

Aus dem  
Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart  
(CVUAS)

angefertigt unter der Anleitung von  
Prof. Dr. R. W. Hoffmann

und vorgelegt über das  
Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Epidemiologische Untersuchungen zur  
Virenen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und  
Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHN)  
im Südwesten Deutschlands**

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

von  
Falk Wortberg  
aus  
Norden

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann  
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. A. Neubauer

Tag der Promotion: 10. Februar 2006





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Geschichte der VHS und IHN.....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS).....	11
2.1.2	Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN).....	11
<b>2.2</b>	<b>Pathogenese, klinisches und pathologisch-anatomisches Bild .....</b>	<b>12</b>
2.2.1	VHSV empfängliche Fische.....	12
2.2.2	IHNV empfängliche Fische.....	13
2.2.3	Pathogenese.....	13
2.2.4	Abhängigkeiten von der Wassertemperatur .....	14
2.2.5	Klinische Symptomatik bei Regenbogenforellen.....	15
2.2.6	Pathologisches Bild bei der Regenbogenforelle .....	16
2.2.7	Virale Hämorrhagische Septikämie bei anderen Fischarten .....	17
2.2.7.1	VHS bei Bachforellen ( <i>Salmo trutta forma fario</i> ) .....	17
2.2.7.2	VHS bei Coregonen ( <i>Coregonus</i> spp.).....	17
2.2.7.3	VHS bei Hechten ( <i>Esox lucius</i> ).....	17
2.2.7.4	VHS bei Äschen ( <i>Thymallus thymallus</i> ).....	18
2.2.7.5	VHS bei Meeresfischen.....	18
<b>2.3</b>	<b>VHSV und IHNV.....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Serotypisierung .....	19
2.3.2	Genotypisierung .....	20
2.3.3	Pathogenität.....	21
<b>2.4</b>	<b>Rechtsvorschriften .....</b>	<b>22</b>
2.4.1	EU-Rechtsvorschriften .....	22
2.4.2	Bundes-Rechtsvorschriften .....	23

<b>2.5</b>	<b>Diagnostik von VHS und IHN.....</b>	<b>24</b>
2.5.1	Amtliche Untersuchungsmethoden.....	24
2.5.2	RT-PCR .....	24
2.5.3	Weitere Methoden zum Nachweis von VHS und IHN.....	25
2.5.3.1	Immunhistologie.....	25
2.5.3.2	Antigen-ELISA.....	25
2.5.3.3	Serologie.....	25
<b>2.6</b>	<b>Vorkommen von VHS und IHN.....</b>	<b>26</b>
2.6.1	VHS in Fließgewässern .....	27
2.6.2	Marines VHS .....	28
2.6.3	IHN in Wildgewässern .....	28
2.6.4	Molekulare Epidemiologie .....	30
<b>2.7</b>	<b>Viren, Fische und Abwasser .....</b>	<b>31</b>
2.7.1	Tenazität von VHSV und IHNV .....	31
2.7.2	Versuche mit Regenbogenforellen im Abwasser von Kläranlagen.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Epidemiologische Untersuchungen in Wildgewässern und Feldversuche ..</b>	<b>33</b>
3.1.1	Untersuchung von Felchen ( <i>Coregonus lavaretus</i> ) aus dem Bodensee .....	33
3.1.2	Organproben von Fischen aus dem Bodensee.....	33
3.1.3	Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines fischverarbeitenden Betriebes .....	34
3.1.3.1	Feldversuch mit drei Hälterkästen von Dezember 2002 .....	
	bis Januar 2003 .....	35
3.1.3.2	Feldversuch mit vier Hälterkästen von Januar 2003 bis März 2003 .....	37
3.1.4	Versuch mit Regenbogenforellen im Ablaufwasser einer Kläranlage .....	38
3.1.5	Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines VHS infizierten Betriebes .....	40
3.1.5.1	Feldversuch 2003.....	40
3.1.5.2	Feldversuch 2004.....	41

---

3.1.6	Epidemiologische Untersuchungen im Bereich eines VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes .....	43
3.1.6.1	Elektroabfischung am Bach D .....	45
3.1.6.2	Elektroabfischung des Zulaufkanals eines Wasserkraftwerkes .....	
	an Fluss E .....	47
<b>3.2</b>	<b>Tötung, Organentnahme, Probentransport und Probenaufbereitung.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Virologische Untersuchungen .....</b>	<b>50</b>
3.3.1	Virusanzucht in Zellkultur .....	50
3.3.1.1	Vorbereitungen.....	50
3.3.1.2	Filtration des Überstands.....	51
3.3.1.3	Positivkontrollen .....	51
3.3.1.4	Beimpfen .....	51
3.3.1.5	Passagieren der Kulturen.....	52
3.3.1.6	Beurteilung.....	53
3.3.2	Virusidentifikation mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests .....	53
3.3.2.1	Auswertung .....	55
3.3.3	VHS- und IHN- RT-PCR .....	57
3.3.3.1	β-Aktin -Kontrolle .....	57
3.3.3.2	Aufreinigung mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) .....	57
3.3.3.3	1. PCR-Schritt (One-Tube RT-PCR) .....	58
3.3.3.4	Seminested PCR.....	60
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	62
3.3.4.1	Photodokumentation .....	63
3.3.4.2	Auswertung der Gele.....	63
3.3.5	Wiederholte Virusanzüchtung.....	64
3.3.6	Sequenzierung .....	65

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der untersuchten Felchen (<i>Coregonus lavaretus</i>) aus dem Bodensee .....</b>	<b>66</b>
4.1.1	Pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	66
4.1.2	Virologische Untersuchungen .....	66
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der virologischen Untersuchungen der Organproben von Fischen aus dem Bodensee .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines fischverarbeitenden Betriebes .....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Ergebnisse des Feldversuchs mit drei Hälterkästen von Dezember 2002 bis Januar 2003 an Fluss A.....	67
4.3.1.1	Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	67
4.3.1.2	Virologische Untersuchungen .....	67
4.3.2	Ergebnisse des Feldversuchs mit vier Hälterkästen von Januar 2003 bis März 2003 an Fluss A.....	68
4.3.2.1	Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	68
4.3.2.2	Virologische Untersuchungen .....	68
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse des Versuchs mit Regenbogenforellen im Ablaufwasser einer Kläranlage .....</b>	<b>69</b>
4.4.1	Klinische Untersuchungen.....	69
4.4.2	Pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	69
4.4.3	Virologische Untersuchungen .....	70
4.4.4	Wasserparameter im Fischversuchsbecken .....	70
<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse des Feldversuchs mit Regenbogenforellen im Bereich eines VHS infizierten Betriebes .....</b>	<b>71</b>
4.5.1	Feldversuch 2003 an Bach B.....	71
4.5.1.1	Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	71
4.5.1.2	Virologische Untersuchungen .....	72
4.5.2	Feldversuch 2004 an Bach B .....	73

---

4.5.2.1	Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	73
4.5.2.2	Virologische Untersuchungen.....	73
4.5.3	Ergebnisse der Sequenzierung der VHS-Isolate .....	75
<b>4.6</b>	<b>Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen im Bereich eines VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes .....</b>	<b>76</b>
4.6.1	Pathologisch-anatomische und virologische Untersuchungen der letzten verbliebenen Regenbogenforellen aus der infizierten Anlage zum Zeitpunkt der Keulung.....	76
4.6.2	Elektroabfischung am Bach D .....	76
4.6.2.1	Pathologisch-anatomische Untersuchungen.....	76
4.6.2.2	Virologische Untersuchungen.....	77
4.6.3	Ergebnisse der Elektroabfischung im Zulaufkanal eines Wasserkraftwerkes an Fluss E .....	78
4.6.3.1	Pathologisch-anatomische Untersuchungen.....	78
4.6.3.2	Virologische Untersuchungen.....	78
4.6.4	Ergebnisse der Sequenzierung der VHS-Isolate .....	78
<b>4.7</b>	<b>Untersuchungen auf IPN .....</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>Derzeitige Situation über die Verbreitung der VHS und IHN in den Wildgewässern Deutschlands .....</b>	<b>80</b>
5.1.1	Rechtlicher Rahmen für die Freiheit eines Gewässers auf VHS und IHN .	81
<b>5.2</b>	<b>Bodenseefelchen und VHS.....</b>	<b>81</b>
5.2.1	Andere Fischarten aus dem Bodensee.....	82
<b>5.3</b>	<b>Die Virusemission aus infizierten Fischhaltungsbetrieben und die Verbreitung der VHS in einem Fließgewässer .....</b>	<b>83</b>
5.3.1	Der fischverarbeitende Betrieb am Fluss A .....	83
5.3.2	Virusemission aus dem VHS infizierten Betrieb an Bach B.....	85
5.3.2.1	Feldversuch an Bach B 2003.....	85
5.3.2.2	Feldversuch an Bach B 2004.....	85

---

5.3.3	Elektroabfischungen im Bereich des VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes am Bach D und im Zulaufkanal bei Fluss E .....	87
<b>5.4</b>	<b>Virusemission im Ablaufwasser des fischverarbeitenden Betriebes nach dreistufiger Reinigung in einer Kläranlage.....</b>	<b>88</b>
<b>5.5</b>	<b>Die Bedeutung der VHS bei der Bachforelle.....</b>	<b>90</b>
<b>5.6</b>	<b>Die VHS und IHN und ihre epidemiologische Bedeutung für die Wildfischpopulation und die Fließgewässer.....</b>	<b>91</b>
<b>5.7</b>	<b>Die Wildfischpopulation und ihre seuchenhygienische Bedeutung für die Aquakultur .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>97</b>
<b>8.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungssymbole für Aminosäuren.....</b>	<b>99</b>
<b>8.3</b>	<b>Alignment der VHS-Isolate von den Feldversuchen an Bach B 2003 .....</b> <b>und 2004.....</b>	<b>100</b>
<b>8.4</b>	<b>Alignment der VHS-Isolate aus dem Schwarzwald im Bereich des Fischhaltungsbetriebes am Bach D .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>136</b>
<b>10.1</b>	<b>Projektfinanzierung.....</b>	<b>137</b>





# 1 Einleitung

Die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und die Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) sind zwei Rhabdovirus-Infektionskrankheiten bei Salmoniden, Äschen, Coregonen, Hechten und verschiedenen marinen Fischarten. Die VHS und IHN verursachen, besonders bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), hohe Verluste im Fischbestand, verlaufen häufig seuchenhaft und sind daher in der Aquakultur wirtschaftlich bedeutsam. Beide Erkrankungen sind nach dem Tierseuchenrecht anzeigepflichtig. Die Fischseuchenbekämpfung wird in Deutschland zum Teil sehr verhalten betrieben. Die Keulung der seuchenkranken Fischbestände und die unmittelbare Verwertung ansteckungsverdächtiger Fische wird nach amtlicher Feststellung bei Ausbruch der VHS oder IHN in der Praxis kaum angeordnet. Grund dafür ist, dass die Kosten einer solchen Maßnahme nicht von den Tierseuchenkassen getragen werden können. So zögert sich die Ausschaltung eines Seuchenherdes oft längere Zeit hinaus und die infizierten Fischhaltungsanlagen emittieren über das Ablaufwasser laufend eine unbekannte Menge an Virus in das angeschlossene Gewässersystem. Viele Fachleute halten infolgedessen eine erfolgreiche Fischseuchenbekämpfung in Anlagen an Fließgewässern für nicht durchführbar, da angenommen wird, dass die Erreger in den Oberflächengewässern durch die Wildfischpopulationen endemisch werden. Es wird befürchtet, dass nach einer Betriebssanierung über den Wasserzulauf VHS- bzw. IHN-Virus erneut in die Anlage gelangen und ein erneutes Seuchengeschehen auslösen könnten, wenn der Wildfischbestand im angeschlossenen Gewässer nicht in die Bekämpfungsmaßnahmen mit einbezogen wird.

Diese Arbeit soll Möglichkeiten aufzeigen, wie der Status in mutmaßlichen „VHS-Endemiegewässern“ erfasst werden kann und demonstrieren, wie bedeutsam die Virusemission aus verschiedenen infizierten Anlagen ist. Dafür wurden in unterschiedlichen Einzugsbereichen von VHS infizierten Anlagen Wildfischpopulationen virologisch untersucht. Hälterkästen mit erregerefreien Versuchsbogenforellen wurden unterhalb und oberhalb der Einleitungsstelle von infizierten Anlagen in Fließgewässern eingesetzt um ferner die Bedeutung von „Virus-

Carriern“ im Wildfischbestand zu prüfen. Im Ablaufwasser einer Kläranlage wurde untersucht, ob sich darin gehaltene erregerefreie Versuchsforellen durch die über den Zulauf zugeführten Schlachtabwässer eines VHS und IHN behafteten Fischverarbeitungsbetriebes mit diesen Viren infizieren lassen.

Die virologischen Untersuchungen wurden mittels Virusanzucht in der Zellkultur mit anschließender Erregeridentifikation durch indirekte Immunfluoreszenztechnik, sowie mittels einer hochsensitiven VHS- und IHN- RT-PCR mit anschließender seminested PCR direkt aus dem homogenisierten Organmaterial durchgeführt. Durch die Sequenzierung des Glykoprotein-Gens wurden die Virusisolate bzw. PCR- Amplifikate bestätigt und durch die Erstellung von Alignments vergleichbar gemacht.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichte der VHS und IHN

#### 2.1.1 Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS)

Die **VHS** wurde möglicherweise erstmalig 1938 von Schäperclaus als Erkrankung bei Regenbogenforellen unter der Bezeichnung „Nierenschwellung“ beschrieben. In Infektionsversuchen mit filtriertem Organmaterial von erkrankten Regenbogenforellen konnte Schäperclaus 1941 per Injektion die Erkrankung auf gesunde Regenbogenforellen übertragen (nach Amlacher, 1992). In der Nähe des Dorfes Egtved in Ostjütland in Dänemark trat 1949 die Erkrankung seuchenhaft in Forellenfarmen auf (Rasmusen, 1965) und wurde darum als Egtved-Disease bezeichnet. Schließlich gelang es Jensen 1965 die virale Ätiologie klarzustellen. Im gleichen Jahr wurde die bis dato unterschiedlich bezeichnete Erkrankung ((infektiöse) Nierenschwellung, Leberdegeneration, Egtved-Disease, Forellenseuche) von der OIE (Office International des Epizooties) im Animal Health Code aufgenommen und die Bezeichnung VHS für eine einheitliche Nomenklatur empfohlen (nach Amlacher, 1992).

#### 2.1.2 Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN)

Die **IHN** gilt als endemische Viruserkrankung bei Brut und Jungfischen verschiedener Pazifikkachsarten an den Flüssen der Westküste Nordamerikas. Ein Oregon-Sockeye-Virus beim Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*) wurde von Rucker et al. (1953), ein Sacramento-River-Chinook-Virus beim Königslachs (*Oncorhynchus tshawytscha*) von Ross et al. (1960) und ein Infectious Hematopoietic Necrosis Virus bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) von Amend et al. (1969) beschrieben (aus Roberts, 2001). Durch einen Plaque-Neutralisationstest wurde serologisch nachgewiesen, dass es sich um das gleiche Virus handelte (McCain et al., 1971). Über infizierte Eier aus Alaska wurde die IHN Anfang der 70er Jahre nach Japan gebracht (Wolf, 1988). 1987 wurde die IHN in Frankreich (Baudin Laurencin, 1987) und Italien

(Bovo et al., 1987) diagnostiziert. Durch infizierte Regenbogenforellen aus Italien wurde 1992 die IHN erstmals nach Deutschland eingeschleppt (Enzmann et al., 1992).

## 2.2 Pathogenese, klinisches und pathologisch-anatomisches Bild

Die VHS und IHN sind schwerwiegende Viruserkrankungen bei verschiedenen Fischarten. Für Fischhaltungsbetriebe mit empfänglichen Fischarten sind sie wirtschaftlich sehr bedeutsam, da beide Erkrankungen seuchenhaft auftreten und die Verluste im Fischbestand bis zu 100% betragen können.

### 2.2.1 VHSV empfängliche Fische

Nachdem die VHS anfänglich nur bei Regenbogenforellen (Ghittino, 1965) und einigen anderen Süßwasserfischen, wie Bachforelle *Salmo trutta f. fario* (de Kinkelin & Le Berre, 1977), Äsche *Thymallus thymallus* (Witzigmann et al., 1980), Hecht *Esox lucius* (Meier et al, 1980 & 1981; Witzigmann et al., 1980) und Felchen *Coregonus* sp. (Ahne & Thomsen, 1985), als Infektionskrankheit Bedeutung hatte, wurde 1991 auch beim Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) im Salzwasser VHSV als Pathogen identifiziert (Schlotfeldt et al., 1991). Inzwischen wurde bei mehr als 45 Fischarten im Süß- und Salzwasser VHSV isoliert. Davon entfallen mindestens 7 Arten auf Lachsartige (Salmoniformes), 1 Art bei Hechten (Esociformes), 4 Arten bei Heringen (Clupeiformes), 11 Arten bei Dorschen (Gadiformes), 7 Arten bei Plattfischen (Pleuronectiformes), 3 Arten bei Stinten (Osmeriformes), 6 Arten bei Barschen (Perciformes), 2 Arten bei Skorpionsfischen (Scorpaeniformes), 1 Art bei Aalen (Anguilliformes), 1 Art bei Zahnkärpflingen (Cyprinodontiformes) und 2 Arten bei Stichlingen (Gasterosteiformes) (OIE, 2003b). Potentiell werden alle Salmoniden und deren Kreuzungen als empfängliche Fische angesehen.

Im Aquatic Animal Health Code 2004 des OIE werden Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Bachforelle (*Salmo trutta*), Äsche (*Thymallus thymallus*), Coregonen (*Coregonus* spp.), Hecht (*Esox lucius*), Forellenbarsch (*Micropterus salmoides*), Japanische Flunder (*Paralichthys olivaceus*) und Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) als Fischarten genannt, die an der VHS klinisch erkranken.

### 2.2.2 IHNV empfängliche Fische

Die für IHN empfindlichen Arten stammen ausschließlich aus der Fam. Salmonidae. IHNV wurde aus der Regenbogen- und Steelhead-Forelle (*Oncorhynchus mykiss*), verschiedenen Pazifik-Lachsarten (*Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus rhodurus* und *Oncorhynchus kisutch*) und dem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) isoliert (OIE, 2004).

Von einem IHNV-Isolat vom europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) wurde bei Bergmann et al. (2002a) berichtet. Experimentell konnte Bachforellenbrut (*Salmo trutta*, ~0,6 g) (LaPatra et al., 1990a), Hechtbrut (*Esox lucius*) (Dorson et al., 1987) und Brut vom weißen Stör (*Acipenser transmontanus*) mit IHNV infiziert werden (LaPatra et al., 1995).

### 2.2.3 Pathogenese

Bei dem natürlichen Infektionsweg über das Wasser wird angenommen, dass die Infektion mit dem Virus über die Kiemen (Neukirch, 1984a; Drolet et al., 1994) oder auch über den Gastrointestinaltrakt (Wolf, 1988; Drolet et al., 1994) verläuft. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte **VHSV** 1 Tag p.i., **IHNV** 2 Tage p.i. im Kiemenepithel von Regenbogenforellen nachgewiesen werden. Die Niere und Milz gelten als Zielorgane für die Virusreplikation. Beide Erreger zeigen eine Affinität zu Endothelzellen. 28 Tage p.i. konnten die Erreger vor allem noch im Gehirn nachgewiesen werden (Bruderseith et al., 2002). Beiden Erregern wird eine mögliche Persistenz im Wirtsorganismus nach überstandener Erkrankung zugeschrieben. Neukirch (1986) hat 421 Tage p.i. **VHSV** aus dem Gehirn experimentell infizierter Regenbogenforellen isoliert und zeigte, dass die Infektion mit VHSV im Verlauf nicht unbedingt mit erkennbaren Krankheitssymptomen vergesellschaftet sein muss. Drolet et al. (1995) konnten bei überlebenden Regenbogenforellen 1 Jahr nach experimenteller **IHNV**- Infektion inaktive "truncated" Viruspartikel im hämatopoetischen Gewebe nachweisen und stützten so die Hypothese der Persistenz von IHNV nach überstandener Infektion.

#### 2.2.4 Abhängigkeiten von der Wassertemperatur

Ausbruch und Verlauf der VHS und IHN sind abhängig von der Wassertemperatur. Für den Ausbruch der **VHS** wird ein Temperaturbereich von 1 bis 12°C angegeben (Wolf, 1988). Bei Temperaturen von 14 bis 15°C und mehr ist die VHS bei adulten Fischen klinisch i. d. R. nicht mehr zu beobachten. In Versuchen mit 0,2 g und 2 g schwerer Regenbogenforellenbrut gab es jedoch auch erhebliche Verluste bei Wassertemperaturen über 14°C. Je schwerer die Forellen, umso niedriger ist die Sterblichkeit. Je niedriger die Wassertemperaturen, desto langsamer verläuft die Krankheit doch umso höher ist die Gesamtmortalität (Neukirch, 1984b). Analog dazu verhält sich die Erreger-Persistenz im Organismus. Bei niedrigen Wassertemperaturen (5°C) bleibt der Erreger länger nachweisbar (bis 98 Tage p.i.). Bei Temperaturen von über 15°C ist VHSV nach ein bis zwei Wochen mit Hilfe der Zellkultur nicht mehr nachweisbar (Jørgensen, 1982).

In der Praxis kann eine Häufung von VHS- Ausbrüchen in Fischhaltungsbetrieben in den Übergangsmonaten im Frühjahr, besonders im Mai, beobachtet werden (Witzigmann et al., 1983). Einen Anstieg der Mortalität konnte bei Regenbogenforellen beobachtet werden, nachdem sie 9 Wochen nach Infektion von 10°C in 20°C warme Hälterungen umgesetzt wurden (Jørgensen, 1982).

Bei der **IHN** wurden natürliche Ausbrüche nie bei Wassertemperaturen über 15°C berichtet (Roberts, 2001). Versuche durch Erhöhung der Wassertemperatur auf 18°C die IHN nach i.p. Infektion bei Rotlachs-Fingerlingen (*Oncorhynchus nerka*) kontrollieren zu können, wurden von Amend (1970) durchgeführt.

Die Inkubationszeiten von VHS und IHN sind ebenso abhängig von der Wassertemperatur. Bei sehr niedrigen Wassertemperaturen verzögert sich der Ausbruch (Wolf, 1988). Bei experimentell mit VHSV infizierter Regenbogenforellenbrut gab es 2 Tage p.i. erste Verluste (Neukirch, 1984b).

### 2.2.5 Klinische Symptomatik bei Regenbogenforellen

Bei der **VHS**, wie sie bei Regenbogenforellen in Aquakultur auftritt, erkranken Fische aller Altersklassen. Es wird eine akute, eine chronische und eine nervöse Form bzw. Phase unterschieden (Ghittino, 1965).

Zu Beginn eines Ausbruchs stehen die Fische lethargisch an der Teichoberfläche oder am Teichrand. Die Forellen zeigen eine Dunkelfärbung und Exophthalmus mit periokularen Blutungen. Die Kiemen sind blass durch die allgemeine Anämie und haben feine punktförmige oder streifige Blutungen. Die Verluste sind während der akuten Phase hoch. Bei der chronischen Form werden die Symptome Dunkelfärbung, Exophthalmie und Anämie ausgeprägter. Die Fische entwickeln z.T. einen Aszites, die hämorrhagische Diathese nimmt ab und die Verluste im Bestand gehen zurück. Die nervöse Form zeichnet sich ggf. durch gekrümmte Körperhaltungen und abnormes Schwimmverhalten mit Drehungen um die Längsachse aus. Nach überstandener Erkrankung können die Fische klinisch völlig gesund erscheinen und dennoch Virusträger sein (Liversidge et al. 1985; Bauer/Rapp, 2003; Center of Food Security and Public Health 2003b).

Bei der **IHN** erkranken überwiegend Brütlinge und Setzlinge mit hoher Mortalitätsrate. Auch größere Regenbogenforellen können erkranken, die Verluste im Bestand bleiben dabei meist moderat. Die erkrankten Forellen zeigen Dunkelfärbung, Glotzaugen, ein angeschwollenes Abdomen, blasse Kiemen sowie Blutungen auf der Haut ventral der Seitenlinie, an den Flossenansätzen, um den Maulbereich und im Auge. Bei junger Brut ist der Dottersack mit blutiger Flüssigkeit gefüllt. Erkrankte Fische stehen lethargisch an der Wasseroberfläche oder zeigen vereinzelt abnormes oder hyperaktives Schwimmverhalten. Pseudofaeces hängen aus dem After. Die klinische Symptomatik kann, insbesondere bei größeren Forellen, ganz ausbleiben (Wolf, 1988; Roberts, 2001; Center of Food Security and Public Health 2003a).

### 2.2.6 Pathologisches Bild bei der Regenbogenforelle

Die **VHS** äußert sich durch eine hämorrhagische Diathese mit petechialen bis flächenhaften Blutungen auf den Serosen, in den Schleimhäuten und in den Parenchymen. Typisch sind die petechialen bis kommaförmigen Blutungen in der Muskulatur sowie Blutungen im visceralen Fettgewebe, im Intestinum, auf der Schwimmblase, im Kiemengewebe und im Auge. Erkrankte Fische zeigen eine ausgeprägte Anämie. Die Milz ist geschwollen, vereinzelt werden Milznekrosen beobachtet. Die Leber ist bei der akuten Form dunkelrot, später blass und geschwollen mit Einblutungen; die Bauchhöhle ist dann oftmals mit Flüssigkeit gefüllt. Die Niere ist in der akuten Phase gerötet, in der chronischen Phase grau verfärbt, geschwollen und knotig verändert. (Liversidge et al. 1985; Bauer/Rapp, 2003; Hoffmann, 2005).

Histologisch sind erst disseminierte Nekrosen und Degenerationen in den Endothelien der Gefäße, den Sinus des hämatopoetischen Nierengewebes und den Lebersinusoiden zu finden. Degenerationen und Nekrosen weiten sich ausgedehnt auf das hämatopoetische Gewebe von Niere und Milz sowie Leber und Pankreasparenchym aus. Hinzu kommt eine Herzmuskelfaserdegeneration und eine lymphozytäre Myokarditis (Hoffmann, 2005). Bei der nervösen Form sind pathologisch-anatomische Veränderungen i.d.R. nicht signifikant, ggf. gibt es Degenerationen der Muskulatur. Histologisch ist jedoch eine nichteitrige Enzephalitis erkennbar (Hoffmann, 2005).

Das pathologisch-anatomische Bild der **IHN** ist dem der **VHS** sehr ähnlich. Man findet Aszites, petechiale Blutungen im Peritoneum, auf den Pylorusschläuchen, im Intestinum, im visceralen Fettgewebe und auf der Schwimmblase. Milz, Niere und Leber sind blass-anämisch, Magen und Darm sind mit klarer, weißlicher bis gelblicher, fadenziehender Flüssigkeit gefüllt. Brütlinge weisen Blutungen im Dottersack auf. Bei überlebenden Fischen findet man häufig Wirbelsäulendeformationen (Roberts, 2001; Center of Food Security and Public Health 2003a; Hoffmann, 2005).

Histologisch stehen die Degenerationen im hämatopoetischen Gewebe von Niere und Milz im Vordergrund. Ausgedehnte Nekrosen im Pankreas, dem Gastrointestinaltrakt und im Nebennierenäquivalent sind weiterhin zu finden (Hoffmann, 2005).

## 2.2.7 Virale Hämorrhagische Septikämie bei anderen Fischarten

### 2.2.7.1 VHS bei Bachforellen (*Salmo trutta forma fario*)

Bachforellen erkranken meist nur inapparent an der VHS, bilden aber Antikörper gegen VHSV (Enzmann et al., 1985; Konrad, 1986). Bei Infektionsversuchen mit dem VHS-Isolat Fi 13 (Serogruppe I) zeigten die Bachforellen (25 cm – 30 cm) am 3. Tag p.i. Dunkelfärbung und ab dem 6. bis 19. Tag Anämie. Verluste gab es bei den Versuchsbachforellen keine (Konrad, 1986; Konrad & Enzmann, 1986). Im Infektionsversuch mit dem Bachforellen-Isolat 23-75 verendeten 50% der 3 bis 4 cm großen Bachforellen mit der typischen VHS-Symptomatik (de Kinkelin & Le Berre, 1977). Schlotfeldt & Ahne (1988) berichteten über einen pathogenen F1-Stamm bei 1,5 bis 3,5 g schweren Bachforellen. Glass et al. (1991) infizierten experimentell Bachforellen-Fingerlinge mit vier verschiedenen Serotyp 1 Stämmen über das Wasser. VHSV konnte bei 0 bis 19% der Versuchsforellen nachgewiesen werden, die Mortalität betrug lediglich 0 bis 1,5 %.

