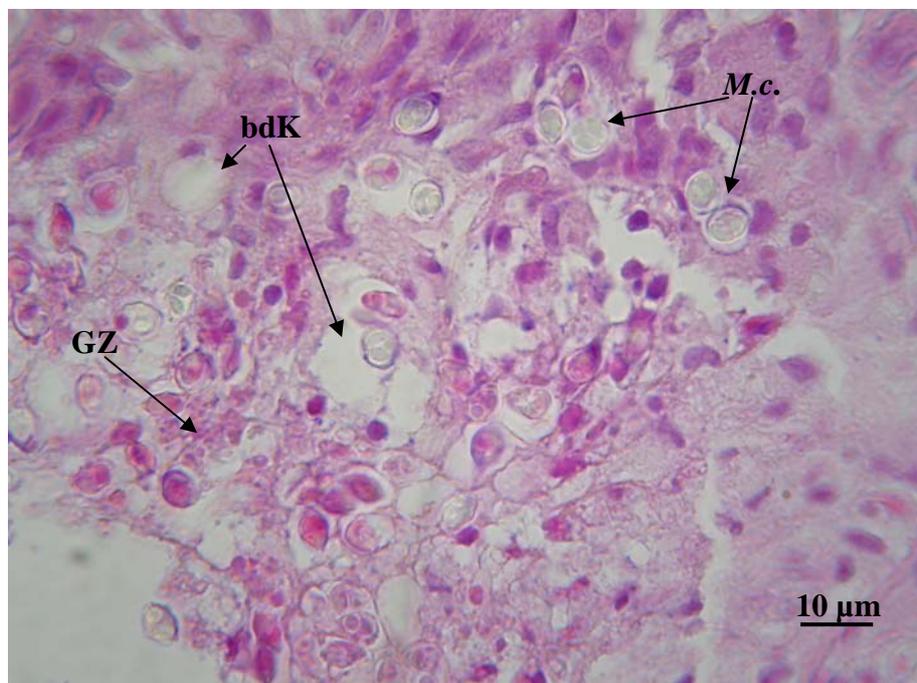
Darstellungen der histopathologischen Veränderungen der verschiedenen Stämme des Laborversuchs finden sich in den Abbildungen 12 bis 21.



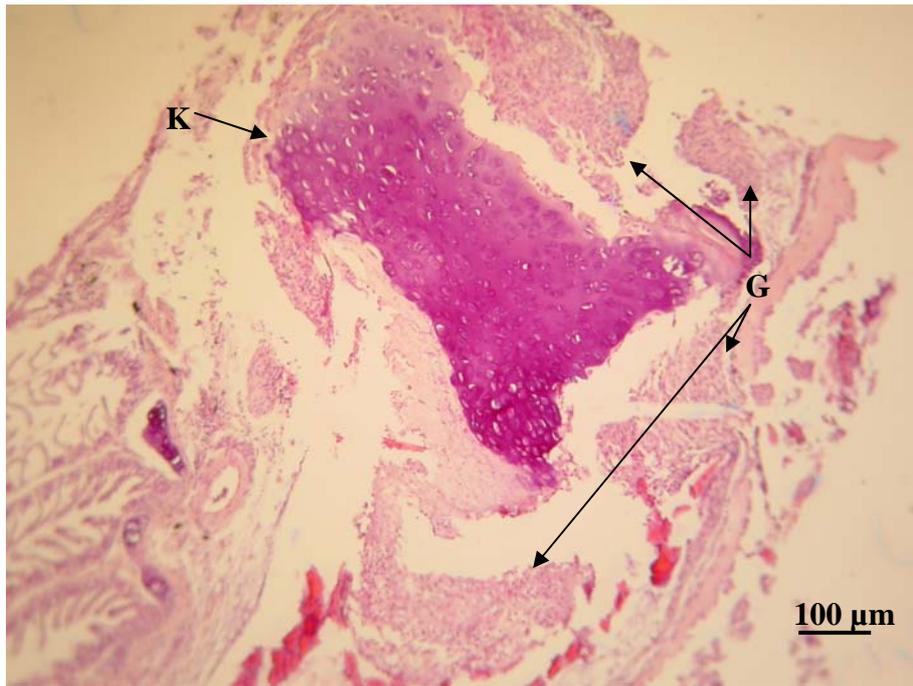
**Abbildung 11:** Übersicht der histopathologischen Veränderungen beim Laborversuch; Einteilung nach Graden der MacConnell Baldwin Numerical Scale; Mittelwerte aus 10 Einzelwerten mit Standardabweichung



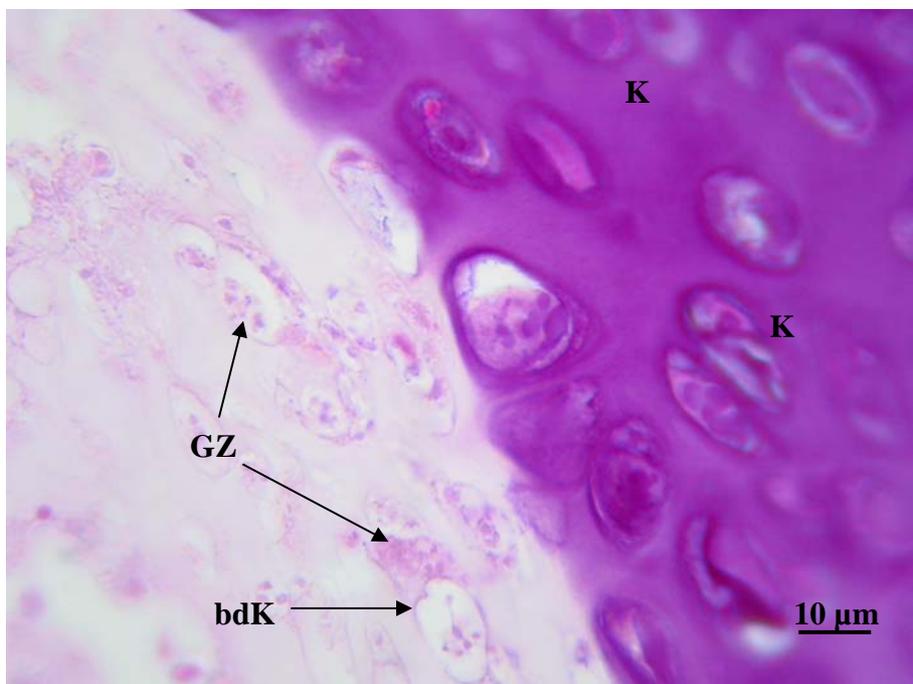
**Abbildung 12:** Hybrid TL(Eier)xHo(Spermien); 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; Granulom (G) mit Leukozyten (L) und Entwicklungsstadien sowie reife Sporen von *Myxobolus cerebralis* (*M.c.*); HE



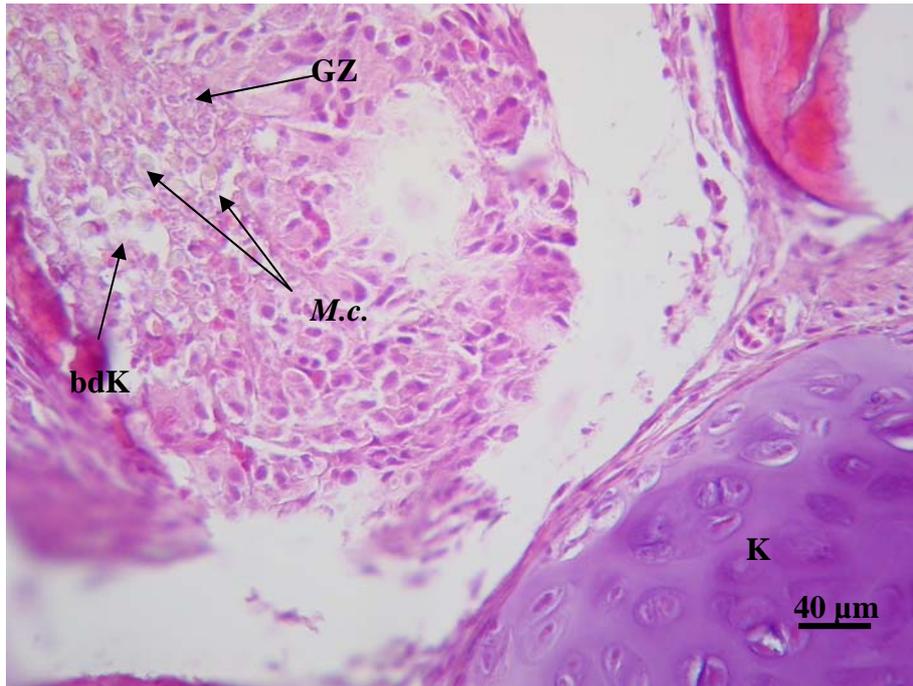
**Abbildung 13:** Hybrid TL(Eier)xHo(Spermien); 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; *Myxobolus cerebralis*-Sporen (*M.c.*); blasig degeneriertes Knorpelmaterial (bdK); Granulozyten (GZ); HE



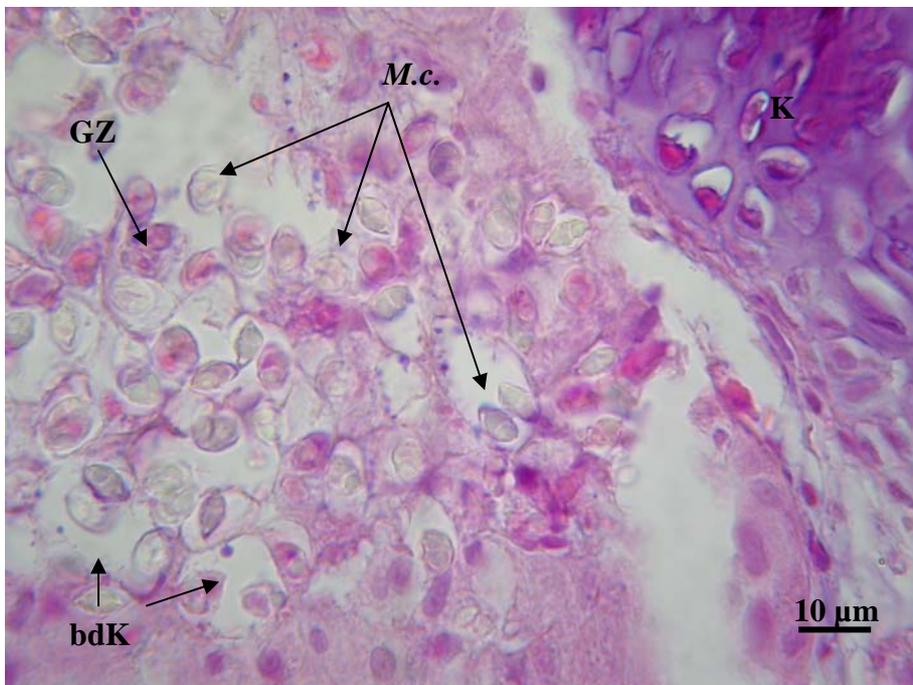
**Abbildung 14:** Hybrid Ho(Eier)xZFF(Spermien); 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; gesundes Knorpelmaterial (K) umgeben von Granulomen (G); HE



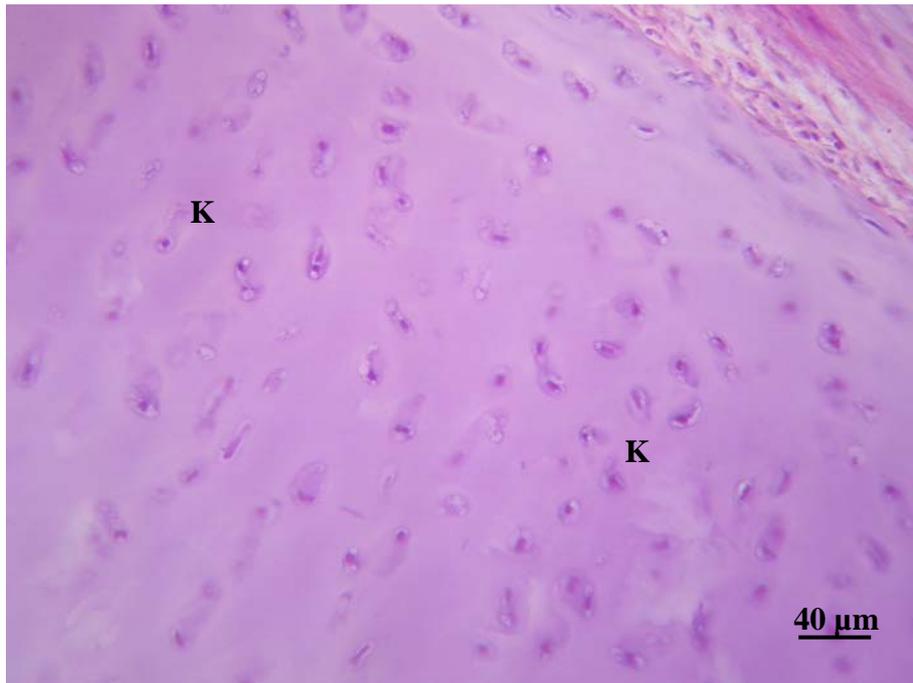
**Abbildung 15:** Hybrid Ho(Eier)xZFF(Spermien); 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; gesundes Knorpelmaterial (K); blasig degenerierte Knorpellakunen (bdK) mit Granulozyten (GZ); HE



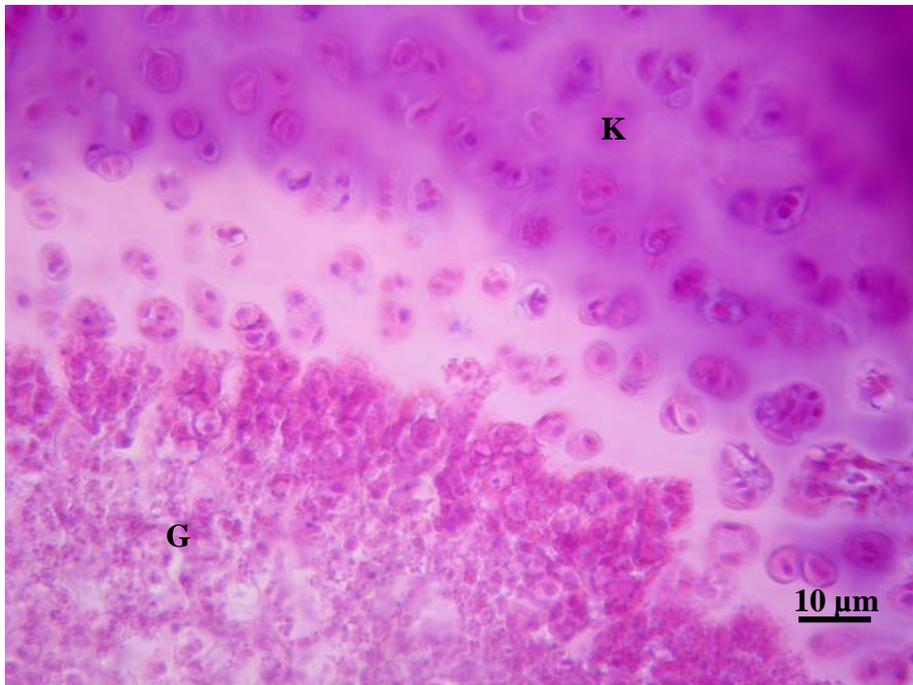
**Abbildung 16:** Stamm S; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; gesunde Knorpelareale (K); zerstörte Knorpelbereiche blasig degeneriert (bdK) mit *Myxobolus cerebralis*-Sporen (M.c.) und Granulozyten (GZ); HE



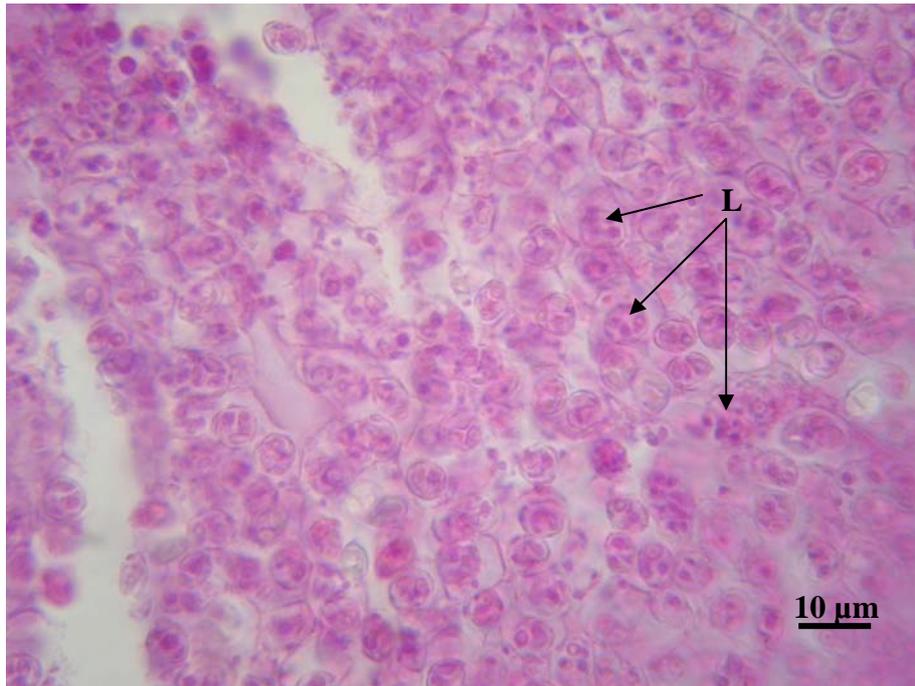
**Abbildung 17:** Stamm S; 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; gesunde Knorpelareale (K); zerstörte Knorpelbereiche blasig degeneriert (bdK) mit *Myxobolus cerebralis*-Sporen (M.c.) und Granulozyten (GZ); HE



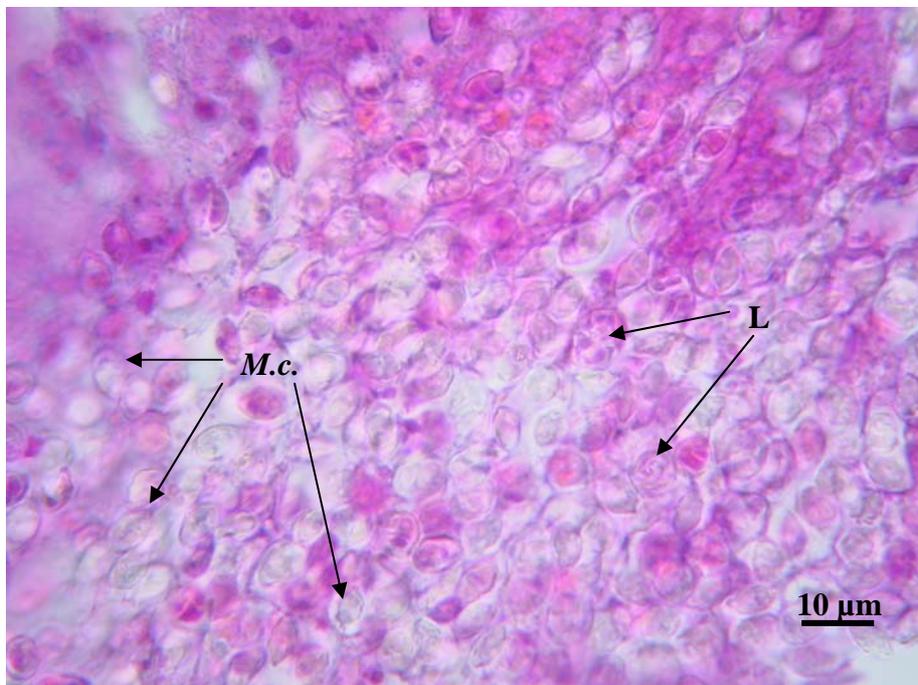
**Abbildung 18:** Stamm Ho; 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; Übersichtsaufnahme gesunder Knorpelarchitektur (K); keine Parasiten bedingten histopathologischen Veränderungen erkennbar; HE



**Abbildung 19:** Stamm Ho; 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; Übergang zwischen gesunder Knorpelarchitektur (K) und einem Granulom mit massenhaft sporogonischen Stadien von *Myxobolus cerebralis* (G); HE



**Abbildung 20:** Stamm TL; 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; massive Leukozyteninfiltration zusammen mit verschiedenen Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis* (L); Knorpel ist vollständig lysiert; HE



**Abbildung 21:** Stamm TL; 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; massenhaft reife *Myxobolus cerebralis*-Sporen (M.c.) mit etwas Leukozyteninfiltration (L); HE

### 4.2.5.2 Pathohistologische Veränderungen beim Feldversuch

Die pathohistologischen Veränderungen des Stamms Ho beim Feldversuch lagen im Mittel bei 0,2.

Die durchschnittliche Beurteilung nach der MacConnell Baldwin Numerical Scale beim Stamm TL erfolgte auf Grad 2,0.

## 4.3 Histopathologische Untersuchungen

### 4.3.1 Anzahl der Parasitenstadien in der Haut in den ersten 12 Stunden nach erfolgter Infektion

Nachdem bei Infektion mit 1.000, 5.000 und 20.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch nur wenige Parasitenstadien in der Haut der Versuchstiere gefunden werden konnten, wurde die Infektionsdosis auf 35.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch erhöht. Es wurden von jedem Fisch mindestens je 8 histologische Schnitte angefertigt und die Mittelwerte aus den Parasitenzahlen errechnet. Da schon lichtmikroskopisch auffiel, dass nicht alle Parasitenstadien in der Haut intakt waren, erfolgte eine quantitative Unterscheidung in "intakte" und "nicht intakte" Parasitenstadien. Auch im Elektronenmikroskop wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. So fielen bei den degenerierten Stadien mehr oder weniger ausgeprägte Dilatation und Lyse der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums, ein Strukturverlust und eine Homogenisierung des Zytoplasmas, Vakuolisierung und Karyolyse auf. Weiterhin scheinen die Wirtszellen nicht mehr von Membranen abgegrenzt und selbst vom Zelluntergang betroffen zu sein (Abbildungen 23 bis 36). Diese auch schon von EL-MATBOULI et al. (1995) beschriebenen Veränderungen der Parasitenstadien werden im Folgenden nicht mehr differenziert, um eine gewisse Übersichtlichkeit zu erhalten. Sie werden zusammenfassend als "degenerierte", "lysierte" oder "nicht intakte" Parasitenstadien tituliert.

Eine Übersicht über die Zahl der gefundenen Parasitenstadien in der Haut der beiden Stämme nach einer Infektion mit 35.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch gibt Tabelle 10.

Eine Gegenüberstellung der Anzahl aller degenerierten und intakten Stadien in den Stunden 4, 6, 8, 10 und 12 post expositionem ist in Abbildung 24 gegeben. Auch 1 Tag und 2 Tage nach der Infektion wurden vereinzelt in der Haut und Unterhaut der Forellen beider Stämme Parasitenstadien gefunden. Wegen der geringen Zahlen wurde hier auf einen quantitativen Vergleich verzichtet.

### *4 Stunden post expositionem*

Beim Stamm Ho waren nach 4 Stunden durchschnittlich 53,1 Parasitenstadien in der Epidermis zu finden, wobei 0,8 degeneriert waren und 52,3 einen völlig intakten Eindruck bei der histologischen Untersuchung machten.

Die mittlere Parasitenanzahl in der Haut der Tiere des Stamms TL war 110,5. Hierbei waren im Schnitt 0,3 Stadien degeneriert. Die restlichen 110,3 Parasiten waren in ihrem äußeren Erscheinungsbild nicht verändert.

### *6 Stunden post expositionem*

Nach 6 Stunden konnten im Mittel 55,7 Parasiten bei der histologischen Untersuchung des Stamms Ho entdeckt werden, wovon 12,6 nicht mehr das normale Aussehen eines intakten Parasiten hatten. 43,1 Stadien schienen noch völlig intakt zu sein.

Die Addition von 7,6 degenerierten und 59,6 intakten Parasitenstadien ergab eine mittlere Anzahl von 67,2 bei Stamm TL.

### *8 Stunden post expositionem*

Die Suche nach Parasitenstadien in der Haut von Stamm Ho war 8 Stunden nach erfolgter Infektion 33,9-mal erfolgreich. Hierbei wurden im Schnitt 9,9 Parasiten als unverändert befundet. 24,0 Stadien zeigten Anzeichen einer Degeneration.