### 2.2.7.2 VHS bei Coregonen (*Coregonus* spp.)

Ahne & Thomsen (1985) isolierten erstmalig VHSV bei 300 g schweren wildlebenden Renken (*Coregonus* sp.). Im nachfolgenden Infektionsversuch mit diesem VHS-Isolat zeigten die verendeten 3 cm großen Renken lediglich Blutungen an den Bauchflossen, weitere pathologisch-anatomischen Veränderungen waren nicht vorhanden. Meier et al. (1986) infizierten 2 bis 3,5 cm große Felchen (*Coregonus* sp.) über das Wasser und zeigten, dass die Virulenz von der infektiösen Dosis mit abhängig ist. Skall et al. (2004) infizierten 1,5 g schwere Schnäpel (*Coregonus lavaretus*), eine anadrome Coregonenart in Dänemark, mit verschiedenen VHSV-Stämmen. Bei erfolgter Infektion über das Wasser betrug die kumulative Mortalität bei den für Forellen pathogenen Virusstämmen knapp 20%. Die verendeten Fische zeigten Dunkelfärbung, Exophthalmie, Blutungen in der Haut, in die Augen und um das Gehirn.

### 2.2.7.3 VHS bei Hechten (*Esox lucius*)

Bei an VHS erkrankter Hechtbrut findet man ausgeprägte Blutungen in der Haut und Muskulatur sowie Exophthalmie (Meier, 1981), Hämorrhagien an Brust- und Schwanzflossen, gelbliche oder blutige Bauchhöhlenflüssigkeit, blass verfärbte Lebern und milchig-schleimigen Darminhalt (Meier & Pfister, 1981). Wie bei einer Pike Fry

Rhabdovirus -Infektion (PFR) sieht man bei Hechtbrut die Ausbildung eines Hydrocephalus (Hoffmann, 2005). Größere Hechte (~35 cm) zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Krankheitssymptomatik mit petechialen Blutungen an der Flossenbasis von Brust-, Bauch- und Afterflossen, allgemeiner Anämie und Atrophie der Kopfniere mit massiven Blutungen in die benachbarte Muskulatur (Konrad, 1986; Konrad & Enzmann, 1986). Das Temperaturoptimum für einen VHS-Ausbruch bei Hechten liegt bei 12 bis 15°C (Enzmann et al., 1993b). Hechte entwickeln mit zunehmendem Alter eine Resistenz gegen VHS. Bei 1,5 Jahre alten Hechten (30 cm; 300 g) wurde über eine VHS-Erkrankung mit hoher Mortalität berichtet (Lehmann et al., 1989). Zwei- und mehrjährige Hechte erkranken nach experimenteller (i. p.) Infektion nicht mehr an der VHS, sind aber latente Virusträger (Meier, 1985).

#### 2.2.7.4 VHS bei Äschen (*Thymallus thymallus*)

Neben Regenbogenforellen sind Äschen eine hoch empfängliche Fischart für die VHS. Im Infektionsversuch über das Wasser erkrankten auch ältere Äschen (1 Jahr; 8 –11 cm) mit hoher Mortalität. Pathologisch-anatomisch zeigen Äschen die typischen VHS-Symptome. Auffällig für diese Fischart sind fokale, subkutane Blutungen im Kopfbereich (Meier & Wahli, 1988).

#### 2.2.7.5 VHS bei Meeresfischen

Bei Ross et al. (1994) werden folgende Veränderungen beim VHS-kranken Steinbutt (*Scophthalmus maximus*) beschrieben: Exophthalmie, aufgetriebenes Abdomen, diffuse Blutungen auf der ventralen Seite der Fische, Aszites, blasse Verfärbung der Leber und weißliche Verfärbungen der Niere, des Intestinums und des Herzens. Ausgedehnte Blutungen in der Haut, an den Flossen, in der Muskulatur und den Organen werden bei der japanischen Flunder (*Paralichthys olivaceus*) beschrieben (Muroga et al., 2004). Meyers et al. (1993) berichteten über Hautulcera, subkutane Blutungen, Blutungen an der Flossenbasis und Lethargie bei 5 Jahre alten laichreifen pazifischen Heringen (*Clupea harengus pallasii*) im Prince William Sound Alaska. Nordamerikanisches VHSV wurde in hohen Titern nachgewiesen, andere Pathogene konnten bei den erkrankten Heringen nicht isoliert werden.

## 2.3 VHSV und IHNV

Die Erreger der VHS und IHN gehören zur Familie Rhabdoviridae, Genus Novirhabdovirus (Walker et al., 2000). Das Genom der Rhabdoviren besteht aus einer nicht-segmentierten einzelsträngigen RNA negativer Polarität. Novirhabdoviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein Non-Virion -Protein-Gen besitzen (Kurath, 2000).

Bei **VHSV** besteht das Genom aus 11.158 Basen und codiert das Nucleoprotein N, Phosphoprotein P, Matrix-Protein M, Glykoprotein G, Non-Virion -Protein NV und die RNA-Polymerase L. Die Gene sind in der Folge 3'-N-P-M-G-NV-L-5' angeordnet (Schütze et al., 1999).

Bei **IHNV** besteht das Genom aus 11.137 Basen und codiert das Nucleoprotein N, die Matrixproteine M1 und M2, das Glykoprotein G, Non-Virion -Protein NV und die RNA-Polymerase L. Die Gene sind in der Folge 3'-N-M1-M2-G-NV-L-5' angeordnet (Schütze et al., 1995; Morzunov et al., 1995).

### 2.3.1 Serotypisierung

Anfänglich stützte sich die Einteilung von **VHSV**-Isolaten auf serologische Eigenschaften. Mittels der Serotypisierung lässt sich jedoch keine Aussage über die Pathogenität ableiten. Marine VHS-Isolate können serologisch nicht von Süßwasser-Isolaten unterschieden werden, da kein Zusammenhang zwischen den serologischen Eigenschaften und der Wirtsspezies erkennbar ist. Die größte Bedeutung haben die serologischen Eigenschaften für die Labordiagnostik (Olesen et al. 1993).

Serotyp 1 (F1):	Der Referenzstamm wurde 1962 in Dänemark von der Regenbogenforelle isoliert (Jensen, 1965).
Serotyp 2 (HE):	Hededam-Isolat von der Regenbogenforelle aus Dänemark (Jørgensen, 1972).
Serotyp 3:	Isolat 23-75; pathogener Stamm von der Bachforelle aus Frankreich (de Kinkelin & Le Berre, 1977).

**IHN**V-Isolate sind serologisch einheitlicher, bilden eine Serogruppe und lassen sich durch polyklonale Antikörper nicht unterscheiden. Unterschiede lassen sich mit monoklonalen Antikörpern und durch die elektrophoretische Auftrennung der Strukturproteine feststellen (aus Roberts, 2001; McAllister, 1993).

### 2.3.2 Genotypisierung

Die molekularbiologische Analyse des Virusgenoms ermöglicht die Erstellung von Stammbäumen und erlaubt eine Aussage über die phylogenetische Verwandtschaft von Virusstämmen. Für die Genotypisierung werden das vollständige oder Teile des G-Gens, NV-Gens bzw. des N-Gens sequenziert.

Bernard et al. (1992) verglichen den europäischen **VHSV**- Referenzstamm mit dem nordamerikanischen Makah-Isolat über das N-Gen. Einer-Jensen et al. (1995) sequenzierten das N-Gen verschiedener nordamerikanischer und europäischer **VHS**-Isolate und konnten damit zwei Gruppen definieren. Basurco et al. (1995) differenzierten nordamerikanische und europäische **VHSV** -Isolate über die Gene des G- und NV-Protein, gruppieren Genotypen und errechneten eine Divergenz der nordamerikanischen und europäischen **VHS** von vor 600 Jahren. Die Einteilung der Genotypen erscheint nicht ganz einheitlich und ist regional beeinflusst. Thiéry et al. (2002) beschreiben drei Genotypen. Genotyp I wurde weiter in 4 Subgruppen unterteilt und enthält 97,7% der französisch-kontinentalen **VHS**-Isolate. Enzmann et al. (2002b) bilden für **VHS** 4 Genotypen auf Basis des G-Gens und des NV-Gens: die Klassische Gruppe, die Klappmølle-Gruppe, die Südeuropagruppe mit zwei Subgruppen und eine Marine Gruppe mit Subgruppen. Snow et al. (2004) und Einer-Jensen et al. (2004) definieren die Genotypen I bis IV. Die phylogenetischen Stammbäume basieren auf dem N- bzw. dem G-Gen, dabei stimmen die Klassifizierungen auf Basis dieser beiden Gene vollständig überein (Snow et al., 2004). Eine Übersicht darüber gibt Tabelle 1. Die Eingruppierung über verschiedene Gene ist in der Regel zutreffend. Enzmann et al. (2002a) stellten jedoch dar, dass eine Rekombination der Virusgene bei einer Doppelinfektion mit zwei verschiedenen **VHS**-Virusstämmen möglich erscheint.

Tabelle 1: Übersicht der VHS- Genotypen nach Einer-Jensen et al. (2004) / Snow et al. (2004)

Genotyp	Subtyp	Herkunft
<b>I</b>	<b>a</b>	Europäische Süßwasser-Isolate
	<b>b</b>	Ostsee, Skagerrak, Kattegat, Ärmelkanal (marine Isolate)
	<b>c</b>	alte dänische Süßwasser-Isolate
	<b>d</b>	alte norwegische <sup>a</sup> und finnische <sup>b</sup> Isolate ( <sup>a</sup> importiert; <sup>b</sup> Regenbogenforellen aus Brackwasser)
	<b>e</b>	Georgien (Regenbogenforelle)
<b>II</b>	Ostsee (marine Isolate)	
<b>III</b>	v.a. Nordsee / Nordatlantik (marine Isolate)	
<b>IV</b>	Nordamerika (Makah-Isolat, marine pazifische Isolate)	

Kurath et al. (2003) konnten die nordamerikanischen **IHN**-Stämme auf Basis des G-Gen in 3 Hauptgenogruppen einteilen. Die drei Gruppen korrelieren mit ihrer geographischen Herkunft, so gibt es eine U- (upper), eine M- (middle) und eine L- (lower) Gruppe. Die in Deutschland aufgetretenen IHN-Stämme bilden eine sehr homogene Gruppe und gehören der M-Gruppe aus dem "Columbia River Basin" an (Fichtner et al., 2005; Enzmann et al., 2005), können jedoch von den nordamerikanischen Stämmen unterschieden werden. Ein IHN-Isolat vom Aal (Bergmann et al., 2002a) unterscheidet sich von allen anderen deutschen und nordamerikanischen Referenzstämmen (Enzmann et al., 2002).

### 2.3.3 Pathogenität

Die Pathogenität von **VHS**-Stämmen ist sehr unterschiedlich. Ein an Regenbogenforellen angepasster Virus-Stamm verursacht signifikante kumulative Mortalitäten. Marine VHS-Isolate verursachen i. d. R. bei Regenbogenforellenbrütlingen (0,6 – 3,0 g) keine oder nur sehr milde Krankheitssymptome bzw. Verluste, wenn die Forellen über das Wasser infiziert werden. Nach i.p. -Infektion wird jedoch häufig ein signifikanter Anstieg der Mortalität deutlich (Skall et al., 2004). Die Virulenz des marinen VHS-Stammes 860/94 vom Steinbutt konnte durch vielfache in vivo -Passagen mittels i.p. -Infektion bei Regenbogenforellen (2 bis 4 g) erhöht werden, ohne dass eine Mutation im G-Gen des Virusstamms nachzuweisen war (Snow & Cunningham, 2000). Ein VHS-Isolat vom europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) verursachte nach i.p. -Injektion bei 3 Monate alten Regenbogenforellen eine hohe

Mortalität, bei 5 Monate alten Regenbogenforellen hingegen konnten keine Verluste beobachtet werden (Castric et al., 1992).

LaPatra et al. (1990b) verglichen die Pathogenität von **IHN**-Stämmen verschiedener Herkunft bei Regenbogenforellenbrütlings (Ø 2,8 g). Die Virulenz des an die Regenbogenforellen angepassten Idaho-Stammes war deutlich am höchsten. Bergmann et al. (2003) konnten dies nicht bestätigen. Der IHN-Stamm aus Hagerman-Valley (Idaho, USA) wurde jedoch vor dem Infektionsversuch vielfach auf EPC-Zellen passagiert. Die Pathogenität eines IHN-Stammes ist letztendlich von vielen Faktoren, wie Alter, Spezies, Entwicklungsstadium der Fische sowie von Umweltparametern, wie Wasserqualität und insbesondere der Wassertemperatur abhängig (LaPatra, 1998). Bergmann et al. (2003) untersuchten die Abhängigkeit der Virulenz von Alter und Gewicht bei Regenbogenforellen (2 g bis 50 g). Die Mortalität nimmt meist mit zunehmendem Alter bzw. der Größe der Fische ab, die Virulenz der IHN-Stämme ist sehr verschieden.

## 2.4 Rechtsvorschriften

### 2.4.1 EU-Rechtsvorschriften

Damit die nationalen Tierseuchen-Rechtbestimmungen innerhalb der verschiedenen EU-Mitgliedsstaaten ähnliche tierseuchenrechtliche Erfordernisse erfüllen, werden die Rahmenbedingungen in EU-Richtlinien festgelegt. Im Gegensatz dazu sind EU-Entscheidungen für die Mitgliedstaaten in der veröffentlichten Form bindend.

In der **Richtlinie 91/67/EWG**, in der jeweils gültigen Fassung, sind die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und Erzeugnissen der Aquakultur verankert. Im Anhang A der Richtlinie sind die VHS und IHN in der Liste 2 aufgeführt. Die Liste 2 umfasst endemische Krankheiten, die langfristig eingedämmt und getilgt werden sollen.

In der **Richtlinie 93/53/EWG**, in der jeweils gültigen Fassung, sind die Anforderungen an die EU-Mitgliedstaaten hinsichtlich der Fischseuchenüberwachung und Bekämpfung beschrieben. Das Kapitel III regelt die amtlichen Maßnahmen zur Bekämpfung der Krankheiten der Liste 2.

In der **Entscheidung 2001/183/EG** zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen sind die Methoden zum Nachweis von VHSV und IHNV verbindlich festgelegt.

In den Entscheidungen der Kommission zur Genehmigung von Programmen zur Erlangung des Status zugelassener Gebiete und zugelassener Betriebe in nicht zugelassenen Gebieten hinsichtlich der Fischseuchen virale hämorrhagische Septikämie (VHS) und infektiöse hämatopoetische Nekrose (IHN) sind die EU-zugelassenen Betriebe und Gebiete aufgelistet. Diese EU-Entscheidungen werden regelmäßig aktualisiert.

#### **2.4.2 Bundes-Rechtsvorschriften**

Neben der ISA und der KHV-Infektion sind, bei den Fischkrankheiten, die **VHS** und **IHN** in der Bundesrepublik Deutschland anzeigepflichtige Tierseuchen (**Tierseuchengesetz; Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen**).

Die Verordnung zum Schutz gegen Fischseuchen, Muschelkrankheiten und zur Schaffung seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe und Gebiete (**Fischseuchenverordnung**), in der jeweils gültigen Fassung, ist zum Schutz vor Fischseuchen und für die Fischseuchenbekämpfung die wichtigste nationale Rechtsvorschrift.

Der Handel und das Verbringen von Fischen ist in der Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (**Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung**) geregelt.

Die Bundes-Rechtsvorschriften dienen mit zur Umsetzung der EU-Rechtsakten.

## **2.5 Diagnostik von VHS und IHN**

### **2.5.1 Amtliche Untersuchungsmethoden**

Für die Viruskontrolluntersuchung nach §5 der Fischseuchenverordnung ist in der Anlage die Probennahme, das Probenvolumen und das Untersuchungsverfahren angegeben und spiegelt die Vorgaben der Entscheidung 2001/183/EG wieder (siehe 2.4 Rechtsvorschriften). In der Entscheidung 2001/183/EG finden sich zudem die Untersuchungs- und Probenahmeregeln für die Erlangung bzw. für die Aufrechterhaltung von EU-Zulassungen auf amtlich anerkannte Freiheit von VHS und IHN. Die rechtlich vorgeschriebene und somit amtliche Untersuchungsmethode ist der Virusnachweis durch Erregeranzüchtung in der Zellkultur auf BF-2- oder RTG-2- und EPC- oder FHM-Zellen. Lorenzen et al. (1999) zeigten, dass BF-2- und RTG-2-Zellen die höchste Sensitivität für die Anzucht von VHSV bzw. EPC- und FHM-Zellen für IHNV haben.

Für den Virusnachweis nach offenkundigem Auftreten eines cpE sind nach Entscheidung 2001/183/EG drei Verfahren zulässig: der Virus-Neutralisationstest (VNT), Immunfluoreszenz-Techniken (IFT) und Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).

Die Anleitung zur Erregeranzucht in Zellkulturen und anschließender Virusidentifikation findet man auch im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (OIE, 2003a).

### **2.5.2 RT-PCR**

Bruchhof et al. (1995) entwickelten eine RT-PCR mit Primern, die spezifisch in den G-Genen von VHSV und IHNV binden. Die G-Gene von VHSV und IHNV sind hochspezifisch und ermöglichen somit die Differentialdiagnose von VHS und IHN. Durch einen anschließenden seminested PCR -Schritt wurde die Sensitivität und Spezifität weiter erhöht. Diese RT-PCR wurde von Miller (1998) weiterentwickelt und evaluiert um VHSV und IHNV auch direkt aus Organmaterial und Blut nachweisen zu können. Bergmann et al. (2002b) entwickelten und validierten diese RT-PCR als „One Tube RT-PCR“. Die Evaluierung erfolgte mit 55 VHSV-Isolaten aus allen Serogruppen

bzw. mit 12 IHNV-Isolaten der unterschiedlichen N-Protein-Elektrophorese-Typen. Die geprüften Virusisolate stammten aus dem Süßwasser und aus mariner Herkunft. Eine auf hochkonservierte Regionen des  $\beta$ -Aktin-Gens basierende RT-PCR-Kontrolle vermindert Kontaminationen der PCR durch die Positivkontrolle.  $\beta$ -Aktin ist ein Protein und Baustein des Cytoskeletts von eukaryotischen Zellen (Stryer, 1988) und in Fischzellkulturen nachweisbar. Die RT-PCR mit anschließender seminested PCR ist die sensitivste Methode zum Nachweis von VHSV und IHNV (Miller et al., 1998; Bergmann et al. 2002a).

Weitere molekularbiologische Methoden auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von VHS und IHN wurden ab der zweiten Hälfte der neunziger Jahre entwickelt und beschrieben (Wang et al., 1996; Guillou et al., 1999; Williams et al., 1999; OIE, 2003a; OIE, 2003b).

### 2.5.3 Weitere Methoden zum Nachweis von VHS und IHN

#### 2.5.3.1 Immunhistologie

Ein schneller VHS- Antigennachweis an Organ-Kryostatschnitten ist mittels immunhistochemischen Techniken möglich. Bei dieser Methode werden jedoch hauptsächlich nur akut erkrankte Fische erfasst (Witzigmann et al., 1983). Sie ist deutlich weniger sensitiv als die Virusanzüchtung in der Zellkultur (Evensen et al., 1994).

#### 2.5.3.2 Antigen-ELISA

Ein kommerzieller **VHSV**- Ag-ELISA wird von der tschechischen Fa. Test-Line Ltd. angeboten und enthält eine Anleitung für die Untersuchung direkt aus Organhomogenaten. Eine Anleitung für einen **IHN**V Ag- ELISA findet sich bei Bergmann et al. (2002a).

#### 2.5.3.3 Serologie

Mit Beginn der Fischseuchenbekämpfung in Deutschland wurden in den achtziger Jahren serologische Untersuchungen mittels Serum-Neutralisationstest (SNT) zum Nachweis von Antikörpern gegen die **VHS** durchgeführt um einen Überblick über die Verbreitung der Erkrankung zu erhalten. Die Ergebnisse waren aufgrund fehlender

Sensitivität und aufgrund falsch positiver Ergebnisse oftmals unbefriedigend (Hoppe & Wernery, 1985; Rapp, 1991). In entwickelten VHS- AK-ELISAs zeigten die Testergebnisse unspezifische, falsch-positive Reaktionen und keine Korrelation mit dem SNT (Cossarini-Durnier, 1985). Olesen et al. (1991) entwickelten und verglichen einen VHS- AK-ELISA mit dem SNT und dem PNT. Der ELISA zeigte eine höhere Sensitivität als die beiden anderen Testmethoden zur Detektion von AK. Das Phänomen der Serumproben von naiven Forellen, die im ELISA unspezifische Reaktionen erzeugten, wurde mitdargestellt, konnte aber nicht abgestellt werden. Ein zuverlässiger VHS-Antikörpernachweis ist mittels Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE) möglich. Diese Technik ist aufgrund der Verwendung von radioaktiv markiertem Antigen aufwendig (Enzmann & Konrad, 1985; Konrad, 1986).

Ein IHN-Antikörper –ELISA wurde von de Avila et al. (1992) beschrieben, eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Plaque-Test konnte jedoch nicht hergestellt werden. Umfassende serologische Untersuchungen in übereinstimmender Korrelation mit einer IHNV-Infektion wurden mittels SNT erzielt (Hattenberger-Baudouy et al., 1995b). Traxler et al. (1997) nutzten für serologische Untersuchungen beim Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*) einen Plaque-Neutralisationstest (PNT). St. Hilaire et al. (2001) infizierten experimentell atlantische Lachse (*Salmo salar*) mit IHNV. Die ersten Fische serokonvertierten nach 9 bzw. 12 Tagen, höhere Titer von IHN spezifischen AK konnten 6 bis 30 Wochen lang nachgewiesen werden.

## **2.6 Vorkommen von VHS und IHN**

Die VHS und IHN haben auf dem europäischen Festland ihre größte Bedeutung als Infektionskrankheiten in der Aquakultur von Salmoniden im Süßwasser, insbesondere von Regenbogenforellen. Die Regenbogenforelle ist im Süßwasser der meistproduzierte Speisefisch. 2004 wurden in der Deutschland 24.408 t Salmoniden, davon 21.436 t Regenbogenforellen, in 4.035 Fischhaltungsbetrieben produziert. 21 VHS- und 6 IHN-Ausbrüche wurden amtlich festgestellt und im TSN erfasst. Die Bundesrepublik Deutschland stand bei der Forellenproduktion 2003 innerhalb der EU an 5. Stelle hinter Frankreich, Italien, Dänemark und Spanien (Fichtner et al., 2005).

Die VHS und IHN wird meist durch den Zukauf klinisch unverdächtiger Fische oder durch kontaminiertes Wasser bzw. Oberflächen von Transportfahrzeug, Gerätschaften, Behältnisse oder Stiefel in einen Fischhaltungsbetrieb eingeschleppt. Die Übertragung erfolgt von Fisch zu Fisch oder über das Wasser (Baur/Rapp, 2003). Fischfressende Vögel können als belebte Vektoren das Virus übertragen. Im Kropf des Graureihers war infektiöses VHSV über 120 min nachweisbar (Peters & Neukirch, 1986). Die vertikale Übertragung von IHN über infizierte Bruteier wurde beim Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*) nachgewiesen. IHNV wird bei infizierten Rognern mit der Ovarialflüssigkeit ausgeschieden (Mulcahy & Pascho, 1985).

### 2.6.1 VHS in Fließgewässern

Jørgensen (1982) untersuchte elektrisch abgefischte „wild lebende“ Regenbogenforellen in einem Fluss mit mehreren ansässigen VHS-infizierten Forellenhaltungsbetrieben und konnte im Winter, auf Höhe der Betriebe, VHSV isolieren. Enzmann et al. (1984) wiesen in einem Fließgewässer mit zwei VHS infizierten gewerblichen Forellenhaltungsbetrieben bei Bachforellen und Hechten VHS-Antikörper nach. Der positive Antikörper-Nachweis mittels Gegenstrom-Immunelektrophorese gelang bei Fischen ober- und unterhalb der Betriebe. Nach Häufung von VHS-Ausbrüchen in Forellenhaltungsbetrieben im Süden Deutschlands wurden von Hechten, Bachforellen und Bodenseefelchen Blutproben entnommen und mittels GIE serologisch untersucht, dabei konnten regelmäßig VHS-Antikörper nachgewiesen werden (Enzmann et al., 1993a). In einer infizierten Bachforellenpopulation im Fließgewässer konnten VHS-AK über einen Zeitraum von 3 Jahren nach Virus-Exposition nachgewiesen werden. Nach 4 Jahren waren nur noch einzelne AK-Nachweise in der Population möglich (Enzmann et al., 1992). Bei Regenbogen- und Bachforellen sind nach experimenteller VHS-Infektion über das Wasser 23 Tage p.i. VHS-Antikörper mittels GIE zu detektieren, nach 100 Tagen p.i. fällt der AK-Titer ab, AK-Nachweise waren danach nur sporadisch möglich (Enzmann & Konrad, 1993a).

### 2.6.2 Marines VHS

In Forschungsreisen mit Befischung der Meere wurde die Verbreitung von VHSV in der marinen Umwelt deutlich. Mortensen et al. (1999) befischten die Ostsee, das Kattegat und Skagerrak sowie die Nordsee und sammelten 923 Proben von 7.344 Fischen von 29 Fischarten zur virologischen Untersuchung. Sie isolierten daraus 31 mal VHSV. King et al. (2001) beprobten 19.293 Fische von 23 Spezies aus der Nordsee, dem östlichen Atlantik und der Irischen See und isolierten 21 mal VHSV. Brudeseth & Øystein (2002) fanden 2 mal VHSV im Skagerrak. In den Küstengewässer Norwegens wurden sie dagegen nicht fündig (insgesamt 8.395 Fische). Bei den Untersuchungen rund um die Gewässer Großbritanniens (Dixon et al., 2003) kam ab 1997 eine RT-PCR mit zum diagnostischen Einsatz. Mittels RT-PCR konnten im ersten Jahr 13 Proben, 1998 6 Proben positiv getestet werden (jeweils 0 positiv in Zellkultur).

Mit der Entdeckung der nordamerikanischen VHSV bei anadromen pazifischen Lachsen 1988 (Winton et al., 1991) begann das Interesse der Erforschung der marinen pazifischen VHS. An der nordamerikanischen Pazifikküste wird bei Heringen (*Clupea harengus pallasii*) regelmäßig VHSV isoliert (Traxler et al., 1994). Bei der "Spawn-on-Kelp Fishery" werden laichreife Heringe eingefangen und in Netzkäfigen über Kelpwälder (*Macrocystis* sp.) bis zum Ablachen auf den Kelpblättern gehalten. Bei diesen Heringen lassen sich hohe VHSV-Titer nachweisen, erkrankte Fische zeigen eine hämorrhagische Diathese und Ulcerationen an Körper und Maul (Hershberger et al., 1999). Hedrick et al. (2003) untersuchten die geographische Verbreitung der nordamerikanischen VHS-Stämme bei verschiedenen VHS-empfindlichen marinen Fischarten und verglichen sie über Sequenzen des Glykoprotein-Gens. Sardinen (*Sardinops sagax*), Makrelen (*Scomber japonicus*) und zwei Stintarten (*Thaleichthys pacificus* und *Hypomesus petiosus*) bestimmten bei diesen Untersuchungen die Prävalenz einer VHSV-Infektion.

### 2.6.3 IHN in Wildgewässern

Die IHN ist endemisch in den Gewässern und Flüssen entlang der Pazifikküste Nordamerikas, von den "Kodiak Inseln" in Alaska bis zum "Sacramento River" in Kalifornien und im Binnenland von Idaho (Center of Food Security and Public Health, 2004a; Kurath et al., 2003). Bei den in Nordamerika heimischen Rotlachsen (engl.

"Sockeye Salmon"; *Oncorhynchus nerka*) und Königslachsen (engl. "Chinook Salmon"; *Oncorhynchus tshawytscha*) sind die IHN- Epidemien meist auf die Fischbrut beschränkt. Krankheitsausbrüche bei Jährlingen oder älteren Lachsen werden eher selten beobachtet (Burk & Grischowsky, 1994; aus Roberts 2001). IHNV lässt sich zuverlässig während der akuten Phase der Infektion bis kurz danach isolieren. Nach überstandener Infektion gelingt ein Virusnachweis nur sporadisch, bei laichreifen Fischen erscheint IHNV wieder. Hohe Titer findet man in der Ovarialflüssigkeit der Rogner (Arkush et al., 2004). Am Anfang der Infektionskette steht sehr wahrscheinlich die vertikale Übertragung durch die infizierten Elternfische (Mulcahy & Pascho, 1985). Nicht ganz geklärt ist, ob die Elternfische mit IHNV persistent infiziert bleiben können, nachdem sie als Jungfische die Erkrankung überstanden haben (Drolet et al., 1995) oder sich während den Laichwanderungen aus dem Meer, die Flüsse hinauf zu den Laichgründen mit IHNV (re)infizieren bzw., ob sogar ein bisher unbekanntes marines Reservoir existiert (Traxler et al., 1997; Arkush et al., 2004).

Engelking et al. (1994) markierten die Nachkommen von IHNV positiven sowie kontrolliert IHNV negativen laichreifen Königslachsen und setzten diese aus. Die nach 7 Jahren aus dem Pazifik zurückkommende, inzwischen laichreife Nachkommenschaft wurde virologisch untersucht. Die IHN positiven Rückkehrer konnten stets aufgrund ihrer Markierung eindeutig als Nachkommen der IHN positiven Elterntiere zugeordnet werden. In Übertragungsversuchen konnte von experimentell IHN infizierten, doch klinisch gesunden Königslachsen (Ø 121,8 g) noch 5 Monate p.i. IHNV auf virusnegative Atlantische Lachse (~50 g) übertragen werden (St. Hilaire et al., 2001b). Der atlantische Lachs (*Salmo salar*) gilt als sehr empfänglich für IHNV. Über den erstmaligen natürlichen Ausbruch der IHN bei der Aufzucht von Atlantischer Lachsbrut in einem Endemiegebiet in Alaska 1984 berichteten Mulcahy & Wood (1986).

Hattenberger-Baudouy et al. (1995a) berichteten über ihre Erfahrungen mit der IHN in infizierten Forellenhaltungsbetrieben in Frankreich. Im Rahmen der Fischseuchenbekämpfung wurden Bachläufe befischt bzw. elektrisch abgefischt. In einem Fall konnten bei zwei ausgewilderten Regenbogenforellen im SNT IHN spezifische Antikörper festgestellt werden. Bei den abgefischten und in den Anlagen untersuchten Bachforellen konnten weder IHNV- noch IHN spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

#### 2.6.4 Molekulare Epidemiologie

In den **IHN**- Endemiegebieten in Nordamerika konnte mittels der Sequenzierung von Genen bzw. Genabschnitten der über die Jahre gesammelten IHNV- Isolate Stammbäume erstellt werden. Emmenegger et al. (2000) sequenzierten Teile des NV- und des G-Gens von IHN-Stämmen vorwiegend aus Alaska. Die phylogenetischen Analysen ergaben, dass die IHN-Isolate mit ihrer geographischen Herkunft korrelierten und die Alaska-Stämme eine gemeinsame Stammlinie (Genotyp U, Kurath et al., 2003; siehe 2.3.2) mit den Isolaten aus British Columbia haben mussten. Troyer et al. (2000) untersuchten die über einen Zeitraum von 20 Jahren gesammelten IHN-Stämme aus dem US-Aquakultur-Zentrum der Forellenproduktion im "Hagerman Valley" am "Snake River" in Idaho. 4 verschiedene Viruslinien des Genotyps M (Kurath et al., 2003; siehe 2.3.2) kursierten als Subgruppen in den verschiedenen Anlagen. In den Sequenzanalysen zeigten die IHN- Linien eine hohe Divergenz der Nukleotide von bis zu 7,6%. In weiterführenden Untersuchungen (Troyer & Kurath, 2003) wurden zwei weitere kleinere Linien identifiziert und es wurde dargestellt, dass die verschiedenen IHN-Linien in den Anlagen und Brutanstalten nebeneinander zirkulieren. Im "Columbia River Basin" und dem "Snake River" kursierten IHN-Stämme vom Genotyp U und M. Die genetische Vielfalt der verschiedenen regionalen nordamerikanischen IHN-Isolate war im "Columbia River Basin" halb so hoch, wie im "Hagerman Valley" mit dem Zentrum der US- Forellenproduktion, aber dreimal höher als in Alaska (Garver et al., 2003).

Umfassende Sequenzanalysen und phylogenetische Stammbäume wurden auch für die **VHS** erstellt. Jørgensen et al.(1995) sequenzierten einen Abschnitt des Glykoprotein-Gens von 6 dänischen Isolaten und dem F1- Referenzstamm vor und nach 510 Passagen in der Zellkultur. Nach den 510 Passagen hatte eine Punktmutation im sequenzierten Abschnitt die Substitution einer Aminosäure hervorgerufen. Stone et al. (1997) konnten durch die Sequenzierung des G-Gens einen Zusammenhang zwischen dem VHS-Ausbruch in einer Steinbuttfarm in der Ostsee und zwei VHS-Isolaten vom Kabeljau, gefangen auf den Shetland Inseln, herstellen. Die Sequenzen stimmten zu 99,4% überein. Durch die Sequenzanalysen entwickelten sich nach und nach immer komplexere phylogenetische Stammbäume (Benmansour et al., 1997; Snow et al., 1999; siehe 2.3.2).

Es konnte aufgezeigt werden, dass die europäischen Süßwasser-Linien durchschnittlich eine 2,5-fach höhere Codon-Substitutions-Rate als marine Linien haben. Für die Trennung der Süßwasserstämme von europäischen marinen Linien konnte auf der Basis einer Wahrscheinlichkeits-Verhältnis-Rechnung, einer "Molekularen Uhr", ein Zeitrahmen von 50 ( $\pm 4,8$ ) Jahren errechnet werden. Ein Zeitrahmen von 500 ( $\pm 25,9$ ) Jahren wurde für die Trennung der europäisch-marinen VHS- und der nordamerikanischen VHS-Linie errechnet (Einer-Jensen et al., 2004). Heute wird angenommen, dass durch die Verfütterung unerhitzter Fischabfälle marines VHSV auf die Regenbogenforelle übergehen konnte und sich daraus in den 50er Jahren in Dänemark die VHS- Süßwasserstämme des kontinentalen Europas entwickelt haben (Dixon, 1999; Einer-Jensen et al., 2004; Skall et al., 2004).

## 2.7 Viren, Fische und Abwasser

Hinsichtlich der Frage, ob VHSV oder IHNV durch das Abwasser von Fischverarbeitungsbetrieben in der Umwelt verbreitet werden kann, nachdem es den Klärprozess in einer Kläranlage durchlaufen hat, ist in der Literatur wenig beschrieben.

Fleischer et al. (2000) untersuchten die Eliminationsleistung verschiedener Kläranlagen bezüglich humanpathogener Enteroviren und anderer viraler und bakterieller enteropathogener Erreger beim Menschen. Abhängig von der Eliminationsleistung der Kläranlage können fast alle enteropathogenen Erreger die Kläranlage in infektionstüchtigem Zustand passieren. In den Untersuchungsergebnissen konnten 80,0 bis 99,9 % der Enteroviren und 59,4 bis 99,9 % der anderen enteropathogenen Viren durch den Klärprozess eliminiert werden.

### 2.7.1 Tenazität von VHSV und IHNV

Ausführliche vergleichende Untersuchungen über die Stabilität der Fischviren **VHSV**, **PFR**, **SVCV** und **IPNV** wurden von Ahne (1982) durchgeführt. Unter simulierten Umweltbedingungen bei 10°C war VHSV im Trinkwasser 28 Tage und im Flusswasser 49 Tage lang infektiös. Im Teichschlamm konnte infektiöses VHSV 10 Tage lang bei 4 und 10°C nachgewiesen werden. Für **IHNV** wird eine 90 % ige Inaktivierung nach 5 Tagen nach Suspension in 12°C kaltem Wasser angegeben (nach Bauer/Rapp, 2003). Yoshinaka et al. (2000) zeigten, dass IHNV in hohem Maße von Bentoniten, Lehm und

anderen Feststoffen adsorbiert wird und infektiös bleibt. So blieb an Lehm, Kaolin (Porzellanerde) und Kieselgur adsorbiertes IHNV bei 4°C über 9 Wochen lang infektiös für Regenbogenforellenbrütlinge.

### **2.7.2 Versuche mit Regenbogenforellen im Abwasser von Kläranlagen**

Hoeger et al. (2004) untersuchten den immunologischen Einfluss von Abwasser auf das weiße Blutbild bei Regenbogenforellen und setzten die Versuchsfische für 32 Wochen einer Abwasserbelastung aus. Die Belastung bewirkte eine permanente unspezifische Stimulation des Immunsystems mit chronischer Entzündungssymptomatik.

Bei einem Versuch mit Regenbogenforellensetzlingen im Ablaufwasser einer Kläranlage wurde im Zulauf der Kläranlage 5 Liter einer Suspension mit *Yersinia ruckeri*, der Erreger der Rotmaulseuche (ERM), zugeben. Nach 18 Tagen wurden die Regenbogenforellen pathologisch-anatomisch und bakteriologisch untersucht. Die Versuchsforellen erschienen klinisch gesund, es konnte abschließend keine Infektion mit dem Erreger der ERM festgestellt werden (Rapp et al., 2004).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Epidemiologische Untersuchungen in Wildgewässern und Feldversuche

#### 3.1.1 Untersuchung von Felchen (*Coregonus lavaretus*) aus dem Bodensee

Im Dezember 2002 wurden im Rahmen der Laichfischerei 300 Blaufelchen (*Coregonus lavaretus*) aus dem Bodensee-Obersee gefangen. Unmittelbar nach der tierschutzgerechten Tötung wurden Herz, Milz und Kopfniere für die virologische Untersuchung entnommen (Probenliste 1). 180 Felchen wurden im Mündungsgebiet von Fluss A, einem Bodenseezufluss und 120 Felchen im Hafengebiet einer Stadt am Bodensee gefischt.

---

300 Felchen (laichreif, 300 g bis 500 g) gefischt im Dezember 2002;

Probenbezeichnung	Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von
Wb01 bis Wb18	je 10 Felchen (gefischt im Mündungsbereich von Fluss A)
Wb19 bis Wb30	je 10 Felchen (gefischt im Bereich des Hafengebietes)

Wassertemperatur: 7°C im Uferbereich

---

Probenliste 1

#### 3.1.2 Organproben von Fischen aus dem Bodensee

Von der Fischereiforschungsstelle in Langenargen wurden gesammelte Organproben von insgesamt 96 Felchen (*Coregonus lavaretus*), 6 Hechten (*Esox lucius*), 8 Seeforellen (*Salmo trutta f. lacustris*) und 20 Seesaiblingen (*Salvelinus alpinus*) übergeben (Probenliste 2). Diese Fische wurden über einen Zeitraum von Mai 2001 bis Januar 2002 im Bodensee (Obersee) gefangen. Milz, Herz und Niere wurden den Fischen entnommen und fangweise in Kunststoffbeutel eingeschweißt. Bis zum Zeitpunkt der Übergabe im März 2002 wurden die Beutel bei -20°C gelagert, dann bei -80°C im Tiefgefrierschrank. Nach dem Auftauen und Öffnen der Beutel im Labor wurden die Organe in Transportmedium A+P gegeben.

*Organproben von Fischen aus dem Bodensee-Obersee*

<b>Proben- bezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>Wb70</b>	1 Hecht 34 cm, gefischt am 07.05.2001 1 Hecht 68 cm, gefischt am 05.07.2001
<b>Wb71</b>	9 Felchen, gefischt am 15.05.2001
<b>Wb72</b>	10 Felchen, gefischt am 21.06.2001
<b>Wb73</b>	4 Seeforellen, gefischt am 17.07.2001 1 Seeforelle 28 cm, gefischt am 28.08.2001
<b>Wb74</b>	11 Felchen, gefischt am 17.07.2001
<b>Wb75</b>	10 Felchen, gefischt am 08.08.2001
<b>Wb76</b>	10 Felchen, gefischt am 28.08.2001
<b>Wb77</b>	10 Felchen, gefischt am 18.09.2001
<b>Wb78</b>	1 Hecht 50 cm, gefischt am 28.11.2001 1 Hecht 86 cm ♀ 5020 g, gefischt am 03.12.2001 1 Hecht 58 cm ♂, 1450 g, gefischt am 05.12.2001 1 Hecht 60 cm ♂, 1465 g, gefischt am 06.12.2001
<b>Wb79</b>	10 Seesaiblinge, gefischt am 16.11.2001
<b>Wb80</b>	10 Seesaiblinge, gefischt am 22.11.2001
<b>Wb81</b>	1 Seeforelle 60 cm ♀, 2500 g, gefischt am 03.12.2001 1 Seeforelle 62 cm ♀, 3045 g, gefischt am 06.12.2001 1 Seeforelle 67 cm ♀, 3420 g, gefischt am 07.12.2001
<b>Wb82</b>	10 Forellen, gefischt am 03.12.2001
<b>Wb83</b>	5 Felchen, gefischt am 11.12.2001
<b>Wb84</b>	10 Felchen, gefischt am 07.12.2001
<b>Wb85</b>	11 Felchen, gefischt am 23.01.2001

*Probenliste 2*

### **3.1.3 Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines fischverarbeitenden Betriebes**

In einem fischverarbeitenden Betrieb in einer Stadt am Bodensee (Karte 1) wurde bei Kontrollen nach §5 Fischseuchen-Verordnung im Februar und März 2003 die VHS bei Regenbogenforellen wiederholt amtlich nachgewiesen (STUA Aulendorf, virologische Befunde **F13/03** und **F28/03**). Dieser Fischverarbeitungsbetrieb bezog zum Zeitpunkt regelmäßig Regenbogenforellen und andere Fischarten von verschiedenen Fischgroßhändlern, die in Becken auf der Anlage bis zur Schlachtung zwischengehäлт wurden. Die Wasserentnahmestelle für die Hälterungen des Fischverarbeiters liegt 650 m flussaufwärts der Mündung von Fluss A. Von dort wird das Wasser in die Hälterungen gepumpt und 5 m unterhalb der Entnahmestelle wieder eingeleitet.

1530 m oberhalb der Mündung des 35 km langen Flusses A wurde an einem 2 m hohen Wehr ein neuer Fischaufstieg fertiggestellt. Der Fischaufstieg umgeht auf 40 m das Wehr auf östlicher Seite. Die Fließgeschwindigkeit wird alle ein bis zwei Meter durch im Bett des Fischaufstiegs rechenartig aufgestellte Felsbrocken abgebremst.

#### 3.1.3.1 Feldversuch mit drei Hälterkästen von Dezember 2002 bis Januar 2003

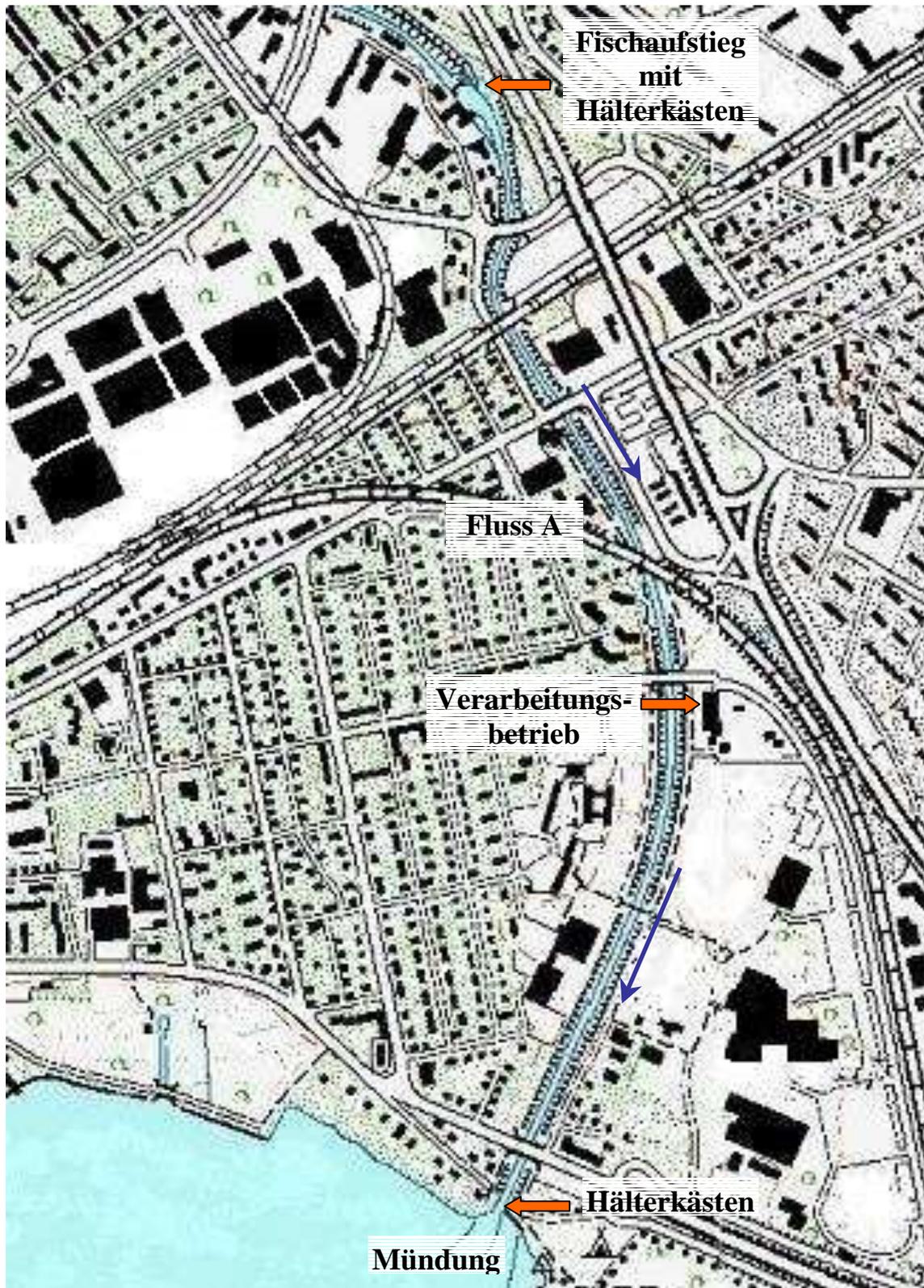
In der Zeit vom Dezember 2002 bis Januar 2003 wurden für 31 Tage 3 Hälterkästen mit Versuchsforellen an zwei Stellen in Fluss A eingesetzt. Die aus Holz gezimmerten Hälterkästen (Außenmaße: L 90 cm x B 108 cm x H 46 cm; Innenmaße: L 80 cm x B 98 cm x H 36,5 cm) hatten 2,0 cm breite Spalten zwischen den Holzlatten um das Durchströmen von Wasser zu ermöglichen. Eine Seite der Kästen war zum Aufklappen. Die Hälterkästen wurden vor dem Einsatz gründlich gereinigt, desinfiziert und waren vollständig ausgetrocknet.

Für die erste Stelle wurde ein Platz im Fischaufstieg (siehe Karte 1) ausgewählt. Um dort einen Hälterkasten installieren zu können, wurde das Wehr während der Installation geöffnet um den Wasserdurchfluss im Aufstieg zu verringern. Mit Ketten und Verschlüssen wurde der Hälterkasten befestigt, verankert und mit Betongewichten beschwert.

Für die zweite Stelle wurde ein Platz direkt an der Mündung (siehe Karte 1) von Fluss A ausgewählt. Zwei Hälterkästen konnten dort schwimmend an einem Bootssteg befestigt werden.

In jeden eingesetzten Hälterkasten wurden 15 Versuchsforellen eingesetzt. Die Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn aus einem EU-zugelassenen VHS- und IHN-Virus freien Betrieb (D-BW-F-18) bezogen. Die Versuchsfische in den Hälterkästen an der Flussmündung wurden zweimal die Woche mit einem handelsüblichen pelletierten Forellenfutter gefüttert.

Nach 14 Tagen wurden die Hälterkästen an beiden Stellen geöffnet und kontrolliert. Verendete Versuchsfische wurden entnommen. Nach 31 Tagen wurde der Versuch beendet und alle Versuchsfische zur Untersuchung entnommen (Probenliste 3).



Karte 1: Gewässerverlauf von Fluss A mit Fischaufstieg und Fischverarbeitungsbetrieb

*1 Hälterkasten mit 15 Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss; Ø 350g) vom Fischaufstieg (Versuchsdauer: 31 Tage von Dez 2002 bis Jan 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>Wb37</b>	6 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 31 Tagen)
<b>Wb100</b>	5 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 14 Tagen)
<b>Wb38</b>	4 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 31 Tagen)

*2 Hälterkästen mit je 15 Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss; Ø 350g) von der Flussmündung (Versuchsdauer: 31 Tage von Dez 2002 bis Jan 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>Wb31 bis Wb35</b>	je 5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 31 Tagen)
<b>Wb36</b>	4 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 31 Tagen)
<b>Wb99</b>	1 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 14 Tagen)

Wassertemperaturen zu Beginn: 6°C am Fischaufstieg und 7°C an der Mündung  
Am Ende des Versuchs: 5°C am Fischaufstieg und 6°C an der Mündung

---

*Probenliste 3*

### 3.1.3.2 Feldversuch mit vier Hälterkästen von Januar 2003 bis März 2003

Der Versuch wurde von Januar 2003 bis März 2003 ein weiteres mal durchgeführt. Zum Schutz der Versuchsfische in den Hälterkästen am Fischaufstieg vor zu starker Strömung wurden die Frontseiten der Hälterkästen mit einem verzinkten Blech von außen verblendet.

Zwei verblendete Hälterkästen mit 15 Regenbogenforellen (D-BW-F-18) wurden im Fischaufstieg eingesetzt, zwei Hälterkästen mit jeweils 15 Versuchsforellen wurden wie im ersten Versuchsdurchlauf an der Flussmündung eingesetzt (Probenliste 4).

Die Versuche an Fluss A wurden nach vorheriger Absprache nach §4 Absatz 3, Tierschutzgesetz (TierSchG) der zuständigen Behörde angezeigt.

---

*2 Hälterkästen mit je 15 Regenbogenforellen (Oncorhynchus mykiss; Ø 350g) vom Fischaufstieg (Versuchsdauer: 44 Tage von Januar 2003 bis März 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>Wb43 und Wb44</b>	je 5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 44 Tagen)
<b>Wb102</b>	20 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 44 Tagen)

2 Hälterkästen mit 15 bzw. 16 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Ø 350g) von der Flussmündung (Versuchsdauer: 44 Tage von Januar 2003 bis März 2003)

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>Wb39</b>	7 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 44 Tagen)
<b>Wb40 bis Wb42</b>	je 6 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 44 Tagen)
<b>Wb101</b>	6 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 44 Tagen)

Wassertemperaturen zu Beginn: 5°C am Fischaufstieg und 6°C an der Mündung  
Am Ende des Versuchs: 3°C am Fischaufstieg 5°C an der Mündung

*Probenliste 4*

### 3.1.4 Versuch mit Regenbogenforellen im Ablaufwasser einer Kläranlage

Der in 3.1.3 erwähnte fischverarbeitende Betrieb leitet seine Schlachtabwässer in die Kanalisation der Stadt. Die Kläranlage dieser Stadt hat eine Ausbaugröße für 87.000 Einwohner und arbeitet mit physikalischen, biologischen und chemischen Reinigungsstufen. Aus den Absetzbecken fließt das geklärte Abwasser zuletzt in den Ablauf. Das geklärte Abwasser wird über eine Kanalleitung dem dortigen Gewässersystem in an einer unzugänglichen Stelle wieder zugeführt.

Es wurde ein Versuchsbecken aufgebaut, in dem Regenbogenforellen als Versuchsfische im Ablaufwasser gehalten werden sollten. Um den Sauerstoffgehalt im Ablaufwasser von unter 1,0 mg/l zu erhöhen und um eine Hälterung von Regenbogenforellen in diesem Wasser zu ermöglichen, wurde mit einer Tauchpumpe aus dem 3 m tiefen Ablaufkanal der Kläranlage geklärtes Abwasser in einen 4 m hohen Belüftungsturm gepumpt. Auf drei Ebenen in diesem Turm befanden sich Belüftungselemente, in denen das Wasser verrieselt wurde und sich mit dem Luftsauerstoff anreichern konnte.

Das Wasser wurde nach der Verrieselung in einer Wanne aufgefangen und über eine Rohrleitung in das 1 m<sup>3</sup> große Versuchsbecken geleitet. Für das Versuchsbecken wurde ein gesäuberter, industrieller Chemikalienbehälter genutzt, der für den Versuchszweck präpariert wurde.

Nach der Installation wurde im Versuchsbecken ein Sauerstoffgehalt von 10,5 mg/l bei 7,2°C gemessen. Die Förderleistung der Saugpumpe im Ablauf wurde auf 2 l/s eingedrosselt, damit ergab sich eine 17- bis 18-fache Erneuerung des Wasserkörpers im Versuchbecken pro Tag. Nach einem achttägigen Probelauf wurden im Februar 2003 10

Regenbogenforellensetzlinge (*Oncorhynchus mykiss*) (Gewicht: 50 g) in das Versuchsbecken eingesetzt. Sieben Tage später wurden weitere 50 Regenbogenforellensetzlinge aus gleicher Herkunft (D-BW-F-18) und Bestand dazu gesetzt (Probenliste 5). Nach der Eingewöhnung wurden die Versuchsforellen mit einem handelsüblichen Forellenfutter für Jungfische gefüttert.

Die Fische wurden täglich überwacht, regelmäßig wurden die Wasserparameter Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Ammonium-Stickstoffgehalt ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) im Versuchsbecken gemessen. pH-Wert, Ammonium-Stickstoff-, Nitrit- und Nitratgehalt im Ablaufwasser sowie die Wasserzulaufmenge sind von Seiten der Kläranlage dokumentiert.



Bild 1: Belüftungsturm und Versuchsbecken in der Kläranlage

*Regenbogenforellensetzlinge (Oncorhynchus mykiss; Ø 50 g)*  
*(Versuchsdauer: 62 Tage von Februar 2003 bis April 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfnieren) von</b>
<b>Wb51 bis Wb55</b>	je 10 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 62 Tagen)
<b>Wb56</b>	7 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 62 Tagen)

*Probenliste 5*

Der Versuch wurde nach vorheriger Rücksprache mit der zuständigen Behörde nach §8 Abs. 7 Nr. 2 Tierschutzgesetz (TierSchG) angezeigt.

### **3.1.5 Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines VHS infizierten Betriebes**

In einem kleinen Fischhaltungsbetrieb wurde im Winter 2002/2003 die VHS wiederholt amtlich festgestellt (CVUA Stuttgart, virologischer Befund **FV10/03**). Die Anlage, eine ehemalige Mühle, wurde mit Bachwasser aus zwei Bächen versorgt. Das entnommene Wasser aus dem Bach B und Bach C und Wasser aus kleineren Quellen wurde der Anlage über den Mühlkanal zugeführt (siehe Karte 2). Die Anlage bestand im wesentlichen aus einem 2,50 m breiten und 45 m langen Fließkanal, in dem die Regenbogenforellen gehalten wurden. Das Ablaufwasser aus der Anlage wurde über einen 126 m langen, teilweise unterirdisch gelegenen Kanal zurück in den Bach B geleitet. Die Anlage hatte ca. 20 l/s Wasser zur Verfügung. Die Fische in der Anlage wurden speisereif eingekauft und auf der Anlage frisch oder geräuchert an die Kundschaft vermarktet.

#### **3.1.5.1 Feldversuch 2003**

In der Zeit vom Februar 2003 bis März 2003 wurden zwei wie in 3.1.3.1 beschriebene Hälterkästen mit Versuchsforellen an zwei Stellen im Bach B eingesetzt.