Beim Stamm TL konnten bei durchschnittlich 63,7 Hautstadien 46,3 als intakt gewertet werden. 17,4 Stadien wiesen Veränderungen auf.

### *10 Stunden post expositionem*

10 Stunden nach der Exposition mit 35.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch waren beim Stamm Ho 31,4 Parasitenstadien zu finden. Dabei zeigten sich 3,5 morphologisch unauffällig. 27,9 Parasiten wiesen Veränderungen in ihrem Erscheinungsbild auf.

Die Zählung der Hautstadien von *Myxobolus cerebralis* beim Stamm TL ergab zu diesem Zeitpunkt eine mittlere Anzahl von 16,8, wobei sich 2,9 als intakt und 13,9 als degeneriert erwiesen.

## Ergebnisse

---

### *12 Stunden post expositionem*

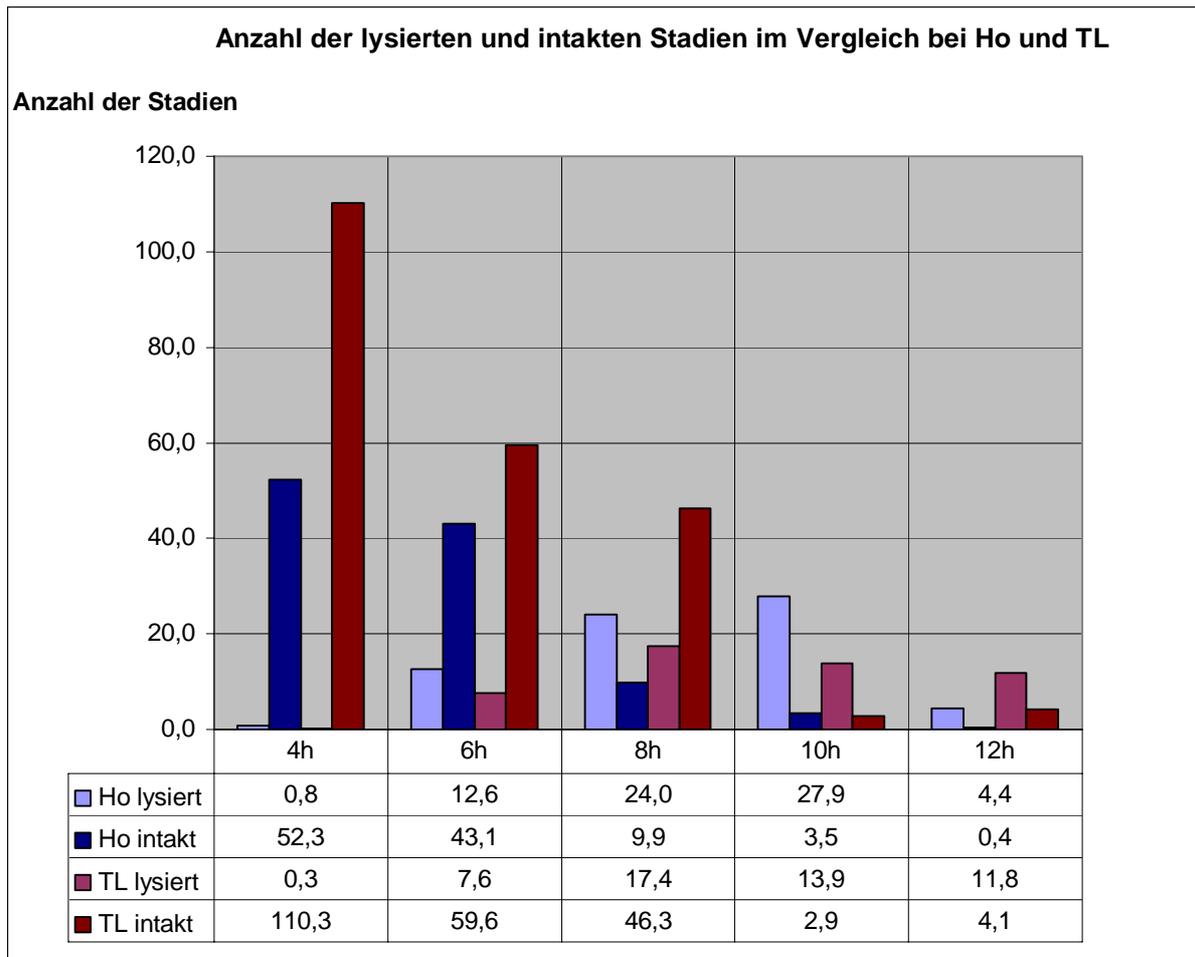
Nach 12 Stunden konnten in der Haut von Fischen des Stamms Ho noch insgesamt 4,8 Parasiten gefunden werden, wobei 0,4 Stadien noch äußerlich unverändert erschienen und 4,5 Defekte in ihrem Aufbau aufwiesen.

Beim Stamm TL ergab die Zählung der Parasiten nach Ablauf von 12 Stunden eine Zahl von 15,9. Hierbei waren 4,1 Stadien noch intakt. 11,8 Stadien wiesen Veränderungen in ihrer Struktur auf.

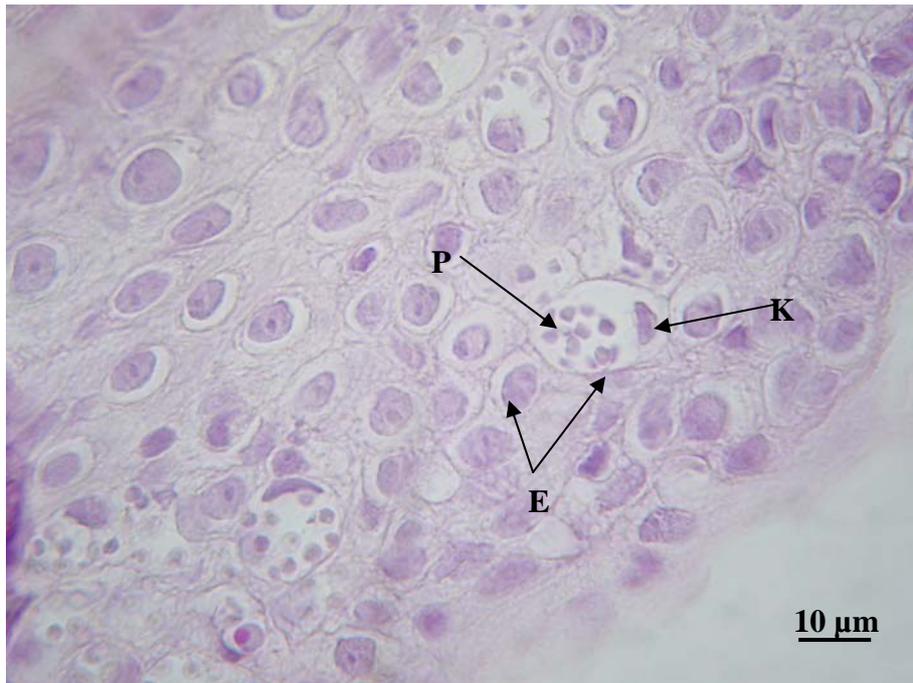
**Tabelle 9:** Anzahl der Parasitenstadien in der Haut ; vergleichende Darstellung der Stämme Ho und TL; Standardabweichung (STABWA); Mittelwert aus 8 Schnitten

<b>Ho</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
<b>Mittelwert</b>	53,1	55,7	33,9	31,4	4,8
<b>STABWA</b>	15,3	10,7	7,0	9,1	3,2

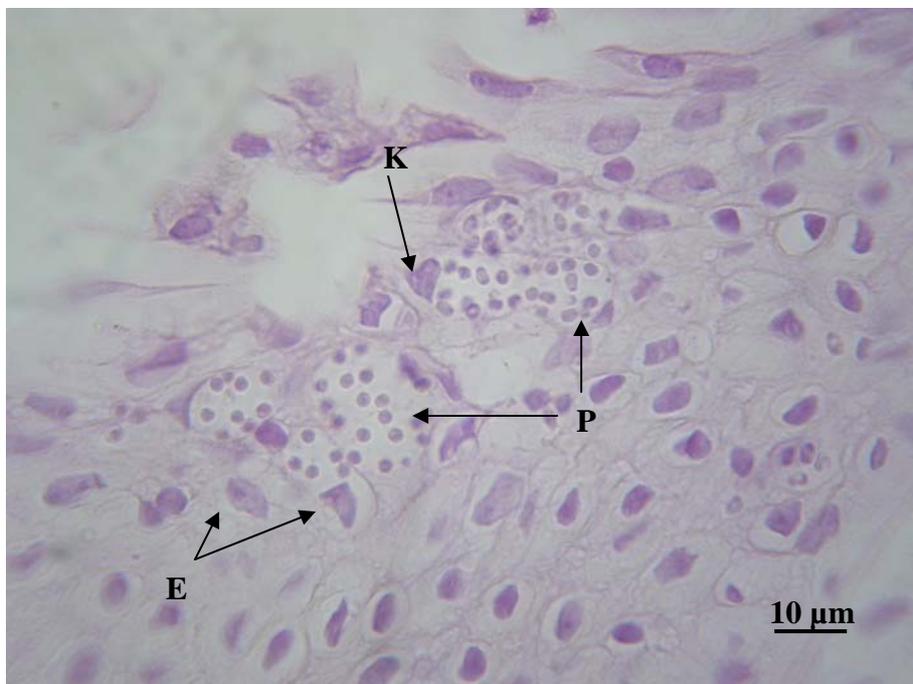
<b>TL</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
<b>Mittelwert</b>	110,6	67,2	63,7	16,8	15,9
<b>STABWA</b>	32,5	18,1	17,6	3,2	6,3



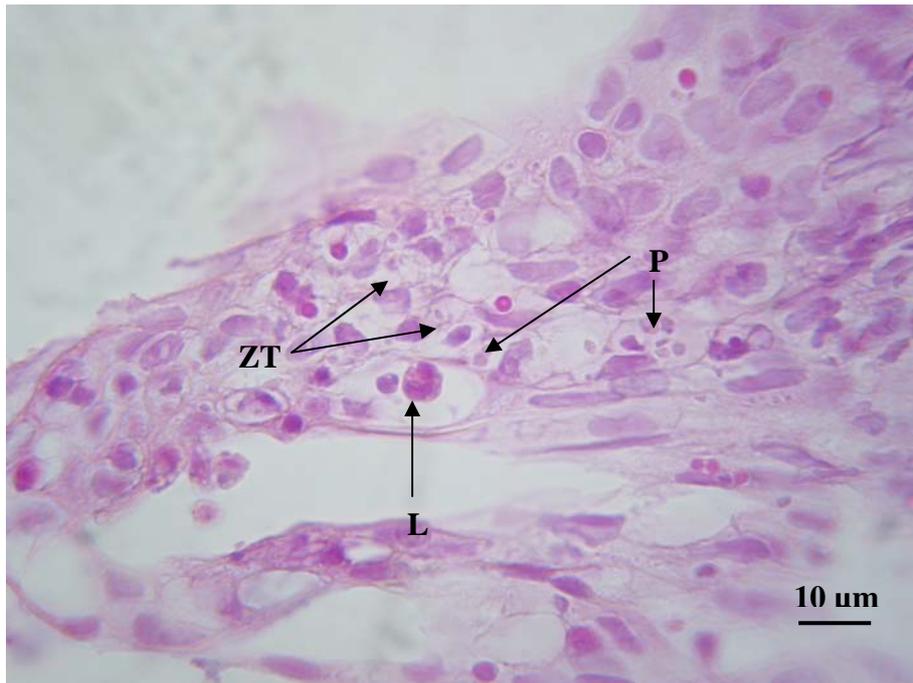
**Abbildung 22:** Vergleich der Anzahl der lysierten und intakten Parasitenstadien der Haut bei den Stämmen Ho und TL; Mittelwerte aus 8 Einzelwerten



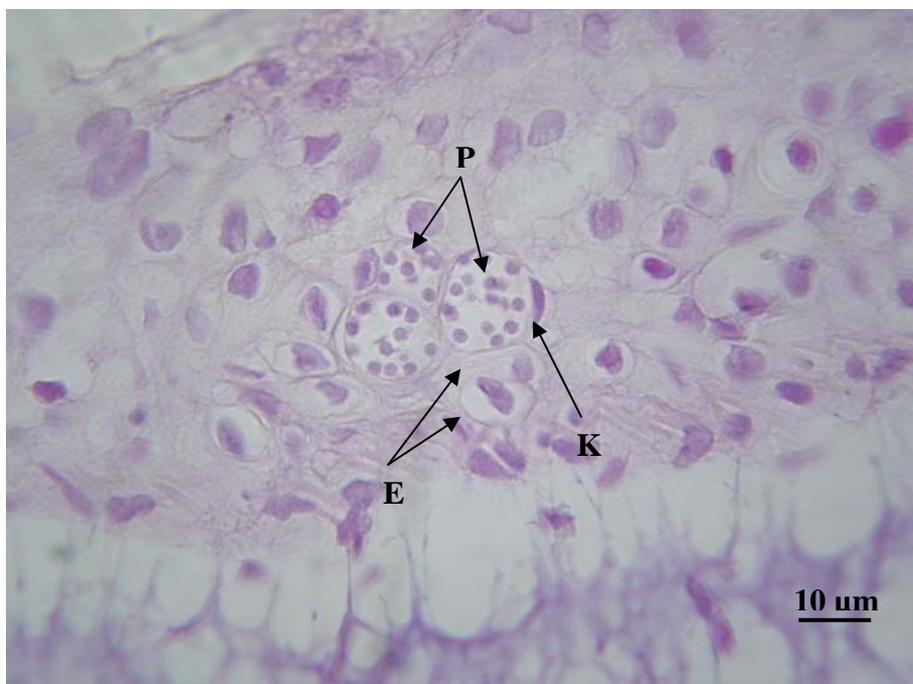
**Abbildung 23:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P) liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen (E), deren Kerne (K) an den Rand verdrängt sind; HE



**Abbildung 24:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P) liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen (E), deren Kerne (K) an den Rand verdrängt sind; HE



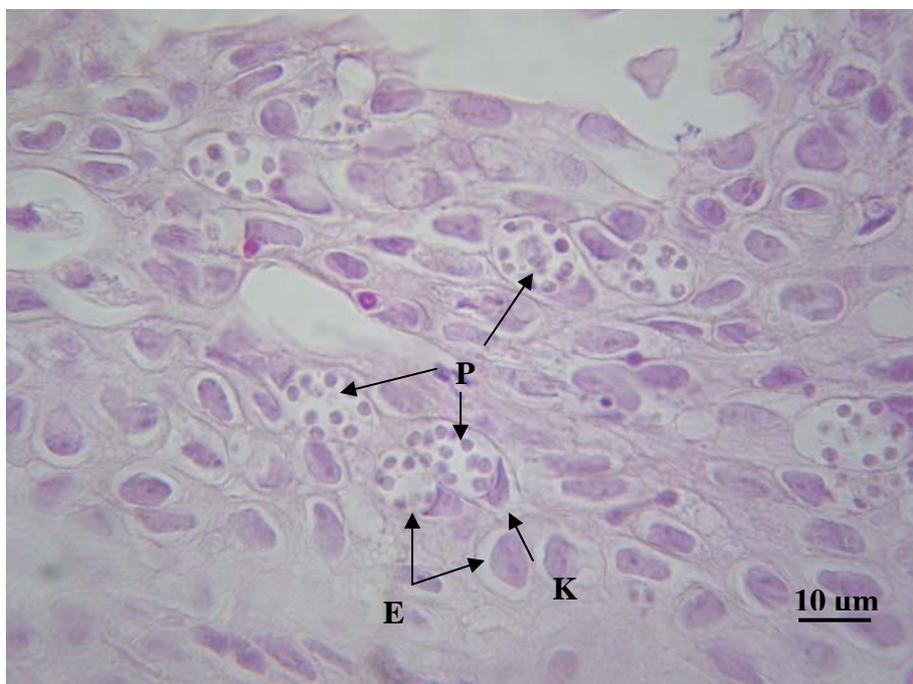
**Abbildung 25:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 6 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P); Bild der Lyse und der Degeneration mit Zelltrümmern (ZT); Leukozyt (L); HE



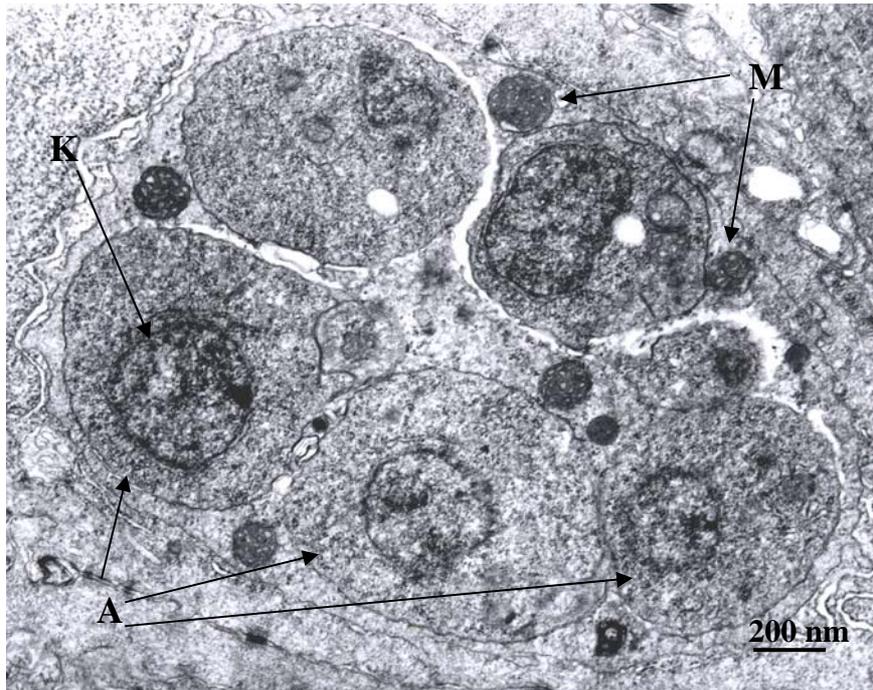
**Abbildung 26:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 6 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P) liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen (E), deren Kerne (K) an den Zellrand verdrängt werden; HE



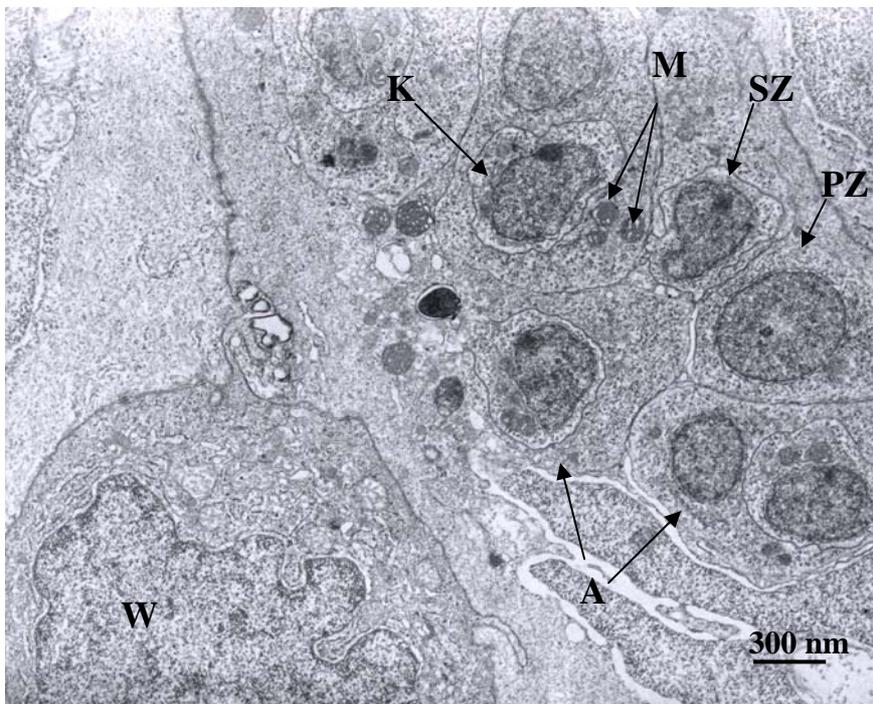
**Abbildung 27:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P) sind nicht mehr intakt und liegen degeneriert in der Epidermis, HE



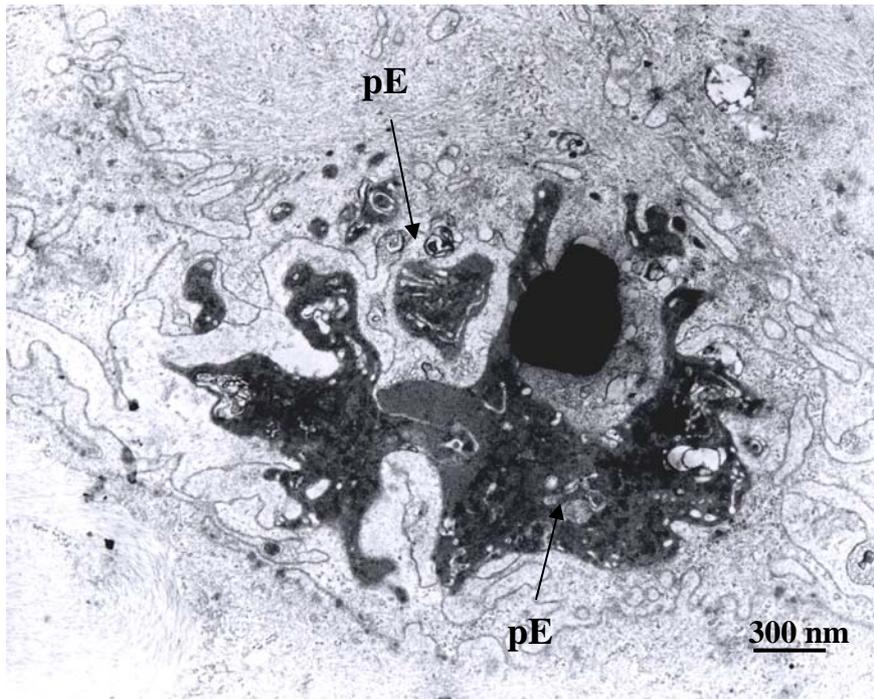
**Abbildung 28:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; Parasitenstadien (P) liegen intakt intrazellulär in den Epidermiszellen (E), deren Kerne (K) an den Rand verdrängt werden; HE



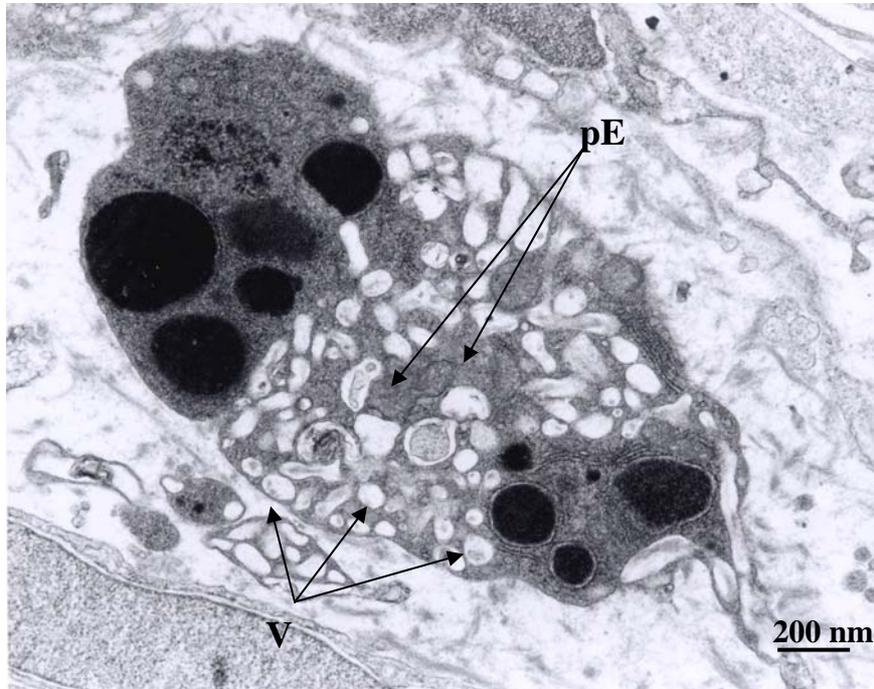
**Abbildung 29:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; mehrere intakte Amöboidkeimzellen (A) mit Zellkern (K) Mitochondrien (M)