Hälterkasten Nr. 1 wurde 80 m bachaufwärts der Einleitungsstelle der Anlage in Bach B an einer geeigneten tiefen Stelle eingesetzt. Hälterkasten Nr. 2 wurde unmittelbar an der Einleitungsstelle aus der Anlage in Bach B eingesetzt. In jeden Hälterkasten wurden 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) (Gewicht: 300 g) aus einem VHS und IHN seuchenfreien Betrieb mit EU-Einzelbetriebszulassung (D-BW-F-42) eingesetzt. Die Hälterkästen wurden mit Ketten am Ufer befestigt und mit Gewichten beschwert. Zum Schutz der Versuchsfische vor zu starker Wasserströmung wurden die Frontseiten der

Hälterkästen mit Kunststofffolie verblendet. Die Versuchsfische in den Hälterkästen (Probenliste 6) wurden täglich kontrolliert und regelmäßig mit einem handelsüblichen, pelletierten Forellenfutter gefüttert.

Die Versuche nach vorheriger Absprache der zuständigen Behörde nach §4 Absatz 3, Tierschutzgesetz (TierSchG) angezeigt.

---

*Hälterkasten Nr.1: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Ø 300g)  
80 m oberhalb Auslaß (Versuchsdauer: 21 Tage von Januar bis März 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfnieren) von</b>
--------------------------	---

<b>Wb45 bis Wb47</b>	je 5 Regenbogenforellen (getötet nach 21 Tagen)
----------------------	---

*Hälterkasten Nr.2: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Ø 300g)  
am Auslaß (Versuchsdauer: 21 Tage von Januar bis März 2003)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfnieren) von</b>
--------------------------	---

<b>Wb48</b>	8 Regenbogenforellen (getötet nach 21 Tagen)
-------------	--

<b>Wb49</b>	5 Regenbogenforellen (getötet nach 21 Tagen)
-------------	--

<b>Wb50</b>	2 Regenbogenforellen (verendet, nach 20 Tagen)
-------------	--

---

#### Probenliste 6

#### 3.1.5.2 Feldversuch 2004

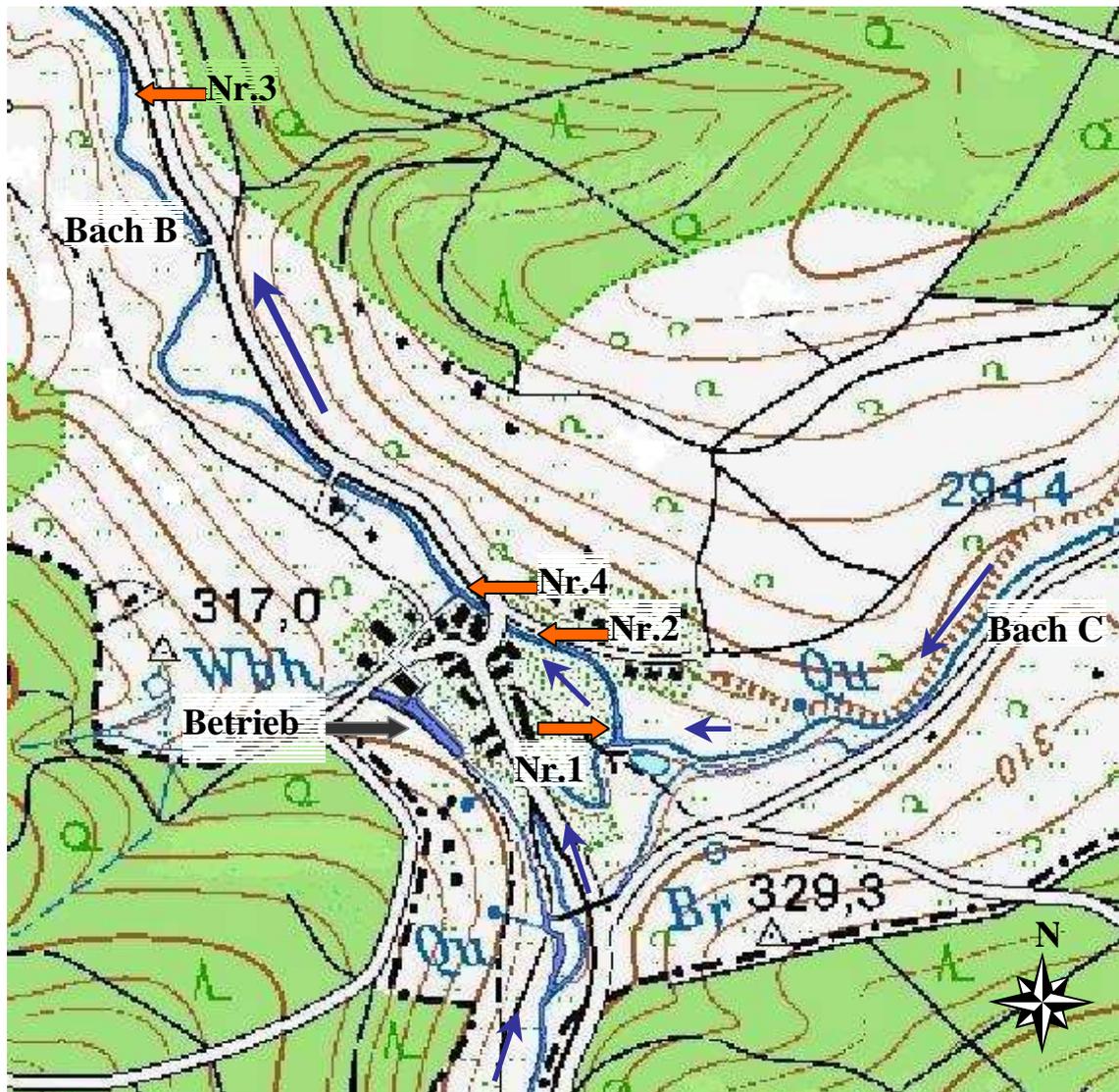
Im Winter 2003/2004 wurde in diesem Betrieb erneut die VHS amtlich festgestellt (CVUA Stuttgart, virologische Befund **FV84/03**). Ein weiterer Feldversuch wurde in ausgebauter Form durchgeführt.

Es wurden 4 verblendete Hälterkästen (siehe 3.1.3.1), wie in Karte 2 dargestellt, in Bach B eingesetzt. Hälterkasten Nr.1 wurde 220 m bachaufwärts vom Auslaß der Anlage eingesetzt. Dort floss Bach C in Bach B und bildeten einen 40 cm tiefen Gumpen. Hälterkasten Nr.2 wurde 80 m bachaufwärts vom Auslaß der Anlage eingesetzt. Hälterkasten Nr.3 wurde 640 m unterhalb des Auslasses im Bach B an einer 80 cm tiefen Stelle schwimmend eingebracht. Hälterkasten Nr.4 wurde zuletzt direkt am Auslaß der Anlage eingesetzt. Alle vier Hälterkästen wurden mit je 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus dem EU-zugelassenen Betrieb (D-BW-F-42) besetzt. Die Hälterkästen wurden täglich kontrolliert und die Versuchsfische wurden regelmäßig gefüttert.

Nach 21 Tagen wurde bei den Versuchsfischen in Hälterkasten Nr. 4 eine VHS-Erkrankung klinisch festgestellt. Unmittelbar vor vollständiger Entnahme der Forellen

aus Hälterkästen Nr.4 wurden je 5 Versuchsforellen aus den Hälterkästen Nr.1, Nr.2 und Nr.3 entnommen. Nach 35 Tagen wurde der Versuch beendet und alle verbliebenen Versuchsfische entnommen (Probenliste 7).

Für den Versuch wurde nach §8 Tierschutzgesetz (TierSchG) eine Genehmigung durch die zuständige Behörde eingeholt.



Karte 2: Übersichtskarte mit Gewässerverlauf, Betrieb und Darstellung der eingesetzten Hälterkästen im Feldversuch 2004

Hälterkasten Nr.1: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; Ø 250g)  
220 m oberhalb Auslaß (Versuchsdauer: 35 Tage von Januar bis März 2004)

Probenbezeichnung	Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von
Wb86	5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 21 Tagen)
Wb92 und Wb93	je 5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 35 Tagen)

Hälterkasten Nr.2: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*); Ø 250g)  
80 m oberhalb Auslaß (Versuchsdauer: 35 Tage von Januar bis März 2004)

Probenbezeichnung	Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von
Wb87	5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 21 Tagen)
Wb94 und Wb95	je 5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 35 Tagen)

Hälterkasten Nr.3: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*); Gewicht: Ø 250g  
640 m unterhalb Auslaß (Versuchsdauer: 35 Tage von Januar bis März 2004)

Probenbezeichnung	Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von
Wb91	5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 21 Tagen)
Wb96	5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 35 Tagen)
Wb97	3 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 35 Tagen)
Wb98	2 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 35 Tagen)

Hälterkasten Nr.4: 15 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*); Gewicht: Ø 250g  
am Auslaß (Versuchsdauer: 35 Tage von Januar bis März 2004)

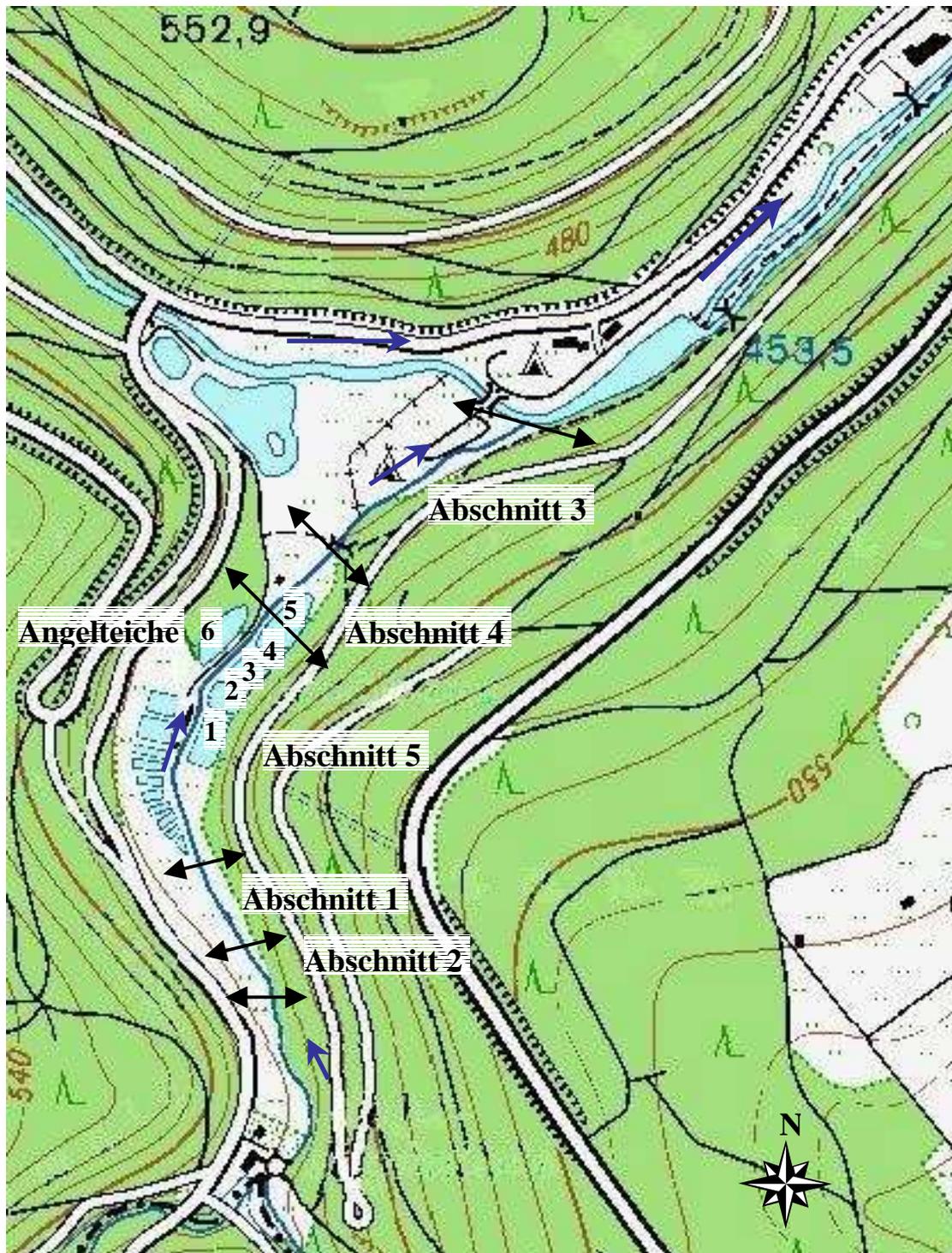
Probenbezeichnung	Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von
Wb88	5 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 21 Tagen)
Wb89	6 Regenbogenforellen (getötet; Entnahme nach 21 Tagen)
Wb90	4 Regenbogenforellen (verendet; Entnahme nach 21 Tagen)

Probenliste 7

### 3.1.6 Epidemiologische Untersuchungen im Bereich eines VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes

In einem größeren Salmonidenhaltungsbetrieb wurde im Mai 2003 ein VHS Ausbruch amtlich festgestellt (CVUA Stuttgart, virologische Befunde **FV37/03** und **FV74/03**). Dieser Betrieb lag am Bach D im Schwarzwald. Der Bach D führte einen durchschnittliche Wassermenge von 120 l/s, hat einen Oberlauf von 11,2 km bis zur Anlage und mündet 345 m unterhalb der Anlage in den Fluss E. In der Anlage wurde ein Angelpark betrieben. Dafür wurden halbwüchsige und speisereife Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) zugekauft, in Fischteichen ausgemästet und in die Angelteiche besetzt. Die Anlage erstreckte sich über 285 m Bachstrecke und bestand zum damaligen Zeitpunkt aus 14 Fischteichen mit einer Teichfläche von 4.646 m<sup>2</sup> und 6 Angelteichen mit einer Teichfläche von ca. 8.793 m<sup>2</sup>. Die 14 Fischteiche und

ein großer Angelteich befanden sich auf der westlichen Seite, 5 Angelteiche auf der östlichen Seite von Bach D (siehe Karte 3). Die gesamte Anlage wurde gespeist von



Karte 3: Übersichtskarte mit Lage des Betriebs, Kennzeichnung der Angelteiche und der eingeteilten Abschnitte

durchschnittlich 60 l/s Bachwasser, die an einem kleinen 45 cm hohen Wehr unmittelbar oberhalb der Anlage entnommen wurden und über einen Kanal und Rohrleitungen den Fisch- und Angelteichen zugeführt wurden.

Nach einem fehlgeschlagenen Sanierungsversuch im Februar 2004 wurde im Mai 2004 bei der Nachbeprobung durch den Fischgesundheitsdienst in einem Fischteich erneut die VHS nachgewiesen (CVUA Stuttgart, virologische Befunde **FV37/04** und **FV50/04**) und verbreitete sich dann rasch binnen weniger Wochen über die gesamte Anlage. Nach dem Ansteigen der Wassertemperaturen auf über 14°C war gegen Mitte des Monats Juli klinisch kein Seuchengeschehen mehr zu beobachten.

Im September 2004 wurde unter Leitung von Veterinäramt und Fischgesundheitsdienst mit der Betriebsanierung begonnen. Der Fischbestand wurde verwertet, die letzten verbliebenen Regenbogenforellen aus den Angelteichen wurden gekeult. Eine Stichprobe von 60 Regenbogenforellen (Probenliste 8) wurde am CVUA Stuttgart virologisch beprobt.

---

*Gekeulte Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*; 350 bis 750g)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV62-1/04 bis -4/04</b>	je 15 Regenbogenforellen aus Angelteichen 1 bis 6

Wassertemperatur: 13°C

---

*Probenliste 8*

### 3.1.6.1 Elektroabfischung am Bach D

Mit Hilfe der Fischereisachverständigen des zuständigen Regierungspräsidiums und dem lokalen Fischereiverein wurde ein Tag nach Keulung der letzten verbliebenen Regenbogenforellen in der Anlage, zeitgleich zu den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in dem Fischhaltungsbetrieb eine Elektroabfischung des Bachs D zur Entfernung der im Bach vorhandenen empfänglichen und ansteckungsverdächtigen Fische durchgeführt. Der abzufischende Teil des Bachs D wurde in 5 Abschnitte unterteilt (siehe Karte 3). Die Grenzen für die Abschnitte wurden durch die am Bach gegebenen Hindernisse, natürliche Gewässerabsätze, Flachwasserzonen, der Einmündungsstelle des Bachs D in Fluss E und durch die Lage der Anlage definiert. Die Abschnitte 1 und 2 befanden sich oberhalb der Anlage, bachaufwärts vom Wehr an der Wasserentnahmestelle und wurden zuerst elektrisch abgefischt. Dabei wurde vom Wehr beginnend bachaufwärts gefischt. Die Abschnitte 3, 4 und 5 lagen unterhalb des Wehres

bis zur Einmündung des Bachs D in das größere Fließgewässer. Mit der Abfischung der unteren 3 Abschnitte wurde an der Stelle der Einmündung des Bach D begonnen und bachaufwärts bis zum Wehr elektrisch abgefischt. Insgesamt wurden in allen 5 Abschnitten 452 Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und 22 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) elektrisch abgefischt (Probenliste 9).

*Abschnitt 1: Wehr Anlage bis 1. Absatz bachaufwärts (Wegstrecke 90 m)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV63-1/04</b>	20 Bachforellen > 30 cm
<b>FV63-2/04</b>	20 Bachforellen 20-30 cm
<b>FV63-3/04 und -4/04</b>	20 und 30 Bachforellen 10-20 cm
<b>FV63-5/04</b>	19 Bachforellen < 10 cm
<b>FV63-6/04</b>	2 Regenbogenforellen > 30 cm

*Abschnitt 2: Oberhalb der Anlage, vom 1. Absatz bis zum 2. Absatz (Wegstrecke 30 m)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV63-7/04</b>	1 Bachforelle < 10 cm; 9 Bachforellen 10-20 cm
<b>FV63-8/04</b>	2 Bachforellen 20-30 cm; 13 Bachforellen > 30 cm

*Abschnitt 3: Mündung Bach D bis Flachwasserzone an Brücke (Wegstrecke 245 m)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV63-9/04</b>	30 Bachforellen > 30 cm
<b>FV63-10/04</b>	20 Bachforellen 20-30 cm
<b>FV63-11/04 und -12/04</b>	30 und 30 Bachforellen 10-20 cm
<b>FV63-13/04 bis -15/04</b>	30, 32 und 30 Bachforellen 10-20 cm
<b>FV63-16/04</b>	42 Bachforellen < 10 cm

*Abschnitt 4: Brücke bis unteren Absatz der Anlage (Wegstrecke ca. 140 m)*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV63-17/04</b>	12 Bachforellen > 30 cm
<b>FV63-18/04</b>	30 Bachforellen 20-30 cm
<b>FV63-19/04</b>	6 Regenbogenforellen > 30 cm; 1 Regenbogenforelle 20-30 cm
<b>FV63-20/04</b>	26 Bachforellen 10-20 cm
<b>FV63-21/04</b>	11 Bachforellen < 10 cm

*Abschnitt 5: Unterer Absatz bis Wehr der Anlage (Wegstrecke ca. 285 m)*

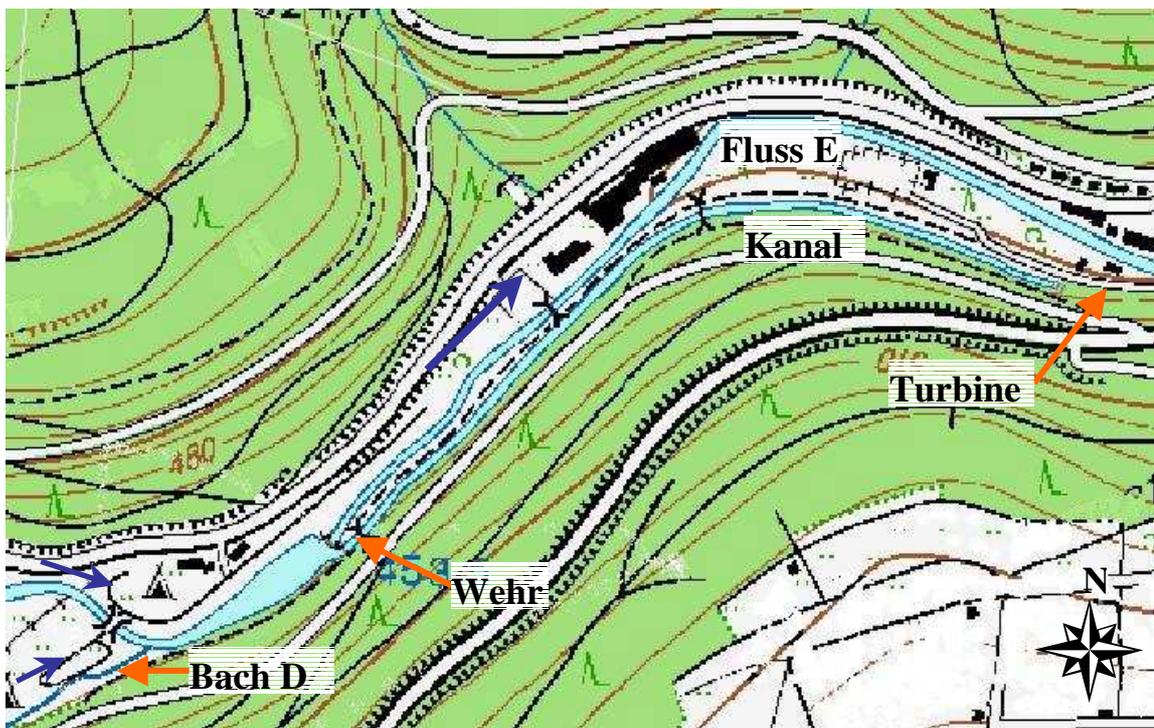
<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV63-22/04</b>	3 Bachforellen > 30 cm; 6 Bachforellen 20-30 cm
<b>FV63-23/04</b>	5 Bachforellen 10-20 cm; 11 Bachforellen < 10 cm
<b>FV63-24/04</b>	6 Regenbogenforellen > 30 cm; 1 Regenbogenforelle 20-30 cm

Wassertemperatur: 11°C in Bach D

Die Befischung wurde bei 700 V Gleich-Spannung (E-Teil: Fischer CD7/4 400/700 V, 5 KW; Diesel: Hatz ES780, 6,6 KW) durchgeführt.

### 3.1.6.2 Elektroabfischung des Zulaufkanals eines Wasserkraftwerkes an Fluss E

18 Tage nach der elektrischen Abfischung an Bach D wurde zu Beginn des Oktobers 2004 im Rahmen von Revisionsarbeiten an einer Turbine zur Stromerzeugung durch Wasserkraft, der Zulaufkanal zum Kraftwerk abgestellt und die im Kanal befindliche Fischpopulation zur Umsiedlung elektrisch abgefischt. Der 909 m lange und durchschnittlich 2,5 m Breite liegt 226 m unterhalb der Einmündungsstelle des Bach D an Fluss E (Karte 4). Der Wasserzulauf zum Kanal wird über ein Wehr reguliert. Am Ende des Kanals ist ein Rechensystem, ab dort wird das Wasser unterirdisch zur Turbine geführt und dann zurück in die Fluss E geleitet.



Karte 4: Übersichtsplan über Kanal mit Lage von Wehr und Turbine

Die Abfischung wurde mit einem tragbaren Elektrofischereigerät (EFKO-Leutkirch Typ FEG 1500, 1,5 KW) vom lokalen Fischereiverein durchgeführt. Es wurden insgesamt 331 Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*), 5 Groppen (*Cottus gobio*), 25 Bachneunaugen (*Lampetra planeri*) und 28 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) elektrisch

abgefischt. Die Regenbogenforellen und 7 Bachforellen wurden virologisch beprobt (Probenliste 10).

---

*Fische aus dem Zulaufkanal*

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Probeninhalt: Organpool (Herz, Milz, Kopfniere) von</b>
<b>FV67-1/04</b>	7 Bachforellen 10-15 cm
<b>FV67-2/04</b>	7 Regenbogenforellen aus „Rohr“ >30 cm
<b>FV67-3/04</b>	11 Regenbogenforellen >30 cm
<b>FV67-4/04</b>	10 Regenbogenforellen >30 cm

Wassertemperatur: 12°C

---

*Probenliste 10*

### **3.2 Tötung, Organentnahme, Probentransport und Probenaufbereitung**

Die untersuchten Fische wurden unmittelbar nach der Entnahme aus den Hälterkästen bzw. nach Abfischung durch Kopfschlag betäubt und durch Organentnahme mit Ausbluten tierschutzgerecht getötet. Mit einem sterilen Messer wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Organe Herz und Milz wurden mit einer sterilen chirurgischer Pinzette und Schere unmittelbar entnommen. Mit der Pinzettenspitze wurde die Serosa über dem Nierengewebe durchstoßen und angeritzt. Mit einem sterilen spitzen Kaffeelöffel unter zu Hilfenahme der Pinzette wurde so die Kopfniere herausgelöst. Die aseptisch entnommenen Organe wurden in gekühlte und sterile 100 ml Glasflaschen mit Glasperlen und 15 ml Transportmedium A+P (MEM-Earle + 10 ml/l NaHCO<sub>3</sub> 7,5% + 200 I.E./ml Penicillin; 333 µg/ml Streptomycin + 0,5 µg/ml Partricin + 10% FKS) gegeben. Das Organmaterial von mehreren Fischen wurde, abhängig vom Versuch (siehe Probenlisten 1 bis 10), in einer Flasche gepoolt. Für jeden Organpool wurde frisches steriles Entnahmenbesteck verwendet. Bei der Organentnahme wurden die Fische pathologisch-anatomisch untersucht. Durch Schütteln der Flaschen wurde das Organmaterial vollständig vom Transportmedium überdeckt und vorzerkleinert. Im Anschluss wurden die Probenflaschen in einer Styropor-Transportbox mit Kühlelementen unmittelbar ins Labor transportiert. Die Temperatur in der Transportbox betrug 4 bis 8°C (Hostnik et al., 2002).

Im Labor wurde das Gewebematerial und Transportmedium A+P auf ein Mischungsverhältnis von 1:10 eingestellt. Mittels der Glasperlen im Probengefäß wurde das Organmaterial durch starkes Schütteln der Flaschen vollständig homogenisiert und im Transportmedium A+P suspendiert. Das Homogenat wurde in mehrere verschiedene Gefäße verteilt: 1 steriles und verschraubbares 14 ml Röhrchen für die Virusanzüchtung in der Zellkultur, 1 steriles und RNA-freies 1500 µl Reaktionsgefäß für die RT-PCR Untersuchung und 2 sterile 2000 µl Reaktionsgefäße zur Rückstellung. Die Behältnisse wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

### 3.3 Virologische Untersuchungen

Die Aufbereitungen und virologischen Untersuchungen in der Zellkultur wurden in Anlehnung an die Entscheidung der Kommission 2001/183/EG zur Festlegung der Probenahmepläne und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen durchgeführt.

#### 3.3.1 Virusanzucht in Zellkultur

##### 3.3.1.1 Vorbereitungen

Die 10 ml Probenröhrchen mit dem Organhomogenat wurden im Kühlschrank über Nacht aufgetaut und anschließend für 15 Minuten bei 3000 g in einer Kühlzentrifuge bei 5°C zentrifugiert. Für die Anzuchtung wurden 24-Well-Zellkultur-Platten (Corning Inc., Costar 3524) benutzt. Maximal wurden pro Ansatz 10 Proben bearbeitet (Abbildung 1). Jede Probe wurde im Doppelansatz bei unterschiedlicher Verdünnung auf RTG-2- und EPC- Zellen in Simultantechnik verimpft.