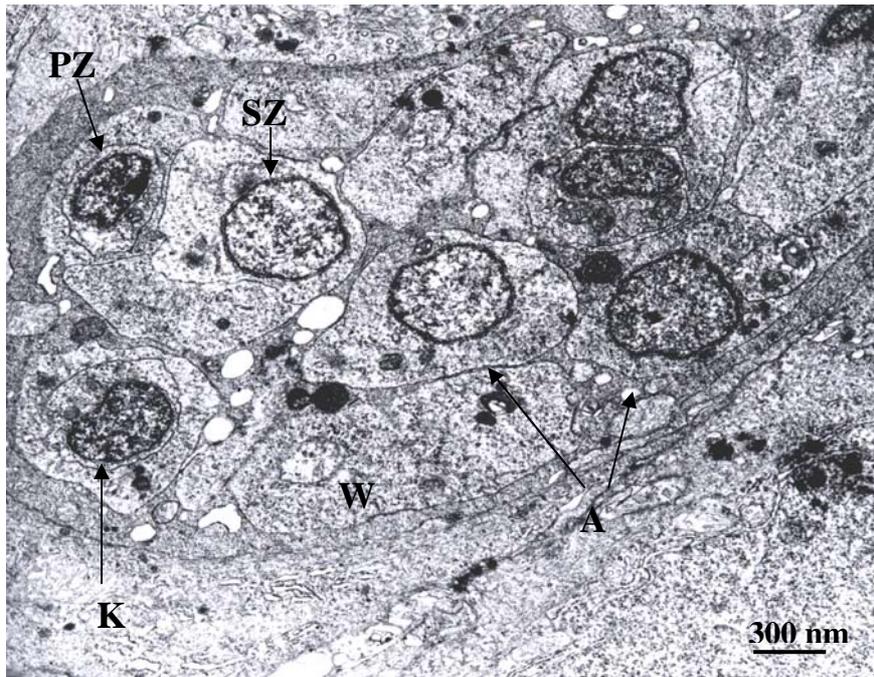
**Abbildung 30:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; intrazellulär liegende intakte Amöboidkeimzellen (A) mit Zellkern (K) und Mitochondrien (M); Primärzelle (PZ) mit eingeschlossener Sekundärzelle (SZ); Wirtszellkern (W)



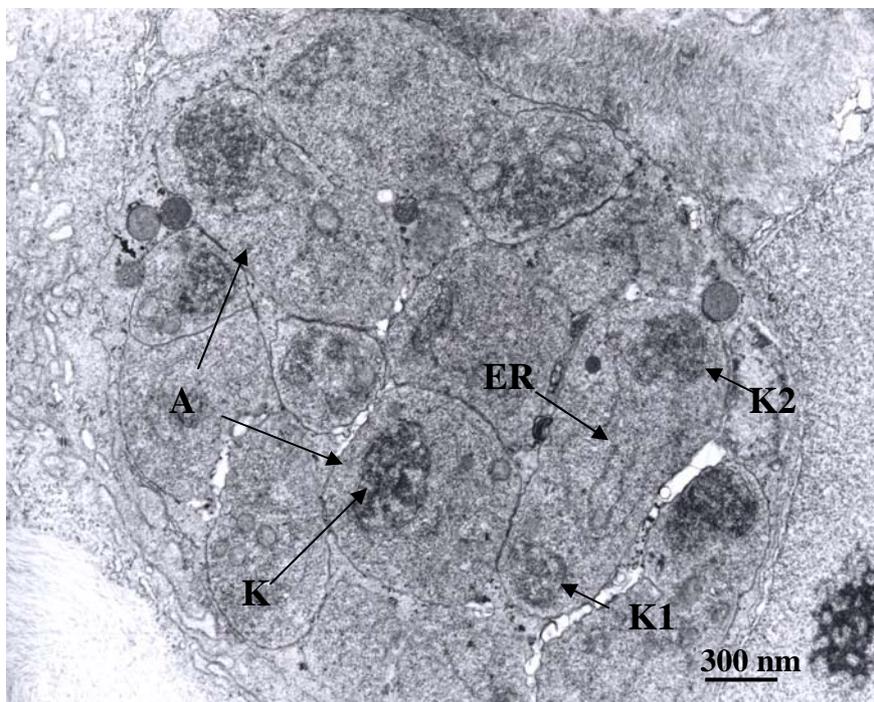
**Abbildung 31:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; phagozytierte Entwicklungsstadien (pE)



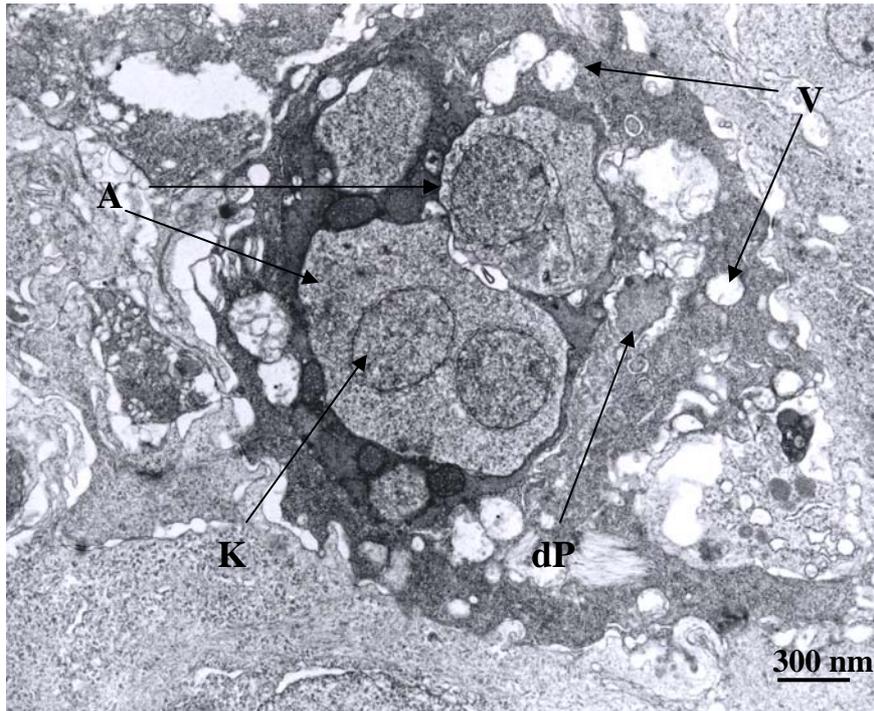
**Abbildung 32:** Stamm Ho; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; phagozytierte Entwicklungsstadien (pE) und Vakuolen (V)



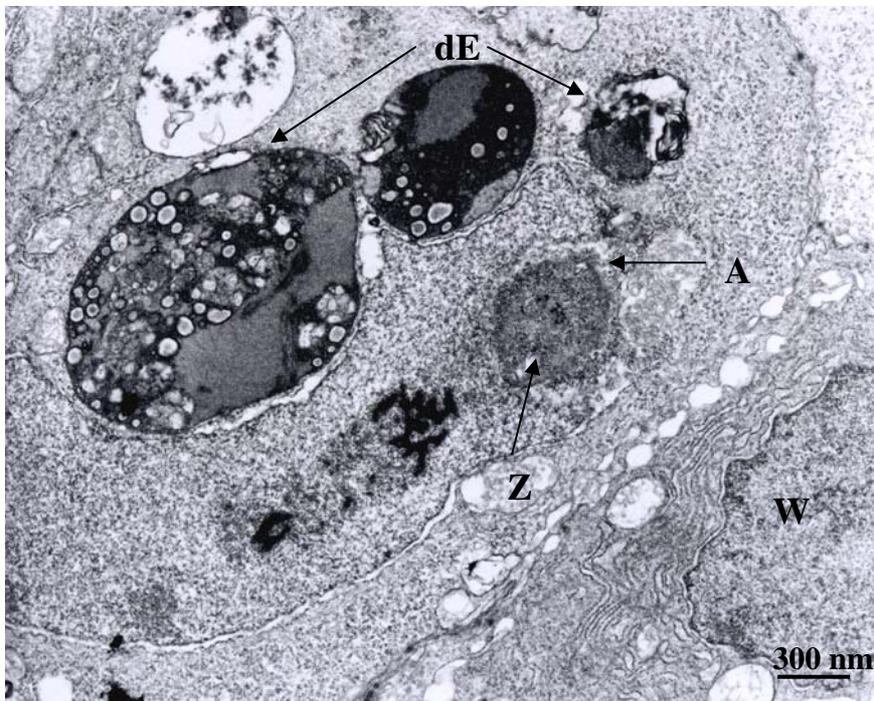
**Abbildung 33:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; intrazellulär liegende Amöboidkeimzellen (A) mit Zellkern (K); Primärzelle (PZ) mit eingeschlossener Sekundärzelle (SZ); Zellkern der Wirtszelle (W)



**Abbildung 34:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 4 Stunden nach der Exposition; intrazellulär liegende Amöboidkeimzellen (A) mit Zellkern (K); Amöboidkeimzelle in früher Telophase der Mitose mit Tochterkernen (K1 und K2) und Endoplasmatischem Retikulum (ER)



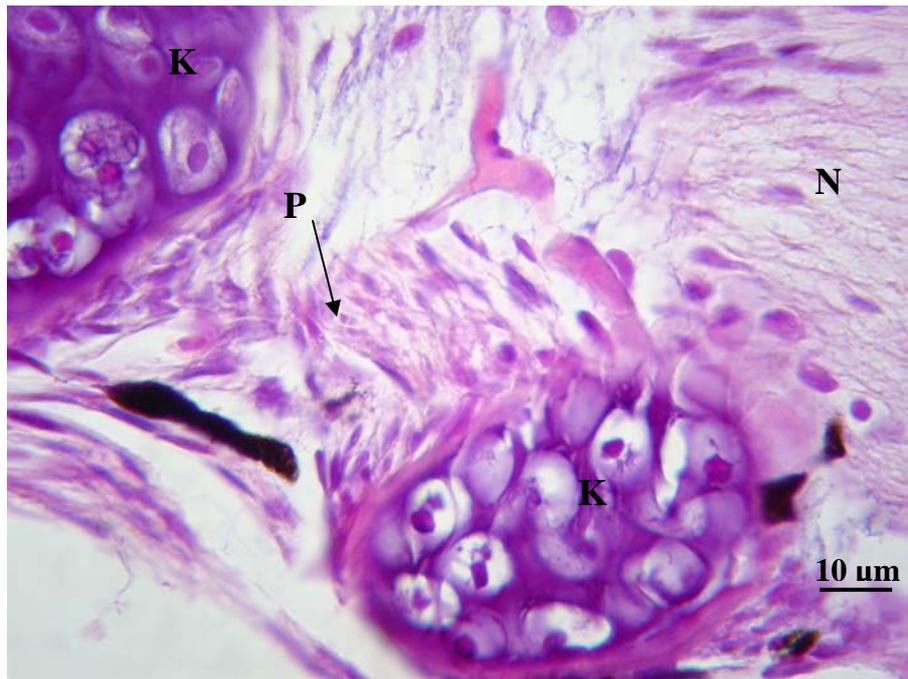
**Abbildung 35:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; degenerierendes Parasitenstadium (dP) und zahlreiche Vakuolen (V) neben intakten Amöboidkeimen (A) mit Zellkern (K)



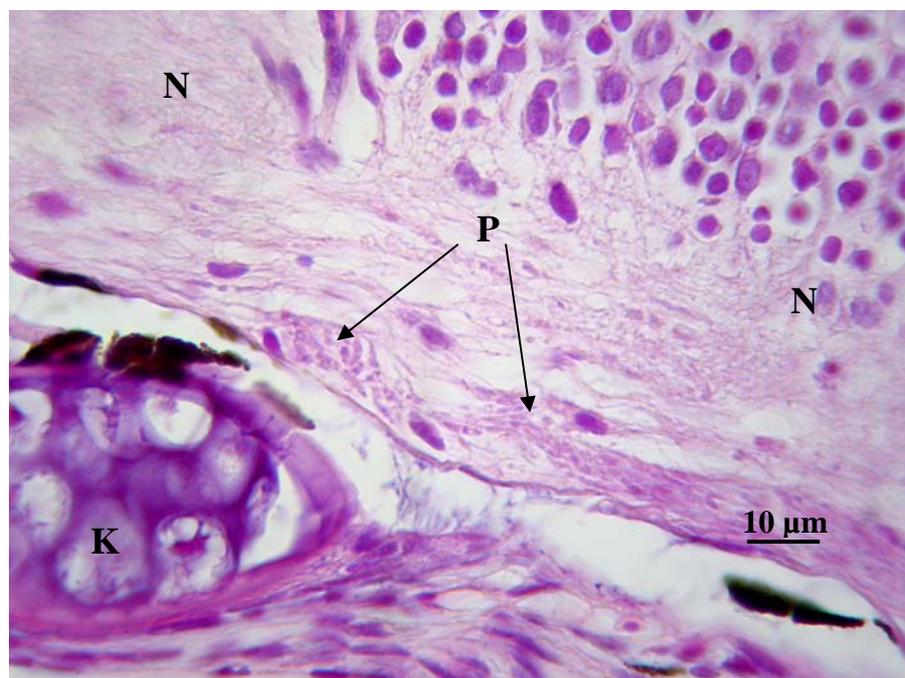
**Abbildung 36:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 8 Stunden nach der Exposition; degenerierte und vakuolierte Entwicklungsstadien (dE); Wirtszellkern (W); Amöboidkeimzelle (A) mit Zellkern (Z)

#### **4.3.2 Parasitenstadien im weiteren Verlauf der Infektion**

Auf Grund der geringen Größe der einzelnen präsporogonischen Zellen im Nervengewebe zu den späteren Entnahmezeitpunkten 3 Tage bis 20 Tage post infectionem waren die Parasitenstadien nur schwer lichtmikroskopisch darzustellen und sind nur eindeutig zu identifizieren, wenn sie in größeren Gruppen im Gewebe liegen. Beim deutschen Stamm Ho wurden keine Anzeichen für Parasitenstadien im Nervengewebe gefunden. Beim amerikanischen Stamm TL fanden sich die Parasiten, wie die Abbildungen 37 und 38 veranschaulichen, vor allem in den knorpelnahen Bereichen des Nervengewebes. Elektronenmikroskopisch konnten trotz Serienultradünnschnitten keine neuralen Stadien gefunden werden. Bei beiden Stämmen wurden außer vereinzelt eosinophilen Granulozyten keine Anzeichen für Wirtsreaktionen gefunden.



**Abbildung 37:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 9 Tage post infectionem; Knorpelgewebe (K); Nervengewebe (N); präsporogonische Stadien von *Myxobolus cerebralis* (P); HE



**Abbildung 38:** Stamm TL; 35000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch; 9 Tage post infectionem; Knorpelgewebe (K); Nervengewebe (N); präsporogonische Stadien von *Myxobolus cerebralis* (P); HE

#### **4.4 Bestimmung des Lysozymspiegels im Hautschleim**

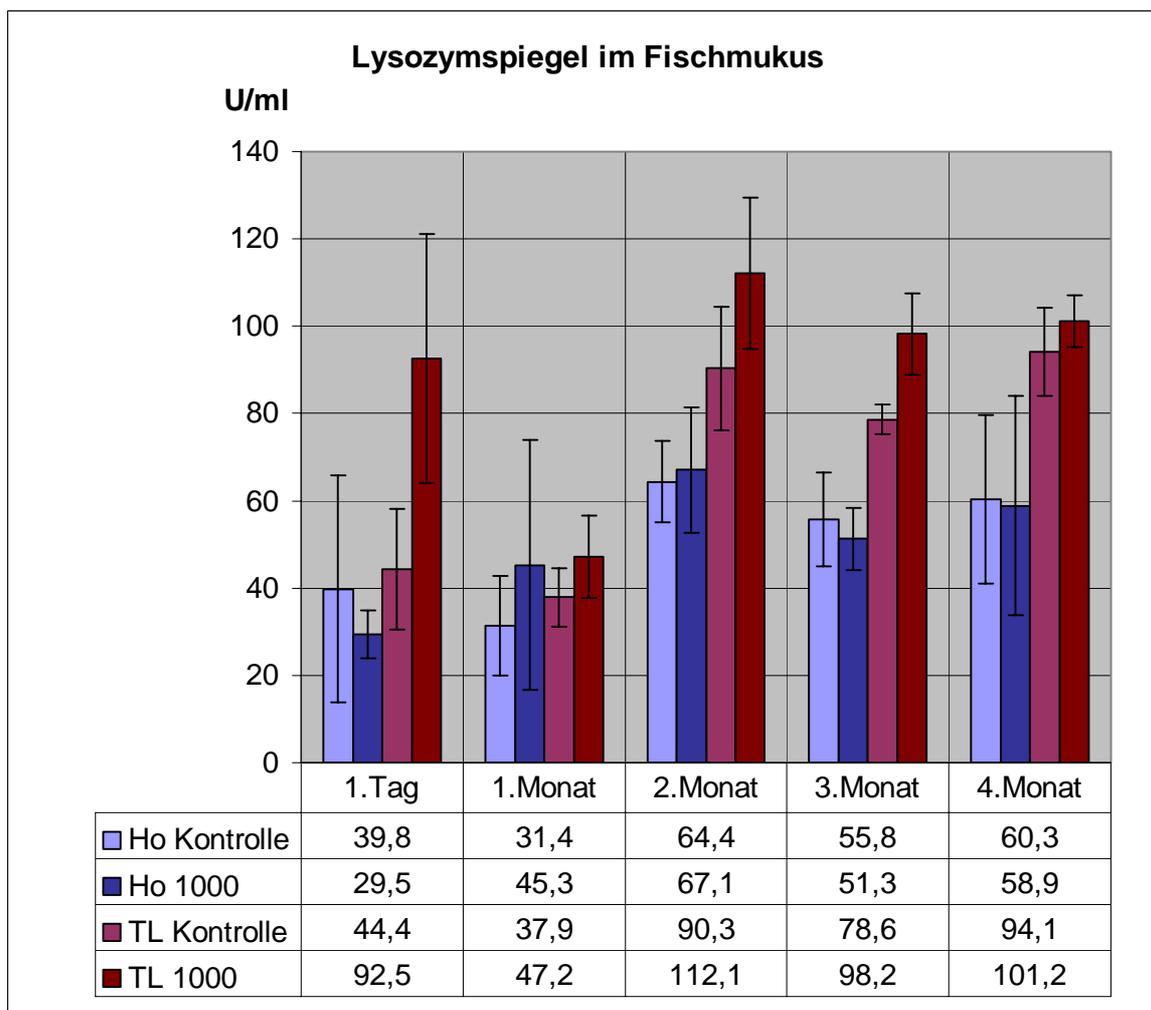
##### **4.4.1 Kontrolle des Infektionserfolgs**

Die Kontrolle des Infektionserfolgs wurde analog Abschnitt 4.1 durchgeführt. Alle drei Parameter wie das Zucken beim Einsetzen in das Infektionsbad, die Anzahl der freien Amöboidkeimzellen und der histologische Nachweis der penetrierten Parasitenstadien in der Haut konnten bei den Untersuchungen nachgewiesen werden.

##### **4.4.2 Vergleich der Lysozymspiegel**

Die Bestimmung der Lysozymwerte im Hautschleim erfolgte bei den Stämmen Ho und TL zu den Zeitpunkten 1 Tag, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate und 4 Monate post expositionem mit 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch. Die Kontrollgruppen wurden nicht infiziert.

Im Folgenden finden sich die Mittelwerte aus 3 Proben, die je als Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Jede Probe besteht wegen der nur kleinen Mengen des gewinnbaren Fischschleims aus dem Mukus von 3 Tieren. Die Angabe der gemessenen Aktivität erfolgt in der Einheit Unit/Milliliter (U/ml).



**Abbildung 39:** Lysozymaktivität im Fischmucus; Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung von jeweils 3 Proben; Angabe der Aktivität in U/ml

### *1. Tag post expositionem*

Beim Stamm Ho lag die durchschnittliche Lysozymaktivität bei der Kontrollgruppe bei 39,8 U/ml. Die infizierten Tiere dieses Stamms wiesen eine mittlere Aktivität von 29,5 U/ml auf. Die Lysozymaktivität des Hautschleims beim Stamm TL lag im Mittel bei 44,4 U/ml in der Kontrollgruppe und bei 92,5 U/ml bei den infizierten Tieren (Abbildung 39).

### *1. Monat post expositionem*

Nach einem Monat hatte der Mucus der Kontrollgruppe des Stamms Ho eine mittlere Aktivität von 31,4 U/ml. Die Lysozymaktivität der infizierten Gruppe lag bei 45,3 U/ml.

Die Aktivitätsmessung des Fischschleim-Lysozyms bei Stamm TL ergab Werte von 37,9 U/ml bei den nicht infizierten und bei 47,2 U/ml bei den infizierten Tieren (Abbildung 39).

### *2. Monat post expositionem*

Die enzymatische Aktivität des Mukus bei der Kontrollgruppe lag nach 2 Monaten durchschnittlich bei 64,4 U/ml. Die Messungen bei den infizierten Fischen ergaben einen Wert von 67,1 U/ml.

Die Lysozymwertbestimmung beim Stamm TL wurden mit den Ergebnissen 90,3 U/ml bei der Kontrollgruppe und mit 112,1 U/ml abgeschlossen (Abbildung 39).

### *3. Monat post expositionem*

Beim Stamm Ho lag die mittlere Enzymaktivität bei den nicht infizierten Fischen bei 55,8 U/ml und bei den mit den Parasiten konfrontierten Tieren bei 51,3 U/ml.

Die Lysozymbestimmung des Hautschleims des Stamms TL ergab eine Enzymaktivität von 78,6 U/ml bei der Kontrollgruppe und von 98,2 U/ml bei den infizierten Forellen (Abbildung 39).

### *4. Monat post expositionem*

Nach 4 Monaten ergaben die Bestimmungen der Aktivität des Hautschleims der Kontrollgruppe des Stamms Ho einen durchschnittlichen Wert von 60,3 U/ml. Bei der infizierten Versuchsgruppe dieses Stamms wurden 58,9 U/ml gemessen.

Beim Stamm TL ergaben die Untersuchungen mittlere enzymatische Aktivitäten von 94,1 U/ml in der Kontrollgruppe und von 101,2 U/ml in der Gruppe, die mit den Parasiten infiziert wurde (Abbildung 39).

## **5.       BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

### **5.1     Infektion der Regenbogenforellen-Brütlinge mit der Drehkrankheit**

Die Beurteilung der Infektion der Versuchsfische wurde anhand der Parameter "Zucken bei Expositionsbeginn im Infektionsbad", "histologischer Nachweis von Amöboidkeimzellen in der Haut nach einer Stunde" und "Anteil der Triactinomyxon-Sporen im Infektionsbad ohne Amöboidkeim" vollzogen.

Das charakteristische Zucken der Tiere kurz nach der Exposition mit den Triactinomyxon-Sporen ist eine Abwehrreaktion auf die Injektion der Polfilamente in die Epidermis und das Eindringen der Amöboidkeimzellen in die Schleimzellen (EL-MATBOULI et al., 1999). Bei den eigenen Versuchen konnten diese Bewegungen vor allem bei den hohen Infektionsdosen des Stammesvergleichs (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) und bei den Infektionen für den Versuch Pathohistologie (35.000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch) beobachtet werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Regenbogenforellen-Gruppen wurden nicht wahrgenommen. Beim Feldversuch wurden aufgrund der langen Expositionszeiten und den geringen Sporenzahlen keine Zuckungen der Tiere vermerkt. Dies entspricht den Beobachtungen von KÜPPERS (2003), die ebenfalls keine Unterschiede innerhalb der untersuchten Regenbogenforellen-Stämme oder bei der Bachforelle feststellen konnte. Sie verzeichnete das charakteristische Zucken wie in der vorliegenden Arbeit vor allem bei der hohen Infektionsdosis (5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch).

Der histologische Nachweis von Amöboidkeimzellen in der Fischhaut gelang bei allen höheren Infektionsdosen der Laborversuche, nicht aber bei den 100 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch-Gruppen und im Feldversuch. Da die Anzahl sehr stark mit der verwendeten Schnittebene und somit dem Hautanteil schwankte, wurde nur im Versuch „Pathohistologie“ auf den quantitativen Vergleich zwischen den Stämmen eingegangen.

Die Entnahme einer Wasserprobe aus dem Infektionsbad 3 Stunden post expositionem ergab 71% der Triactinomyxon-Sporen ohne Amöboidkeimzellen. Untersuchungen von HEDRICK et al. (1999) ergaben einen Wert von 80%. EL-MATBOULI et al. (1999) beschrieben bei ihren Untersuchungen, dass 60-70% aller Triactinomyxon-Sporen keine Amöboidkeimzellen nach der Exposition hatten.

Aufgrund der oben aufgeführten Parameter kann die Infektion zusammenfassend als erfolgreich bewertet werden.

## **5.2 Vergleich der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF (Spermien) mit den „Elternstämmen“ Ho und TL**

In vorangegangenen Arbeiten erwies sich der deutsche Stamm Ho als relativ resistent, während sich der amerikanische Stamm TL als hoch empfänglich gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion zeigte (KÜPPERS, 2003). Im Vordergrund des Interesses dieses Teils der vorliegenden Arbeit steht die Empfänglichkeit zweier Kreuzungen aus empfindlichen und weniger empfindlichen Regenbogenforellen-Stämmen. Diese Untersuchungen wurden in kontrollierten Laborversuchen durchgeführt.

Da in der oben erwähnten vorangegangenen Studie von KÜPPERS (2003) der Vergleich der beiden Stämme Ho und TL, die in der vorliegenden Arbeit als empfängliche und wenig empfängliche Referenzstämme dienen, im Feldversuch nur über einen kurzen Versuchszeitraum durchgeführt werden konnte, wurde dieser Versuch hier erneut durchgeführt.

### **5.2.1 Klinische Symptomatik**

Der Vergleich der klinischen Symptomatik wurde beispielhaft am Symptom der „Deformationen“ durchgeführt, weil die beiden anderen Kardinalsymptome (pathologisches Drehverhalten und Schwarzverfärbung der Kaudalpartien) reversibel sind (EL- MATBOULI et al., 1992) und somit am Ende der Versuchsdauer, nämlich nach 150 Tagen post expositionem, keine zuverlässige Aussage mehr liefern können. Außerdem wird das erste Auftreten der klinischen Symptomatik bei den Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) vergleichend mit den beiden Stämmen Ho und TL dargestellt.

#### **a) Klinische Symptomatik beim Laborversuch**

Innerhalb der Infektionsgruppen waren die meisten Deformationen bei den 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppen zu beobachten, gefolgt von der 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe und der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe, wobei jeweils keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren.

Die Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) zeigte am Ende des Versuchszeitraums mehr Deformationen als die Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Beide Kreuzungen erwiesen sich bezüglich dieses Symptoms nur geringgradig

empfindlicher als der als wenig empfindlich bekannte deutsche Stamm Ho, wobei sich jeweils keine signifikanten Unterschiede ergaben. Der empfindliche amerikanische Stamm TL hingegen wies am Tag 150 post infectionem signifikant mehr Deformationen auf als die Kreuzungen (Stamm TL 98%, Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) 13,3% und Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien). Der Unterschied entspricht einem Faktor von 7,4 beziehungsweise 6,5).

KÜPPERS (2003) verglich die Symptomprävalenz zwischen verschiedenen Regenbogenforellen-Stämmen anhand des Symptoms „pathologisches Drehverhalten“ zum Zeitpunkt 100 Tage nach der Exposition. Hier war der amerikanische Stamm TL bezüglich der Symptomprävalenz als am empfindlichsten eingestuft worden, während sich der deutsche Stamm Ho als relativ unempfindlich zeigte.

Beim Vergleich des primären Auftretens eines Symptoms der Drehkrankheit wurde jeweils bei allen Stämmen beziehungsweise Kreuzungen das Symptom „Schwarzverfärbung der Kaudalpartie“ als erstes beobachtet. Der erste Stamm, der dieses Symptom nach 45 Tagen zeigte, war der amerikanische hoch empfängliche Vergleichs-Stamm TL. Während dieses Symptom bei den Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) am Tage 48 post expositionem auftrat, konnten beim wenig empfänglichen Vergleichs-Stamm Ho erst am 51. Tag nach der Infektion dunkle Schwanzpartien beobachtet werden.

### b) Klinische Symptomatik beim Feldversuch

Beim Feldversuch konnten weder beim Stamm Ho noch beim Stamm TL am Ende der Versuchsdauer Deformationen festgestellt werden.

### 5.2.2 Endgrößen und -Gewichte

Schon PLEHN (1904) beschrieb bei der Drehkrankheit die verminderte Futteraufnahmefähigkeit der Fische auf Grund der Bewegungsstörungen und der Deformationen. Zu erwarten wäre deshalb beim folgenden Vergleich der Endgrößen und -Gewichte ein geringeres Wachstum derjenigen Tiere, die zum einen mit hohen Sporenzahlen infiziert worden sind und zum anderen zu den empfindlichen Gruppen zählen.

### a) Endgrößen und -Gewichte beim Laborversuch

Beim Vergleich der einzelnen Infektionsdosen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den nicht infizierten Kontrollgruppen und jeder einzelnen Infektionsgruppe (100, 1000 und 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe), wobei sich die nicht infizierten Tiere als leichter und kleiner erwiesen. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu der von PLEHN (1905) beschriebenen verminderten Futteraufnahmefähigkeit der von der Drehkrankheit betroffenen Tiere im Gegensatz zu gesunden Fischen. Die Wachstumsraten werden aber zusätzlich noch von anderen Faktoren bestimmt. In den Fischaquarien entsteht durch die beengten Raumverhältnisse ein gewisser Stress, der sich in bestimmten Situationen wie der Fütterung noch verstärkt. Je höher die Besatzdichte in einem Becken ist, desto schlechter ist die Wasserqualität und desto höher ist der Stress, dem die Tiere ausgesetzt sind. Schon BOLLARD et al. (1993) beobachteten bei in schlechter Wasserqualität gehaltenen Fischen eine erhöhte Kortisolausschüttung und in der Folge vermindertes Wachstum. Da die Todesraten bei den infizierten Tieren höher waren und dadurch die Besatzdichte in diesen Aquarien sank, erklären sich die höheren Gewichte und Größen bei den infizierten Forellen. Der Faktor Stress scheint hier also gegenüber dem Faktor Infektion eine dominierende Rolle zu spielen.

Bei den Endgewichten gab es zwischen den einzelnen Infektionsgruppen (100, 1000 und 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch) keinerlei signifikante Unterschiede. Beim Vergleich der Endgrößen unterschieden sich nur die mit 100 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch von den mit 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch infizierten Tieren signifikant, wobei sich die Tiere, die mit der höheren Anzahl an Sporen infiziert worden waren, als kleiner erwiesen als die Tiere der 100 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe.

Sowohl bei der Größe als auch beim Gewicht waren die Standardabweichungen bei den Kontrollgruppen aller Stämme geringer als bei den Versuchsgruppen, die mit *Triactinomyxon*-Sporen infiziert worden waren. Die höchsten Standardabweichungen waren jeweils entweder in der 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch oder in der 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe, also in den beiden höchst dosierten Infektionsgruppen, zu finden. Der höhere Betrag dieses Parameters kann wie folgt erklärt werden: Die Ausprägung der Drehkrankheit ist nicht bei allen Individuen eines Stammes exakt gleich (MARKIW, 1992). Manche Tiere leiden stark an Deformationen im Schädelbereich oder zeigen vermehrt die stressbedingten Drehbewegungen. Beides kann zu einer eingeschränkten Futteraufnahme führen, wodurch diese Fische in Größe und Gewicht gegenüber ihren Artgenossen

zurückbleiben (PLEHN, 1904). Den weniger betroffenen Tieren bleibt von der genau eingeteilten Futterration mehr übrig. Sie zeigen in Folge forciertes Wachstum. Dieser Effekt verstärkt sich bei den hohen Infektionsdosen. Dieser Umstand erklärt die hohen Standardabweichungen bei den infizierten Tieren und insbesondere bei den beiden höheren Infektionsgruppen.

Bei der dosisunabhängigen Betrachtung des Endgewichts der Kreuzungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien). Während sich beide Kreuzungen im Gewicht nicht signifikant vom deutschen wenig empfänglichen Vergleichs-Stamm Ho unterschieden, waren die Tiere des amerikanischen, als empfindlich geltenden Stamms TL signifikant leichter.

Beim Vergleich der Endgrößen zu Versuchsende ergab sich bis auf folgende Ausnahmen das gleiche Bild wie beim Endgewicht: Die Fische der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) waren signifikant kleiner als die der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien). Des Weiteren waren bei der Größe keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) und dem hoch empfänglichen, amerikanischen Stamm TL zu erkennen.

Zusammenfassend kann man auf Grund der starken Abhängigkeit der Parameter von der verbleibenden Gruppengröße im Aquarium nur vorsichtige Aussagen treffen. Wegen der größeren Standardabweichungen bei Größe und Gewicht scheinen aber die hohen Infektionsgruppen stärker von der Drehkrankheit betroffen zu sein. Beim Vergleich der Kreuzungen mit den Vergleichs-Stämmen Ho und TL scheint der als hoch empfänglich geltende amerikanische Stamm TL am stärksten betroffen zu sein. Die Gruppengröße beim Stamm TL ist ähnlich wie beim deutschen wenig empfindlichen Stamm Ho und den Kreuzungen Ho(Eier)xZFF(Spermien) und TL(Eier)xHo(Spermien). Somit ist der Unterschied wohl vor allem dem Einfluss der unterschiedlichen Empfänglichkeiten der verschiedenen Stämme gegenüber der Drehkrankheit zuzuschreiben.

### b) Endgrößen beim Feldversuch

Da die Forellen des Feldversuchs nach plötzlichem Wegfall der Frischwasserzufuhr kurz vor Versuchsende verstarben und bei Einsammlung der Kadaver vor allem im Bauchbereich schon autolytisch waren, musste die Bestimmung des Gewichts entfallen.

Beim Vergleich der durchschnittlichen Endgrößen der beiden verschiedenen Regenbogenforellenstämme Ho und TL waren keine signifikanten Unterschiede zu entdecken. Beim Feldversuch waren die Krankheitssymptome nicht so stark ausgeprägt wie beim

Laborversuch. Es gab keine Deformationen und nur beim Stamm TL wurde pathologisches Drehverhalten beobachtet. Diese geringen Beeinträchtigungen führten aber nicht zu dem schon von PLEHN (1904) beschriebenen Minderwuchs auf Grund der Deformationen und Drehbewegungen bei der Drehkrankheit. Somit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen Ho mit 9,9cm und TL mit 8,9cm verzeichnet werden.

c) Vergleich der Wachstumspotenz der Stämme Ho und TL

Es wurde in letzter Zeit immer wieder von verschiedenen Fischzüchtern berichtet, dass der deutsche Stamm Ho nicht die Wachstumsfähigkeit des amerikanischen Stamms TL besitze (nicht veröffentlicht). Im Laborversuch kann die Wachstumspotenz nur schwer verglichen werden, da auf Grund der verschiedenen Besatzdichten unterschiedlicher Grad an Stress entsteht. Dies hat nach BOLLARD et al. (1993) einen mindernden Einfluss auf die Entwicklung der jungen Fische. Am ehesten lässt sich ein Vergleich in der 100 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe durchführen. Hier waren bei beiden Stämmen in etwa vergleichbare Gruppengrößen (Stamm Ho über den ganzen Versuchszeitraum 22 Tiere; Stamm TL allmählich von 28 auf 22 abfallend) vorhanden. Dabei stieg die durchschnittliche Größe beim deutschen Stamm Ho von 3,3cm auf 13cm an, während beim amerikanischen Stamm TL ein Wachstum von 3,6cm auf 12cm zu verzeichnen war. Beim Feldversuch, bei dem identische Fischzahlen verwendet wurden, war ein Wachstum der deutschen Forellen des Stamms Ho von 3,1cm zu Beginn des Versuchs auf 9,9cm am Ende des Versuchs zu vermerken, während die amerikanischen Forellen des Stamm TL von 3,2cm auf 8,9cm wuchsen. Somit können oben genannte Behauptungen der stärkeren Wachstumsfähigkeit des amerikanischen Stamms TL gegenüber dem deutschen Stamm Ho auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

### 5.2.3 Infektionsprävalenz

Die Infektionsprävalenz gibt an, wie viel Prozent der untersuchten Fische Sporen im Kopfknochen aufwiesen.

#### a) Infektionsprävalenz beim Laborversuch

Der stammesunabhängige Vergleich der Infektionsdosen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den mit 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch infizierten Tiere und der 100 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe, wobei die höher infizierte Gruppe auch eine höhere Infektionsprävalenz verzeichnete. Alle anderen Vergleiche zwischen den Infektionsdosen ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) waren prozentual mehr Tiere infiziert (90%) als bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) (87%), wobei der Unterschied nicht signifikant ausfiel. Beide Kreuzungen wiesen nach 150 Tagen Versuchsdauer signifikant mehr infizierte Tiere auf wie der als wenig empfindlich geltende deutsche Stamm Ho (73%). Im Vergleich zum hoch empfindlichen Stamm TL, bei dem 100% aller Tiere infiziert waren, wies lediglich die Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) eine signifikant kleinere Infektionsprävalenz auf, während sich die Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) von dem amerikanischen Stamm nicht signifikant unterschied.

KÜPPERS (2003) konnte bei ihren Versuchen weder innerhalb der deutschstämmigen Regenbogenforellen, noch zwischen dem sich als hochempfindlich erweisenden Stamm TL und dem relativ resistenten Stamm Ho einen signifikanten Unterschied in der Infektionsprävalenz feststellen.

#### b) Infektionsprävalenz beim Feldversuch

Die beiden Stämme des Feldversuchs unterscheiden sich bezüglich der Infektionsprävalenz signifikant. Während beim Stamm TL alle Tiere (100%) infiziert waren, wiesen beim Stamm Ho lediglich 20% der untersuchten Tiere Sporen im Kopfknochen auf.

#### 5.2.4 *Myxobolus cerebralis*-Sporen-Zahlen pro Kopf

Die Zählung der *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Kopfknorpel mit der Verdauungsmethode nach MARKIW und WOLF (1974) ist eine häufig verwendete Technik die Sporenanzahl eines infizierten Fisches zu bestimmen.

##### a) *Myxobolus cerebralis*-Sporen-Zahlen pro Kopf beim Laborversuch

Beim Vergleich innerhalb der verschiedenen Infektionsgruppen wurden durchschnittlich die meisten Sporen bei der 5000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe gefunden, dicht gefolgt von der 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch-Gruppe. Der Unterschied zwischen diesen beiden hohen Infektionsdosen war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu waren bei der niedrigsten Infektionsgruppe signifikant weniger Sporen zu finden als bei beiden höheren Infektionsdosen. NEHRING & THOMPSON (1998) beschreiben die Infektionslast der nordamerikanischen Gewässer mit zirka 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch. Bei dieser auch im Laborversuch verwendeten Infektionsdosis wurde beim Stamm TL mit 759.375 Sporen die höchste Anzahl der vorliegenden Arbeit erreicht. Somit weist er bei dieser Infektionsdosis die größten Unterschiede zu allen anderen Stämmen auf.

Beim Dosis-übergreifenden Vergleich der durchschnittlichen *Myxobolus cerebralis*-Sporenzahlen bei den Kreuzungen und den Referenz-Stämmen wurden nicht signifikant mehr Sporen im Knorpel der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) detektiert als bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien). Beide Kreuzungen wiesen in den Sporenzahlen keine signifikanten Unterschiede zu dem als wenig empfindlich geltenden Stamm Ho auf, während der als hoch empfänglich geltende amerikanische Stamm TL die signifikant meisten Sporen hervorbrachte. Bei der Infektionsdosis 1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch, die laut NEHRING & THOMPSON (1998) der Infektionslast der nordamerikanischen Gewässer entspricht, unterschieden sich die Sporenzahlen der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) (114.843) um den Faktor 7 und die der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) (65.075) um den Faktor 12 von dem in Amerika heimischen, hoch empfindlichen Stamm TL (759.375).

##### b) *Myxobolus cerebralis*-Sporen-Zahlen pro Kopf beim Feldversuch

Die beiden Stämme des Feldversuchs (Ho und TL) unterscheiden sich untereinander bezüglich der durchschnittlichen *Myxobolus cerebralis*-Sporen-Zahlen pro Kopf signifikant.

Mehr Sporen wurden hierbei bei dem amerikanischen Stamm TL gefunden (107.340), während bei dem deutschen Stamm Ho eine mittlere Sporenzahl von 3.750 pro Kopf ermittelt wurde. Somit unterscheiden sich die beiden Stämme im Feldversuch etwa um den Faktor 29.

### **5.2.5 Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen**

Die histologische Beurteilung ist in eine Skala von Grad null bis fünf gegliedert und findet sich im Standard Protocol for Whirling Disease Research (BARTHOLOMEW et al., 2001), wobei aufsteigende Gradzahlen vermehrte Parasiten bedingte Veränderung bedeuten. KÜPPERS (2003) führte Korrelationsanalysen bei Regenbogenforellen zwischen dem Grad der histopathologischen Veränderungen und der Sporenanzahl im Kopfknochen durch. Dabei fand die Autorin signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern und vermutet deshalb, im Gegensatz zu HEDRICK (1999a), dass die granulomatöse Entzündung, die meist um die Parasiten assoziiert ist, nicht in der Lage ist die Infektion abzuschwächen. Auf Grund dieser Korrelation wäre in der vorliegenden Arbeit eine ähnliche Staffelung nach Dosis und Stamm zu erwarten wie bei der Sporenzählung in Kapitel 5.2.4.

#### a) Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen beim Laborversuch

Beim Vergleich der pathohistologischen Veränderungen im Kopfknochen unterschied sich die höchste Infektionsdosis (5000 *Triactinomyxon*-Sporen/ Fisch) von allen anderen signifikant und wies die durchschnittlich schwersten Veränderungen auf. Auch die übrigen Infektionsgruppen unterschieden sich signifikant untereinander, wobei folgende Hierarchie der pathohistologischen Veränderungen in absteigender Reihenfolge entstand: 5000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe, 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe, 100 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-Gruppe.

Beim Vergleich der pathohistologischen Veränderungen bei den Kreuzungen im Gegensatz zu den Vergleichs-Stämmen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kreuzung TL((Eier)xHo(Spermien)) und der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) zu erkennen. Beide Kreuzungen wiesen in der 1000 *Triactinomyxon*-Sporen-Gruppe überwiegend milde pathohistologische Veränderungen auf. So wurden bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) 50% der Tiere auf Grad 1 und 30% auf Grad 0 und bei der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) 40% der Forellen auf Grad 1 und 30% auf Grad 2 der Veränderungen eingestuft. Während die Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) signifikant mehr

Veränderungen aufwies als der deutsche Stamm Ho, bei dem alle Tiere in Grad 0 bis 2 eingeteilt wurden, ergaben sich zwischen der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) und diesem deutschen Vergleichs-Stamm keine signifikanten Unterschiede. Beide Kreuzungen wiesen signifikant mildere pathohistologische Veränderungen auf als der Stamm TL. Bei diesem amerikanischen Stamm wiesen 40% der Tiere der 1000 Triactinomyxon-Sporen-Gruppe den höchsten Grad 5 und weitere 30% den Grad 4 der pathohistologischen Veränderungen auf. Somit hatten 70% aller Fische des Stamms TL bei dieser den natürlichen Bedingungen in Amerika gleichenden Infektionsdosis (1000 Triactinomyxon-Sporen pro Fisch) einen der beiden höchsten Grade der Veränderungen.

Zusammenfassend ergibt sich bei der Einstufung nach den pathohistologischen Veränderungen im Kopfknochen von Grad 0 bis 5 folgende Reihenfolge, geordnet von hohen zu weniger starken Veränderungen: TL, TL(Eier)xHo(Spermien), Ho(Eier)xZFF(Spermien) und Ho. Damit ergibt sich die gleiche Reihenfolge wie bei der Sporenzählung. Dieses Ergebnis gleicht somit den Untersuchungen von KÜPPERS (2003), die ebenfalls Korrelationen zwischen den beiden Parametern "Histograde" und "Sporenanzahl" feststellte. Besonders auffällig ist das Ergebnis bei der Infektionsdosis 1000 Triactinomyxon-Sporen/Fisch. Hier weist ein Großteil der amerikanischen Forellen des Stamms TL schwere Veränderungen auf, während die Mehrheit der Tiere des Stamms Ho und der Kreuzungen Ho(Eier)xZFF(Spermien) und TL(Eier)xHo(Spermien) nur relativ milde Entzündungsanzeichen und Knochenläsionen aufweisen. Auch HEDRICK et al. (1999a) beschrieben, dass die größten Unterschiede zwischen verschiedenen empfänglichen Regenbogenforellen-Stämmen bei mittleren Infektionsdosen zu Tage treten. Sie begründen diese Tatsache damit, dass hohe Sporenanzahlen auch das Immunsystem der weniger empfindlichen Stämme überwinden können.

### b) Pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen beim Feldversuch

Die gravierenderen histopathologischen Veränderungen wurden beim amerikanischen Stamm TL gefunden. Hier erreichten 80% der Fische Grad 2 oder Grad 3 der Veränderungen. Nur einer von 10 Fischen wies bei diesem Stamm keine Entzündungsanzeichen oder Knochendegenerationen auf. Auch beim Stamm Ho konnten Veränderungen erkannt werden. So wiesen 2 von 10 Tieren milde Veränderungen des Grads 1 auf.

### **5.2.6 Zusammenfassende Diskussion der Empfänglichkeit der Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) im Vergleich mit den Referenz-Stämmen Ho und TL**

Die untersuchten Kreuzungen der vorliegenden Arbeit entstanden jeweils aus einem empfänglichen und einem nicht empfänglichen Elternteil. Nach KLUPP (1979) und AYLES & BAKER (1983) ist es nicht möglich die Überlebensfähigkeit von Kreuzungen und deren Empfänglichkeit gegenüber einer Erkrankung vorauszusagen. Auch CHEVASSUS & DORSON (1990) beschrieben zwar eine erhöhte Resistenz gegen bestimmte Krankheiten bei manchen Kreuzungen, aber die geringe Überlebensfähigkeit dieser Hybriden machten sie wenig interessant für die kommerzielle Zucht. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Empfänglichkeit der beiden Kreuzungen TL(Eier)xHo(Spermien) und Ho(Eier)xZFF(Spermien) untereinander und im Bezug auf die bekannt empfänglichen und wenig empfänglichen Stämme TL und Ho verglichen.