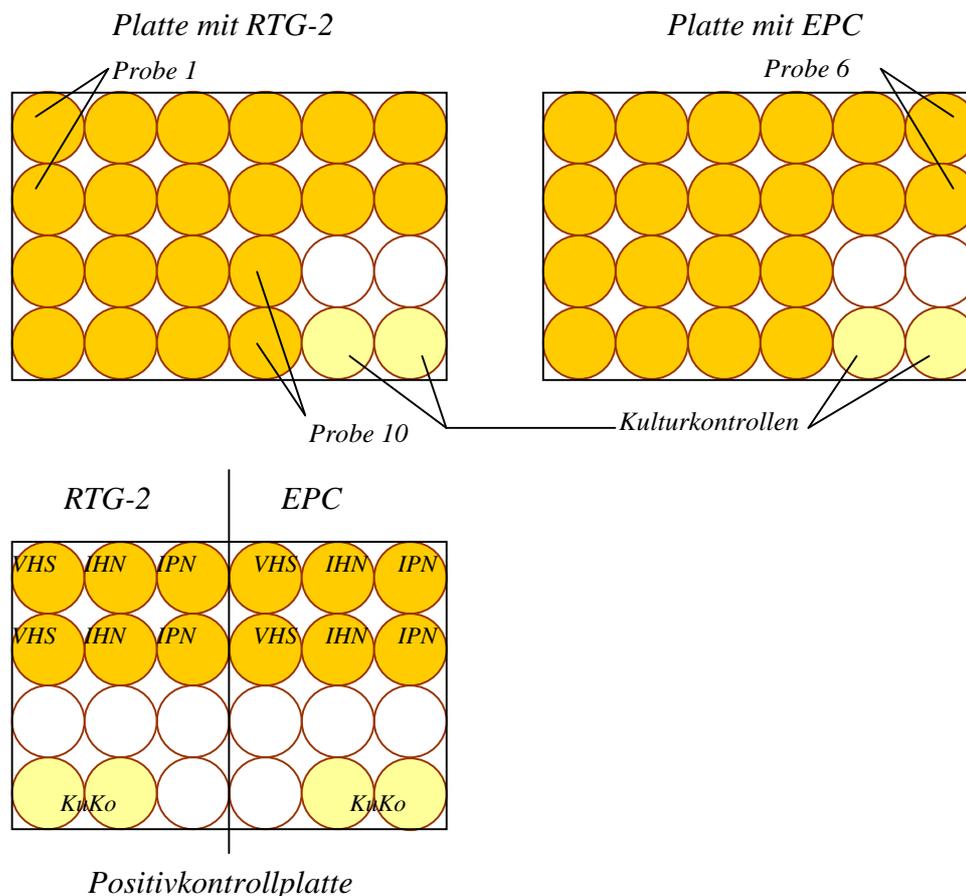


Abbildung 1 zeigt das angewandte Pipettierschema

### 3.3.1.2 Filtration des Überstands

1,2 ml Überstand der zentrifugierten Proben wurden mit einer sterilen 2 ml Spritze aus dem 14 ml Probenröhrchen entnommen und ein steriler Membranfilter mit 0,8 µm bzw. 0,45 µm Porengröße auf den Konus der Spritze fest aufgesetzt. 2 Tropfen (~80 µl) und 1 Tropfen (~40 µl) wurden so für jede Probe in die zugeordneten Vertiefungen pro Zellkulturplatten vorgelegt.

### 3.3.1.3 Positivkontrollen

Als Positivkontrolle wurde VHS-, IHN- und IPN- Kontrollvirus (Tabelle 2) in eine separate Zellkulturplatte, wie in Abbildung 1 dargestellt, eingesetzt. 2 Tropfen (~80 µl) und 1 Tropfen (~40 µl) wurden in die zugeordneten Vertiefungen der Zellkulturplatten mit einer sterilen 1 ml Pipette vorgelegt.

*Tabelle 2: Eingesetzte Laborviren für Positivkontrollen*

Virus:	<b>VHS- Virus</b>
Serotyp:	1 (F1), Serogruppe I
Virusstamm:	Fi 13
Lfd.Nr.NRL-VF:	V935

Virus:	<b>IHN- Virus</b>
Virusisolat:	332
Lfd.Nr.NRL-VF:	IHN 265

Virus:	<b>IPN- Virus</b>
Serotyp:	SPJARRUP (Sp.)
Bezeichnung:	IPN 345

### 3.3.1.4 Beimpfen

Für die Virusanzüchtung wurden 5 bis 10 Tage alte RTG-2- und EPC- Zellkulturen eingesetzt. Die Zellen wurden aus den 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Fa. Nunc) abtrypsiniert (Trypsin / EDTA- Lösung 0,05/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>; Biochrom AG) und in 30 ml Anzuchtmedium A+P (MEM-Earle + 10 ml/l NaHCO<sub>3</sub> 7,5% + 200 I.E./ml Penicillin; 333 µg/ml Streptomycin + 0,5 µg/ml Partricin + 10% FKS) aufgenommen. Mit einer sterilen 10 ml Pipette wurde 1 ml Zellsuspension in die Vertiefungen pipettiert. Zuerst wurden die Kulturkontrollen (KuKo) einer Platte, dann die Wells mit dem Probensubstrat, anschließend die Kulturkontrollen auf der Positivkontrollplatte, dann die mit VHS-, IHN- und IPN- Kontrollvirus vorgelegten Vertiefungen befüllt. Bei

einer Ausgangsverdünnung der Organsuspension von 1:10 ergab sich bei Vorgabe von 80 µl Substrat eine Verdünnung von 1:135 und bei 40 µl Substrat eine Verdünnung von 1:260. In einem Umkehrmikroskop (Will, Wilovert) wurde in 40-facher Vergrößerung die homogene Verteilung und der Zustand der beimpften Zellen überprüft. Die beimpften Zellkulturplatten wurden zur Bebrütung in einen erschütterungsfreien CO<sub>2</sub>-Kühlbrutschrank (Kendro, BBK 6220 mit externem Umwälzkühler: Haake, Thermo UWK45) mit 2,5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 15°C Temperatur gestellt.

Nach 3, 5 und 7 Tage wurden die beimpften Zellkulturen unter dem Umkehrmikroskop bei 40- bis 150-facher Vergrößerung auf das Auftreten eines cpE überprüft. Um potentiell toxische Effekte durch das Substrat von cytopathischen Effekten besser unterscheiden zu können, wurden die unterschiedlich verdünnten Proben, die Kulturkontrollen sowie die Positivkontrollen in die Beurteilung mit einbezogen.

#### 3.3.1.5 Passagieren der Kulturen

Nach 7 Tagen war die erste Passage abgeschlossen. Nach der Beurteilung wurden die Zellkulturplatten mit den RTG-2- und EPC- Zelllinien sowie die Kontrollplatte bei –70°C eingefroren. Das Einfrieren und anschließende Auftauen bewirkte das Platzen der Zellen und ggf. die Freisetzung von intrazellulär gelegenem Virus.

Waren nur geringe Mengen von Virus im Ausgangssubstrat vorhanden, so war ein virusbedingter cpE nach der ersten Passage oft noch nicht erkennbar. Eine vielfache Vermehrung von Virus wurde durch weitere Zellkultur-Passagen bewirkt. Toxische Eigenschaften des Ausgangssubstrates verringerten sich beim Passagieren durch die Verdünnung. Ein virusbedingter cpE wurde so offenkundig.

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Zellkulturplatten wurde mit der Spitze einer sterilen und gestopften 1 ml Pipette der Zellrasen der doppelt angesetzten Proben bzw. der Positivkontrollen mit kreisender Bewegung abgeschabt und in ein Well zusammen gemischt. 100 µl respektive 50 µl des gemischten Agens wurden in die zugeordneten Vertiefungen der frischen Zellkulturplatte vorgelegt. Je 1 ml frisch abtrypsinierte RTG-2- und EPC- Zellen wurden in der Reihenfolge Kulturkontrollen, Proben, Kulturkontrollen, Positivkontrollen in die neuen Zellkulturplatten pipettiert. Die Platten wurden bei 15°C und 2,5% CO<sub>2</sub> – Atmosphäre bebrütet, nach 3 und 5 Tagen kontrolliert und nach 7 bzw. wiederholt nach maximal 10 Tagen beurteilt.

### 3.3.1.6 Beurteilung

Die Zellkulturen wurden unter dem Umkehrmikroskop bei 40- bis 150-facher Vergrößerung beurteilt.

Der Zellrasen der Kulturkontrollen musste einheitlich dicht gewachsen, das Kulturmedium ungetrübt und frei von Verunreinigungen sein.

Die VHSV-, IHNV- und IPNV- Positivkontrollen mussten einen cpE aufweisen. War nach 7 Tage bzw. 10 Tagen bei einer oder mehreren Positivkontrollen kein cpE sichtbar, musste die gesamte Anzucht wiederholt werden.

War nach 7 bzw. nach max. 10 Tagen in der 2. Passage bei einer Probe kein cpE auf RTG-2 oder EPC-Zellen erkennbar, wurde die Probe negativ beurteilt.

War nach 7 bzw. nach max. 10 Tagen in der 2. oder folgenden Passage ein offensichtlich virusbedingter cpE erkennbar, wurde eine Virusidentifikation durchgeführt. War nach 7 bzw. nach max. 10 Tagen bei einer Probe eine klare Beurteilung nicht möglich (unklare cpE) wurden weitere Passagen der Proben durchgeführt. Die Virusidentifikation mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests bzw. RT-PCR war als ergänzende Option möglich. Bis zur Identifikation wurden die Platten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.3.2 Virusidentifikation mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests

Proben, bei denen in der 2. oder einer der folgenden Passage in der Virusanzucht ein cpE auftrat bzw. Proben, die nicht eindeutig negativ zu beurteilen waren, wurden mit indirekten Immunfluoreszenz-Tests (IIFT) untersucht.

Die Untersuchung wurde in einer 96-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. Jeder Ansatz einer Probe sowie die Positivkontrollen (PK) wurden auf die 96-Well-Zellkulturplatte übertragen und mittels IIFT auf VHSV, IHNV und IPNV untersucht um auch Mehrfachinfektionen detektieren zu können (Tabelle 3).

Tabelle 3: Schema der Plattenbelegung für die IFTs

	RTG-2				EPC				RTG2	EPC	RTG2	EPC
VHS	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	VHSV	VHSV
VHS	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	VHSV	VHSV
IHN	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	IHNV	IHNV
IHN	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	IHNV	IHNV
IPN	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	IPNV	IPNV
IPN	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	KuKo	KuKo	IPNV	IPNV

Pro Vertiefung wurden 100 µl frische abtrypsinierte RTG-2- bzw. EPC-Zellkultursuspension vorgelegt. 25 µl Probenüberstand wurden aus den aufgetauten 24-Well-Zellkulturplatten für den Reaktionsansatz eingesetzt. Wie beim Passagieren wurde vorher mit der sterilen Pipettenspitze der restliche am Boden anhaftende Zellrasen abgekratzt. Nach der Beimpfung wurden die Platten bei 15°C und 2,5% CO<sub>2</sub> - Atmosphäre für 3 bis 6 Tage bebrütet und regelmäßig im Umkehrmikroskop bei 40- bis 150-facher Vergrößerung kontrolliert. Die Bebrütungsdauer wurde so gewählt, dass keine vollständige cpE-bedingte Ablösung des Zellrasens vom Boden der Zellkulturplatte auftrat. Für den VHSV- Nachweis wurden gute Farbe-Ergebnisse nach 3 Tagen und für den IHNV- und IPNV- Nachweis nach 6 Tagen erzielt.

Die IFTs wurden mit BIO-FLUO VHS (BIO K 06; Charge: FVHS04J12), BIO-FLUO IHN (BIO K08; Charge: FIHN04I23) und BIO-FLUO IPN (BIO K10; Charge: F04J12) Testkits (BioX Diagnostics) durchgeführt.

#### Vorbereitung der Testkit- Reagenzien

- 1x 100 ml Waschkonzentrat: 10-fach konzentrierte PBS wurde verdünnt in 900 ml Aqua dest. und ergab die gebrauchsfertige Waschlösung.
- Jeweils 1 Flasche lyophilisierter monoklonaler Antikörper (Maus), spezifisch gegen VHS, IHN bzw. IPN wurde aufgelöst in 500 µl Aqua dest. (Stocklösung), aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Stocklösung 1:20 mit gebrauchsfertiger Waschlösung verdünnt.
- 1 Flasche lyophilisiertes Fluorescein- markiertes Immunglobulin (FITC-konjugiertes anti-Maus Ziegen-Ig) wurde in 500 µl Aqua dest. (Stocklösung) aufgelöst, aliquotiert und in Glasbehältern bei -20°C eingefroren. Unmittelbar vor

Gebrauch wurde die Stocklösung 1:20 mit Verdünnungspuffer (enthält Evan's blue) verdünnt.

Nach der Bebrütung wurde das Anzuchtmedium durch Abschleudern von der Platte entfernt. Der Zellrasen am Boden jeder Vertiefung wurde mit 50 µl Aceton-haltiger Fixationslösung für 20 min bei 4°C fixiert. Die Fixationslösung wurde durch Umdrehen der Platte entfernt und die Platte einige Sekunden zum Abtropfen auf saugfähiges Papier gelegt. Mit der Waschlösung wurde die Zellkulturplatte vorsichtig zweimal mit Hilfe einer Mehrkanalpipette gewaschen und anschließend zum Abtropfen auf saugfähiges Papier gelegt. 50 µl der gebrauchsfertigen Verdünnungen mit den monoklonalen VHS-, IHN-, IPN- Antikörpern wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und 1 h bei 20°C inkubiert. Die monoklonalen Antikörper wurden durch Umdrehen und leichtes Klopfen entfernt, abgetrocknet und die Platte zweimal mit Waschlösung gewaschen. 50 µl gebrauchsfertiges Konjugat wurden in die Vertiefungen zugegeben und 1 h bei 20°C inkubiert. Mit Waschlösung wurde zweimal gespült, die Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig trocken geklopft und 50 µl Eindeckmedium in die Vertiefungen geben.

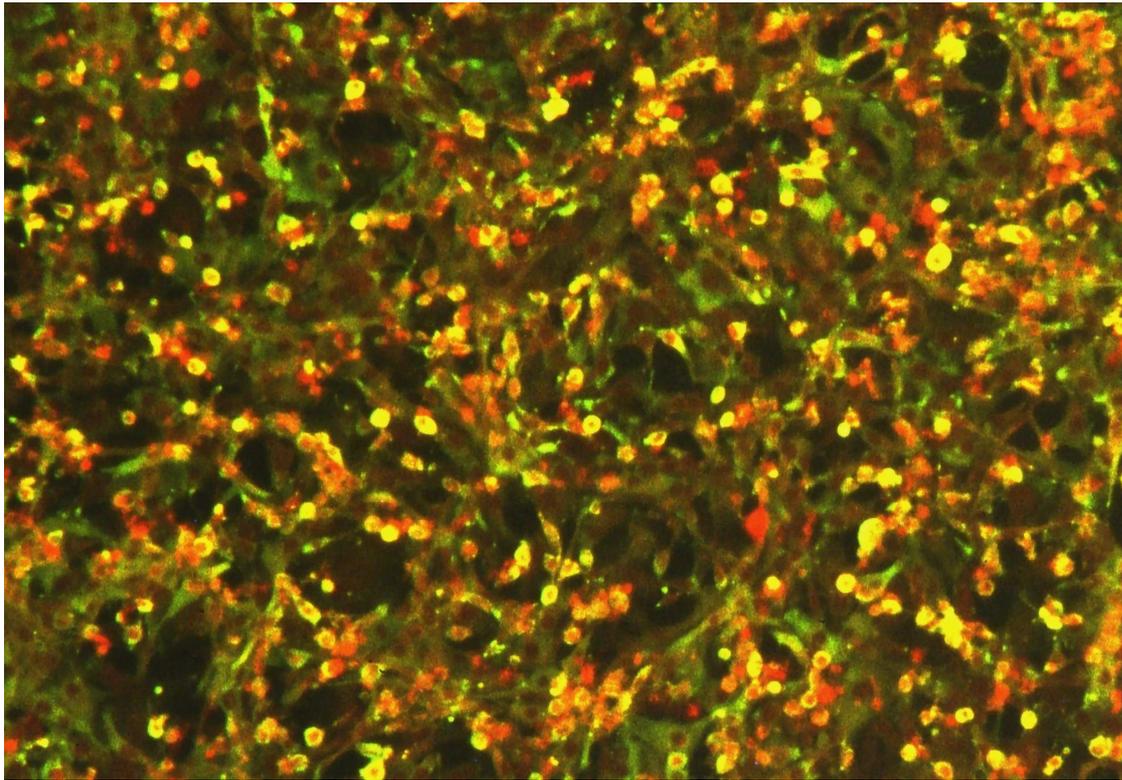
#### 3.3.2.1 Auswertung

Unter einem Fluoreszenz-Umkehrmikroskop (Leitz, Fluovert FS mit Fotodokumentation: Wild MPS46) wurde die 96-Well-Zellkulturplatte ausgewertet.

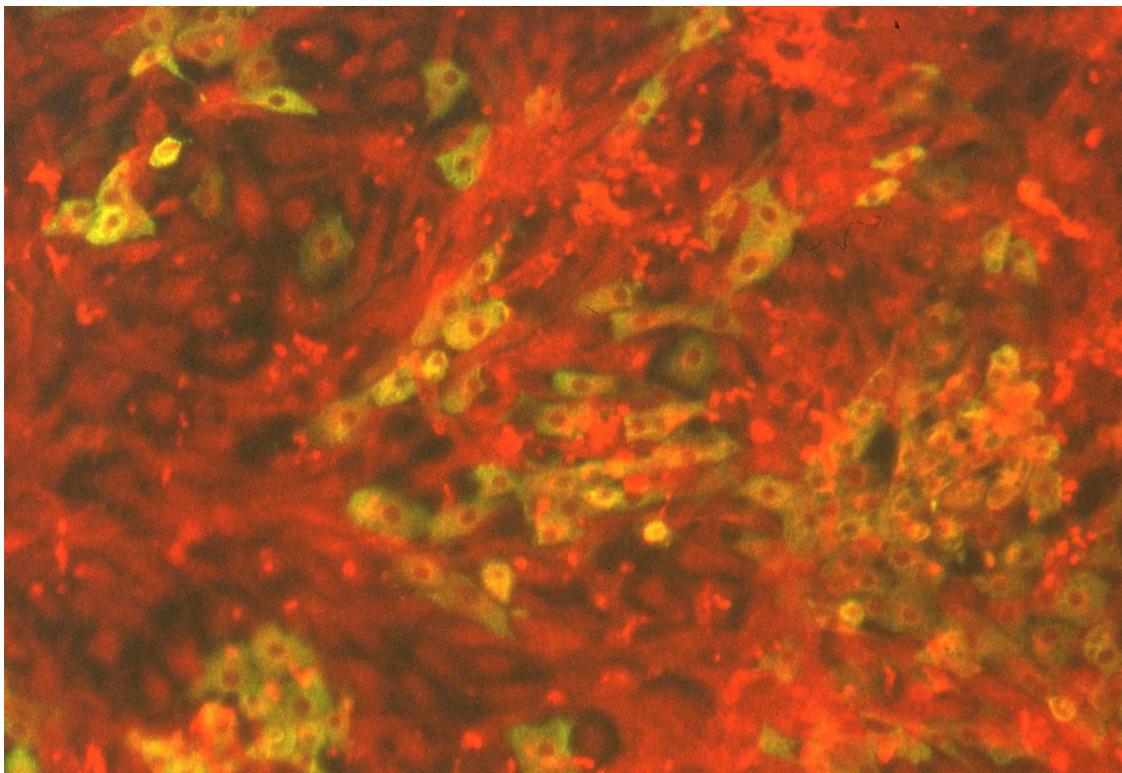
Die Kulturkontrollen wurden zuerst betrachtet. Es durften keine hellgrün leuchtenden Partikel inner- und außerhalb der Zellen erkennbar sein. Die Zellen selbst sollten dunkelrot angefärbt sein.

Die mit VHS-, IHN- bzw. IPN- Laborvirus inokulierten Positivkontrollen durften nur bei der entsprechenden IF-Reaktion leuchtende Virus- Partikel inner- und außerhalb der Zellen aufweisen.

Eine Probe wurde positiv bewertet, wenn in der spezifischen IF-Reaktion kleine hellgrün leuchtende Partikel in und außerhalb der Zellen zu erkennen waren (siehe Bild 2 und Bild 3). Das Fluoreszenzbild wurde zwischen der Probe und der Positivkontrolle verglichen und sollte übereinstimmen. Unspezifische Färbeartefakte sollten nicht mit Virus-infizierten Zellen verwechselt werden.



*Bild 2: VHSV- Nachweis mittels indirekter IF auf RTG-2 Zellen (100-fache Vergrößerung)*



*Bild 3: IHNV- Nachweis mittels indirekter IF auf RTG-2 Zellen (250-fache Vergrößerung)*

### 3.3.3 VHS- und IHN- RT-PCR

Die Untersuchungen erfolgten auf Grundlage der bei Miller et al. (1998) und Bergmann et al. (2002b) beschriebenen Methode.

Für die Aufarbeitung des Probenmaterials in der RT-PCR wurden die Aliquots mit dem Organhomogenat in den RNase-freien 1500 µl Reaktionsgefäßen benutzt. Die Proben wurden aufgetaut und für 5 min bei 720 g gekühlt zentrifugiert. Für die ersten PCR-Durchläufe wurden 50 µl Überstand, für Wiederholungsuntersuchungen 80 bzw. 100 µl Überstand aus dem Homogenat eingesetzt. Für die RT-PCR- Untersuchungen aus Zellkulturüberständen wurden 100 µl Zellkultursuspension nach dem Einfrieren und Wiederauftauen der Zellkulturen eingesetzt.

#### 3.3.3.1 $\beta$ -Aktin -Kontrolle

Um Kontaminationen durch eine Positivkontrolle bei der PCR zu vermeiden, wurde eine auf hochkonservierten Regionen des  $\beta$ -Aktin-Gens basierende RT-PCR Kontrolle verwendet (Bergmann et al., 2002b).

Dafür wurde eine 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 7 Tagen alten EPC-Zellen abtrypsiniert und in 10 ml Anzuchtmedium A aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden in sterile und RNase-freie 1500 µl Reaktionsgefäße portioniert und bei -20°C eingefroren.

#### 3.3.3.2 Aufreinigung mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen)

Für jede Probe, den Leerwert (LW  $\hat{=}$  Negativkontrolle) und die  $\beta$ -Aktin-Kontrolle (BA-Kontrolle  $\hat{=}$  Positivkontrolle) wurden in einem Ständer RNase -freie 1500 µl Reaktionsgefäße vorbereitet und mit 350 µl RLT-Puffer mit 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth, Best. Nr. 4227.1) vorgelegt. In die Reaktionsgefäße wurde das einzusetzende Probenmaterial (50 µl, 80 µl oder 100 µl Überstand aus Organhomogenat bzw. 100 µl Zellkultursuspension) hinein pipettiert und mit einem Vortex-Mischer vermischt. Die LW-Kontrollen wurden ohne Probenmaterial bearbeitet; für die BA-Kontrollen wurde 50 µl Zellkulturmaterial eingesetzt. Die Reaktionsgefäße wurden mit dem Deckel verschlossen und für 2 min bei 15.000 U/min ( $\hat{=}$  14.000 g) zentrifugiert (Eppendorf; Mini Spin Plus).

Es wurden 400 µl 70%iger Ethanol (Roth, Best. Nr. 7301.1) in die Probengefäße gegeben, mit einem Vortex-Mischer gemischt und anschließend für 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die RNeasy Mini-Zentrifugen-Säulen aus dem Kit wurden auf 2 ml Mini Kit- Sammelröhrchen gesteckt, der gesamte Inhalt aus jedem Reaktionsgefäß auf jeweils eine Säulen pipettiert und für 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, neue Röhrchen auf die Säulen aufgesteckt, 700 µl RW1-Puffer dazugegeben und für 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säulen auf neue Röhrchen gesteckt, 500 µl RPE-Puffer dazugegeben und für 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säulen auf die Röhrchen wieder aufgesteckt, 500 µl RPE-Puffer dazugegeben und 2 min bei 14.500 U/min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säulen in neue Röhrchen gesteckt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. In den Säulen durfte kein RPE-Puffer mehr vorhanden sein! Die Röhrchen wurden verworfen und die Säulen auf gekennzeichnete und RNase -freie 1500 µl Reaktionsgefäße aufgesteckt. 30 µl RNase -freies Wasser wurde in die Säulen dazugegeben und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Säulen verworfen und die Reaktionsgefäße mit den Deckeln sofort verschlossen.

Da aufgereinigte RNA nicht stabil ist, wurden die Proben unmittelbar in der RT-Reaktion weiterbearbeitet.

### 3.3.3.3 1. PCR-Schritt (One-Tube RT-PCR)

RT-Reaktion mit 1.PCR wurden unter Verwendung des Qiagen OneStep RT-PCR Kits durchgeführt. Pro Ansatz wurden maximal 10 Proben, der LW und die BA-Kontrolle bearbeitet.

#### Herstellung des Mastermix I

Im 1500 µl Reaktionsgefäß wurden für die RT- PCR der Mastermix zusammen- gemischt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammenstellung des Mastermix I für RT-PCR

Anzahl Portionen	1. DEPC	2. 5x Puffer	3. Q-Solution	4. dNTPs	5. RNasin	6. Enzym	Gesamt menge
1	18,5 µl	10 µl	10 µl	2 µl	0,5 µl	2 µl	43 µl
5	92,5 µl	50 µl	50 µl	10 µl	2,5 µl	10 µl	215 µl
10	185 µl	100 µl	100 µl	20 µl	5 µl	20 µl	430 µl
12	222 µl	120 µl	120 µl	24 µl	6 µl	24 µl	516 µl
13	240,5 µl	130 µl	130 µl	26 µl	6,5 µl	26 µl	559 µl

BA-Kontrolle

43 µl Mastermix I wurden für die BA-Kontrolle in ein 200 µl Reaktionsgefäß abpipettiert und die  $\beta$ -Aktin- Primer (1 µl **ba1** + 1 µl **ba2**) hinzugegeben.

BA-Kontroll- Primer (für RT- und seminested PCR)

(Thermo Electron GmbH; Charge: OR174238-1 /-2)

**ba1** Position 357 – 377, sense Primer

5'- GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC -3'

**ba2** Position 1092 – 1076, antisense Primer

5'- CTC GTC GTA CTC CTG CTT G -3'

In dem verbliebenen Mastermix I wurden pro Portion je 1 µl (50 pmol/µl) der sense und antisense Primer (**VG1/VD3** bzw. **IG1/ID3**; Endkonzentration 1 µM) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und je 45 µl in die 200 µl Reaktionsgefäße verteilt.

Primer für 1.PCR (Bruchhof et al., 1995)

VHS-Primer für 1.PCR (50 pmol/µl)

(Thermo Electron GmbH; Charge: OR172677-1 /-2)

**VG1** (VHSV G-Gen), sense Primer, Position 1 – 21

5'- ATG GAA TGG AAC ACT TTT TTC -3'

**VD3** (VHSV G-Gen), antisense Primer, Position 697 – 678

5'- TGT GAT CAT GGG TCC TGG TG -3'

IHN-Primer für 1.PCR (50 pmol/µl)

(Thermo Electron GmbH; Charge: OR173665-1 /-2)

**IG1** (IHNV G-Gen), sense Primer, Position 1 – 21

5'- ATG ATC ACC ACT CCG CTC ATT -3'

**ID3** (IHNV G-Gen), antisense Primer, Position 682 – 663

5'- GAT TGG AGA TTT TAT CAA CA -3'

Es wurden 5 µl des aufgereinigten Probenmaterials in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten Primer-Mastermix pipettiert, mit einem Vortex-Mischer durchmischt, kurz zentrifugiert (Nat. Labnet. Co.; Mini Centrifuge C1200) und in den Thermocycler gestellt.

#### One-Tube RT-PCR

Die Reverse Transkription und die 1. Polymerase- Kettenreaktion wurden in einem Reaktionsgefäß durchgeführt.

Der beheizbare Deckel des Thermocyclers (Eppendorf, Mastercycler gradient; PCR lizenziert) verhinderte bei Schließung des Cyclers das selbstständige Öffnen der Reaktionsgefäße während der Erhitzung, ein Verdampfen von Probenmaterial sowie die Bildung von Kondenswasser durch Temperaturunterschiede im Probengefäß.

#### Thermoprofil 1.PCR

Deckeltemperatur: 99°C

1. 50°C für 40 min      Reverse Transkription
2. 95°C für 15 min      Initiale Denaturierung
3. 94°C für 1 min      Denaturierung
4. 52°C für 1 min      Annealing
5. 72°C für 1 min      Elongation

Schritt 3. bis 5. mit 35 Amplifikationszyklen

6. 72°C für 10 min      Finale Elongation
7. 4°C bis Ende      Kühlung

#### 3.3.3.4 Seminested PCR

Der RT-PCR wurde eine seminested PCR angeschlossen. Für diese zweite PCR wurde der Eppendorf Mastermix 2,5x (Eppendorf, Best. Nr. 0032 002.250; Charge: PD 223 A) verwendet.