Beim Vergleich dieser beiden Kreuzungen untereinander erwies sich die Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) als etwas empfindlicher als die Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien), wobei sie sich nur bei den erreichten Endgrößen am Ende des Laborversuchs signifikant voneinander unterschieden. Beide Kreuzungen wiesen zwar ähnliche Tagesgradalter bei der Infektion auf (TL(Eier)xHo(Spermien): 852 und Ho(Eier)xZFF(Spermien):840), aber die Tiere der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) waren mit 4,2cm und 0,7g zu Versuchsbeginn größer und schwerer als die Tiere der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) mit 2,7cm und 0,3g. Da auch dieser Faktor einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung nimmt, kann die Empfänglichkeitslage der beiden Kreuzungen als etwa gleich bewertet werden. So beschrieb auch RYCE et al. (1998), dass wahrscheinlich vor allem bei sehr jungen Fischen auch die Größe der Tiere für den Verlauf der Drehkrankheit eine wichtige Rolle spielt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der beiden Elternstämme TL und Ho lagen die gekreuzten Stämme in allen untersuchten Parametern zwischen den Werten der beiden oben genannten. Hierbei waren die Unterschiede zwischen den Kreuzungen und dem empfindlichen Stamm TL bei allen Untersuchungsparametern jeweils immer signifikant, während die Unterschiede zum Stamm Ho bei der Symptomprävalenz, den histopathologischen Veränderungen und den Sporenanzahlen im Kopfknochen nicht signifikant ausfielen. Im Gegensatz dazu war die Infektionsprävalenz der Kreuzungen signifikant höher als beim Stamm Ho. Das erste Erscheinen eines Symptoms der Drehkrankheit bei den Kreuzungen lag genau in der Mitte zwischen den beiden Stämmen TL und Ho. Somit scheint die Empfänglichkeitslage der

beiden Kreuzungen zwischen den beiden Stämmen TL und Ho zu liegen. Sie liegt wohl jedoch etwas näher am weniger empfindlichen Stamm Ho. Nach HEDRICK & KIM (2000) hat die Resistenz gegenüber einer Krankheit oft eine signifikante genetische Komponente. Wahrscheinlich wird die Vererbung der für die Unempfindlichkeit verantwortlichen Mechanismen von mehreren Genorten bestimmt. Auch SIMON & JONES (2001) vermuten, dass angeborene Immunität und Resistenz bestimmende Faktoren unter genetischer Kontrolle liegen und somit die selektive Zucht nach Resistenz gegen parasitäre Krankheiten möglich sei. Genaue Vererbungsregeln (eventuell nach Mendel) können aber auf Grund der relativ kleinen Gruppengrößen nach diesem Versuch nicht festgestellt werden. Der Vererbungsweg der verantwortlichen Resistenzfaktoren scheint allerdings nicht geschlechtsspezifisch, sondern geschlechtsunabhängig (autosomal) zu sein, denn beide Kreuzungen erwiesen sich als etwa gleich empfindlich. Dabei war bei der Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien) der Vaterstamm der resistenter und der Mutterstamm der empfindlicher, während die Verhältnisse bei der Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) genau umgekehrt liegen. Auch IBARRA et al. (1992, 1994) untersuchten einen hochempfindlichen, einen wenig empfindlichen Regenbogenforellen-Stamm und die F1- und F2-Generationen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion des Parasiten *Ceratomyxa shasta*. Es wurden keine einfachen Mendel'schen Gesetze der Vererbung der Sterblichkeitsrate und der mittleren Zeit bis zum Tod gefunden. Dies ließ die Autoren vermuten, dass die beiden Parameter von mehreren Genorten bestimmt werden. Dabei lagen die beiden Kreuzungen F1 und F2 in der Empfindlichkeit in der Mitte ihrer Elternstämme. Der Beitrag der männlichen und weiblichen Elterntiere für die Empfindlichkeit ihrer Nachkommen war hierbei jeweils gleich groß. Die Resistenzmechanismen sind allerdings ebenso wie bei der Drehkrankheit noch unbekannt. Auch DORSON et al. (1995) zeigten in ihren Studien den starken genetischen Einfluss der Resistenz bei einer VHS-Infektion. So lag die Sterblichkeitsrate von Nachkommen eines unempfindlichen Männchens und empfindlichen Weibchen höher als bei Kreuzungen desselben Männchens mit unempfindlichen Weibchen.

Während beim Feldversuch keine signifikanten Unterschiede in der Größe zwischen den beiden Stämmen TL und Ho entstanden, hatte der amerikanische Stamm, der sich auch im Laborversuch als am empfindlichsten zeigte, die meisten Sporen im Kopfknochen, die schwersten histopathologischen Veränderungen und die meisten klinisch auffälligen Tiere. Somit unterschied er sich in diesen Parametern signifikant vom Stamm Ho, der sich auch im Feldversuch als relativ unempfindlich gegenüber der *Myxobolus cerebralis*-Infektion zeigte.

Somit konnte auch im Feldversuch bestätigt werden, was KÜPPERS (2003) nach ihren Laborversuchen beschrieb: Der deutsche Stamm Ho ist signifikant unempfindlicher gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*- Infektion als der amerikanische Stamm TL. Während NEHRNG & THOMPSON (1998) die Infektionsbürde der amerikanischen Gewässer mit einer einmaligen Infektion mit 1000 TAMs pro Fisch verglich, zeigte sich beim Feldversuch in einem deutschen Gewässer bei Landsberg am Lech, dass die Parasitenbürde sogar unter der einmaligen Gabe von 100 TAMs pro Fisch liegt. Bei allen untersuchten Parametern lagen die Ergebnisse der Stämme TL und Ho hinter den Ergebnissen der gleichen Stämme beim Laborversuch mit 100 TAMs pro Fisch zurück. Dies ist wahrscheinlich mit der Verwendung von weniger empfänglichen Stämmen in Deutschland zu erklären, wodurch sich die Sporenausscheidung verringert. Folglich ist wohl auch die Infektionsbürde der deutschen Gewässer geringer als die der amerikanischen.

### **5.3 Empfänglichkeit des Wildstamms S**

Der Wildstamm S aus der Schweiz nimmt in der Empfänglichkeit gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion eine gewisse Zwischenstellung ein. Er ist in bei der Symptomprävalenz, bei der Sporenzählung und bei der Einteilung nach histopathologischen Graden jeweils signifikant empfindlicher als der deutsche Vergleichs-Stamm Ho und signifikant weniger empfindlich als der amerikanische Vergleichs-Stamm TL. Obwohl die Versuchsgruppen bei dem Stamm S klein waren, waren die durchschnittlichen Endgrößen und -Gewichte relativ gering, was für eine hohe Empfindlichkeit spricht. Man muss aber beachten, dass die Tiere des Stamms S im Vergleich zu den anderen Stämmen in einem geringeren Tagesgradalter infiziert worden sind. Da dies nachgewiesenermaßen einen fördernden Einfluss auf die Krankheitsentwicklung hat (RYCE, 2001), ist der Stamm S wohl in Wirklichkeit im Verhältnis zu den Referenz-Stämmen etwas unempfindlicher, als die Versuche der vorliegenden Arbeit vermuten lassen. Im Gegensatz zu den Beschreibungen von BEHNKE (2002), der Wildstämme für krankheitsresistenter hält als Zuchtstämme, liegen hier die Verhältnisse zum Teil umgekehrt. Der Wildstamm S aus der Schweiz erwies sich zwar resistenter als der amerikanische Zuchtstamm TL, nicht aber so resistent wie der deutsche Zuchtstamm Ho. Somit kann momentan der Forderung von BEHNKE (2002) noch nicht nachgekommen werden, lieber einen unempfindlichen Wildstamm in den amerikanischen Gewässern auszusetzen, um der Selektion noch Raum zu lassen, da zurzeit noch kein

Wildstamm bekannt ist, der eine ähnliche Resistenz gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion aufweist, wie der deutsche Zuchtstamm Ho.

#### **5.4 Histopathologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen**

*Myxobolus cerebralis*, der Verursacher der Drehkrankheit, macht im Salmonidenwirt im Verlauf der Infektion eine Wanderung durch die Haut und das Nervengewebe des Fisches, bis er schließlich sein Zielgewebe, den Knorpel, erreicht (EL-MATBOULI et al., 1995). Da die Krankheit beim Erreichen des Knorpels durch den Parasiten schon manifestiert ist und im Nervengewebe nur wenige Immunreaktionen gefunden werden konnten, vermutet EL-MATBOULI (unveröffentlicht) die Haut als entscheidende Abwehrbarriere einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion. Die vergleichenden Untersuchungen zwischen den unterschiedlich empfänglichen Regenbogenforellen-Stämmen TL und Ho richteten sich deshalb vor allem auf diese ersten Stunden nach der Infektion, in denen sich der Parasit in der Haut des Wirts aufhält. Es wurden aber bis zum 30. Tag nach der Infektion alle 2 Tage Proben entnommen, um auch im Nerven- und Knorpelgewebe eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu erkennen.

Hierfür wurden die Versuchsfische zuerst mit 1.000 beziehungsweise 5.000 Triactinomyxon-Sporen infiziert, da diese Dosis laut NEHRNG & THOMPSON (1998) am ehesten der Infektionsbürde der amerikanischen Gewässer entspricht und es somit sinnvoll erschien den Vergleich bei dieser Infektionsdosis zu vollziehen. Es konnten in der Folge aber nur vereinzelt histologisch Parasitenstadien in der Haut gefunden werden. Selbst nach der Erhöhung der Infektionsdosis auf 20.000 Triactinomyxon-Sporen wurden für einen aussagefähigen quantitativen Vergleich keine ausreichenden Mengen an Parasiten in der Haut der Probanden gefunden. Somit wurde der Versuch schließlich mit einer Infektionsdosis von 35.000 Triactinomyxon-Sporen durchgeführt, obwohl diese Dosis nicht mehr den Bedingungen der amerikanischen Gewässer entspricht.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Haut nach einer Infektion mit 35.000 Triactinomyxon-Sporen konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen dem hoch empfindlichem Stamm TL und dem wenig empfindlichen Stamm Ho festgestellt werden. Bei beiden Stämmen fanden sich in den Stunden 4, 6, 8 und 10 post infectionem sowohl völlig intakte als auch degenerierte Parasitenstadien in der Haut der Versuchsfische. Wie schon von EL-MATBOULI (1995) beschrieben, fielen bei den veränderten Stadien Strukturverlust und

eine Homogenisierung des Zytoplasmas, Vakuolisierung und Karyolyse auf (Abbildung 32 bis 39).

Diese Strukturverluste und Degenerationen der Parasitenstadien in der Haut der Regenbogenforellen konnten auch im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abbildung 26 bis 31). Hier erfolgte außerdem der quantitative Vergleich der intakten-, degenerierten- und Gesamtparasitenstadien in den ersten Stunden nach der Infektion beim Stamm Ho und TL (siehe Kapitel 5.4.1).

#### **5.4.1 Anzahl der Parasitenstadien in der Haut in den ersten 12 Stunden nach erfolgter Infektion**

Beim Stamm Ho waren bei der ersten Entnahme nach 4 Stunden im Schnitt insgesamt 53,1 Parasiten zu finden. Hiervon waren noch fast alle Stadien intakt. Während die Gesamtzahl der Parasiten in der Haut nach 10 Stunden im Mittel allmählich auf 31,4 abgesunken ist, wuchs der Anteil der nicht intakten Stadien beträchtlich. So waren zu diesem Zeitpunkt von 31,4 Stadien 27,9 degeneriert.

Beim Stamm TL war die Gesamtzahl der Parasiten in der Haut bei der ersten Entnahme mit 110,3 mehr als doppelt so hoch wie beim Stamm Ho. Während beim Stamm Ho nach 8 Stunden schon 24 von 33,9 (70,9%) Parasiten nicht mehr intakt waren, wiesen beim Stamm TL durchschnittlich lediglich 17,4 von 63,7 (27,3%) Parasitenstadien Anzeichen einer Degeneration auf. Von den insgesamt 63,7 Stadien nach 8 Stunden waren 10 Stunden post expositionem nur noch 16,8 in der Epidermis der Fische des Stamms TL zu finden. Dieser Abfall wurde vor allem durch eine Verminderung der intakten Stadien verursacht. So sank deren Zahl von 46,3 nach 8 Stunden auf 2,9 nach 10 Stunden (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Anzahl der intakten Parasitenstadien im Vergleich zur Gesamtzahl der Parasitenstadien der Haut beim Stamm Ho und TL

<b>Stamm</b>	<b>4h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>	<b>10h</b>	<b>12h</b>
<b>Ho</b>	52,3 (53,1)	43,1 (55,7)	9,9 (33,9)	3,5 (31,4)	0,4 (4,8)
<b>TL</b>	110,3 (110,6)	59,6 (67,2)	46,3 (63,7)	2,9 (16,8)	4,1 (6,3)

Stamm TL hat also im Vergleich zu Stamm Ho mehr als doppelt so hohe Ausgangszahlen an Parasiten in der Haut (110,3 gegenüber 52,3). Ursache hierfür könnte beispielsweise ein Unterschied in den Oberflächenmolekülen der Wirtsepidermis der beiden

Regenbogenforellen-Stämme sein. Nach EL-MATBOULI et al. (1999) sind bei der Auffindung und Anheftung am Wirt durch den Parasiten neben mechanischen auch Chemorezeptoren wichtig. Eine höhere Affinität zwischen den Oberflächenmolekülen des Stamms TL und den Triactinomyxon-Sporen versetzt vielleicht mehr Parasiten in die Lage, an die Wirtshaut des Stamms TL zu binden und den Amöboidkeim zu injizieren als an die des Stamms Ho. Zum Thema der Lektin-abhängigen Interaktion zwischen Parasit und Wirt laufen zurzeit in der gleichen Arbeitsgruppe Dissertationen, die vielleicht bald neue Informationen in diesen Bereichen liefern können.

Beim Stamm Ho wird der Anteil der nicht mehr intakten Stadien im Verlauf der ersten Stunden der Infektion immer höher, bis schließlich nach 10 Stunden fast alle, nämlich 27,9 von 31,4 Stadien nicht mehr intakt sind. Zu diesem Zeitpunkt sind dann zum ersten Mal beim Stamm Ho mehr Parasiten zu finden als beim Stamm TL (31,4 und 16,8). Bei letzterem ist der größte Abfall der Parasitenzahlen in der Haut zwischen der 8. und 10. Stunde nach der Infektion zu verzeichnen. Vielleicht werden beim Stamm Ho die Parasiten durch das Immunsystem des Fisches so verändert, dass sie degenerieren und ihre Wanderung nicht fortsetzen können. So sind nach 10 Stunden noch relativ viele, wenn auch zerstörte, Parasiten in der Haut anzutreffen. Bei dem empfänglicheren Stamm TL hingegen können sogar nach 8 Stunden noch hohe Zahlen an intakten Parasiten gefunden werden (46,3). Nach 10 Stunden werden aber nur noch durchschnittlich 2,9 intakte Stadien in der Haut entdeckt. Dieser starke Abfall der Parasitenstadien beim Stamm TL könnte dadurch erklärt werden, dass die Immunantwort der Haut bei diesem gegenüber der Drehkrankheit empfänglicheren Stamm geringer ausgeprägt ist und folglich mehr Parasiten die von EL-MATBOULI et al. (1995) beschriebene Wanderung über die peripheren Nervenendigungen fortsetzen können. Die Immunmechanismen, die diese Unterschiede zwischen den empfänglichen und nicht empfänglichen Stämmen bedingen, bleiben bisher noch unbekannt. Sie sind auf Grund der oben geschilderten Ergebnisse aber wahrscheinlich vor allem in der Haut zu suchen. QUILLET et al. (2001) fanden in ihren Untersuchungen bei Regenbogenforellen eine hohe Korrelation zwischen der Virusreplikation in der Haut und der Überlebensfähigkeit der Tiere. Dies war der erste Beweis in der Literatur, dass es einen Zusammenhang zwischen der Überlebensfähigkeit der Tiere und anderen Faktoren geben kann. Sie zeigten außerdem die Bedeutung der oberflächlichen Gewebe bei der Abwehr von Pathogenen. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre diese hohe Bedeutung auch bei der Abwehr einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion denkbar.

Da die Reaktionszeit des spezifischen Immunsystems bei niedrigen Wassertemperaturen erhöht ist und die volle Wirkung dieses Teils erst bei wiederholtem Kontakt zu dem betreffenden Antigen erfolgt (BALDO und FLETCHER, 1973), liegt der Grund für die verschiedenen Empfänglichkeiten vermutlich im unspezifischen Immunsystem. Hier können humorale Faktoren, von denen das Lysozym im nächsten Abschnitt ausführlich besprochen wird, und die zellulären Mechanismen eine Rolle spielen. So wurden zwischen den Epidermiszellen Makrophagen, die häufig Melaningranula enthalten, neutrophile und eosinophile Granulozyten gefunden (ANDERSON, 1974; COOPER et al., 1990). Bei Regenbogenforellen wurden neutrophile Granulozyten und Makrophagen im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen nach parasitären Invasionen in der Haut gefunden (FINN & NIELSON, 1971). REITE (1998) beschreibt die Mastzellen als wichtigen Bestandteil der Haut. Das Aufzeigen der Hypersensitivität vom verzögerten Typ beim Fisch gegen die Protozoen *Cryptobia salmositica* (THOMAS & WOO, 1990) und *Ichthyophthirius multifiliis* (SIN et al., 1996) lässt vermuten, dass eine ähnliche Antwort bei Regenbogenforellen aktiviert werden kann (BUCHMANN, 1999). Neue in vitro-Untersuchungen zum Wanderungsverhalten der Epithelzellen von Salmoniden und ihrer Phagozytosefähigkeit lassen vermuten, dass diese Zellen im Prozess der Wundheilung und Lysis von Mikroorganismen wichtig sind (ÅSBAKK & DALMO, 1997). Für den Parasiten *Myxobolus cerebralis* spielen die peripheren Nervenendigungen eine wichtige Rolle. HERRAEZ & ZAPATA (1986) fanden an den Nervenendigungen von Fischen Melanomakrophagen. Man kann also erkennen, dass dem Wirt Mechanismen zu Verfügung stehen, die eine Infektion mit *Myxobolus cerebralis* eventuell schon in den frühen Stadien in der Haut abwehren können (Genaueres siehe Literaturteil Abschnitt 2.5.2).

Bei einem anderen Vertreter der Klasse der Myxosporea, *Sphaerospora dicentrarchi*, wurden mit Hilfe des Elektronenmikroskops Makrophagen und zum Teil auch Granulozyten bei der Einverleibung von Parasitensporen beobachtet. Es wurden außerdem große Zahlen von Zelltrümmern im Zytoplasma dieser Zellen gefunden. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Kopfnieren-Leukozyten war bei denjenigen Fischen höher, die mit dem Parasiten konfrontiert waren. Nach Stimulation dieser Zellen mit hitzeinaktiviertem Serum wurden geringere Steigerungsraten der „respiratory burst“-Aktivität gemessen als bei normalem Serum. Die Autoren vermuten deshalb, dass die Bekämpfung des Parasiten *Sphaerospora dicentrarchi* vor allem mit Hilfe einer komplementinduzierten Phagozytose durch Makrophagen erfolgt. Diese Zellen können die Parasiten in der Folge mit einer Freisetzung von reaktiven Verbindungen abtöten (MUÑOZ et al., 2000).

Bei dem Befall mit dem Ektoparasiten *Gyrodactylus monogenea* wurde ein Abfall der Parasitenzahlen nach 20 bis 30 Tagen festgestellt. SIMON & JONES (2001) vermuten deshalb, dass auch hier das adaptive Immunsystem eine Rolle spielen könnte.

Weitere Untersuchungen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems müssen in Zukunft folgen, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen empfänglichen Regenbogenforellenstämmen herauszufinden.

### 5.4.2 Die Parasitenstadien im Nervengewebe

*Myxobolus cerebralis*, der Verursacher der Drehkrankheit, macht im Verlaufe der Infektion eine Wanderung durch die Haut ins Nervengewebe um schließlich das Zielgewebe, den Knorpel, zu erreichen. Schon ab Tag 4 nach der Infektion können nach EL-MATBOULI et al. (1995) Parasitenstadien im Nervengewebe festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten nach einer Infektion mit 35.000 Triactinomyxon-Sporen ausschließlich beim als empfindlich geltenden amerikanischen Stamm TL Parasiten gefunden werden, wobei die Suche vor allem zu den Tagen 6 bis 12 Tage nach der Infektion erfolgreich war. Im Gegensatz dazu waren im Nervengewebe des unempfindlichen deutschen Stamms Ho keine Anzeichen für die Infektion zu erkennen. Da die Parasitenstadien im Nervengewebe sehr klein sind, lassen sie sich im Lichtmikroskop nur schwer darstellen. Einzelne Stadien sind deshalb nicht eindeutig als Parasiten anzusprechen. Beim Stamm TL erreichen große Zahlen an Parasiten das Zielgewebe Knorpel (EL-MATBOULI & KÜPPERS, 2002). Folglich müssen auch große Mengen an Parasiten das Nervengewebe passieren, so dass sie wie in der vorliegenden Arbeit in Gruppen liegen und somit gut erkennbar sind. Beim Stamm Ho erreichen nur kleine Zahlen das Knorpelgewebe. Die vereinzelt vorkommenden Parasiten im Nervengewebe dieses Stamms sind deswegen nur schwer zu finden beziehungsweise nicht eindeutig als Parasit anzusprechen. Dieses Ergebnis ist somit ein weiteres Indiz für die These des vorigen Kapitels, dass der Unterschied der Empfänglichkeit der beiden Stämme Ho und TL bereits in den frühen Hautstadien der Infektion zu suchen ist. So können wahrscheinlich beim Stamm Ho auf Grund effektiverer Abwehrmechanismen in der Haut trotz gleicher Infektionsdosis nur weniger Parasiten das Nerven- und schließlich das Knorpelgewebe erreichen als beim Stamm TL. Auch HEDRICK et al. (2003) fand beim amerikanischen Stamm bis zu 100mal höhere Sporenzahlen im Kopfknorpel wie beim deutschen Stamm.

Bei beiden Stämmen fanden sich im Nervengewebe lediglich vereinzelte eosinophile Granulozyten, die auf eine Reaktion des Wirts auf die parasitäre Infektion hinweisen.

HEDRICK (1999b, 2001) stellte fest, dass die eosinophilen Granulozyten vor allem bei der unempfindlichen Bachforelle vorkommen, während sie bei empfindlichen Regenbogenforellen-Stämmen kaum anzutreffen sind. Er vermutete deshalb, dass diese Zellen eine Sporenanzahl limitierende Wirkung haben und somit vielleicht die Unterschiede in der Empfänglichkeit begründen könnten. Auf Grund dessen, dass diese Art der Granulozyten in der vorliegenden Arbeit bei beiden Stämmen gleichermaßen und nur vereinzelt vorkommen, lässt sich vermuten, dass sie eher eine untergeordnete Rolle bei der Begründung des Unterschieds der verschiedenen Empfänglichkeiten der beiden Stämme Ho und TL spielen.

### 5.5 Der Lysozymspiegel im Hautschleim

Wie im Literaturteil dargestellt, erwartet man die Immunmechanismen, die die unterschiedliche Empfänglichkeit des deutschen Stamms Ho und des amerikanischen Stamms TL begründen, vor allem zu dem Zeitpunkt der Infektion (EL-MATBOULI, unveröffentlichte Daten), bei dem sich der Parasit an die Fischhaut anheftet und dort in den ersten Stunden die ersten Teilungen vollführt (EL-MATBOULI et al., 1995). Bei der Anheftung der Triactinomyxon-Spore und der Penetration des Amöboidkeims in die Haut hat der Parasit Kontakt zu der die Epidermis umgebenden Schleimschicht. Hier könnten humorale Faktoren des angeborenen Immunsystems einen wirksamen Schutz vor der Infektion aufbauen.

ØYSTEIN et al. (1989) schreiben vor allem dem Lysozym eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Infektionskrankheiten zu. So wurden bei mikrobieller Invasion hohe Werte im Schleim nachgewiesen. Bei mit Vibriosis oder „Cold Water Disease“ infiziertem Atlantischen Lachs wurden nur geringe Werte an Lysozym gemessen. Hier könnte nach Meinung der Autoren die hohe Empfänglichkeit dieser Art gegenüber diesen Krankheiten begründet sein.

STUDNICKA et al. (1986) machten die Beobachtung, dass die Serumlysozymwerte im Verlauf einer Protozoeninfektion mit *Eimeria subepithelialis* signifikant anstiegen.

Der deutliche Anstieg des Lysozymgehaltes nach *Myxobolus*-Infektion bei dem empfänglicheren Stamm TL kann zweierlei bedeuten:

- 1) Der Versuch des Organismus in einer Akut-Phase-Reaktion den Erreger durch Lysozym zu inaktivieren hat keinen Einfluss auf die Triactinomyxon-Spore oder den Amöboidkeim.
- 2) Die Infektiösität von *Myxobolus cerebralis* wird durch die enzymatische Wirkung des Lysozyms auf die Triactinomyxon-Spore erhöht. Hier wäre eine Spaltung von Strukturproteinen der die Sporoplasmen umhüllenden Membran des Amöboidkeimes mit einer nachfolgenden erhöhten Anheftungsfähigkeit zu diskutieren.

Beides könnte Ursache für die geringere Empfänglichkeit des Stammes Ho gegenüber der Drehkrankheit sein. (KÖLLNER, persönliche Mitteilung)

Bei Studien mit 3 verschiedenen Austernstämmen wurden die Versuchstiere mit einer Parasiteninfektion konfrontiert. Dabei zeigte sich der Stamm mit der höchsten Lysozymaktivität als am unempfindlichsten (HAWKINS et al., 1992). Obwohl Austern keine Wirbeltiere sind, macht dieser Vergleich deutlich, dass auch innerhalb einer Spezies zwischen verschiedenen Stämmen Unterschiede in den Lysozymaktivitäten existieren können, die eine unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber einer Parasiteninfektion begründen können.

Es schien deshalb interessant, auch die Lysozymspiegel von mit der Drehkrankheit infizierten und nicht infizierten Regenbogenforellen-Stämmen miteinander zu vergleichen.

Die Bestimmung der Lysozymwerte im Hautschleim erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei dem deutschen Stamm Ho, der sich als relativ unempfindlich gegenüber der Drehkrankheit erwies und bei dem amerikanischen Stamm TL, der sich als sehr empfänglich gegenüber dieser parasitären Krankheit zeigte. Die Messungen wurden bei infizierten (1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch) und nicht infizierten Tieren beider Stämme zu den Zeitpunkten 1 Tag, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate und 4 Monate post expositionem durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit ist vor allem die erste Bestimmung am 1. Tag post expositionem von Bedeutung, um der Erforschung der Resistenzmechanismen bei der Drehkrankheit näher zu kommen. Die weiteren Bestimmungen nach 1, 2, 3 und 4 Monaten post expositionem spielen in den folgenden Betrachtungen nur eine untergeordnete Rolle, weil zu diesem Zeitpunkten die Infektion schon weitestgehend manifestiert ist und kein Kontakt zwischen dem Lysozym im Hautschleim und dem Parasiten (ab dem 20. Tag post expositionem schon im Knorpelgewebe) mehr stattfindet.

Beim dosis- und zeitpunktunabhängigen Vergleich der beiden Stämme ergab sich ein signifikant höherer Mittelwert des Lysozymspiegels beim Stamm TL, der mit im Schnitt 79,6 U/ml Lysozymaktivität im Schleim aufzuweisen hatte, während Stamm Ho einen mittleren Wert von 50,3 U/ml erreichte.

Beim zeitpunktunabhängigen Vergleich der infizierten Fische mit den nicht infizierten Kontrolltieren ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Mittelwert 69,1 U/ml) und den infizierten Tieren (1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch) (Mittelwert 90,2 U/ml) des Stamms TL. Hingegen unterschieden sich die Kontrollgruppe und die mit dem Parasiten in Kontakt gekommenen Tiere des Stamms Ho nicht signifikant (50,3 U/ml bei der Kontrollgruppe und 50,4 U/ml bei der 1000 *Triactinomyxon*-Sporen/Fisch-

Gruppe). Ebenfalls bei Regenbogenforellen fanden BUCHMANN & BRESCIANI (1998) keine Unterschiede in der Lysozymaktivität zwischen den mit *Gyrodactylus derjavini* infizierten Tieren und den Kontrollfischen.

Bei Betrachtung der Einzelwerte der nicht infizierten Kontrollgruppen des Stamms Ho (39,8 U/ml) und des Stamms TL (44,4 U/ml) des 1. Tags, die somit auch dem Level vor der Parasitenexposition entsprechen, wird kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen deutlich. Vermutlich kann also der weniger empfängliche Stamm Ho keinen prophylaktischen Schutz aus einem höheren Lysozympegel erreichen. Dies stimmt mit Untersuchungen von GRINDE (1989) überein, der von verschiedenen Fischarten die höchste Lysozymkonzentration bei der Regenbogenforelle fand. Auch FAST et al. (2002) fanden bei der Regenbogenforelle nicht nur höhere Anzahlen an Schleimzellen in der Epidermis, sondern auch signifikant höhere Lysozymspiegel als bei 2 anderen Spezies (Coho Lachs und Atlantischer Lachs).

Am 1. Tag post expositionem steigt der Lysozymspiegel beim Stamm TL im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Stamm Ho signifikant an. Dies könnte im Sinne einer akute-Phase-Antwort nach dem Entzündungsreiz der Infektion gesehen werden. So berichteten auch RAMOS & SMITH (1978) erstmals über ein Anwachsen eines Plasmaproteins nach Entzündungsreizen. Ähnliche Beobachtungen machten STUDNICKA et al. (1986), die beschrieben, dass die Serumlysozymwerte im Verlauf einer Protozoeninfektion mit *Eimeria subepithelialis* signifikant anstiegen.

Der signifikante Unterschied des Lysozympegels der Monate 2, 3 und 4 gegenüber den ersten beiden Entnahmen kann auch im Sinne eines Altersanstiegs gesehen werden. Auch STUDNICKA et al. (1986) zeigten in Untersuchungen beim Karpfen, dass der Lysozymspiegel mit dem Alter der Tiere ansteigt.

Zusammenfassend konnte nicht geklärt werden, ob das Lysozym im Fischschleim eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Empfänglichkeiten gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion spielt. Weitere vergleichende Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunmechanismen bei diesen beiden Stämmen müssen in Zukunft klären, welche Faktoren der Immunabwehr die unterschiedlichen Resistenzlagen gegenüber der Drehkrankheit begründen.

## 5.6 Zukunftsaussichten für die USA

Momentan gibt es noch keine effektiven Therapieformen für die Drehkrankheit. Die Bekämpfungsmaßnahmen beschränken sich auch in den schwer betroffenen USA (VINCENT, 1996) auf Eindämmungsversuche. Deshalb wird diskutiert, ob man die Infektion durch Einführung eines weniger empfindlichen Stamms in die Flusssysteme und Fischzuchten mildern kann. Es wurden allerdings noch keine amerikanischen Regenbogenforellen-Stämme gefunden, die sich als widerstandsfähig gegenüber der Infektion erweisen (DENSEMORE, 2001). Die Möglichkeit einen wenig empfindlichen, deutschen Stamm in die USA zu bringen, um ihn dort in den Flüssen auszusetzen, wurde schon von KÜPPERS (2003) beschrieben. Man muss sich aber über die Problematik im Klaren sein, dass ein solcher Eingriff in das Ökosystem weit reichende Folgen haben kann. Man kann zum Beispiel nicht voraussagen, ob sich der importierte Stamm gegen die einheimischen wilden Forellen in den für sie fremden Gewässern behaupten kann (BEHNKE, 2002). Es wäre auch möglich, dass der importierte Stamm wiederum empfänglicher für andere Krankheiten ist, die in den Gewässern der USA häufiger auftreten. Somit könnte zwar die Drehkrankheit zurückgedrängt werden, aber andere Krankheiten könnten eventuell zum Problem werden. Zurzeit laufen Arbeiten, die die Empfänglichkeit des deutschen Stamms Ho mit der des amerikanischen Stamms TL aus der vorliegenden Arbeit gegenüber anderen Krankheiten vergleichen (MATTES, unveröffentlicht). Ein weiteres Problem besteht in der eventuellen Homozygotie des Zuchtstamms Ho. Durch die jahrelange Züchtung eines Stamms geht die Genvielfalt durch die unvermeidbaren Inzuchten verloren. So beschrieben HEDRICK et al. (2001) und COLTMAN et al. (1999) eine höhere Krankheitsanfälligkeit von Tieren aus Inzuchten. Auch ARKUSH et al. (2002) zeigten in ihren Versuchen eine höhere Anfälligkeit von Fischen gegenüber der Drehkrankheit, die aus einer Inzucht stammen. Sie vermuteten einen Zusammenhang zwischen Inzuchtgrad und sowohl der Wahrscheinlichkeit als auch mit der Schwere einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion. Auch BEHNKE (2002) äußerte Bedenken, dass die Tiere des Zuchtstamms Ho auf Grund der begrenzten genetischen Vielfalt in freier Natur überleben können. Er fordert deshalb eher die Aussetzung eines weniger empfänglichen Wildstamms aus Deutschland, um der natürlichen und künstlichen Selektion Raum zu liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde dies allerdings nicht bestätigt. So ist der Zuchtstamm Ho weniger empfänglich als der Wildstamm S aus der Schweiz. Außerdem ist bis heute kein Wildstamm aus Deutschland bekannt, der sich ähnlich resistent gegenüber der Drehkrankheit verhält wie der Zuchtstamm Ho. Auch WEIS (2003) widerspricht den Einwänden von BEHNKE. So zeigt

er die Möglichkeit auf, nicht einen Fluss mit einem neuen Stamm komplett zu füllen, sondern die Resistenz in die dort heimischen Wildstämme einzukreuzen. Danach könne man hoffen, dass die natürliche Selektion die gegenüber der Drehkrankheit weniger empfindlichen Tiere begünstigt.

Da nach einer Einführung eines neuen Stamms in ein Gewässer unvermeidlich auch Paarungen mit dem dort heimischen Stamm stattfinden, könnte sich ein weiteres Problem ergeben. Wenn sich das Merkmal der hohen Empfänglichkeit bei der Kreuzung gegenüber dem Merkmal der geringen Empfänglichkeit dominant verhält, wäre es möglich, dass nach einigen Generationen wieder hoch empfängliche Tiere heranwachsen. In der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzungen aus hoch empfänglichen und weniger empfindlichen Stämmen mit ihren Elternstämmen verglichen. Hier schien die Empfänglichkeit der Kreuzungen sogar eher in Richtung des resistenteren Elternstammes Ho zu tendieren. Wenn sich also der importierte Stamm in den fremden Gewässern zurechtfindet und gegen die dort einheimischen Tiere behaupten kann, bleibt zu hoffen, dass auch nach einigen Generationen noch Tiere heranwachsen, die sich weniger empfindlich zeigen als die momentan dort lebenden einheimischen Forellen. Auf diese Weise könnte das Problem der Drehkrankheit eventuell langfristig in den USA entschärft werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei Kreuzungen aus hoch und wenig gegenüber der Drehkrankheit empfindlichen Regenbogenforellen-Stämmen mit verschiedenen *Triactinomyxon*-Sporenanzahlen infiziert und bezüglich der Parameter klinische Symptomatik, Endgrößen und –Gewichte, Infektionsprävalenz, Sporenanzahl pro Kopf und pathohistologische Veränderungen im Kopfknochen untersucht und mit den Elternstämmen verglichen. Sowohl die Kreuzung TL(Eier)xHo(Spermien), als auch die Kreuzung Ho(Eier)xZFF(Spermien) lagen in ihrer Empfänglichkeit zwischen jener der Vergleichs-Stämme TL und Ho, wobei sich die Empfänglichkeitslage eher dem Stamm Ho annäherte. Die Empfindlichkeit solcher Kreuzungen aus empfänglichen und wenig empfänglichen Stämmen könnte in Zukunft von großem Interesse sein. Ein eventuelles Aussetzen von Tieren des Stamms Ho in amerikanischen Gewässern hätte unvermeidlich auch Kreuzungen mit den dort heimischen empfindlichen Stämmen zur Folge. Da das Aussetzen eines resistenten Regenbogenforellen-Stammes in amerikanischen Gewässern diskutiert wird, ist man auf der Suche nach einem Wildstamm, der sich als ähnlich unempfindlich erweist, wie der Zuchtstamm Ho, dem auf Grund der eingeschränkten Genvielfalt schlechte Überlebenschancen in der freien Natur eingeräumt werden. Der hier untersuchte Wildstamm aus der Schweiz zeigte sich allerdings als sehr empfänglich für die Erkrankung.

Im 2. Teil der Arbeit wurden Tiere der Stämme Ho und TL mit hohen Sporenanzahlen infiziert. Anschließend wurden jeweils 4 Stunden, 6 Stunden, 8 Stunden, 10 Stunden und 12 Stunden nach der Exposition die Parasitenstadien in der Haut der Forellen gezählt, wobei eine Differenzierung in intakte und nicht intakte Parasitenstadien erfolgte. Beim Stamm TL wurden nach 4 Stunden höhere Parasitenzahlen gefunden als beim Stamm Ho. Nach 8 Stunden waren beim amerikanischen Stamm TL die meisten Stadien noch intakt. Der größte Abfall der Parasitenzahlen bei diesem gegenüber der Drehkrankheit empfindlichen Stamm erfolgte zwischen der 8. und 10. Stunde nach der Exposition. Beim weniger empfindlichen deutschen Stamm Ho wurden geringere Parasitenzahlen 4 Stunden post expositionem gefunden als beim Stamm TL. Der Anteil der nicht mehr intakten Parasitenstadien war zum Zeitpunkt 8 Stunden post expositionem höher als beim amerikanischen Stamm. Außerdem war der Abfall der Parasitenstadien in der Haut bei Stamm Ho zwischen der 4 Stunden- und der 8 Stunden-Entnahme insgesamt weniger ausgeprägt als beim Stamm TL. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann somit vermutet werden, dass das Immunsystem der

Haut beim resistenteren Stamm Ho nach einer *Myxobolus cerebralis* Infektion besser in der Lage ist, den Parasiten in den ersten frühen Stunden der Infektion zu bekämpfen, als das des Stammes TL. Die aus den Aktivitäten des Immunsystems resultierende Schädigung der Parasiten macht es vielleicht unmöglich, dass diese den weiteren Infektionsweg über die Nerven ins Knorpelgewebe bestreiten, so dass beim Stamm Ho insgesamt weniger Parasiten das Zielgewebe Knorpel erreichen können. Hierdurch wären auch die geringeren Krankheitsausprägungen und Sporenzahlen im Kopfknochen dieses Stammes zu erklären.

Im 3. Teil der Arbeit wurden die beiden Stämme Ho und TL mit 1000 *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch infiziert. Nach 1 Tag, 1 Monat, 2 Monaten, 3 Monaten und 4 Monaten wurden jeweils Schleimproben von infizierten und nicht infizierten Tieren beider Stämme gewonnen. Anschließend wurden die jeweiligen Lysozymaktivitäten bestimmt und verglichen. Neben dem wahrscheinlich altersabhängigen Anstieg der Lysozymaktivität zwischen den Entnahmen bei beiden Stämmen, war vor allem der hohe Wert einen Tag nach der Exposition bei den infizierten Tieren des empfänglicheren Stammes TL auffällig. Dies könnte als Antwort auf den stärkeren Entzündungsreiz beim Stamm TL nach der Infektion gesehen werden. Andererseits könnte gerade der hohe Lysozymspiegel kurz nach der Infektion beim Stamm TL den Parasiten begünstigen, seine Wanderung ins Nervengewebe fortzusetzen, wo er vor dem Immunsystem des Wirts sicher ist. So wäre zum Beispiel ein Angriff des Lysozyms gegen die Sporoplasmen umhüllenden Zellen des Amöboidkeims möglich, wodurch die Parasitenstadien leichter ins Gewebe gelangen könnten.

## 7. SUMMARY

### **Investigation of the resistance mechanism of a rainbow trout strain against *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease**

In part one of this work, two different rainbow trout cross-breeds were tested for their susceptibility to infection by *Myxobolus cerebralis*. The cross-breeds were created by mixing one more-sensitive and one less-sensitive trout strain: TL(eggs)xHo(sperm) and Ho(eggs)xZFF(sperm). The two strains were each exposed to different triactinomyxon-spore concentrations (100, 1000 and 5000 per fish). After any infection had developed, fish were measured (weight & length), and the prevalence of infection was quantified through counting spores per head and through examination of any histo-pathological damage to cerebral cartilage. The sensitivity of both cross-breeds was approximately midway between that of the original TL and Ho strains (though marginally closer to Ho).

Future work could include investigation of the susceptibility of strains derived by crossing sensitive strains (like TL and ZFF) and non-sensitive strains (Ho). We are also considering the consequences of introducing the German Ho strain into the United States. This would unavoidably result in cross-breeding with native, more-sensitive strains. New, non-sensitive European wild strains are being searched for at this time: strains which should have similar low susceptibility as the German cultured strain Ho (which is assumed to have lower survival chances in the wild due to reduced gene polymorphism). We have already investigated one wild strain (S) from Switzerland, which was very sensitive against to *Myxobolus cerebralis* infection.

In part two of the work, the strains Ho and TL were exposed to high numbers of spores (35.000 triactinomyxon-spores/fish). At intervals of 4, 6, 8, 10 and 12 hours post-exposure, parasites in the skin of the trout were counted, and viable and non-viable parasite states were noted. At 4 hours post-exposure, more parasites were found at the skin of the more sensitive American strain TL. At 8 hours, most parasite states on TL trout were still viable. Between 8-10 hours post-exposure, we detected the greatest decrease in parasite numbers on TL. At 4 hours post-exposure, there were significantly lower parasite numbers on Ho than TL. At 8 hours, the proportion of degenerated parasite states on Ho was higher than TL, however the decrease in number of parasite states on Ho between 4-8 hours post-exposure was lower than at that for TL.

## Summary

---

These results suggest that in the first hours after infection with *Myxobolus cerebralis*, there is a more effective immune response in the skin of strain Ho than TL. That is probably why fewer parasites are able to reach the target cartilage in strain Ho, leading to lower myxospore counts and fewer clinical signs.

In the part three of the work, the two rainbow trout strains Ho and TL were infected with 1000 triactinomyxon-spores per fish. Mucous was sampled from exposed and non-exposed fish from both strains, at 1 day, and at 1, 2, 3 and 4 months post-infection, and assayed for lysozyme activity. We detected an age-dependent increase in lysozyme activity in both strains. The exceptionally high one-day post-infection value from the more sensitive TL strain was remarkable; this could possibly be explained by a stronger inflammatory response of the more sensitive TL post-infection. The high lysozyme activity of TL could also facilitate passage of the parasite through the skin and into the nerves (where it is safe from the host immune response): we suppose that lysozyme degrades the parasite cell enveloping its infective sporoplasms, facilitating their passage into surrounding host tissue.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, S. M. (1990)

Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish  
American Fisheries Society Symposium 8, 1 - 8

ADKINSON, M. A., LEVINE, R. P., HEDRICK, R. P. (1997)

Investigations into the immune response of rainbow trout to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease  
Proceedings of the Whirling Disease Symposium  
Expanding the database: 1996 research progress reports  
Logan, Utah March 6-8, 1997

AGIUS, C. (1985)

The melano-macrophage centres of fish: a review  
In: Fish Immunology (Hrsg. Manning & Tatner)  
Academic Press Incorporation, London, 85-105

AGRAWAL, A., SHRIVE, A. K., GREENHOUGH, T. J., VOLANAKIS, J. E. (2001)

Control of the classical and the MBL pathway of complement activation  
Journal of Immunology 166, 3998-4004

ALEXANDER, J. B. (1985)

Non immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish  
In: Fish Immunology (Hrsg. Manning & Tatner), Academic Press Incorporation,  
London, 133-140

AL-HASSAN, J. M., THOMSON, M., SUMMERS, B., CRIDDLE, R. S. (1986)

Purification and properties of a hemagglutination factor from Arabian gulf catfish (*Arius thalassinus*) epidermal secretion  
Comparative Biochemistry and Physiology 85B, 31-39

AMARO, C., FOUZ, B., BIOSCA, E. G., MARCO-NOALES, E., COLLADO, R. (1997)

The lipopolysaccharide O side chain of vibrio vulnificus serogroup E is a virulence determinant for eels  
Infection and Immunity 65, 2475-2479

AMLACHER, E. (1992)

Tagebuch der Fischkrankheiten, 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena

ANDERSON, D. P. (1974)

Fish immunology  
Diseases of Fishes (Hrsg. Snieszko, Axelrod), Vol. 4,  
T.F.H. Publications Incorporation, Neptune City

ANDERSON, D. P. (1990)

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

- ANDREE, K. B., McCONNELL, E., HEDRICK, R. P. (1998)  
A polymerase chain reaction test for detection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in fish, and a comparison to existing detection techniques  
Diseases of Aquatic Organisms 34 (2), 145-154
- ANTONIO, D. B., ANDREE, K. B., McDOWELL, T. S., HEDRICK, R. P. (1998)  
Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete tissues by using a non radioactive *in situ* hybridization (ISH) protocol  
Journal of Aquatic Animal Health 10, 338-347
- ARKUSH, K. D., GIESE, A. R., MENDONCA, A. R., McBRIDE, A. M., MARTY, A. M., HEDRICK, P.W. (2002)  
Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes  
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 59, 966-975
- ÅSBAKK, K., DALMO, R. A. (1998)  
Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malphigian cells-motile cells clearing away latex beads *in vitro*  
Journal of Marine Biotechnology 6, 30-34
- AYLES, G. B., BAKER, R. F. (1983)  
Genetic differences in growth and survival between strains and hybrids of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) stocked in aquaculture lakes in the Canadian prairies  
Aquaculture 33, 269-280
- BALAKHNIN, I. A., GALAGAN, N. P. (1972)  
Distribution and survival rate of individuals with different transferrine types in the carp progeny of different parents combinations  
Gidrobiologiceskij Zurnal 8, 56-61
- BALDO, B. A., FLETCHER, T. C. (1973)  
C-reactive protein-like precipitins in plaice  
Nature 246, 235-236
- BALDWIN, T. J., PETERSON, J. E., McGHEE, G. C., STAIGMILLER, K. D., MOTTERAM, E., DOWNS, C. (1997)  
Distribution of whirling disease, caused by *Myxobolus cerebralis*, in salmonid fishes in Montana  
In: Whirling Disease Symposium: Expanding the Database. Whirling Disease Foundation, 19-26
- BANKA, C. L., YUAN, T., DE BEER, M. C., KINDY, M., CURTIS, L. K., DE BEER, F. C. (1995)  
Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux  
Journal of Lipid Research 36, 1058-1065
- BATTHOLOMEW, J. L. (1998)  
Host resistance to infection by the Myxosporean Parasite *Ceratomyxa shasta*: A review  
Journal of Aquatic animal health 10, 112-120

BARTHOLOMEW, J. L., BALDWIN, T., HEDRICK, R., KATHMAN, D., McMAHON, T., McCONNELL, B., MOFFITT, C., NEHRING, B., WINTON, J. along with contributions from Karl Andree, Mary George, Susan Higgins, Terry McDowell, Todd Sandell, Kathryn Sweeney, Richard Vincent, Eric Wagner, Pete Walker, and John Wood (2001)

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

BAYNE, C. J., GERWICK, L. (2001)

The acute phase response and innate immunity of fish

Developmental and Comparative Immunology 25, 725-743

BEACHAM, T. D., EVELYN, T. P. T. (1992)

Population and Genetic Variation in Resistance of Chinook Salmon to Vibriosis, Furunculosis and Bacterial Kidney Disease

Journal of Aquatic Animal Health 4, 153-167

BEHNKE, R. (2002)

The nature and nurture of trout behaviour

In: Trout Unlimited, Autumn 54-55

BERLINER, J. A., NAVAB, M., FOGELMANN, A. M., FRANK, J. S., DEMER, L. L., EDWARDS, P. A., WATSON, A. D., LUSIS, A. J. (1995)

Atherosclerosis: basic mechanism-oxidation, inflammation, and genetics Circulation 91, 2488-2496

BOESEN, H. T., PEDERSEN, K., LARSEN, J. L., KOCH, C., ELLIS, A. E. (1999)

*Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide

Infection and Immunity 67, 294-301

BOFFA, G. A., FINE, J. M., DRILHORN, A., AMOUCH, P. (1967)

Immunoglobulins and transferrin in marine lamprey sera

Nature 214, 700-702

BOLLARD, B. A., PANKHURST, N. W., WELLS, R. M. G. (1993)

Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Sparidae)

Comparative Biochemistry and Physiology A 106, 157-162

BONIFER, C., JAGLE, U., HUBER, M. C. (1997)

The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eucaryotic gene loci

Journal of Biological Chemistry 272, 26075-26078

BRAUN, R., ARNESEN, J. A., RINNE, A., HJELMELAND, K. (1990)

Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L.