#### Herstellung des Mastermix II

In einem 1500 µl Reaktionsgefäß wurde für die seminested PCR der Mastermix II zusammengemischt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenstellung des Mastermix II für die seminested PCR

Anzahl Portionen	1. RNase - freies Wasser	2. Mastermix	Gesamtmenge
1	22 µl	20 µl	42 µl
5	44 µl	40 µl	88 µl
10	220 µl	200 µl	440 µl
12	264 µl	240 µl	504 µl
13	286 µl	260 µl	546 µl

43 µl Mastermix II wurden für die BA-Kontrolle in ein 200 µl Reaktionsgefäß abpipettiert und die  $\beta$ -Aktin- Primer (1 µl **ba1** + 1 µl **ba2**) hinzugegeben.

In dem verbliebenen Mastermix II wurden pro Reaktionsansatz je 1,5 µl (5 pmol/µl) der sense und antisense Primer (**VD3/VD5** bzw. **ID3/ID4**; Endkonzentration 150 nM) für die seminested PCR zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und je 45 µl in die 200 µl Reaktionsgefäße verteilt.

Primer für seminested PCR (Bruchhof et al., 1995)

VHS-Primer für seminested PCR (5 pmol/µl)

(Thermo Electron GmbH; Charge: OR172677-2 /-3)

**VD3** (VHSV Diagnose 3), antisense Primer, Position 697 - 678

5'- TGT GAT CAT GGG TCC TGG TG -3'

**VD5** (VHSV Diagnose 5), sense Primer, Position 254 - 272

5'- TCC CGC TAT CGG TCA CCA G -3'

IHN-Primer für seminested PCR (5 pmol/µl)

(Thermo Electron GmbH; Charge: OR173665-2 /-3)

**ID3** (IHNV Diagnose 3), antisense Primer, Position 682 - 663

5'- GAT TGG AGA TTT TAT CAA CA -3'

**ID4** (IHNV Diagnose 4), sense Primer, Position 134 - 154

5'- CTC TGG ACA AGC TCT CTA AGG -3'

Es wurden 5 µl des DNA-Materials aus der 1. PCR in die Reaktionsgefäße pipettiert, mit einem Vortex-Mischer durchmischt, kurz zentrifugiert (Nat. Labnet. Co.; Mini Centrifuge C1200) und in den Thermocycler (Eppendorf; Mastercycler gradient; PCR lizenziert) gestellt.

### Thermoprofil seminested PCR

Deckeltemperatur: 105°C

1. 95°C für 5 min      Initiale Denaturierung
2. 95°C für 30 sec      Denaturierung
3. 52°C für 40 sec      Annealing
4. 72°C für 40 sec      Elongation

Schritt 2. bis 4. mit 25 Amplifikationszyklen

5. 72°C für 5 min      Finale Elongation
6. 4°C bis Ende      Kühlung

### **3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die PCR-Produkte aus der RT-PCR und der seminested PCR wurden auf einem mit Laufpuffer überschichteten 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden Gele mit 8, 16 bzw. 2x 16 Taschen hergestellt.

Für ein 2%iges Gel mit 16 Taschen wurden in eine 200 ml Glasflasche 2 g Agarose und 100 ml gebrauchsfertigen TBE-Laufpuffer gegeben und durch Aufkochen im Mikrowellengerät aufgelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung dazugegeben und das flüssige Gel unter Vermeidung von Luftblasenbildung in die Gelkammer gegossen. Für die Taschen im Gel wurde ein Kamm eingesetzt bis das Gel vollständig abgekühlt war.

Das erstarrte Gel wurde in die mit TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die erste und die letzte Tasche wurden mit 7 µl Markerlösung (1 µl 100 bp DNA-Ladder + 4 µl Aqua dest. + 2 µl Ladungspuffer) befüllt. Je 8 µl der PCR-Produkte wurden in 50 µl Mischgefäßen mit 2 µl Ladungspuffer gemischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Der Deckel der Elektrophoresekammer (Keutz) wurde geschlossen und die Kabel zum Elektrophorese-Netzgerät (Consort) angeschlossen. Für ein kleines Gel mit 8 Taschen wurde für 10 min eine Spannung von 60 V, dann für 20 bis 25 min eine Spannung von 130 V angelegt. Für ein großes Gel mit 16 bzw. 2x16 Taschen wurde für 10min eine Spannung von 90 V, dann für ca. 20 bis 25 min eine Spannung von 250 V angelegt. Nach 30 bis 35 min Laufzeit war die Bromphenolblau-

Fraktion im Ladungspuffer 4 bis 4,5 cm weit von der Tasche in Richtung Anode gelaufen.

#### 3.3.4.1 Photodokumentation

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und vorsichtig auf einen UV-Transilluminator (Benda; TFX-M/10194) gegeben. Das UV-Licht des Transilluminators (302nm) wird vom EtBr-DNA-Komplex absorbiert und als oranges Licht (590nm) reemittiert. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde mit einem Dokumentationssystem erfasst. Eine auf einer Abdeckhaube (Dark Hood) installierte Digitalkamera (Kodak 290 Zoom) war mit einem Rechner (PC mit Windows XP) mit Dokumentationssoftware (Alpha Innotech; Alpha Digi Doc V) verbunden. Die Abdeckhaube wurde über den Transilluminator gesetzt und über die Software fotografiert. Das Bild vom Gel wurde mit der Software invertiert und beschriftet und als gängige tif- oder jpg- Bilddatei auf der Festplatte abgespeichert und ausgedruckt.

#### 3.3.4.2 Auswertung der Gele

Um die Bandengrößen vergleichen zu können, wurden die Marker (100 bp-DNA-Leiter) mitgeführt.

##### Eigenkontrollen:

Der Leerwert **LW** darf im 1. PCR-Schritt (RT-PCR) und im 2. PCR-Schritt (seminested PCR) keine Bande zeigen.

Die **BA**-Kontrolle muss im 1. PCR-Schritt (RT-PCR) und im 2. PCR-Schritt (seminested PCR) eine Bande mit einer Größe von 719 bp zeigen.

##### VHS bzw. IHN spezifische Banden zeigen folgende Größen:

**VHS:** 1. PCR-Schritt (RT-PCR): 697 bp    2. PCR-Schritte (seminested PCR): 444 bp

**IHN:** 1. PCR-Schritt (RT-PCR): 682 bp    2. PCR-Schritte (seminested PCR): 549 bp

Proben mit spezifischen Banden im 1. und 2. PCR-Schritt wurden als positiv bewertet. Proben mit spezifischen Banden im 2. PCR-Schritt wurden als positiv bewertet. Proben ohne oder ohne spezifische Banden wurden als negativ bewertet. Bei nicht eindeutigen PCR Ergebnissen wurde der gesamte Ansatz wiederholt.

### 3.3.5 Wiederholte Virusanzüchtung

Für die Proben, die in der RT-PCR VHS- oder IHN- spezifische Banden aufwiesen, bei denen aber in der Zellkultur zunächst kein Virus angezüchtet werden konnte, wurde die Virusanzüchtung nochmals in modifizierter Form durchgeführt.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen und zurückgestellten 2000  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäße mit Organhomogenat wurden im Kühlschrank aufgetaut, durchmischt und in einer  $5^{\circ}\text{C}$  Kühlzentrifuge für 5 min bei 720 g abzentrifugiert. In 24-Well Zellkulturplatten wurden pro Vertiefung 0,05 ml bzw. 0,1 ml Überstand pro Probe unfiltriert vorgelegt, um nicht an organisches Material gebundenes Virus oder an den Filter elektrostatisch gebundenes Virus zu verlieren. Ein Doppelansatz wurde auf RTG-2- und für EPC-Zellen durchgeführt. Positivkontrollen mit VHSV, IHNV und IPNV auf beiden Zelllinien wurden auf einer separaten Zellkulturplatte mitgeführt. 1,5 ml frisch abtrypsinierte und in Anzuchtmedium A+P aufgenommene RTG-2 und EPC-Zellen wurden pro Vertiefung einpipettiert. Dabei wurden erst die Kulturkontrollen, dann die Proben mit einer neuen 10 ml Pipette die Kulturkontrollen der Kontrollplatte und zuletzt die Positivkontrollen befüllt. Für die wiederholte Virusanzüchtung ergab sich bei einer Ausgangsverdünnung des Homogenats von 1:10 eine Endverdünnung von 1:160 bei 0,1 ml bzw. 1:320 bei 0,05 ml Agens. Absolut wurde die Menge an potentiell infektiösem Agens (Virus in der Probe) und der Menge an empfänglichen Zellen in der modifizierten Virusanzüchtung erhöht. Unter täglicher Kontrolle wurden die Platten bei  $15^{\circ}\text{C}$  und 2,5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre im Kühl-Brutschrank bebrütet. Nach drei Tagen Inokulation wurden 1400  $\mu\text{l}$  des Überstands aus den Zellkulturplatten mit einer sterilen und gestopften 1000  $\mu\text{l}$  Pipette unter größtmöglicher Schonung des Zellrasens am Boden der Zellkulturplatte abpipettiert und durch 1000  $\mu\text{l}$  frisches und  $15^{\circ}\text{C}$  temperiertes Anzuchtmedium A+P vorsichtig ausgetauscht. Nach anschließender Kontrolle des Zellrasens im Umkehrmikroskop wurden die Zellkulturen unter täglicher Beobachtung in den  $15^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$ - Kühl-Brutschrank zurückgestellt. Nach 1 bis 2 weiteren Tagen zeigten sich ggf. erste cytopathische Effekte und die Zellkulturplatten wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben bis zu 4 mal passagiert. Für verdächtige Proben wurde ein Virusnachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz bzw. auch mittels RT-PCR aus dem Zellkulturüberstand durchgeführt.

### **3.3.6 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Virusisolate und der PCR-Produkte wurden von Dr. P.-J. Enzmann am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit in Tübingen durchgeführt. Es wurden das gesamte Glykoprotein-Gen bzw. Teile davon sequenziert und Alignments zusammengestellt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der untersuchten Felchen (*Coregonus lavaretus*) aus dem Bodensee**

#### **4.1.1 Pathologisch-anatomische Untersuchungen**

Die pathologisch-anatomische Untersuchung verlief für alle 300 Felchen ohne besonderen Befund.

#### **4.1.2 Virologische Untersuchungen**

Die Virusanzucht in der Zellkultur (nach 2. bzw. 3. Passage) sowie die VHS- und IHN-PCR verliefen bei allen Proben (**Wb01** bis **Wb30**, siehe Probenliste 1) mit negativem Ergebnis.

### **4.2 Ergebnisse der virologischen Untersuchungen der Organproben von Fischen aus dem Bodensee**

Von den gefangenen Hechten, Felchen, Seesaiblingen und Seeforellen verlief die Virusanzucht (nach 2. Passage), die VHS- und IHN-PCR für alle Proben (**Wb70** bis **Wb85**; siehe Probenliste 2) mit negativem Ergebnis.

### 4.3 Feldversuche mit Regenbogenforellen im Bereich eines fischverarbeitenden Betriebes

#### 4.3.1 Ergebnisse des Feldversuchs mit drei Hälterkästen von Dezember 2002 bis Januar 2003 an Fluss A

##### 4.3.1.1 Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen

###### Fischaufstieg:

Klinisch erschienen die Versuchsfische geschwächt, pathologisch-anatomisch zeigten die 6 überlebenden Regenbogenforellen (**Wb37**; Probenliste 3) bei der äußeren Untersuchung oberflächliche Abschürfungen der Haut im Bereich des Abdomens. Die Untersuchungen der inneren Organe war pathologisch-anatomisch ohne besonderen Befund.

Die verendeten Regenbogenforellen (**Wb38** und **Wb100**; Probenliste 3) zeigten einen unterschiedlich fortgeschrittenen Verwesungsgrad. Die Sektion der bedingt untersuchungsfähigen Fische war ohne besonderen Befund.

###### Flussmündung:

29 Versuchsforellen (**Wb31** bis **Wb36**; Probenliste 3) hatten die Hälterung gut überstanden und waren klinisch gesund. Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen waren ohne besonderen Befund. Eine Versuchsforelle (**Wb99**; Probenliste 3) verstarb kurz nach dem Einsetzen und war nach Entnahme pathologisch-anatomisch nicht mehr untersuchungsfähig.

##### 4.3.1.2 Virologische Untersuchungen

Die Virusanzüchtung in der Zellkultur (nach 2. bzw. 3. Passage) sowie die VHS- und IHN-PCR verliefen für alle Proben (Fischaufstieg: **Wb37**, **Wb38**, **Wb100**; Flussmündung: **Wb31** bis **Wb36**, **Wb99**; Probenliste 3) mit negativem Ergebnis.

### 4.3.2 Ergebnisse des Feldversuchs mit vier Hälterkästen von Januar 2003 bis März 2003 an Fluss A

#### 4.3.2.1 Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen

##### Fischaufstieg:

Klinisch erschienen die überlebenden Regenbogenforellen deutlich geschwächt (**Wb43** und **Wb44**; Probenliste 4). Äußerlich zeigten die Fische besonders im Bereich des ventralen Abdomens oberflächliche Abschürfungen; weiterhin waren die Fische ohne besonderen Befund. Die verendeten Regenbogenforellen (**Wb102**; Probenliste 4) waren, sofern untersuchungsfähig, pathologisch-anatomisch ohne besonderen Befund.

##### Flussmündung:

Die überlebenden Regenbogenforellen (**Wb39** bis **Wb42**; Probenliste 4) waren bei der klinischen Untersuchung deutlich geschwächt. Bei pathologisch-anatomischen Untersuchungen waren alle Versuchsfische ohne besonderen Befund. Die verendeten Versuchsfische (**Wb101**; Probenliste 4) waren nur eingeschränkt untersuchungsfähig.

#### 4.3.2.2 Virologische Untersuchungen

In der erstmaligen Virusanzucht konnte bei allen Proben (**Wb39** bis **Wb44**, **Wb101**, **Wb102**; Probenliste 4) nach zwei Passagen in der Zellkultur kein Virus isoliert werden.

In der IHN-PCR konnten für die Proben **Wb39**, **Wb40**, **Wb42** und **Wb101** (Probenliste 4) (Einsatz: 50 µl Homogenat) in der seminested PCR spezifische Banden für IHNV erzielt werden. Die VHS-PCR verlief mit negativem Ergebnis.

In der wiederholten Virusanzucht konnte in der Probe **Wb42** nach der 4. Passage und mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik IHNV nachgewiesen werden. Das IHN-Isolat wurde vom FLI in Tübingen bestätigt.

Zuordnung siehe Probenliste 4

*Fischaufstieg (Januar 2003 - März 2003)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben	
		Wb43 & Wb44 (je 5 Rf)	Wb102 (20 Rf †)
VHS	Zellkultur	negativ	negativ
VHS	PCR	negativ	negativ
IHN	Zellkultur	negativ	negativ
IHN	PCR	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ

*Flussmündung (Januar 2003 - März 2003)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben				
		Wb39 (7 Rf)	Wb40 (6 Rf)	Wb41 (6 Rf)	Wb42 (6 Rf)	Wb101 (6 Rf †)
VHS	Zellkultur	negativ <sup>2VZ</sup>				
VHS	RT-PCR	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
IHN	Zellkultur	negativ <sup>2VZ</sup>	negativ <sup>2VZ</sup>	negativ	positiv <sup>2VZ</sup>	negativ <sup>2VZ</sup>
IHN	RT-PCR	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
IPN	Zellkultur	negativ <sup>2VZ</sup>				

<sup>2VZ</sup> wiederholte Virusanzucht durchgeführt

† : verendet

Virologische Befunde 4.3.2.2

## 4.4 Ergebnisse des Versuchs mit Regenbogenforellen im Ablaufwasser einer Kläranlage

### 4.4.1 Klinische Untersuchungen

Klinisch waren alle 57 Regenbogenforellensetzlinge nach einer kurzen Eingewöhnungszeit bis zum 62. Versuchstag unauffällig. Die Fische zeigten physiologisches Schwimm- und Fütterungsverhalten.

### 4.4.2 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigten die Versuchsfische äußerlich keine Veränderungen. Bei der Untersuchung der inneren Organe zeigten alle Fische eine starke Füllung des Verdauungsapparates. Folgende pathologische Veränderungen wurden gefunden: blasse Farbe der Herzen; z.T. leicht brüchige Konsistenz der Milz; Nieren z.T. schmutzig-braun gefärbt, 1x kleiner Abszess im kranialen Bereich

(hämatopoetischer Teil), 1x im kaudalen Bereich (exkretorischer Teil) der Niere; 2x einzelne petechiale, nicht verstreichbare Blutung im kaudalen Bereich der Muskulatur.

#### 4.4.3 Virologische Untersuchungen

Die Virusanzucht in der Zellkultur (nach 2. Passage) sowie die VHS und IHN-PCR verliefen für die Proben **Wb51** bis **Wb56** (Probenliste 5) mit negativem Ergebnis.

#### 4.4.4 Wasserparameter im Fischversuchsbecken

Der Anteil des fischtoxischen Ammoniaks ( $\text{NH}_3$ ) im Messwert Ammonium-Stickstoffgehalt ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) ist abhängig von der Wassertemperatur und dem pH-Wert und bewegte sich an 60 Tagen im grenzwertigen Bereich. An zwei Versuchstagen wurde der Grenzwert von 0,01 mg/l  $\text{NH}_3$  geringfügig überschritten (Tag 46: 0,117 mg/l; Tag 48: 0,135 mg/l  $\text{NH}_3$ ). Eine Übersicht über die tägliche Abwasser-Zulaufmenge ist in Abbildung 2 dargestellt, Eck- und Mittelwerte der Wasserparameter im Ablaufwasser sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

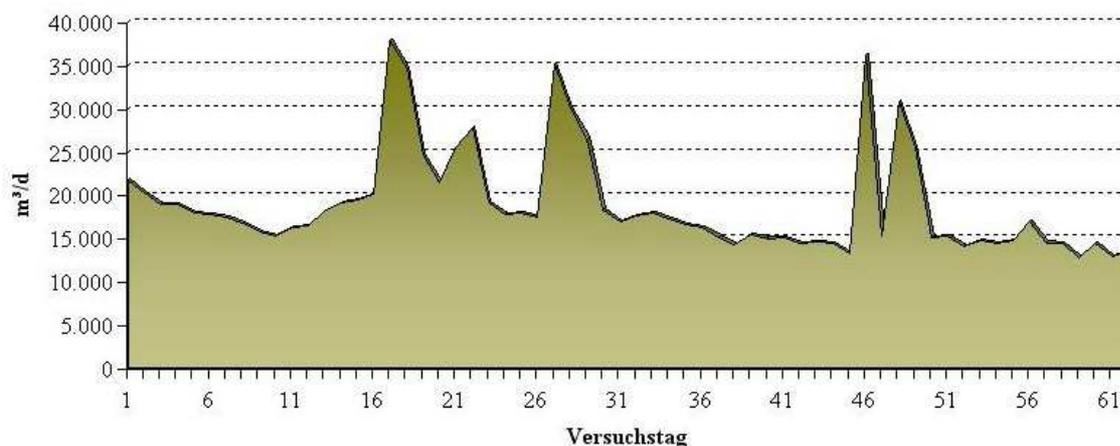


Abbildung 2: Täglicher Wasserzulauf der Kläranlage

Tabelle 6: Wasserparameter im Ablaufwasser der Kläranlage

Messwert:	Minimum:	Maximum:	Ø Mittel: <sup>R</sup>	Bemerkungen:
Temp. <sup>B</sup>	6,5 °C	12,5 °C	9,6 °C	im unproblematischen Bereich
pH-Wert <sup>B</sup>	7,8	8,1	8,0	optimaler Bereich: 6,5 - 8,0
O <sub>2</sub> -Gehalt <sup>B</sup>	7,20 mg/l	10,30 mg/l	9,15 mg/l	optimaler Bereich: 7,0 - 30,0 mg/l
NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>B</sup>	0,28 mg/l	7,56 mg/l	2,84 mg/l	
davon NH <sub>3</sub> <sup>R</sup>	0,006 mg/l	0,135 mg/l	0,049 mg/l	kritischer Bereich: 0,1 - 0,2 mg/l
NO <sub>2</sub> <sup>-A</sup>	0,08 mg/l	0,25 mg/l	0,13 mg/l	
davon HNO <sub>2</sub> <sup>R</sup>	0,01 x 10 <sup>-4</sup> mg/l	0,14 x 10 <sup>-4</sup> mg/l	0,04 x 10 <sup>-4</sup> mg/l	kritischer Bereich: 2,0 - 5,0 x 10 <sup>-4</sup> mg/l
NO <sub>3</sub> <sup>-A</sup>	4,2 mg/l	17,7 mg/l	8,0 mg/l	optimaler Bereich: < 30 mg/l

<sup>A</sup> gemessen im Ablaufwasser Kläranlage    <sup>B</sup> gemessen im Fischversuchsbecken

<sup>R</sup> errechnete Werte

## 4.5 Ergebnisse des Feldversuchs mit Regenbogenforellen im Bereich eines VHS infizierten Betriebes

### 4.5.1 Feldversuch 2003 an Bach B

#### 4.5.1.1 Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen

##### Hälterkasten Nr. 1: (80 m oberhalb Auslaß)

Alle 15 Regenbogenforellen in Hälterkasten Nr. 1, 80 m oberhalb des Auslasses der infizierten Anlage überstanden die Hälterung und waren klinisch gesund.

##### Hälterkasten Nr. 2: (am Auslaß)

Die überlebenden Versuchsforellen in Hälterkasten Nr. 2 am Auslaß der Anlage erschienen bei der klinischen Untersuchung geschwächt. Einige Fische zeigten rostral Stoßverletzungen. Eine der beiden verendeten Regenbogenforellen zeigte bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung die typischen Zeichen einer akuten VHS-Erkrankung mit Blutungen in den inneren Organen und kommaförmigen Blutungen in der Muskulatur (siehe Bild 4).



Bild 4: Regenbogenforelle mit VHS-typischen Blutungen in der Muskulatur aus dem Hälterkasten Nr. 2

#### 4.5.1.2 Virologische Untersuchungen

##### Hälterkasten Nr. 1: (80 m oberhalb Auslaß)

Die virologischen Untersuchungen in der Zellkultur (nach 2. Passage) und in der VHS- und IHN-PCR verliefen bei allen Proben (**Wb45** bis **Wb47**; Probenliste 6) mit negativem Ergebnis.

##### Hälterkasten Nr. 2: (am Auslaß)

VHSV konnte mittels Virusanzucht (nach 2. Passage) und anschließender Immunfluoreszenz-Färbung und in der VHS-PCR in allen Proben (**Wb48** bis **Wb50**; Probenliste 6) nachgewiesen werden.

Zuordnung siehe Probenliste 6

##### Hälterkasten Nr. 2

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben		
		Wb48 (8 Rf)	Wb49 (5 Rf)	Wb50 (2 Rf †)
VHS	Zellkultur	positiv	positiv	positiv
VHS	RT-PCR	positiv	positiv	positiv
IHN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ
IHN	RT-PCR	negativ	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ

† : verendet

Virologische Befunde 4.5.1.2

#### 4.5.2 Feldversuch 2004 an Bach B

Während der Versuchszeit von 35 Tagen gab es zweimal ein durch Schneeschmelze bedingtes Hochwasser. Die maximale Wassertemperatur betrug 8°C (Tag 10), die minimale Wassertemperatur betrug 3°C (Tag 26 bis Tag 30) und im Mittel 5,1°C.

##### 4.5.2.1 Klinische und pathologisch-anatomische Untersuchungen

###### Hälterkasten Nr. 1: (220 m oberhalb Auslaß)

Alle Fische waren klinisch gesund, bei Versuchsende erschienen die Versuchforellen geschwächt, die pathologisch-anatomische Untersuchung war ohne besonderen Befund.

###### Hälterkasten Nr. 2: (80 m oberhalb Auslaß)

Alle Fische waren klinisch gesund, erschienen bei Versuchsende geschwächt. Einige Versuchforellen zeigten ventral am Abdomen oberflächliche Hautabschürfungen. Pathologisch-anatomisch waren alle Fische ohne besonderen Befund.

###### Hälterkasten Nr. 3: (640 m unterhalb Auslaß)

Die Versuchforellen erschienen bei der klinischen Untersuchung bereits nach der ersten Entnahme nach 21 Versuchstagen geschwächt. Bei Versuchsende nach 35 Tagen waren 2 Forellen verendet. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigten 2 überlebende und die beiden verendeten Regenbogenforellen die Anzeichen einer akuten VHS- Erkrankung mit Blutungen in der Muskulatur.

###### Hälterkasten Nr. 4: (am Auslaß)

Bei der täglichen Kontrolle zeigten die Regenbogenforellen nach 18 Tagen ein deutliches lethargisches Verhalten und nahmen kein Futter mehr auf (Temp. 7°C). Eine Versuchforelle verendete perakut an Tag 11, eine weitere an Tag 20. Bei der Entnahme der Fische nach 21 Tagen waren insgesamt 4 Fische verendet. Die 2 zuletzt verendeten Fische und 3 überlebende Forellen zeigten pathologisch-anatomisch die Symptome einer akuten VHS-Erkrankung mit kommaförmigen Muskelblutungen.

##### 4.5.2.2 Virologische Untersuchungen

Bei der Probe **Wb86** (nach 3. Passage), den Proben **Wb88** bis **Wb91** (nach 2. Passage), sowie den Proben **Wb96** bis **Wb98** (nach 2. Passage) (Probenliste 7) konnte in der Virusanzucht mit anschließender Virusidentifikation mittels IIFT VHSV nachgewiesen

werden. In der VHS-PCR konnten für diese Proben spezifische Banden im Bereich von 444 bp erzeugt werden.

Zuordnung siehe Probenliste 7

*Hälterkasten Nr. 1 (220 m oberhalb Auslaß)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben		
		Wb86 (5 Rf)	Wb92 (5 Rf)	Wb93 (5 Rf)
VHS	Zellkultur	positiv <sup>RTG2</sup>	negativ	negativ
VHS	RT-PCR	positiv	negativ	negativ
IHN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ
IHN	RT-PCR	negativ	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ

<sup>RTG2</sup> Virusanzucht gelang nur auf RTG-2 –Zellen

*Hälterkasten Nr. 2 (80 m oberhalb Auslaß)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben		
		Wb87 (5 Rf)	Wb94 (5 Rf)	Wb95 (5 Rf)
VHS	Zellkultur	negativ	negativ	negativ
VHS	RT-PCR	negativ	negativ	negativ
IHN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ
IHN	RT-PCR	negativ	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ

*Hälterkasten Nr. 3 (640 m unterhalb Auslaß)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben			
		Wb91 (5 Rf)	Wb96 (5 Rf)	Wb97 (3 Rf)	Wb98 (2 Rf †)
VHS	Zellkultur	positiv	positiv	positiv	positiv
VHS	RT-PCR	positiv	positiv	positiv	positiv
IHN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ	negativ
IHN	RT-PCR	negativ	negativ	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ	negativ

† : verendet

*Hälterkasten Nr. 4 (am Auslaß)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben		
		Wb88 (5 Rf)	Wb89 (6 Rf)	Wb90 (4 Rf †)
VHS	Zellkultur	positiv	positiv	positiv
VHS	RT-PCR	positiv	positiv	positiv
IHN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ
IHN	RT-PCR	negativ	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ	negativ

† : verendet

### 4.5.3 Ergebnisse der Sequenzierung der VHS-Isolate

Am FLI wurden Teile bzw. das vollständige Glykoprotein-Gen (Position: 1 - 1524) der VHS-Isolate sequenziert. Eine Übersicht ist in Tabelle 7 dargestellt.

Das amtliche VHS-Isolat **FV10/03** (siehe 3.1.5) aus der infizierten Anlage vom Winter 2002/2003 war identisch mit den Isolaten **Wb48** bis **Wb50** aus dem Hälterkasten Nr. 2 vom Feldversuch 2003 (siehe 4.5.1).

Das amtliche VHS-Isolat **FV84/03** (siehe 3.1.5.2) aus der Anlage vom Winter 2003/2004 war identisch mit dem amtlichen Isolat **FV10/03** aus dem vorherigen Winter.

Die Isolate aus den Hälterkästen Nr. 3 (**Wb91**, **Wb96** bis **Wb98**) und Nr. 4 (**Wb88** bis **Wb90**) vom Feldversuch 2004 (siehe 4.5.2) waren identisch mit den Isolaten aus der infizierten Anlage (**FV10/03** und **FV84/03**).

Das VHS-Isolat **Wb86** aus dem Hälterkasten Nr. 1, 220 m oberhalb des Auslasses vom Feldversuch 2004 (siehe 4.5.2) zeigte, abweichend von den anderen sonst identischen Isolaten aus der infizierten Anlage und Bach B, zwei Punktmutationen auf dem Glykoprotein-Gen. Die Mutation an Position 13 hat eine Änderung der Aminosäure-Sequenz zur Folge mit Austausch der AS Threonin gegen Alanin. Die 2. Punktmutation im G-Gen an der Position 900 blieb für die Primärstruktur des viralen Glykoproteins ohne Folge (Alignment siehe unter 8.3 im Anhang).

Tabelle 7: Übersicht über die am FLI Tübingen sequenzierten Abschnitte der VHS-Isolate

Proben - Isolat	Herkunft (Zeitraum)	Sequenz: Position
<b>FV10/03</b>	Isolat aus Anlage (Winter 2002/2003)	1 - 1524 (vollständig)
<b>Wb48</b>	Hälterkasten Nr. 2 (Feldversuch 2003)	1 - 1524 (vollständig)
<b>Wb49</b>	Hälterkasten Nr. 2 (Feldversuch 2003)	1 - 685
<b>Wb50</b>	Hälterkasten Nr. 2 (Feldversuch 2003)	155 - 1200
<b>FV84/03</b>	Isolat aus Anlage (Winter 2003/2004)	1 - 1524 (vollständig)
<b>Wb86</b>	Hälterkasten Nr. 1 (Feldversuch 2004)	1 - 1524 (vollständig)
<b>Wb88</b>	Hälterkasten Nr. 4 (Feldversuch 2004)	1 - 1524 (vollständig)
<b>Wb91</b>	Hälterkasten Nr. 3 (Feldversuch 2004)	189 – 893
<b>Wb97</b>	Hälterkasten Nr. 3 (Feldversuch 2004)	1 - 1524 (vollständig)

Zuordnung siehe Probenliste 6 und Probenliste 7

## **4.6 Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen im Bereich eines VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes**

### **4.6.1 Pathologisch-anatomische und virologische Untersuchungen der letzten verbliebenen Regenbogenforellen aus der infizierten Anlage zum Zeitpunkt der Keulung**

Bei den pathologisch-anatomischen Untersuchungen der letzten 60 Regenbogenforellen wurden regelmäßig Entzündungen der Maulschleimhaut, Organschwellungen von Leber und Milz, Rötungen der Darmschleimhaut und leichte diffuse Rötungen der Bauchhöhle gefunden. Die Muskulatur war im paramedianen Anschnitt stets ohne Befund.

Die Virusanzucht der Proben **FV62-1/04** bis **FV62-4/04** (Probenliste 8) in der Zellkultur (nach 2. Passage) und die VHS- und IHN-PCR verliefen für alle vier Proben mit negativem Ergebnis.

### **4.6.2 Elektroabfischung am Bach D**

#### **4.6.2.1 Pathologisch-anatomische Untersuchungen**

Alle 452 elektrisch abgefischten Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und 22 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus den 5 Abschnitten wurden bei der Organentnahme pathologisch-anatomisch untersucht. Bei verdächtigen Fischen wurde ein paramedianer Schnitt durch die Muskulatur durchgeführt. Bei den äußeren Untersuchungen wurden regelmäßig feine Blutungen auf den Kiemenlamellen gefunden. Bei Untersuchungen der inneren Organe wurden folgende Befunde festgestellt: Herzen, teilweise blass; regelmäßig punktförmige Blutungen auf den Lebern; regelmäßig kugelige Schwellung der Milz; vereinzelt unscharf begrenzte Blutungen auf Schwimmblase, regelmäßig Schwimmblasenwürmer (*Cystidicola farionis*); vereinzelt punktförmige Blutungen im Depotfett, regelmäßig Rötungen der Darmserosa und der Pylorusschläuche, teilweise diffuse Rötungen der Bauchhöhlenauskleidung.

## 4.6.2.2 Virologische Untersuchungen

Die Virusanzüchtung in der Zellkultur verlief für alle 24 Proben (FV63-1/04 bis FV63-24/04 nach 3. Passage; Probenliste 9) mit negativem Ergebnis.

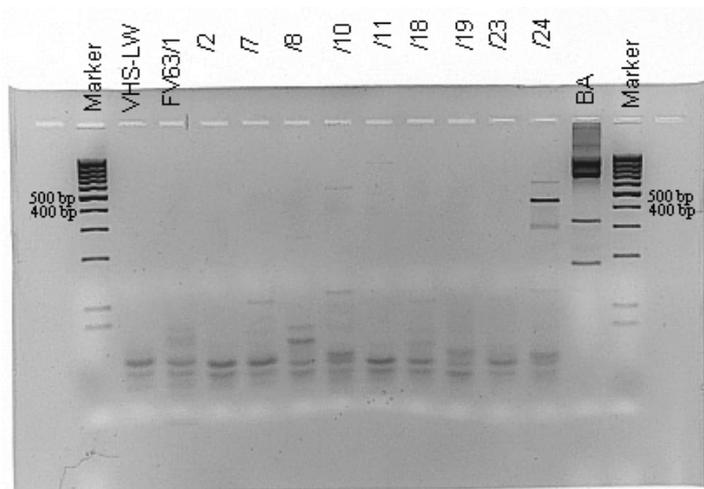


Abbildung 3:  
Agarose-Gel der VHS  
seminested PCR  
(Primer: VD3/VD5)  
mit spezifischer Bande  
bei Probe FV63/24

**Probe FV63-24/04:** (7 Regenbogenforellen; Abschnitt 5)

In der VHS-PCR konnte bei der Probe **FV63-24/04** (Einsatz: 50 µl Homogenat) in der seminested PCR eine spezifische Bande für VHSV erzielt werden (siehe Abbildung 3). Bei der Probe handelte es sich um 7 abgefischte Regenbogenforellen in Abschnitt 5 auf Höhe der Anlage (siehe Probenliste 9). Die wiederholte Virusanzucht (nach 3. Passage) verlief mit negativem Ergebnis.

Zuordnung siehe Probenliste 9

*E-Fischung am Bach D (September 2004)*

Befund	Methode	Ergebnisse der Proben	
		FV63-1 /04 bis FV63-23/04	FV63-24 /04 (7 Rf)
VHS	Zellkultur	negativ	negativ <sup>2VZ</sup>
VHS	RT-PCR	negativ	<b>positiv</b>
IHN	Zellkultur	negativ	negativ <sup>2VZ</sup>
IHN	RT-PCR	negativ	negativ
IPN	Zellkultur	negativ	negativ <sup>2VZ</sup>

<sup>2VZ</sup> wiederholte Virusanzucht durchgeführt

Virologische Befunde 4.6.2.2

### **4.6.3 Ergebnisse der Elektroabfischung im Zulaufkanal eines Wasserkraftwerkes an Fluss E**

#### **4.6.3.1 Pathologisch-anatomische Untersuchungen**

Alle 28 elektrisch abgefischten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und 7 Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) wurden pathologisch-anatomisch untersucht. Bei der äußeren Besichtigung wurden bei 7 Regenbogenforellen (**FV67-2/04**, siehe Probenliste 10) leichte Hauttrübungen festgestellt. Die Fische hatten sich in einem ausgedienten blind endenden Ablaufrohr aufgehalten. Bei der Untersuchung der inneren Organe wurden vereinzelt eine blasse Färbung der Herzen, punktförmige Blutungen im Depotfett und kleine Blutungen auf der Serosa des Darms und den Pylorusschläuchen festgestellt. In einem Fall wurde bei einer Regenbogenforelle mit septischem Sektionsbild und einer hochgradig geschwollenen, grau, grobknotigen Veränderung des Nierengewebes bakteriologisch BKD (Bacterial Kidney Disease) diagnostiziert.

#### **4.6.3.2 Virologische Untersuchungen**

Die Virusanzüchtung in der Zellkultur verlief für alle 4 Proben (**FV67-1/04** bis **FV67-4/04**, Probenliste 10) mit negativem Ergebnis (nach 3. Passage). In der RT-PCR konnten keine spezifischen Banden für VHSV bzw. IHNV erzielt werden.

### **4.6.4 Ergebnisse der Sequenzierung der VHS-Isolate**

Das Glykoprotein-Gen wurde bei allen amtlich gewonnenen VHS-Isolate vollständig sequenziert (Position: 1 – 1524). Die Isolate des VHS-Ausbruchs von 2003 (**FV37/03** und **FV74/03**) waren identisch. Die Isolate vom Ausbruch 2004 nach Sanierung (**FV37/04** und **FV50/04**) waren identisch. Die Isolate aus dem Jahr 2004, verglichen mit den Isolaten aus dem Jahr 2003, zeigten an Position 775 des G-Gens eine Punktmutation mit Austausch der Base Guanin gegen die Base Adenin. Die Mutation bedingte einen AS-Austausch von Alanin nach Threonin. Das 444 bp lange PCR-Produkt der Probe **FV63-24/04** (Probenliste 9) von 7 Regenbogenforellen aus dem Abschnitt 5 auf Höhe der Anlage aus Bach D unterschied sich durch zwei Punktmutationen (Positionen 327 und 668) von den Isolaten aus dem Jahr 2003 und 2004. Die Mutation bei Position 327 bedingte keine Änderung der Primärstruktur, die

---

Mutation bei Position 668 bedingte den Austausch der AS Alanin durch Threonin. Das Alignment ist unter 8.4 im Anhang abgebildet.

#### **4.7 Untersuchungen auf IPN**

Mittels der durchgeführten Virusanzucht wurde eine mögliche IPN- Infektion miterfasst. Bei sämtlichen in der Zellkultur virologisch untersuchten Fischen konnte kein einziges Mal das Virus der Infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) isoliert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Derzeitige Situation über die Verbreitung der VHS und IHN in den Wildgewässern Deutschlands

Über die Verbreitung der VHS und IHN in Seen, Flüssen und Bächen Deutschlands ist nur wenig bekannt. Krankheitsausbrüche bei wildlebenden Fischen sind kaum beschrieben. Dennoch wird das Infektionsrisiko, welches von der Wildfischpopulation ausgeht als sehr hoch eingeschätzt. Man nimmt an, dass vor allem durch langjährige VHS infizierte Fischhaltungsbetriebe oder durch infizierte Besatzfische die Salmoniden in der Wildfischpopulation subklinisch und persistent infiziert und die Erreger endemisch geworden sind. Misslungene VHS-Bekämpfungsprogramme bei Bachwasserbetrieben, wie z. B. in Programmgebieten in Dänemark, nähren diese Befürchtung (Rösch, 2005; persönliche Mitteilung, Rapp 2005). Andere Erfahrungen aus dem Südwesten Deutschlands haben gezeigt, dass auch Gebiete in denen die VHS endemisch war (Konrad et al., 1984), saniert und inzwischen als EU zugelassene, seuchenfreie Gebiete anerkannt werden konnten (Entscheidung 2003/458/EG).

Über die Existenz von IHN- Endemiegebieten in den Gewässern Deutschlands kann lediglich spekuliert werden. Endemisch ist die IHN in den Flüssen der Westküste Nordamerikas. Regelmäßig treten dort bei pazifischen Lachsen IHN Epidemien bei Brut und Setzlingen auf. Aufgrund der Gewässerstrukturen und der Laichwanderungen der IHN- empfänglichen pazifischen Lachsarten ist die Situation derzeit nicht mit der in Deutschland und Mitteleuropa vergleichbar. Ein wichtiger Unterschied besteht in der starken Verbauung der deutschen Fließgewässer durch künstliche Aufstiegshindernisse, wie Schleusen, Wehre oder Wasserkraftwerke und das Fehlen von Rückzugsräumen, ökologischen Nischen und natürlichen Laichgründen durch Uferbegradigungen und die Verbauung von Flussauen. Mit dem Rückbau der Oberflächengewässer und dem Abbau von künstlichen Aufstiegshindernissen bzw. der Installation funktionstüchtiger Fischaufstiegsmöglichkeiten gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG könnte sich die Situation ändern.

### **5.1.1 Rechtlicher Rahmen für die Freiheit eines Gewässers auf VHS und IHN**

Die EU ermöglicht es in der Richtlinie 91/67/EWG Binnenwassergebiete als VHS und IHN freie Gebiete zuzulassen. Ein zugelassenes Gebiet reicht dabei von den Quellen bis zur Mündung ins Meer bzw. bis zu einem künstlichen oder natürlichen Hindernis, welches eine Stromaufwärtswanderung der Fische verhindert. Damit soll in erster Linie die Laichwanderung, insbesondere durch die Bachforellen, unterbunden werden. Um ein Gebiet zulassen zu können, müssen sämtliche Fische über einen Zeitraum von mindestens vier Jahren klinisch gesund sein. Sämtliche Fischhaltungsbetriebe im Gebiet stehen unter amtlicher Aufsicht, werden kontrolliert und virologisch beprobt. Besatzfische dürfen nur aus EU zugelassenen Betrieben bzw. Gebieten stammen oder aus Anlagen in denen keine empfänglichen Fischarten gehalten werden. Für die Flüsse und die großen Ströme in Deutschland ist die Anerkennung auf Seuchenfreiheit mit EU-Zulassung nach den derzeitigen Regelungen somit kaum erreichbar. Die von der EU geforderten Maßnahmen zur Erlangung und Aufrechterhaltung der Seuchenfreiheit in einem Gewässer spiegeln die Bedenken bezüglich des Infektionspotentials der Wildfischpopulation wieder.

## **5.2 Bodenseefelchen und VHS**

Mit der virologischen Beprobung von laichreifen Felchen sollte die Prävalenz von VHSV im Bodensee untersucht werden. Während der Laichzeit stehen die Fische unter Stress, zudem sind die Wassertemperaturen im Winter in einem Bereich, der den Ausbruch einer VHS ermöglicht.

Die Laichfischerei auf Blaufelchen (*Coregonus lavaretus*) war am Bodensee im Dezember 2002 für vier Nächte freigegeben (siehe 3.1.1). Die dabei eingesetzten Netze hatten eine Maschenweite von 44 mm, damit wurden adulte Felchen mit einer Größe von 300 g und mehr gefangen (Rösch, 2002). Die Laichreife Blaufelchen hatten ein Alter von 3 bis 5 Jahren. Der Laich der gefangenen Felchen wurde in die Fischbrutanstalten zur Aufzucht verbracht. Bei der Felchenbrut wurde in den vom Fischgesundheitsdienst betreuten Fischbrutanstalten bisher noch nie klinisch oder virologisch VHS nachgewiesen. Auch von Schweizer Seite sind keine Ausbrüche von VHS in den Fischbrutanstalten bei Coregonen beschrieben worden (Meier et al., 1991; Wahli et al., 1992; Knuesel et al., 2003). Enzmann et al. (1993b) konnten jedoch bei

45% von 120 gefischten Bodenseefelchen mittels Gegenstrom-Immunelektrophorese Antikörper gegen VHSV nachweisen.

Nach dem Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen nach Cannon and Roe (1990) beträgt in einem Bestand (N) von  $\infty$  Tieren und bei einem Stichprobenumfang (n) von 299 Individuen (bei 10.000 Tieren, 294 Individuen) die Wahrscheinlichkeit 95% um mindestens 1 infiziertes Tier zu erfassen. Ist unter den untersuchten Tieren kein infiziertes Tier, so ist die Prävalenz für eine nachweisbare Infektion in der Population geringer als 1%.

Grundsätzlich wäre eine subklinische Verlaufsform der VHS bei adulten Coregonen zu erwarten. Lediglich Coregonen-Brütlinge und Jungfische erkrankten nach experimenteller VHS-Infektion (Ahne et al., 1985; Meier et al., 1986; Skall et al., 2004). Mit zunehmendem Alter scheinen Coregonen aber eine Resistenz gegen eine VHS-Erkrankung zu entwickeln (Meier et al. 1994) und der Virusnachweis in der Zellkultur verläuft mit negativem Ergebnis (Skall et al., 2004).

Eine Präsenz von VHSV konnte bei den untersuchten laichreifen Felchen aus dem Bodensee nicht nachgewiesen werden. Die VHS als Erkrankung spielt bei Coregonen keine bedeutsame Rolle. Coregonen sind jedoch als potentielle „Virus-Carrier“ einzustufen.

### **5.2.1 Andere Fischarten aus dem Bodensee**

Eine Verbreitung der VHS unter den anderen beprobten Fischarten (Seesaibling, *Salvelinus alpinus*; Seeforelle, *Salmo trutta f. lacustris*; Hecht, *Esox lucius*) im Bodensee (siehe 3.1.2) konnte nicht nachgewiesen werden. Eine größere, repräsentativere Stichprobe wäre allerdings notwendig, um eine fundiertere Aussage über die Prävalenz von VHSV, IHNV und auch IPNV im Bodensee machen zu können.

### **5.3 Die Virusemission aus infizierten Fischhaltungsbetrieben und die Verbreitung der VHS in einem Fließgewässer**

Durch den Einsatz von Hälterkästen unterhalb und oberhalb der Auslassstellen von infizierten Fischhaltungsbetrieben sollten praktische Erkenntnisse hinsichtlich der Virusemission aus infizierten Anlagen gewonnen werden (Feldversuche 3.1.3 & 3.1.5). Es sollte untersucht werden, ob durch aufsteigende Wildfische Virus stromaufwärts verschleppt und eine Übertragung auf naive Versuchsregenbogenforellen in Hälterkästen erfolgen kann.

Mit den Sanierungsmaßnahmen bei einem VHS infizierten Betrieb am Bach D war es möglich, die gesamte Salmonidenpopulation im Bach D im Bereich der Anlage bis zur Mündung in Fluss E elektrisch abzufischen und virologisch zu untersuchen (siehe 3.1.6). Durch eine weitere elektrische Abfischung an dem Zulaufkanal an Fluss E unterhalb der Einmündungsstelle von Bach D konnten 18 Tage später weitere Forellen, insbesondere „wilde“ Regenbogenforellen, virologisch beprobt werden.

#### **5.3.1 Der fischverarbeitende Betrieb am Fluss A**

Zum Zeitpunkt der Beprobungen nach §5 der Fischseuchen-Verordnung konnte in dem fischverarbeitenden Betrieb wiederholt VHSV nachgewiesen werden (siehe 3.1.3). Der Betrieb hält die lebenden Fische für wenige Tage zwischen bis diese geschlachtet und verarbeitet werden. Während der Zeit von Dezember 2003 bis März 2003 wurden ca. 13 t Regenbogen- und Lachsforellen, 3 t Saiblinge und etwa 3,5 t Karpfen, Welse und Störe verarbeitet. In über 60 Lieferungen wurden Fische unbekannter Herkunft von Fischhändlern und Großbetrieben angeliefert.

In dem Versuch mit vier Hälterkästen (siehe 3.1.3.2) an der Mündung von Fluss A infizierten sich die Versuchsforellen in den Hälterkästen mit der IHN. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass für die IHN-Infektion der Versuchsfische beim Feldversuch mit vier Hälterkästen an der Flussmündung (**Wb39, Wb40, Wb42, Wb101**, siehe 4.3.2.2) der fischverarbeitende Betrieb verantwortlich ist. Im Versuchszeitraum von Dezember 2003 bis März 2004 konnten bei den zwei Kontrolluntersuchungen in dem Verarbeitungsbetrieb nach §5 Fischseuchen-Verordnung jedoch kein IHNV nachgewiesen werden.

Ein anderer Übertragungsweg für die IHN- Infektion wäre über den Kontakt mit Wildfischen aus dem Bodensee denkbar. Die Landesfischereiverordnung Baden-Württembergs verbietet zwar den Besatz von Regenbogenforellen in den Bodensee-Zuflüssen, dennoch existieren im Bodensee in geringem Maße Regenbogenforellen als einzige bekannte für IHN empfängliche Fischart. Coregonen (*Coregonus* spp.), Saiblinge (*Salvelinus* spp.), Hechte (*Esox lucius*) und Bachforellen (*Salmo trutta*) werden nicht als IHN empfängliche Fischarten im Aquatic Animal Health Code 2004 der OIE aufgeführt. Lediglich Bachforellen- (LaPatra & Fryer, 1990) und Hechtbrut (Dorson et al., 1987) lassen sich experimentell infizieren. Diese Kenntnis ist sicherlich auf die im Bodensee heimische Seeforelle (*Salmo trutta forma lacustris*) übertragbar. In den epidemiologischen Untersuchungen über die IHN in Frankreich (Hattenberger-Baudouy et al., 1995) konnten bei Bachforellen (*Salmo trutta*) in den IHN infizierten Anlagen und bei Elektroabfischungen der angeschlossenen Fließgewässer weder IHNV isoliert, noch Antikörper gegen IHNV serologisch nachgewiesen werden. Damit spielt die Bachforelle für die IHN sehr wahrscheinlich keine bedeutsame Rolle.

Es besteht die theoretische Möglichkeit der Übertragung von IHNV durch infizierten wildlebenden Regenbogenforellen auf die Versuchsforellen in den Hälterkästen an der Mündung von Fluss A oder es existierte eine weitere unbekannte IHNV-Emissionsquelle. Jedoch verfestigt sich der Verdacht, dass durch die Einleitung von IHNV durch den verarbeitenden Betrieb eine Infektion der Versuchs-Regenbogenforellen 650 m flussabwärts verursacht wurde. Wäre die IHN endemisch im Gewässer von Fluss A und Bodensee, hätte man auch mit einem IHN- positiven Ergebnis am Fischaufstieg 1530 m oberhalb der Mündung rechnen können, da dort eine Engstelle für aufsteigende Wildfische bestand und ein Kontakt mit den dortigen Versuchsfischen stattfinden musste.

Das virologische Untersuchungsergebnis (siehe 4.3.2.2) bestätigt die höhere Sensitivität der RT-PCR mit anschließender seminested PCR (4 positive Proben: **Wb39**, **Wb40**, **Wb42** und **Wb101**) gegenüber der Virusanzucht in der Zellkultur (1 positiver Nachweis: **Wb42**) (Bergmann et al., 2002a) im praktischen Einsatz.

### 5.3.2 Virusemission aus dem VHS infizierten Betrieb an Bach B

Der betroffene Forellenhaltungsbetrieb wurde im Nebenerwerb betrieben und hatte sich die VHS im Frühjahr 2002 durch Regenbogenforellen von einem Fischhändler eingeschleppt. Im Winter 2002/2003 (**FV10/03**) sowie im Winter 2003/2004 (**FV84/03**) wurde die VHS klinisch und virologisch erneut amtlich festgestellt. Die Betreiber der Anlage kauften regelmäßig speisereife Regenbogenforellen ein, um diese frisch geschlachtet oder geräuchert an die Kundschaft zu vermarkten. Nach dem erstmaligen Ausbruch der VHS wurden die Fische nur noch aus einer zugelassenen Fischzucht bezogen.

Der Bach B (siehe Karte 2) hat einen Oberlauf von ca. 3,94 km und der kleinere Bach C (3,91 km Bachstrecke) mündet 220 m oberhalb vom Auslaß der Anlage in Bach B. Bachaufwärts beider Bäche existieren keine oberliegende Fischhaltungen. Vorwiegende Fischart in diesem Gewässersystem ist die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*); weiterhin gibt es nach Auskunft des Fischwaspächters Groppen (*Cottus gobio*) und Bachneunaugen (*Lampetra planeri*). Ein Besatz mit Bachforellen in Bach B wurde zuletzt im Frühjahr 2001 durchgeführt. Die Besatzfische stammten aus einem im EU-Zulassungsverfahren befindlichen und vom Fischgesundheitsdienst betreuten seuchenfreien Quellwasserbetrieb. Die Populationsdichte der Bachforellen in diesem Gewässer konnte als gering eingestuft werden.

#### 5.3.2.1 Feldversuch an Bach B 2003

In dem Feldversuch 2003 (siehe 3.1.5.1 & 4.5.1) konnte dargestellt werden, wie effektiv die Übertragung von VHSV durch den Vektor Wasser ist. Die Distanz des Ablaufkanals zwischen Ablauf der Anlage und der Einleitungsstelle in den Bach B (Auslaß) betrug 126 m. Bereits nach 20 Tagen Versuchsdauer konnte bei den Versuchsforellen in Hälterkasten Nr. 2 am Auslaß der Ausbruch der VHS klinisch festgestellt werden. Aus allen drei Organpools dieser Versuchsfische (**Wb48** bis **Wb50**) konnte das identische VHSV aus der infizierten Anlage nachgewiesen werden.

#### 5.3.2.2 Feldversuch an Bach B 2004

Im ausgebauten Feldversuch 2004 (siehe 3.1.5.2 & 4.5.2) konnte das Ergebnis vom Versuch 2003 reproduziert werden. Aus allen Proben (**Wb88** bis **Wb90**) aus dem Hälterkasten Nr. 4 am Auslaß konnte VHSV isoliert werden. Weiterhin gelang es, das

identische VHSV aus der Anlage bereits nach der Probennahme am Versuchstag 21 bei 5 Versuchsfischen (**Wb91**) (Hälterkasten Nr. 3) 640 m unterhalb vom Auslaß der Anlage nachzuweisen.

Zudem konnte aufgezeigt werden, dass eine VHS- Infektion bachaufwärts verbreitet werden kann. Das bei der Probennahme von 5 Versuchsforellen nach 21 Tagen aus dem Hälterkasten Nr. 1 (220 m oberhalb vom Auslaß) isolierte VHSV (**Wb86**) hatte zwei Punktmutationen auf dem G-Gen. Dieser VHS-Stamm konnte nicht durch abfließendes Wasser aus der Anlage auf die Versuchsfische übertragen worden sein. Die Infektion musste über einen anderen Vektor stattgefunden haben. Der Hälterkasten Nr. 1 befand sich an einer Stelle, die nach Aussage des Fischwasserpächters gut zum Fischen geeignet war. Während der Versuchszeit wurde vom Fischwasserpächter der Kontakt der Versuchsfische mit wildlebenden Bachforellen an dieser Stelle bestätigt. Es erscheint am wahrscheinlichsten, dass die Übertragung einer in der Bachforellenpopulation vorhandenen VHSV- Mutante auf die Versuchsfische im Hälterkasten gelungen sein könnte. Der an die Regenbogenforelle adaptierte, aus der Anlage isolierte VHS-Stamm (Isolate **FV10/03** & **FV84/03**) erfuhr über den Zeitraum vom Winter 2002/2003 bis zum Winter 2003/2004 in der Regenbogenforellenpopulation keine Mutation des Glykoprotein-Gens. Die Glykoproteine der Virushülle (Envelope) von Rhabdoviren vermitteln die Adsorption der Viruspartikel an bestimmte zelluläre Strukturen der Wirtszelle, um anschließend in die Zelle gelangen zu können (Penetration) (Modrow et al., 2003). Aus evolutionärer Sicht erscheint es sinnvoll, dass Virus-Mutanten, die besser an eine neue Spezies angepasst sind, sich bei der neuen Art etablieren. Ein solches Geschehen könnte im Verlauf durch die permanente Virusemission aus der VHS infizierten Anlage in das Gewässersystem passiert sein. Im Zusammenhang mit der Evolution der VHS wird die Adaptation von marinem VHS an die Regenbogenforelle durch Mutation bereits diskutiert (Skall et al., 2004). Das Glykoprotein von VHSV besteht aus 507 Aminosäuren (Schütze et al., 1999). Einer-Jensen et al. (2004) errechneten für Süßwasser-Isolate eine Codon-Substitutions-Rate von bis zu  $1,74 \times 10^{-3}$  Substitutionen im G-Gen pro Jahr. Rechnerisch würden so 1 Codon in 0,88 Jahren bzw. 1,13 Codone pro Jahr ausgetauscht werden. Die Höhe einer Substitutions-Rate ist abhängig von der Populationsdichte. Je höher die Populationsdichte, desto schneller treten Mutanten auf.

Diese Erkenntnis gibt es auch bei phylogenetischen Untersuchungen zur IHN aus Nordamerika (Kurath et al., 2003).

In Anlehnung an die aufgeführten Berechnungen nach Einer-Jensen et al. (2004) erscheint das Auftreten einer Mutante (**Wb86**) in diesem Gewässersystem mit Substitution eines einzelnen Codons in dem zeitlichen Rahmen durchaus wahrscheinlich.