Journal of Fish Diseases 13, 233-238

- BRAUN-NESJE, R., KAPLAN, G., SELJELID, R. (1982)  
Rainbow trout macrophages  
In: Vitro Morphology and Phagocytic Activity  
Developmental and Comparative Immunology 6, 281-291
- BUCHMANN, K. (1998)  
Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Plathelminthes: Momogenea)  
Diseases of Aquatic Organism 32, 195-200
- BUCHMANN, K. (1999)  
Immune mechanisms in fish skin against monogeneans – a model  
Folia Parasitologica 46, 1-9
- BUCHMANN, K., BRESCIANI, J. (1998)  
Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*:  
association between mucous cell density in skin and site selection  
Parasitology Research 60, 17-24
- CARROLL, M. C., PRODEUS, A. P. (1998)  
Linkages of innate and adaptive immunity.  
Current Opinions in Immunology 10, 36-40
- CHEVASSUS, B., DORSON, M. (1990)  
Genetics of resistance to diseases in fish  
Aquaculture 85, 83-107
- CHU, F. L., LA PEYRE, F. J., BURRENSEN, C. S. (1993)  
*Perkinsus marinus* infection and potential defence related activities in eastern oysters *C. virginica*: salinity effects  
Journal of Invertebrate Pathology 62, 225-232
- CIPRIANO, R. C., HEARTWELL, C. M. (1986)  
Susceptibility of salmonids to furunculosis: differences between serum and mucus responses  
against *Aeromonas salmonicida*  
Transactions of the American Fisheries Society 115, 83-88
- CLAIRE, M., HOLLAND, H., LAMBRIS, J. D. (2002)  
The complement system in teleosts  
Fish and Shellfish Immunology 12, 399-420
- COLLINS, M. D., FARROW, J. A. E., PHILIPS, B. A., FERUSU, S., JONES, D. (1990)  
Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase  
negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*  
International Journal of Systematic Bacteriology 37, 310-316
- COLTMAN, D. W., PILKINGTON, J. G., SMITH, J. A., PEMBERTON, J. M. (1999)  
Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population  
Evolution 53, 1259-1267

- COOPER, E. L., GREWAL, I. S., MAGOR, B. G. (1990)  
Comparative Immunology of the Integument  
In: Skin Immune System (Hrsg. Bos), 9-24
- COUTINHO, C. M., VAN LEUVEN, F., ARAUJO-JORGE, T. C. (1999)  
Detection of alpha-macroglobulin in the heart of mice infected with *Trypanosoma cruzi*  
Parasitology Research 85, 249-255
- CRONIN, M. A., CULLOTY, S. C., MULCAHY, M. F. (2001)  
Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.)  
Fish and Shellfish Immunology 11, 611-622
- CROSS, M., MANGELSDORF, I., WEDEL, A., RENKAWITZ, R. (1988)  
Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies  
Proceedings of the national Academy of Science of United States of America 85, 6232-6236
- DE KINKELIN, P., DORSON, M., HATTENBERGER-BAUDOUIY, A. M. (1982)  
Interferon synthesis in trout and carp after viral infection  
Developmental and Comparative Immunology Supplements 2, 167-174
- DEMMELE, E. (1999)  
Untersuchungen zu Immunreaktionen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bei der Drehkrankheit der Salmoniden.  
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München
- DENSMORE, C. L., BLAZER, V. S., CARTWRIGHT, D. D., SCHILL, W. B., SCHACHTE, J. H., PETRIE, C. J., BATUR, M. V., WALDROP, T. B., MACK, A., POOLER, P. S. (2001)  
A Comparison of Susceptibility to *Myxobolus cerebralis* among Strains of Rainbow Trout and Steelhead in Field and Laboratory Trials.  
Journal of Aquatic Animal Health 133, Sept. 2001
- DEXIANG, C., AINSWORTH, A. J. (1991)  
Assessment of metabolic activation of channel catfish peripheral blood neutrophils  
Developmental and Comparative Immunology 15, 201-208
- DOBSON, D. E., PRAGER, E. M., WILSON, A. C. (1984)  
Stomach lysozymes of ruminants  
1. Distribution and catalytic properties  
The Journal of Biological Chemistry 259, 11607-11613
- DORSON, M., QUILLET, E., HOLLEBECQ, M. G., TORHY, C., CHEVASSUS, B. (1995)  
Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis  
Veterinary Research 26, 361-368

- EBENBICHLER, C. F., THIELENS, N. M., VORNHAGEN, R., MARSCHANG, P., ARLAUD, G. J., DIERICH, M. P. (1991)  
Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41  
*Journal of Experimental Medicine* 174, 1417-1424
- EDAGAWA, T., MURATA, M., HATTORI, M., ONUMA, M., KODAMA, H. (1993)  
Cell surface C-reactive protein of rainbow trout lymphocytes  
*Developmental and Comparative Immunology* 17, 119-127
- ELLIS, A. E., HASTINGS, T. S., MUNRO DAFS, A. L. S. (1981)  
The role of *Aeromonas Salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis  
*Journal of Fish Diseases* 4, 41-51
- EL-MATBOULI, M. (1996)  
Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* Hofer 1903 (Myxozoa).  
Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- EL-MATBOULI, M., FISCHER-SCHERL, T., HOFFMANN, R. W. (1992)  
Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some *Myxosporea* spp. important for freshwater fish  
*Annual Review of Fish Diseases* 3, 367-402
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1986)  
Verbreitung von Myxosporidien unter freilebenden Fischen in Bayern  
DVG e.V. (Hrsg.). Verhandlungsband, Tagung der Fachgruppe Fischkrankheiten der DVG, 28.-29.Okt. München, 63-71
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1989)  
Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms  
*Parasitology Research* 75(6), 461-464
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1991)  
Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores  
*Journal of Aquatic Animal Health* 3, 260-262
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1993)  
*Myxosoma carassii* Klokacewa, 1914, also requires an aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*, as an intermediate host in its lifecycle  
*Bulletin of the European Association of the Fish Pathologists* 13, 189-192
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W. (1998)  
Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*  
*International Journal for Parasitology* 28, 195-217

- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W., MANDOK, C. (1995)  
Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage  
Journal of Fish Biology 46, 919-935
- EL-MATBOULI, M., HOFFMANN, R. W., SCHOEL, H., McCONNEL, T. S., HEDRICK, R. P. (1999)  
Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cartilage  
Diseases of Aquatic Organisms 35, 1-12
- EMBODY, G. C., HAYFORD, C. O. (1925)  
The advantage of rearing brook trout fingerlings from selected breeders  
Transactions of the American Fisheries Society 55, 135-138
- FÄNGE, R. (1982)  
A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish  
Developmental and Comparative Immunology Supplements 2, 23-33
- FÄNGE, R., LUNDBLAD, G. (1984)  
Leucocytes, lymphohemopoietic tissues and lysosomal enzymes in fishes  
Developmental and Comparative Immunology 8, 941
- FÄNGE, R., LUNDBLAD, G., LIND, J. (1976)  
Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish  
Marine Biology 36, 277-282
- FÄNGE, R., LUNDBLAD, G., SLETTENGREN, K., LIND, J., (1980)  
Glycosidases in lymphomyeloid (hematopoietic) tissues of elasmobranch fish  
Comparative Biochemistry and Physiology 67 B, 527-532
- FAST, M. D., SIMS, D. E., BURKA, J. F., MUSTAFA, A., ROSS, N. W. (2002)  
Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon  
Comparative Biochemistry and Physiology: Part A: Molecular and Integrative Physiology 132 (3), 645-657
- FERGUSON, H. W. (1984)  
Renal portal phagocytosis of bacteria in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)  
Ultrastructural observations  
Canadian Journal of Zoology 62, 2505-2511
- FEVOLDEN, S. E., REFSTIE, T., RØED, K. H. (1992)  
Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response  
Aquaculture 104, 19-29
- FINN, J. P., NIELSON, N. O. (1971)  
The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout  
The Journal of Pathology 105, 257-268

- FJALESTAD, K. T., GJEDREM, T., GJERDE, B. (1993)  
Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview  
*Aquaculture* 111, 65-74
- FLETCHER, T. C., WHITE, A. (1973)  
Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)  
*Experientia* 29, 1283-1285
- FLOS, R., REIG, L., TORRES, P., TORT, L. (1988)  
Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*  
*Aquaculture* 71, 99 - 106
- FREEDMAN, S. J. (1991)  
The role of alpha-2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout  
*Comparative Biochemistry and Physiology* 98B, 549-553
- FUJII, T. (1981)  
Antibody-enhanced phagocytosis of lamprey polymorphonuclear leucocytes against sheep erythrocytes  
*Cell and Tissue Research* 219, 41-51
- FUJII, T., NAKAMURA, T., SEKIZAWA, A., TOMONAGA, S. (1992)  
Isolation and characterization of a protein from hagfish serum that is homologous to the third component of the mammalian complement system  
*Journal of Immunology* 148, 117-123
- FUJIKI, K., SHIN, D. H., NAKAO, M., YANO, T. (2000)  
Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor (subunit and serum amyloid A)  
*Fish and Shellfish Immunology* 10, 229-242
- GHOSH, S., BHATTACHARYA, S. (1992)  
Elevation of C-reactive protein in serum of *Channa punctatus* as an indicator of water pollution.  
*Indian Journal of Experimental Biology* 30, 736-737
- GJEDREM, T., SALTE, R., GJEN, H. M. (1991)  
Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis  
*Aquaculture* 97, 1-6
- GOETHE, R., PHI-VAN, L. (1998)  
Posttranscriptional lipopolysaccharide regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11-cells  
*Journal of Immunology* 160, 4970-4978
- GRAHAM, S., SECOMBES, C. J. (1990)  
Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?  
*Journal of Fish Biology* 36, 563-573

GRIFFIN, B. R. (1984)

Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes activation by antibody, complement, and normal serum components  
Developmental and Comparative Immunology 8, 589-597

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

*Myxosoma cerebralis*: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*salmo gairdneri*)  
Journal of the Fisheries Research Board of Canada 35, 1186-1190

GRINDE, B. (1989)

Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens  
Journal of Fish Diseases 12, 95-104

HALLIDAY, M. M. (1973a)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids  
I. The diagnosis of infection  
Nordisk Veterinaermedicin 25, 345-348

HALLIDAY, M. M. (1973b)

Studies of *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids  
The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures  
Nordisk Veterinaermedicin 25, 349-358

HALLIDAY, M. M. (1974)

Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids  
IV. Preliminary immunofluorescent investigation of the spores of *Myxosoma cerebralis*  
Nordisk Veterinaermedicin 26, 173-179

HALLIDAY, M. M. (1976)

The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease in salmonids  
Journal of Fish Biology 9, 339-357

HAMAGUCHI, M., KUSUDA, R. (1992)

Antigen receptor on lymphocytes and macrophages in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*  
Developmental and Comparative Immunology 16, VII

HARRELL, L. W., ETLINGER, H. M., HODGINS, H. O. (1976)

Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease  
II. Anti *Vibrio Anguillarum* activity in mucus and observations on complement  
Aquacultura 7, 363-370

HARRIS, P. D., SOLENG, A., BAKKE, T. A. (1998)

Killing of *Gyrodactylus salaris* (Plathelminthes, Monogenea) mediated by host complement  
Parasitology 117, 137-143

HAUSER, C., SAURAT, J., SCHMITT, A., JAUNIN, F., DANYER, J. (1986)

Interleukin 1 is present in normal human epidermis  
Journal of Immunology 136, 3317-3323

- HAWKINS, L. E., HUTCHINSON, S., BROOKES, J. D., BUCKE, D. (1992)  
Differential response of three strains of *O. edulis* to environmental stress  
Quantified phenotypic responses in morphology and physiology  
Proceedings of the twenty seventh European Marine Biology Symposium, 7-11<sup>th</sup> September  
1992, Dublin, Ireland
- HAYNES, L., FULLER, L., MCKINNEY, E. C. (1988)  
Fc receptor for shark IgM  
Developmental and Comparative Immunology 12, 123-134
- HEDRICK, P. W., KIM, K. J. (2000)  
Genetics of complex polymorphisms: Pathogens and maintenance of the major  
histocompatibility complex variation  
In: Singh, R. S. and Krimbas, C. B. (Eds)  
Evolutionary Genetics: From Molecules to Morphology  
Cambridge University Press, Cambridge, 204-234
- HEDRICK, P. W., KIM, K. J., PARKER, K. M. (2001)  
Parasite resistance and genetic variation in the endangered *Gila topminnow*  
Annual Consults 4, 103-109
- HEDRICK, R. P., EL-MATBOULI, M., ADKISON, M. A., MAC CONNELL, E. (1998)  
Whirling Disease: Re-emergence among wild trout  
Immunological Revue 166, 365-376
- HEDRICK, R. P., MC DOWELL, T. S., GAY, M., MARTY, G. D., GEORGIADIS, M. P.,  
McCONNELL, E. (1999a)  
Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo  
trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease  
Diseases of Aquatic Organisms 37, 173-183
- HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., MUKKATIRA, K., GEORGIADIS, M. P.,  
McCONNELL, E. (1999b)  
Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with  
*Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease  
Journal of Aquatic Animal Health 11, 330-339
- HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., MARTY, G. D., MAKKATIRA, K., ANTONIO, D.  
B., ANDREE, K. B., BUKHARI, Z., CLANCY, T. (2000)  
Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a  
treatment for hatchery water supplies  
Diseases of Aquatic Organisms 42, 53-59
- HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., MARTY, G. D., FOSGATE, G. T., MAKKATIRA,  
K., MYKLEBUST, K., EL-MATBOULI, M. (2003)  
Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling  
disease) to *Myxobolus cerebralis*-infection  
Diseases of Aquatic Organisms 55(1), 37-44

- HERRAEZ, M. P., ZAPATA, A. (1986)  
Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*  
Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 117-126
- HERRAEZ, M. P., ZAPATA, A. (1987)  
Trapping of intraperitoneal-injected *Yersinia ruckeri* in the lymphoid organs of *Carassius auratus*  
The role of melano-macrophage centres  
Journal of Fish Biology 31 (Supplements A), 235-237
- HINES, R. S., WOHLFARTH, G. W., MOAV, R., HULATA, G. (1974)  
Genetic difference in susceptibility to two diseases among strains of the common carp  
Aquaculture 3, 187-197
- HNATH, J. G. (1988)  
Whirling Disease in Michigan: a historical perspective  
For: Whirling Disease Management in North America, an Emergency Conference. Denver  
CO. April, 12-14
- HOFER, B. (1903)  
Über die Drehkrankheit der RBF  
Allgemeine Fischereizeitung 28, 7-8
- HOFFMAN, G. L. (1970)  
Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with  
emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*)  
In: Symposium on Diseases of Fisheries and Shellfish. Sniezko S. F.  
American Fisheries Society, 69-81
- HOFFMAN, G. L. (1974)  
Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling  
disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish  
Transactions of the American Fisheries Society 103, 541-550
- HOFFMAN, G. L. (1975)  
Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): control with ultraviolet irradiation and effect on fish  
Journal of Wildlife Diseases 11, 505-507
- HOFFMAN, G. L. (1977)  
Control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): use of methylen blue staining as a  
possible indicator of effect of heat on spores  
Journal of Fish Biology 10, 181-183
- HOFFMAN, G. L. (1990)  
*Myxosoma cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease  
Journal of Aquatic Animal Health 2, 30-37
- HOFFMAN, G. L., DUNBAR, C. E., BRADFORD, A. (1962)  
Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States  
United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report-Fisheries 427, 1 -14

- HOFFMAN, G. L. Sr., HOFFMAN, G. L. Jr. (1972)  
Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*)  
I. The effects of chemicals on spores in vitro and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds  
Journal of Wildlife Diseases 8, 49-53
- HOFFMAN, G. L., PUTZ, R. E. (1969)  
Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*  
The Progressive Fish Culturist 31, 35-37
- HOFFMANN, R. W., EL-MATBOULI, M., HOFFMANN-FEZER, G. (1991)  
Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)  
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Fischkrankheiten (Hrsg.) Tagung Schmiedefeld/Thüringen, 14.-16. 11. 1990, 135-139
- HOLLAND, J. W., ROWLEY, A. F. (1998)  
Studies on the eosinophilic granule cells in the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*  
Comparative Biochemistry and Physiology 120, 321-328
- HOWELL, C. J. (1987)  
A chemokinetic factor in the carp *Cyprinus carpio*  
Developmental and Comparative Immunology 11, 139-146
- IBARRA, A. M., HEDRICK, R. P., GALL, G. A. E. (1992)  
Inheritance of susceptibility to *Ceratomyxa Shasta* (Myxozoa) in rainbow trout and the effect of length of exposure on the liability to develop ceratomyxosis  
Aquaculture 104, 217-229
- IBARRA, A. M., HEDRICK, R. P., GALL, G. A. E. (1994)  
Genetic analysis of rainbow trout susceptibility of the myxosporean, *Ceratomyxa Shasta*  
Aquaculture 120, 239-262
- IIDA, T., WAKABAYASHI, H. (1993)  
Resistance of *Edwardsiella tarda* to opsonophagocytosis of eel neutrophils  
Fish Pathology 28, 191-192
- INGRAM, G. A. (1980)  
Substances involved in the natural resistance of fish infection- a review  
Journal of Fish Biology 16, 23-60
- JAMES, K. (1990)  
Interactions between cytokines and  $\alpha_2$ -macroglobulin  
Immunology Today 11, 163-166
- JANISZEWSKA, J. (1955)  
Actinomyxidia. Morphology, ecology, history of investigations, systematics, development  
Acta parasitologica Pollonia 2, 405-443

JENKINS, J. A., OURTH, D. D. (1990)

Membrane damage to *E. coli* and bactericidal kinetics by the alternative complement pathway of channel catfish

Comparative Biochemistry and Physiology B 97, 477-481

JENSEN, J. A., FESTA, E., SMITH, D. S., CAYER, M. (1981)

The complement system of the nurse shark

Hemolytic and comparative characteristics

Science 214, 566-569

JOLLES, P., JOLLES, J. (1984)

What's new in lysozyme research?

Always a model system, today as yesterday

Molecular Biochemistry 63, 165-189

JORGENSEN, J. B., LUNDE, H., JENSEN, L., WHITEHEAD, A. S., ROBERTSEN, B. (2000)

Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha or bacterial lipopolysaccharide

Developmental and Comparative Immunology 24, 553-563

KARLSON, P. (1984)

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 12. Auflage

KENT, M. L., MARGOLIS, L., CORLISS, J. O. (1994)

The demise of a class of protists: Taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grassé, 1970

Canadian Journal of Zoology 72, 932-937

KICZKA, W. (1994)

From lysozyme monomer to lysozyme dimer

Zycie Weterynaryjne 4A, 131-136

KICZKA, W., POMORSKI, Z., TASZKUN, Z., MILCZAREK, I., SITKOWSKI, A. (1994)

The influence of lyodium-KLP on selected parameters of non-specific cellular immunity in healthy dogs

Zycie Weterynaryjne 4A, 145-148

KIKUCHI, S., SHIMOZAWA, A., NAKAMURA, H. (1990)

Large melanin-containing cells in the skin of ocular side of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, during wound healing (a preliminary report)

Developmental and Comparative Immunology 14, S.VII

KLUPP, R. (1979)

Genetic variance for growth in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

Aquaculture 18, 123-134

- KOCH, E. A., SPITZER, R. H., PITHAWALLA, R. B., DOWNING, S. W. (1991)  
Keratin-like components of gland thread cells modulate the properties of mucus from hagfish (*Eptatretus stoutii*)  
Cell and Tissue Research 264, 79-86
- KODOMA, H., YAMADA, F., MURAI, T., NAKANISHI, Y., MIKAMI, T., IZAWA, H. (1989)  
Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*  
Developmental and Comparative Immunology 13, 123-132
- KOUMANS-VAN DIEPEN, J. C. E., EGBERTS, E., PEIXOTO, B. R., TAVERNE, N., ROMBOUT, J. H. W. M. (1995)  
B-cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.): An immuno(cyto)chemical study  
Developmental and Comparative Immunology 19, 97-108
- KOUMANS-VAN DIEPEN, J. C. E., VAN DE LISDONK, M. H. M., TAVERNE-THIELE, A. J., VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L., ROMBOUT, J. H. W. M. (1994)  
Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.)  
Developmental and Comparative Immunology 18, 45-65
- KÜPPERS, M. (2003)  
Untersuchungen verschiedener Regenbogenstämme auf ihre Empfänglichkeit für *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden  
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München
- LAMMENS, M., DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F. (2000)  
Effects of *Flavobacterium psychrophilum* stains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes  
Diseases of Aquatic Organisms 41, 173-179
- LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F. E. G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B. M., LEEDALE, G. F., LOEBLICH, A. E., LOM, J., LYNN, D., MERINGFELD, E. G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F. G. (1980)  
A newly revised classification of the Protozoa  
Journal of Protozoology 27, 37-58
- LINDENSTRØM, T., BUCHMANN, K., SECOMBES, C. J. (2003)  
*Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 $\beta$  expression in rainbow trout skin  
Fish and Shellfish Immunology 15, 107-115
- LOM, J., DYVOKÁ, I. (1992)  
Protozoan Parasites of Fish 26, Elsevier, Amsterdam
- LOM, J., DYKOVÁ, I. (1995)  
Myxosporea (Phylum Myxozoa). In Woo (editor):  
Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and metazoan infections, CAB International, Wallington 97-148

- LOM, J., HOFFMAN, G. L. (1971)  
Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (HOFER, 1903) and *M. cartilagini* (HOFFMAN, PUTZ and DUNBAR, 1965)  
*Journal of Parasitology* 57, 1303-1308
- LOM, J., NOBLE, E. R. (1984)  
Revised classification of the class Myxosporea Bütschli, 1881  
*Folia Parasitologica (Prague)* 31, 193-205
- LORENZEN, N., OLESEN, N. J., KOCH, C. (1999)  
Immunity to VHS virus in rainbow trout  
*Aquaculture* 172, 41-61
- LUKYANENKO, V. I. (1965)  
Interspecies differences in frequency of discovery of serum lysozyme in fishes  
*Izvestiia Akademii Nauk Gruzinskoi Serii Biologicheskoi* 3, 409-413
- McARTHUR, J. I., FLETCHER, T. C. (1985)  
Phagocytosis in fish  
In: *Fish immunology* (Hrsg. Manning und Tatner), Academic Press Incorporation, London, 29-46
- McARTHUR, J. I., FLETCHER, T. C., THOMSON, A. W. (1983)  
Distribution of radiolabeled erythrocytes and the effect of temperature on clearance in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)  
*Journal of the Reticuloendothelial Society* 34, 13-21
- MALE, D., ROITT, I. (1991)  
Erworbene (adaptive) und angeborene Immunität  
In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Hrsg. Roitt, Brostoff, Male)  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1-10
- MANDOK, C. (1993)  
Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)  
Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München
- MARGOLIS, M. L., KENT, M. L., BUSTOS, P. (1996)  
Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America  
*Diseases of Aquatic Organisms* 25, 33-37
- MARKIW, M. E. (1986)  
Salmonid whirling disease: dynamics of experimental production of the infective stage - the Triactinomyxon spore  
*Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 43, 521-526
- MARKIW, M. E. (1989)  
Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout  
*Diseases of Aquatic Organisms* 6, 7-10

MARKIW M. E. (1992)

Salmonid Whirling Disease

U. S. Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center, Leetown

National Fish Health Research Laboratory

Fish and Wildlife Leaflet 17

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

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

Journal of the Fisheries Research Board of Canada 31, 15-20

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

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

Canadian Journal of Fish Aquatic Science 37, 2225-2227

MARQUÈS, A. (1984)

Contribution à la connaissance des Actinomyxidies: Ultrastructure, cycle biologique, systematique

Languedoc, Université des Sciences et Techniques, Thèse de Doctorat d'Etat

MATSUYAMA, H., TANAKA, K., NAKAO, M., YANO, T. (1988)

Characterization of the alternative complement pathway of carp

Developmental and Comparative Immunology 12, 403-408

MATSUYAMA, H., YANO, T., NAKAO, M., YAMAKAWA, T. (1991)

Opsonic effect of carp C3 on phagocytosis by neutrophils

Developmental and Comparative Immunology 15 (Supplements I), 59

MATSUYAMA, H., YANO, T., NAKAO, M., YAMAKAWA, T. (1992)

Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils

Fish and Shellfish Immunology 2, 69-78

McCUMBER, L. J., SIGEL, M. M., TRAUGER, R. J., CUCHENS, M. A. (1982)

RES structure and function of the fishes

In: The reticuloendothelial system

A comprehensive treatise, Vol. 3 (Hrsg. Cohen und Sigel)

Plenum Press, New York, 393-422

MICHEL, C., DORSON, M., FAIVRE, B. (1991)

Opsonizing activity of anti-Aeoromonas salmonicida antibodies after inactivation of complement in rainbow trout

Annals of Veterinary Research 22, 51-58

MODIN, J. (1998)

Whirling Disease in California: A Review of its History, Distribution and Impacts, 1965-1997

Journal of Aquatic Animal Health 10, 132-142

- MUÑOZ, P., ÁLVAREZ-PELLITERO, P., SITJÀ-BOBADILLA, A. (2000)  
Modulation of the *in vitro* activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida)  
Fish and Shellfish Immunology 10, 567-581
- MURAI, T., KODAMA, H., NAIKI, M., MIKAMI, T., IZAWA, H. (1990)  
Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein  
Developmental and Comparative Immunology 14, 49-58
- MURRAY, C. K. (1976)  
The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa*) tissues  
Journal of Fish Biology 9, 329-334
- NAGELKERKE, L. A. J., PANNEVIS, M. C., HOULIHAN, D. F., SECOMBES, C. J. (1990)  
Oxygen uptake of rainbow trout *Oncorhynchus myciss* phagocytes following stimulation of the respiratory burst  
The Journal of Experimental Biology 154, 339-353
- NAKAMURA, H., KIKUCHI, S., SHIMOZAWA, A. (1992)  
Active involvement of the skin in eliminating nonself materials in the teleost, *Oryzias latipes*  
Developmental and Comparative Immunology 16, S. IX
- NAKANISHI, T., OTOTAKE, M. (1997)  
Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination  
Developmental Biological Standards 90, 59-68
- NAKANISHI, Y., KODAMA, H., MURAI, T., MIKAMI, T., IZAWA, H. (1991)  
Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein  
American Journal of Veterinary Research 52, 397-401
- NAKAO, M., MATSUMOTO, M., NAKAZAWA, M., FUJIKI, K., YANO, T. (2000)  
Diversity of the complement factor B/C2 in the common carp  
Developmental and Comparative Immunology 24, E6 (Abstract)
- NASH, J. T., TAYLOR, P. R., BOTTO, M., NORSWORTHY, P. J., DAVIES, K. A., WALPORT, M. J. (2001)  
Immune complex processing in C1q-deficient mice  
Clinical and Experimental Immunology 123, 196-202
- NASH, K. A., FLETCHER, T. C., THOMSON, A. W. (1986)  
Migration of fish leucocytes in vitro  
The effect of factors which may be involved in mediating inflammation  
Veterinary Immunology and Immunopathology 12, 83-92
- NEHRING, R. B., THOMPSON, K. G. (1998)  
Assessment of the *Myxobolus cerebralis* myxospore load of fish collected in Colorado streams or held as sentinel fish in the Colorado River and an analysis of the degree days required for myxospore formation  
Proceedings Whirling Disease Symposium, Lory Student Center, Colorado State University Fort Collins, Colorado, February 19-21, 47-52

- NEHRING, B., THOMPSON, K. G., TAURMAN, K. A., SHULER, D. L. (2002)  
Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* myxospores  
American Fisheries Society Symposium 29, 125-134
- NEOPMUCENO, R. R., RUIZ, S., PARK, M., TENNER, A. J. (1999)  
ClqRp is a heavily O-glycosylated cell surface protein involved in the regulation of phagocytic activity  
Journal of Immunology 162, 3583-3589
- NEWTON, R. A., RAFTOS, D. A., RAISON, R. L., GECZY, C. L. (1994)  
Chemotactic responses of hagfish (Vertebrata, Agnatha) leucocytes  
Developmental and Comparative Immunology 9, 377
- NICKUM, D. (1999)  
Whirling Disease in the United States: A Summary of Progress in Research and Management.  
Trout Unlimited January 1999
- NILSEN, F. (1995)  
Description of *Trichodina hippoglossis* n. sp. from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*  
Diseases of Aquatic Organisms 17, 191-196
- NOGA, E. J. (1996)  
Whirling Disease (Black Tail)  
In: Fish Disease: Diagnosis and Treatment  
Eds.: L. L. Duncan, M. Steube, B. J. Wilson, Mosby-Year Book Incorporation, 183-185
- NONAKA, M. (1985)  
Evolution of complement system  
Developmental and Comparative Immunology 9, 377
- NONAKA, M. (1994)  
Molecular analysis of the lamprey complement system  
Fish and Shellfish Immunology 4, 437-446
- NONAKA, M., NATSUUME-SAKAI, S., TAKAHASHI, M. (1981a)  
The complement system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)  
II. Purification and characterization of the fifth component (C5)  
Journal of Immunology 126, 1495-1498
- NONAKA, M., NATSUUME-SAKAI, S., TAKAHASHI, M. (1981b)  
The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)  
I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement  
Journal of Immunology 126, 1489-1494
- NUNOMURA, W. (1990)  
Biological characterization of eel C-reactive protein  
Developmental and Comparative Immunology 14, VIII

- OBENAUF, S. D., HYDER SMITH, S. (1985)  
Chemotaxis of nurse shark leucocytes  
Developmental and Comparative Immunology 9, 221-230
- O'GRODNICK, J. (1975)  
Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge  
Journal of Wildlife Diseases 11, 54-57
- O'GRODNICK, J. (1979)  
Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*)  
Trans American Fisheries Society 108, 187-190
- OSSERMANN, E. F., LAWLOR, D. P. (1966)  
Serum and urinary lysozyme (Muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukaemia  
Journal of Experimental Medicine 124, 921-951
- OURTH, D. D., BACHINSKY, L. M. (1987)  
Bacterial sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)  
Developmental and Comparative Immunology 11, 551-564
- OURTH, D. D., WILSON, E. A. (1982)  
Alternative pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*  
Developmental and Comparative Immunology 6, 75-85
- ØYSTEIN, L., ØYSTEIN, E., SØRENSEN, A., FRØYSADAL, E. (1989)  
Study on lysozyme activity in some fish species  
Diseases of Aquatic Organisms 6, 1-5
- PAGE, M., ROWLEY, A. F. (1984)  
The reticulo-endothelial system of the adult river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L.)  
The fate of intravascularly injected colloidal carbon  
Journal of Fish Diseases 7, 339-353
- PALMOUR, R. M., SUTTON, H. E. (1971)  
Vertebrate transferrins. Molecular weights, chemical compositions, and iron-binding studies  
Biochemistry 10, 4026-4032
- PARISH, N., WRATHMELL, A., HARRIS, J. E. (1985)  
Phagocytic cells in the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.)  
In: Fish immunology (Manning und Tatner)  
Academic Press Incorporation, London
- PARRY, R. M., CHADAU, R. C., SHANHANI, R. M. (1965)  
A rapid and sensitive assay of muramidase  
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 119, 384-386

- PASCUAL, M., SCHIFFERLI, J. A. (1992)  
The binding of immune complexes by the erythrocyte complement receptor 1 (CR1)  
*Immunopharmacology* 24, 101-106
- PAULSEN, S. M., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. (2001)  
Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-Glucan and bacterial lipopolysaccharide  
*Fish and Shellfish Immunology* 11, 23-37
- PELETEIRO, M. C., RICHARDS, R. H. (1990)  
Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson  
*Journal of Fish Diseases* 13, 225-232
- PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G., CHRISTIE, P. (1982)  
Recovery of brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study  
*Journal of Fish Biology* 20, 229-244
- PLEGUEZUELOS, O., ZOU, J., CUNNINGHAM, C., SECOMBES, C. J. (2000)  
Cloning, sequencing and analysis of expression of a second IL-1 $\beta$  gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)  
*Immunogenetics* 51, 1002-1011
- PLEHN, M. (1904)  
Über die Drehkrankheit der Salmoniden [*Lentospora cerebralis*, (Hofer) Plehn]  
*Archiv für Protistenkunde* 5, 145-166
- POWELL, M. D., WRIGHT, G. M., BURKA, J. F. (1991)  
Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)  
*Cell and Tissue Research* 266, 469-474
- PUTNAM, F. W. (1975)  
The plasma proteins, structure, function and control  
Volume I, Academic Press, London, 2. Auflage
- QUILLET, E., DORSON, M., AUBARD, G., TORHY, C. (2001)  
In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation  
*Diseases of Aquatic Organisms* 45, 171-182
- RAMOS, F., SMITH, A. C. (1978)  
The C-reactive protein (CRP): Test for the detection of early disease in fishes  
*Aquaculture* 14, 261-266
- RAVAGLIA, M. A., MAGGESE, M. C. (1995)  
Melano-macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae): Histological and histochemical characterization  
*Journal of Fish Diseases* 18, 117-125

- RED, K. H., FJALESTAD, K., LARSEN, H. J., MIDTHJEL, L. (1992)  
Genetic variations in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)  
Journal of Fish Biology 40, 739-750
- REITE, O. B. (1998)  
Mast cell/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses  
Fish and Shellfish Immunology 8, 489-513
- RIJKERS, G. T. (1982)  
Non-lymphoid defence mechanisms in fish  
Developmental and Comparative Immunology 6, 1-13
- ROCK, G. (1991)  
Immunität gegen Viren, Bakterien und Pilze  
In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Hrsg. Roitt, Brostoff, Male), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 195-211
- ROITT, I. M., BROSTOFF, J., MALE, D. K. (1991)  
Kurzes Lehrbuch der Immunologie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2.Auflage
- ROSE, J. D., MARRS, G. S., LEWIS, C., SCHISLER, G. (2000)  
Whirling Disease Behavior and its Relation to Pathology of Brain Stem and Spinal Cord in Rainbow Trout  
Journal of Aquatic Animal Health 12, 107-118
- ROWLEY, A. F., BARROW, S. E., HUNT, T. C. (1987)  
Preliminary studies on eicosanoid production by fish leucocytes, using GC-mass spectrometry  
Journal of Fish Biology 31 (Supplements A), 107-111
- ROWLEY, A. F., HUNT, T. C., PAGE, M., MAINWARIN, G. (1988)  
Fish  
In: Vertebrate blood cells (Hrsg. Rowley & Ratcliffe)  
Cambridge University Press, Cambridge, 19-128
- ROWLEY, A. F., PETTITT, T. R., SECOMBES, C. F., SHARP, G. F. E., BARROW, S. E., MALLETT, A. I. (1990)  
Generation and biological activities of lipoxins in the rainbow trout - an overview  
Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research 21, 557-560
- RYE, M., LILLEVIK, K. M., GJERDE, B. (1990)  
Survival in early life of Atlantic salmon and rainbow trout: estimates of heritabilities and genetic correlations  
Aquaculture 89, 209-216

- RYCE, E., McCONNELL, E., ZALE, A. (1998)  
U.S. Fish and Wildlife Service Bozeman Fish Technology Center and Montana State University  
Effects of age, dose and environmental stress on the development of whirling disease in rainbow trout  
Whirling Disease Symposium, Research in Progress-Booklet, Feb.19-21, 33-36
- SAHU, A., LAMBRIS, J. D. (2001)  
Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity  
Immunological Reviews 180, 35-48
- SAKAI, D. K. (1981a)  
Blastogenic response of peripheral lymphocyte separated from rainbow trout to phytohemagglutinin, concanavalin A and pokeweed mitogen  
Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries 47, 1545-1550
- SAKAI, D. K. (1981b)  
Heat inactivation of complements and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia  
Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries 47, 565-571
- SAKAI, D. K. (1983)  
Lytic and bactericidal properties of salmonid sera  
Journal of Fish Biology 23, 457-466
- SAKAI, D. K. (1984)  
Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudates cells isolated from salmonid fishes  
Journal of Fish Diseases 7, 29-38
- SCHÄPERCLAUS, W. (1931)  
Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung  
Zeitschrift für Fischerei 29, 521-567
- SCHÄPERCLAUS, W. (1990)  
Fischkrankheiten  
5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin
- SCHISLER, G. J., BERGERSEN, E. P. (1998)  
The effect of electrofishing injury and *Myxobolus cerebralis* infection on fingerling rainbow trout  
Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit.  
Whirling Disease Symposium: Research in Progress 1998, 93-98
- SCHLEGEL, M., LOM, J., STECHMANN, A., BERNHARD, D., LEIPE, D., DYKOVA, I., SOGIN, M. L. (1996)  
Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa related to the Bilateria  
Archiv für Protistenkunde 147, 1-9

SCHOTT, A. (2002)

Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagilin und TNP-470 im Rahmen der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen, *Oncorhynchus myciss*  
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München

SCHREIBER, G., TSYKIN, A., ALDRED, A. R., THOMAS, T., FUNG, W. P., DICKSON, P. W., COLE, T., BIRCH, H., DE JONG, F. A., MILLAND, J. (1989)

The acute phase response in the rodent.

Annals of the New York Academy of Sciences 557, 61-85

SECOMBES, C. J., CHUNG, S., JEFFRIES, A. H. (1988)

Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C

Developmental and Comparative Immunology 12, 201-206

SECOMBES, C. J., CROSS, A. R., SHARP, G. J. E., GARCIA, R. (1992)

NADPH oxidase-like activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) macrophages

Developmental and Comparative Immunology 16, 405-413

SEKIZAWA, A., FUJII, T., TOCHINAI, S. (1984)

Membrane receptors on *Xenopus* macrophages for two classes of immunoglobulins (IgM and IgY) and the third complement component (C3)

Journal of Immunology 133, 1431-1435

SHARP, G. J. E., PIKE, A. W., SECOMBES, C. J. (1991)

Leukocyte migration in rainbow trout (*Oncorhynchus myciss* (Walbaum)): Optimization of migration conditions and responses to host and pathogen (*Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch)) derived chemoattractants

Developmental and Comparative Immunology 15, 295-305

SIDDALL, M. E., MARTIN, D. S., BRIDGE, D., DESSER, S. S., CONE, D. K. (1995)

The demise of a phylum of protists: phylogeny of myxozoa and other parasitic cnidaria  
Journal of Parasitology 8, 961-967

SIMON, R. M., JONES (2001)

The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish

Developmental and Comparative Immunology 25, 841-852

SIN, Y. M., LING, K. H., LAM, T. J. (1996)

Cell-mediated immune response of goldfish, *Carassius auratus* (L.), to *Ichthyophthirius multifidus*

Journal of Fish Diseases 19, 1-7

SIWICKI, A. K., KLEIN, P., MORAND, M., KICZKA, W., STUDNICKA, M. (1998)

Immunostimulatory effects of dimerized lysozyme (KLP-602) on the non-specific defence mechanisms and protection against furunculosis in salmonids

Veterinary Immunology and Immunopathology 61, 369-377

- SMITH, L. C., AZUMI, K., NONAKA, M. (1999)  
Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways  
*Immunopharmacology* 42, 107-120
- SMOTHERS, J. F., VON DOHLEN, C. D., SMITH, L. H. Jr., SPALL, R. D. (1994)  
Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans  
*Science* 265, 1719-1721
- SOTTRUP-JENSEN, L. (1989)  
 $\alpha$ -Macroglobulins: structure, shape and mechanism of proteinase complex formation  
*The Journal of Biological Chemistry* 264, 11539-11542
- SPILLER, O. B., MORGAN, B. P. (1998)  
Antibody-independent activation of the classical complement pathway by cytomegalovirus-infected fibroblasts  
*Journal of Infectious Diseases* 178, 1597-1603
- STARKEY, P. M., BARRETT, A. J. (1982a)  
Evolution of alpha-2-macroglobulin  
The structure of a protein homologous with human alpha-2-macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L.) plasma  
*The Biochemical Journal* 205, 105-115
- STARKEY, P. M., BARRETT, A. J. (1982b)  
Evolution of alpha-2-macroglobulin  
The demonstration in a variety of vertebrate species of a protein resembling human alpha-2-macroglobulin  
*The Biochemical Journal* 205, 91-95
- STARKEY, P. M., FLETCHER, T. C., BARRETT, A. J. (1982)  
Evolution of alpha-2-macroglobulin  
The purification and characterization of a protein homologous with human alpha-2-macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L.) plasma  
*The Biochemical Journal* 205, 97-104
- STUDNICKA, M., SIWICKI, A., RYKA, B. (1986)  
Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio* L.)  
*Bamidgeh* 1, 22-25
- SUNYER, J. O., LAMBRIS, J. D. (1998)  
Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates  
*Immunological Reviews* 166, 39-57
- SUNYER, J. O., TORT, L., LAMBRIS, J. D. (1997)  
Structural C3 diversity in fish-characterization of five isoforms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*  
*Journal of Immunology* 158, 2813-2821
- SUNYER, J. O., ZARKADIS, I. K., LAMBRIS, J. D. (1998)  
Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity?  
*Immunology Today* 19, 519-523

- SUZUMOTO, B. K., SCHRECK, C. B., McINTYRE, J. D. (1977)  
Relative resistance of three transferring genotypes of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their haematological responses to bacterial kidney disease  
Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34, 1-8
- TEMMINK, J. H. M., BAYNE, C. J. (1987)  
Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.)  
Developmental and Comparative Immunology 11, 125-137
- TENGELSEN, L. A., TROBRIDGE, G. D., LEONG, J. C. (1991)  
Characterization of an inducible interferon-like antiviral activity in salmonids  
Proceedings of the second international symposium on viruses of lower vertebrates, 219-226
- THOMAS, P. T., WOO, P. T. K. (1990)  
In vivo and in vitro cell-mediated immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Cryptobia salmonis* Katz. 1951 (Sarcomastigophora: Kinetoplastida)  
Journal of Fish Diseases 13, 423-433
- UHLAR, C. M., WHITEHEAD, A. S. (1999)  
Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant  
European Journal of Biochemistry 265, 501-523
- VINCENT, D. (1996)  
Whirling Disease, the Montana Experience, Madison River  
In: Whirling Disease Workshop Proceedings: Where do we go from here?  
Bergersen, E. P and Knopf, B. A. (ed)  
Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, 159
- VIRELLA, G. (1977)  
Electrophoresis of lysozyme into Micrococcus-containing agarose gel: quantitative analytical applications  
Clinical Chimica Acta, International Journal of Clinical Chemistry 75, 107-115
- WALKER, P. G., NEHRING, R. B. (1995)  
An investigation to determine the cause(s) of the disappearance of young wild rainbow trout in the upper Colorado River in Middle Park, Colorado  
Colorado Division of Wildlife Report, Denver
- WALPORT, M. (1991)  
Komplement  
In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Hrsg. Roitt, Brostoff, Male), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 151-167
- WATERSTRAT, P. R., AINSWORTH, A. J., CAPLEY, G. (1991)  
In vitro responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, neutrophils to *Edwardsiella ictaluri*  
Developmental and Comparative Immunology 15, 53-63
- WEIS, J. (2003)  
Breeding resistance  
In: Trout Unlimited, Winter 8

- WIEGERTJES, G. F., YANO, T., VAN MUISWINKEL, W. B. (1993)  
Estimation of the genetic variation in complement activity of common carp  
(*Cyprinus carpio* L.)  
Veterinary Immunology and Immunopathology 37, 309-319
- WINKELHAKE, J. L., CHANG, R. J. (1982)  
Acute phase (C-reactive) protein like macromolecules from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)  
Developmental and Comparative Immunology 6, 481-489
- WINKELHAKE, J. L., VODICNIK, M. J., TAYLOR, J. L. (1983)  
Induction in rainbow trout of an acute-phase (C-reactive) protein by chemicals of  
environmental concern  
Comparative Biochemistry and Physiology 74C, 55-58
- WINTER, G. W., SCHRECK, C. B., McINTYRE, J. D. (1980)  
Resistance of different stocks and transferrin genotypes of Coho Salmon, *Oncorhynchus*  
*kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis  
Fishery Bulletin 77, 795-802
- WOLF, K., MARKIW, M. E. (1975)  
*Myxosoma cerebralis*: Serological identification by indirect fluorescent antibody test  
Fish Health 4, 8
- WOLF, K., MARKIW, M. E. (1982)  
*Myxosoma cerebralis*: inactivation of spores by hot smoking of infected trout  
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39, 926-928
- WOLF, K., MARKIW, M. E., HILTUNEN, J. K. (1986)  
Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in  
the protozoan life cycle  
Journal of Fish Diseases 9, 83-85
- WOLF, K., MARKIW, M. E., MACHADO, J., CRUZ, M., GALHANO, H., EIRAS, J.,  
HERMAN, R. L. (1981)  
Non-myxosporidan black tail of salmonids  
Journal of Fish Diseases 4, 355-357
- WOODBURY, R. (1996)  
A killer runs through it  
Time, June 3, 64
- YIN, Z., LAM, T., SIN, Y. M. (1995)  
The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus*  
*carpio* L.)  
Fish and Shellfish Immunology 5, 519-529
- YOUSIF, A. N., ALBRIGHT, L. J., EVELYN, T. P. T. (1994)  
In vitro evidence for the antibacterial role of the lysozyme in salmonids eggs  
Diseases of Aquatic Organisms 19, 15-19

ZAPATA, A., COOPER, E. (1990)

The immune system: Comparative histophysiology

John Wiley and Sons, Chichester

ZELIKOFF, J. T., ENANE, N. A., BOWSER, D., SQIBB, K. S., FRENKEL, K. (1991)

Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in immunotoxicological studies

I. Characterization of trout macrophage morphological, functional and biochemical properties

Fundamental and Applied Toxicology, Official Journal of the Society of Toxicology 16, 576-589

### 9. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die freundliche Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit bei Prof. Dr. Dr. Mansour El-Matbouli bedanken.

Bei Dr. Bernd Köllner bedanke ich mich für das geduldige Beibringen des Lysozymtests, für die Ratschläge und Anregungen in der Zeit danach und vor allem für die freundschaftliche Woche auf der Insel Riems.

Bei Frau Christine Kühnhauser-Vogt möchte ich mich herzlich für die freundlichen Einweisungen in den histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungstechniken bedanken.

Andre Hohenegger spreche ich für die Betreuung der Versuchsfische meinen Dank aus.

Denise Ebenrecht danke ich für die nette Zeit in der Histologie. Die Arbeit am Mikrotom verging bei den netten Unterhaltungen wie im Flug.

Herrn Dr. Popp bin ich für das jederzeitige zur Verfügung stellen des Photometers dankbar. Seinen Assistentinnen danke ich für die Einarbeitung und die freundliche Hilfestellung bei den immer wieder auftretenden Störungen des Geräts.

Bei Prof. Dr. Osterkorn möchte ich mich für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen ganz herzlich bedanken.

Ein großer Dank geht an unsere australischen Gäste Sasha und Steven. Sie waren immer freundlich und hilfsbereit und gaben der englischen Zusammenfassung den letzten, dringend nötigen Schliff.

Marianne Mattes, M'hamed Oumouna, Martin Knaus, Amine Oucible und Christoph Dörfler danke ich ganz herzlich für die nette Atmosphäre im Labor, das Fische versorgen, die spannenden Billardpartien und die Filmabende.

## Danksagung

---

Markus Killich und Isa Zenker spreche ich meinen Dank aus für das Aufmerksammachen auf diese Dissertation und die vielen schönen Abende bei ihnen zu Hause, bei denen auch das leibliche Wohl nie zu kurz kam. Außerdem danke ich von ganzem Herzen Yvonne Hirle für die moralische Unterstützung in den letzten beiden Jahren.

Ein großer Dank geht an Walter Meixner, Daxi Grandel, Mirmel Küppers, Christoph Dörfler und Vanessa Severin für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit und meinem Bruder Thomas Meixner für die äußerst wertvollen Hilfestellungen in Computerfragen.

Besonders dankbar bin ich für das Kennenlernen meiner drei Labormädels Sandy Heyer, Annabelle Culas und Mirmel Küppers. Sie haben den Arbeitsalltag durch schöne Gespräche und nette Stimmung im Labor erheitert. Vor allem aber haben sie sich inzwischen zu wichtigen Freunden entwickelt auf die man immer zählen kann. Letztgenannter danke ich auch noch für die vielen Stunden der Einarbeitung und Hilfe in Untersuchungsmethoden und Computerfragen, die sie mir zu jeder Zeit opferte. Außerdem danke ich unseren Goldstücken Josie und Nejca für die schönen und erheitenden gemeinsamen Spaziergänge in den Mittagspausen im Englischen Garten.

Mein größter Dank geht an meine Familie für die tolle Unterstützung, nicht nur in finanzieller Hinsicht, die ich all die Jahre erhalten habe!!

**10. LEBENSLAUF**

Name: Michael Joachim Meixner

Geburtsdatum: 30.05.1976

Geburtsort: Stuttgart

Eltern: Walter Meixner  
Margot Meixner, geb. Schneider

Schulbildung: 1982-1986 Konrad-Kocher-Schule in Ditzingen  
1986-1995 Gymnasium Glemsaue in Ditzingen

Zivildienst: 1995-1996 bei AMSEL in Gerlingen

Studium: 1996-2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
Abschluss des III. Abschnitts der Tierärztlichen Prüfung am 08.01.2002  
Approbation am 04.02.2002

Promotionsstudium: Seit März 2002 am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und  
Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Internship: Seit Oktober 2003 in der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-  
Maximilians-Universität München