### **5.3.3 Elektroabfischungen im Bereich des VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes am Bach D und im Zulaufkanal bei Fluss E**

Die Untersuchung über die Eintragung der VHS in den Fischhaltungsbetrieb ergab, dass aller Wahrscheinlichkeit nach VHSV über kontaminierte Gerätschaften bzw. ein kontaminiertes Transportfahrzeug in die Anlage gelangen konnte. Die gelieferten Forellen stammten zwar aus einer EU zugelassenen Anlage, das Transportfahrzeug hatte zuvor jedoch mehrere Betriebe angefahren.

Das erste und das letzte amtliche VHS-Isolat (**FV37/03** vom Mai 2003; **FV74/03** vom Oktober 2003) aus dem Betrieb erfuhren keine genetische Mutation im G-Gen. Nach dem Wiederausbruch der VHS 2004 (**FV37/04** und **FV50/04**, Anfang und Ende Mai 2004) zeigten die Isolate eine einzelne Punktmutation auf dem G-Gen. Es ist anzunehmen, dass die Ursache für den Wiederausbruch der VHS im Mai 2004 eine unzureichende Desinfektion im Februar 2004 gewesen ist. Eine Reinfektion durch die Wildfischpopulation kann zwar nicht ganz ausgeschlossen werden, da aber ein kleines Wehr die Wasserentnahmestelle von den Wasserauslassstellen trennt, ist diese Möglichkeit weit weniger wahrscheinlich.

Es überraschte sehr, dass durch die Elektroabfischungen im Bach D (siehe 3.1.6.1 / 4.6.2) und 18 Tage später unterhalb im Zulaufkanal am Fluss E (siehe 3.1.6.2 / 4.6.3) bei der Beprobung von 452 + 7 Bachforellen und 22 + 28 Regenbogenforellen kein VHSV angezüchtet werden konnte. Lediglich bei den abgefischten Regenbogenforellen auf Höhe der Anlage konnte mittels VHS-PCR ein spezifisches PCR-Produkt erzeugt werden. Das 444 bp große PCR- Amplifikat zeigte zwei, zu den Virusisolaten von 2003 und 2004, differente Punktmutation. Es kann nicht genau beantwortet werden, ob nach vielfacher Amplifikation und anschließender Aufreinigung bei der Sequenzierung

einzelne Fehler in der Nukleotidsequenz auftreten können. Unabhängig davon ist jedoch die Verwandtschaft zu den VHSV-Isolaten aus der Anlage eindeutig gegeben.

Die magere virologische Ausbeute muss mit der grenzwertig hohen Wassertemperatur über den Sommer hinweg erklärt werden. Ein klinisches Seuchengeschehen konnte in der Anlage bis Mitte Juli beobachtet werden. Bei der virologischen Beprobung (FV62-1/04 bis -4/04) der letzten Fische zu Sanierungsbeginn im September 2005 konnte virologisch kein VHSV nachgewiesen werden. Die tagesrhythmischen Temperaturschwankungen eines raschen und gut beschatteten Baches des Hochlandes im Sommer betragen nach Dyk (1940) etwa 3 bis 4°C (aus Konrad, 1986). In einem Infektionsversuch mit Regenbogenforellen bei andauernden Temperaturschwankungen (8°C bis 15°C) wurde deutlich, dass eine VHS-Erkrankung weitaus weniger schwer und mit geringerer Mortalität und teilweise auch inapparent verläuft. Die dabei ermittelten Virustiter aus den Seren der Versuchsforellen waren bei diesem Versuch deutlich geringer als bei Versuchen mit 15°C Wassertemperatur und weniger (Konrad, 1986).

Weiterhin ist davon auszugehen, dass die freilebenden Bach- und Regenbogenforellen zum Zeitpunkt der elektrischen Befischungen bereits eine Immunität gegen die VHS aufbauen konnten. Der Wiederausbruch der VHS in der Anlage bestand im September bereits seit über 4 Monate. Mit der zusätzlichen Entnahme von Gehirnmaterial hätte der Anteil positiver VHS Proben ggf. erhöht werden können (Neukirch, 1986).

Die pathologisch-anatomischen Befunde bei den abgefischten Forellen in Form von kleinen Blutungen in den verschiedenen Organen sind als Folge der elektrischen Einwirkungen zu erklären (Bretzinger, 2001).

#### **5.4 Virusemission im Ablaufwasser des fischverarbeitenden Betriebes nach dreistufiger Reinigung in einer Kläranlage**

Beim Schlachtvorgang virusinfizierter Fische gelangt viruskontaminiertes Wasser über die Kanalisation in eine Kläranlage und nach dem Klärprozess potentiell wieder ins Wildgewässer. In diesem Versuch sollte beleuchtet werden, inwiefern eine Infektion mit den Fischviren auf naive Versuchsforellen durch das geklärte Ablaufwasser möglich ist.

Bei der Schlachtung von Fischen in dem fischverarbeitenden Betrieb wurden nach der elektrischen Betäubung der Fische die Bauchhöhlen eröffnet und mit einer Schlachthilfe

die Bauchorgane mit Unterdruck abgesaugt und am Schlund abgetrennt. Die Fischkonfiskate wurden in der Tierkörperbeseitigungsanlage entsorgt. Verbliebene Reste von Nierengewebe ventral der Wirbelsäule wurden mit einer rotierenden Auswaschbürste entfernt und ausgewaschen. Mit der Schlachtung von VHSV, IHNV oder auch IPNV infizierten Salmoniden wurden aus den Erfolgsorganen große Mengen an Virus direkt freigesetzt. Die Schlachtabwässer sowie Wasser für die Reinigung der Maschinen, Geräte, sonstiger Oberflächen und Böden gelangten über die Kanalisation zur Kläranlage.

Die Schlachtabwässer aus dem Fischverarbeitungsbetrieb erfuhren in der Kanalisation bereits eine enorme Verdünnung. Durchschnittlich wurden während des Fischversuchs täglich 18.920 m<sup>3</sup> bzw. 219 l/s Abwasser im Zulauf der Kläranlage gemessen (siehe Abbildung 2). Das Abwasser im Zulauf floss durch einen Grob- und Feinrechen in den Sandfang. Größere Partikel wurden dort entfernt. Im folgenden Vorklärbecken floss das Wasser sehr langsam damit Fäkalstoffe sich absetzen konnten. Etwa 30% der organischen Belastung konnten hier entfernt werden. Der angefallene Primärschlamm gelangte nach Voreindickung in den Faulturm und verbleibt dort etwa 50 Tage bei 37°C im anaeroben Milieu. Der Schlamm aus dem Turm wurde eingedickt und in einer Zentrifuge entwässert. Das entstandene Zentrat-Wasser wurde zurück ins Vorklärbecken geleitet. In der nächsten Stufe im Belebungsbecken wurden durch Belüftung des Abwassers gelöste Abwasserinhaltsstoffe durch Bakterien­schlämme biologisch abgebaut. Durch zugesetztes Fällmittel wurden Phosphat ausgefällt und die Absetzeigenschaften der Bakterien­schlämme im Nachklärbecken verbessert. Der Überlauf im Nachklärbecken gelangte in den Ablauf der Kläranlage.

Ahne (1982) konnte zeigen, dass VHSV im Flusswasser oder im Teichschlamm suspendiert bei niedriger Temperatur deutlich länger infektiös bleibt als im reinen Trinkwasser. Yoshinaka et al. (2000) demonstrierten die Fähigkeit der Adsorption von IHNV an nicht organische Stoffe und einer damit verbundenen erhöhten Tenazität. Es kann somit vermutet werden, dass für wasseradaptierte Rhabdoviren eine Adsorption auch an organisches Material mit einer Erhöhung der Tenazität möglich ist und ggf. auch VHSV oder IHNV den Klärprozess in einer Kläranlage in infektiösem Zustand überstehen können. Für andere Virustypen ist dies bekannt (Fleischer et al., 2000).

Bei den im Ablaufwasser gehaltenen Fischen waren die negativen Ergebnisse der virologischen Untersuchungen (**Wb51** bis **Wb56**, siehe 4.4.3) aufgrund des hohen Verdünnungseffektes und des dreistufigen Klärprozesses zu erwarten. Weitere experimentelle Versuche wären nötig, um dieses Thema detaillierter zu untersuchen. Erfreulicherweise war es völlig unproblematisch, die Versuchsforellen in dem unverdünnten mit Luftsauerstoff angereicherten Ablaufwasser für einen Zeitraum von 62 Tagen zu halten, obwohl der Anteil des toxischen Ammoniaks ( $\text{NH}_3$ ) im Ammonium-Stickstoffgehalt ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) sich oftmals im grenzwertigen Bereich befand. Durch den leicht alkalischen pH-Wert des Ablaufwassers lag das Dissoziationsgleichgewicht des Fischgiftes salpetrige Säure ( $\text{HNO}_2$ ) auf Seiten des unproblematischen Nitrits ( $\text{NO}_2^-$ ). Bei der Sektion der im Ablaufwasser gehälteren Fische zeigte sich, dass pathologisch-anatomische Veränderungen in Form von unspezifischen, leichten Entzündungsreaktionen, vereinzelt mit einer lokalen, abszedierenden Infektion im Nierengewebe doch zu finden waren. Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen Folgen der Wasserqualität und des hohen Keimdrucks im Ablaufwasser waren (Höger et al., 2004).

## 5.5 Die Bedeutung der VHS bei der Bachforelle

Die Bachforelle (*Salmo trutta*) ist als VHS empfängliche Fischart gegenüber einer VHS- Erkrankung sehr widerstandsfähig. Sie erkrankt nach Infektion inapparent (Konrad, 1986), lediglich Bachforellenbrut und kleine Setzlinge zeigen ggf. klinische und pathologisch-anatomische Veränderungen einer VHS-Erkrankung (de Kinkelin & LeBerre, 1977). Ob die Pathogenität eines VHSV wirklich abhängig ist vom Serotyp sei an dieser Stelle angezweifelt. Möglicherweise hängt die Virulenz eines VHSV-Stammes eher von der Adaptation an die Wirtsspezies ab (Neukirch, 1991; Snow & Cunningham, 2000). Es erscheint vielmehr, dass Bachforellen eine Altersresistenz gegen die Ausbildung einer VHS-Erkrankung entwickeln und die Virulenz des VHSV für Bachforellenbrut und kleine Setzlinge abhängig von der Anpassung an die Spezies ist. Nach der Infektion über das Wasser repliziert sich das Virus im Zielgewebe, der Virustiter im Fischserum erreicht aber längst nicht die Höhe wie bei Regenbogenforellen (Konrad, 1986). Die erregerbedingten Läsionen im Wirtsgewebe sind pathophysiologisch damit weniger folgenschwer und die Ausscheidung von VHSV

weniger hoch. Nach etwa 3 Wochen kommt es zur Serokonversion (Enzmann & Konrad, 1993). Auch wenn nach Ausbildung einer gewissen Immunität der Virusnachweis nicht mehr möglich ist, muss dennoch davon ausgegangen werden, dass manche Fische persistent infiziert bleiben (Neukirch, 1986). Die Bachforelle hat ihre größte Bedeutung als stummer Virusträger und Virusreservoir. Dass eine Übertragung von VHSV auch im Feldversuch auf die naive Regenbogenforellen möglich erscheint, konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden.

## **5.6 Die VHS und IHN und ihre epidemiologische Bedeutung für die Wildfischpopulation und die Fließgewässer**

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die Emission von VHSV oder IHNV über das abfließende Wasser infizierter Anlagen epidemiologisch sehr bedeutsam ist und die infektiöse Dosis hoch genug ist, um mehrere hundert Meter unterhalb von kleinen und mittelgroßen Fließgewässern Versuchsfische in Hälterkästen zu infizieren. Je länger die Virusemission aus einer Anlage besteht, desto weiter kann sich die Erkrankung in einem Gewässereinzugsgebiet verbreiten und etablieren.

Der Anteil hochempfindlicher Fischarten und die Fischdichte in der Wildfischpopulation sind sehr wahrscheinlich miteinscheidend, ob die VHS oder IHN in einem Wassereinzugsgebiet endemisch werden. Vergleicht man die Situation in Nordamerika, so befinden sich in den IHN- Endemiegebieten hochempfindliche Fischarten, die tatsächlich auch an der Seuche mit hoher Mortalität erkranken. Es ist davon auszugehen, dass die Sanierung eines VHS infizierten Gewässers mit einer Population an hochempfindlichen Regenbogenforellen viel schwieriger zu bewältigen ist, als in einem Gewässer in dem lediglich inapparent infizierbare Bachforellen vorkommen. Enzmann (1989) ermittelte für ein VHS infiziertes Fließgewässer einen Zeitraum von 4 Jahren bis die Infektionskette bei der Bachforellenpopulation abbrechen konnte. Ob ein Abriss der Infektionskette in einer Population mit hochempfindlichen Fischarten möglich ist, erscheint fraglich.

Bei andauernder Virusexposition in einem Gewässersystem ist damit zu rechnen, dass eine Adaptation des Virus auch an weniger empfindliche Arten möglich wird und sich mit erhöhter Virulenz bei diesen Arten etabliert (Neukirch, 1991; Snow & Cunningham, 2000). Diese Hypothese stützt sich auch die Erkenntnis, dass sehr wahrscheinlich in den

50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts durch die Verfütterung von unerhitzten Seefischabfällen einem VHSV-Stamm marinen Ursprungs der Artensprung auf die Regenforelle gelungen ist (Dixon, 1999).

Mit dem nach der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) 2000/60/EG geplanten Abbau von künstlichen Aufstiegshindernissen in unseren heimischen Oberflächengewässer wird die akute Fischseuchenbekämpfung und die Vermeidung von Virusemissionen aus infizierten Betrieben immer bedeutsamer. Bäche und Flüsse sind nicht mehr durch Aufstieghindernisse in ökologisch separate Abschnitte unterteilt, so dass größere Laichwanderung von Salmoniden u. a. Fischarten möglich werden. Mit der Wiederansiedlung des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) in unseren Flüssen und den großen Strömen Deutschlands könnte das IHNV als endemische Erreger Bedeutung erlangen, da der Atlantische Lachs eine hochempfindlich Fischart für IHNV ist und mit hoher Mortalität auch daran erkrankt (St-Hilaire et al., 2001).

Es gilt zu verhindern, dass sich Virus in der Wildfischpopulation adaptiert und etabliert. Daher ist es Aufgabe der Fischseuchenbekämpfung, in Fischhaltungsbetrieben die Virusemission in die Umwelt rasch und mit Nachdruck abzustellen. Unterliegende Fischhaltungsbetriebe und ggf. auch die Wildfischpopulation müssen in die Bekämpfungsmaßnahmen miteinbezogen werden. Letztendlich sind die Seuchenfreiheit und die Gesundheit der Fische für die Produktion eines in Aquakultur erzeugten, qualitativ hochwertigen und konkurrenzfähigen Lebensmittels entscheidende Wirtschaftlichkeitsfaktoren und für Teichwirtschaften mittel- bis langfristig unabdingbar.

Das wirtschaftliche Interesse von Fischverarbeitungsbetrieben setzt andere Schwerpunkte. Durch die Hälterung schlachtreifer Fische bis zur Verarbeitung ist es den Betrieben möglich, eine hohe an den Markt angepasste Flexibilität zu gewährleisten und stets frische Ware liefern zu können. Aus Sicht der Fischseuchenbekämpfung ist in solchen Betrieben zumindest die rasche Verwertung ansteckungsverdächtiger Fische aus Seuchenanlagen gegeben. Eine Möglichkeit zur Vermeidung der Virusemission aus solchen Anlagen in das angeschlossene Gewässersystem bestünde in der Entkeimung des Ablaufwassers aus den Hälterungen durch die Behandlung mit UVC-Strahlung

(Øye & Rimstad, 2001). Zur Entkeimung humanpathogener Erreger im Ablaufwasser von Kläranlagen gibt es solche technischen Lösungsansätze bereits (ATV, 1998).

## **5.7 Die Wildfischpopulation und ihre seuchenhygienische Bedeutung für die Aquakultur**

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Übertragung von VHSV auf Versuchsfische über die Wildfischpopulation in einem Endemiegewässer als durchaus möglich erscheint (siehe 5.3.2.2). Es werden in der Fachliteratur die Faktoren diskutiert, die dazu führen können, dass ein klinischer Ausbruch stattfindet oder sich verzögert (Enzmann, 1989; Hoffmann, 2005). Damit sich ein seuchenfreier naiver Regenbogenforellenbestand in einer Teichwirtschaft durch Wildfische infizieren lässt, muss Virus in einer ausreichend hohen infektiösen Dosis bis zu den Fischen in die Anlage gelangen. Geht die Infektion bei einem einzelnen Fisch in der Anlage an, kann die Infektionskette auf den Bestand weitergetragen werden. Dabei sind die Höhe der Virusausscheidung durch die „Wildfische“ und die Distanz zum Bestand in der Anlage wichtige Faktoren. Ein Risiko durch infizierte Fischarten, die einen hohen Virusgehalt im Gewebe replizieren und ausscheiden (z. B. Regenbogenforelle) ist bedeutend höher zu bewerten als durch Fischarten (z. B. Bachforelle), die subklinisch erkranken, keine patente Infektion entwickeln und auch weniger Virus ausscheiden. Das Rechensystem im Zulauf einer Bachwasseranlage ist der wichtigste Schutz um ein Eindringen von Wildfischen in die Anlage zu vermeiden. Es muss derart konstruiert sein, dass keine Fische, auch keine Jungfische, in die Anlage gelangen können.

Besatzfische sollten ausschließlich aus gesunden und kontrolliert virusnegativen Betrieben stammen um den Eintrag von Virusträgern in Gewässer zu unterbinden. Durch den Verzicht des Besatzes mit hochempfindlichen Fischarten, wie der Regenbogenforelle, wird die Gegenwart eines hocheffektiven Virusträgers im Gewässersystem vermieden. Dies schließt entwichene Regenbogenforellen aus der Speisefischproduktion von Fischzuchten mit ein.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die epidemiologische Bedeutung der Virusemission aus VHS oder IHN infizierten Fischhaltungsbetrieben untersucht. In einem Feldversuch konnten Versuchsregenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus einem Hälterkasten, der 640 m unterhalb der VHS infizierten Anlage installiert war, mit dem identischen Virusstamm angesteckt werden. An einem anderen Fließgewässer konnte 650 m flussabwärts eines Fischverarbeitungsbetriebes bei Versuchsregenbogenforellen in Hälterkästen IHNV isoliert werden. Dem Fischverarbeitungsbetrieb wurden regelmäßig infizierte Fische geliefert, die bis zur Schlachtung in mit Flusswasser versorgten Hälterungen gehalten wurden. In einem Endemiegewässer gelang die Übertragung von VHSV, vermutlich durch wildlebende Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*), 220 m bachaufwärts der Einleitungsstelle eines VHS infizierten Fischhaltungsbetriebes auf Versuchsforellen in einem Hälterkasten.

Im Rahmen von Sanierungsmaßnahmen eines großen VHS infizierten Bachwasserbetriebes wurde das betroffene Fließgewässer im Spätsommer elektrisch abgefischt. Hierbei konnten zum Zeitpunkt der Befischung lediglich noch bei „verwilderten“ Regenbogenforellen mittels RT-PCR ein VHSV spezifischer Genabschnitt nachgewiesen werden.

Durch die Sequenzierung der Virusisolate konnte demonstriert werden, dass in infizierten Anlagen und im angeschlossenen Gewässersystem Mutationen bei VHSV auftraten.

In weiteren epidemiologischen Untersuchungen wurden im Rahmen der Laichfischerei 300 laichreife Bodenseefelchen (*Coregonus lavaretus*) sowie weitere Organproben von gefischten Felchen (*Coregonus* spp.), Seeforellen (*Salmo trutta f. lacustris*), Hechten (*Esox lucius*) und Seesaiblingen (*Salvelinus alpinus*) aus dem Bodensee virologisch untersucht. Es konnte kein VHSV oder IHNV nachgewiesen werden.

In einem Versuch im Ablaufwasser einer Kläranlage wurden nach Sauerstoffanreicherung Regenbogenforellen-Setzlinge (*Oncorhynchus mykiss*) gehalten. Der Kläranlage wurden die potentiell infektiösen Schlachtabwässer des bereits

---

erwähnten Fischverarbeitungsbetriebes zugeführt. Nach der 62-tägigen Exposition mit dem geklärten Abwasser konnte gezeigt werden, dass VHSV oder IHNV den dreistufigen Klärprozess offensichtlich nicht infektionstüchtig überstehen.

## 7 Summary

### **Epidemiological studies on Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) and Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN) in the Southwest of Germany**

The purpose of this thesis has been to research the epidemiological importance of virus emission from fish farms infected by Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) or Infectious Haematopoietic Necrosis (IHN). In a field experiment rainbow trout were encaged 640 m below a VHS-infected farm. The rainbow trout were infected by the virus identical to the farm isolate. In an other watercourse IHN-Virus was isolated from experimental rainbow trout in water cages 650 m downstream a fish processing plant, which was regularly supplied with infected fish. In an endemic stream the transmission of VHS-Virus to experimental encaged trout succeeded, presumably through wild brook trout (*Salmo trutta f. fario*), 220 m upstream the discharge position of an VHS-infected fish farm.

In the course of eradication of VHS-Infection in a large fish farm, the supplying brook was completely electrically fished in the late summer. A specific VHSV gene sequence could only be detected by means of RT-PCR in feral rainbow trout.

By sequencing the virus isolates it was possible to demonstrate mutations of VHSV in infected farms and the connected watercourse-system.

Furthermore, during the spawning-fishery epidemiological studies, 300 sexually mature white fish (*Coregonus lavaretus*), as well as on further organ samples of fished white fish (*Coregonus* spp.), lake trout (*Salmo trutta f. lacustris*), pike (*Esox lucius*) and arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from Lake Constance were virologically examined. Neither VHSV nor IHNV were detected.

Rainbow trout fingerlings were exposed to cleaned and oxygenated sewage effluent for 62 days. Potential infectious waste water from slaughtering of the above-mentioned fish processing plant was introduced to the sewage plant. VHSV or IHNV obviously do not endure the three-stage sewage treatment in infectious condition.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BA	Beta-Aktin
Bf	Bachforelle ( <i>Salmo trutta forma fario</i> )
BF-2	Bluegill Fry -2 (-Zellen)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cpE	cytopathischer Effekt
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EPC	Epithelioma Papuloma Cyprini (-Zellen)
ERM	Enteric Redmouth Disease (Rotmaulseuche)
FHM	Fathead Minnow (-Zellen)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GIE	Gegenstrom-Immunelektrophorese
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin

---

IHN(V)	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (Virus)
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenz-Test
IPN(V)	Infektiöse Pankreasnekrose (Virus)
ISA	Infectious Salmon Anaemia (Infektiöse Anämie der Lachse)
KHV	Koi-Herpesvirus
KuKo	Kulturkontrolle(n)
LW	Negativkontroll-Leerwert
M	molare Masse (Molmasse)
mAK	monoklonale Antikörper
OIE	Office International des Epizooties
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFR	Pike-Fry-Rhabdovirus
PK	Positivkontrolle(n)
PNT	Plaque-Neutralisationstest
Rf	Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )
RT	Reverse Transkription
RTG-2	Rainbow Trout Gonad -2 (-Zellen)
SNT	Serum-Neutralisationstest
STUA	Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt
SVC(V)	Spring Viremia of Carp (Virus)
T	Thymin
TSN	Tierseuchennachrichten-System
VHS(V)	Virale Hämorrhagische Septikämie (Virus)
VZ	Virusanzüchtung

## 8.2 Abkürzungssymbole für Aminosäuren

<u>Symbol</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Aminosäure</u>
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

### 8.3 Alignment der VHS-Isolate von den Feldversuchen an Bach B 2003 und 2004

```

                10                30                50
FV10/03      ATGGAATGGAACTTTTTTCTGGTGATCTTGATCATCATCATAAAGAGCACCACACCA
WB48-03      .....
WB49-03      .....
FV84/03      .....
WB86-04      .....G.....
WB88-04      .....
WB97-04      .....

FV10/03      M E W N T F F L V I L I I I I K S T T P
WB48-03      . . . . .
WB49-03      . . . . .
FV84/03      . . . . .
WB86-04      . . . . .A.....
WB88-04      . . . . .
WB97-04      . . . . .

                70                90                110
FV10/03      CAGATCACTCAACGACCTCCGGTCGAAAACATCTCGACGTACCATGCAGACTGGGACACT
WB48-03      .....
WB49-03      .....
FV84/03      .....
WB86-04      .....
WB88-04      .....
WB97-04      .....

FV10/03      Q I T Q R P P V E N I S T Y H A D W D T
WB48-03      . . . . .
WB49-03      . . . . .
FV84/03      . . . . .
WB86-04      . . . . .
WB88-04      . . . . .
WB97-04      . . . . .

                130                150                170
FV10/03      CCGCTATACACTCATCCCTCCAAGTGCAGGGACGATTCCTTTGTCCCGATTCGACCGGCT
WB48-03      .....
WB49-03      .....
WB50-03      .....
FV84/03      .....
WB86-04      .....
WB88-04      .....
WB97-04      .....

FV10/03      P L Y T H P S N C R D D S F V P I R P A
WB48-03      . . . . .
WB49-03      . . . . .
WB50-03      . . . . .
FV84/03      . . . . .
WB86-04      . . . . .
WB88-04      . . . . .
WB97-04      . . . . .

```















	1210	1230	1250
<b>FV10/03</b>	GACAAATTGATCATCCCGGACATCGAAAAGTATCAGAGTGTCTATGACAGTGGGAATGCTC		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	D K L I I P D I E K Y Q S V Y D S G M L		
WB48-03	. . . . .		
<b>FV84/03</b>	. . . . .		
WB86-04	. . . . .		
WB88-04	. . . . .		
WB97-04	. . . . .		
	1270	1290	1310
<b>FV10/03</b>	GTTCAAAGAAACCTTGTGGAAGTCCCTCATCTGAGCATTGTGTTCGTCTCCAACACATCT		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	V Q R N L V E V P H L S I V F V S N T S		
WB48-03	. . . . .		
<b>FV84/03</b>	. . . . .		
WB86-04	. . . . .		
WB88-04	. . . . .		
WB97-04	. . . . .		
	1330	1350	1370
<b>FV10/03</b>	GACCTTTCCTAATCACATCCACACCAACCTAATCCCTTCGGATTGGTCATTCAACTGG		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	D L S T N H I H T N L I P S D W S F N W		
WB48-03	. . . . .		
<b>FV84/03</b>	. . . . .		
WB86-04	. . . . .		
WB88-04	. . . . .		
WB97-04	. . . . .		

	1390	1410	1430
<b>FV10/03</b>	AGTCTTTGGCCATCATTATCGGGGATGGGGGTTGTGGGAGGGGCCCTCCTTCTACTGGTA		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	S L W P S L S G M G V V G G A L L L L V		
WB48-03	. . . . .		
<b>FV84/03</b>	. . . . .		
WB86-04	. . . . .		
WB88-04	. . . . .		
WB97-04	. . . . .		
	1450	1470	1490
<b>FV10/03</b>	CTCTGCTGTTGCTGCAAGGCGTCCCCTCCCATTCCAAATTACGGGATTCCGATGCAGCAG		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	L C C C C K A S P P I P N Y G I P M Q Q		
WB48-03	. . . . .		
<b>FV84/03</b>	. . . . .		
WB86-04	. . . . .		
WB88-04	. . . . .		
WB97-04	. . . . .		
	1510		
<b>FV10/03</b>	TTCTCCAGAAGTCAGATGGTCTGA		
WB48-03	.....		
<b>FV84/03</b>	.....		
WB86-04	.....		
WB88-04	.....		
WB97-04	.....		
<b>FV10/03</b>	F S R S Q M V *		
WB48-03	. . . . . *		
<b>FV84/03</b>	. . . . . *		
WB86-04	. . . . . *		
WB88-04	. . . . . *		
WB97-04	. . . . . *		

## 8.4 Alignment der VHS-Isolate aus dem Schwarzwald im Bereich des Fischhaltungsbetriebes am Bach D

```

1
FV37/03 ATGGAATGGAACACTTTTTTCCTGGTGATCTTGATCATCATCATAAAGAG
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

1
FV37/03 M E W N T F F L V I L I I I I K S
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

51
FV37/03 CACCACACCACAGATCACTCAACGACCTCCGGTCGAAAACATCTCGACGT
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

18
FV37/03 T T P Q I T Q R P P V E N I S T
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

101
FV37/03 ACCATGCAGACTGGGACACTCCGCTATACACTCATCCCTCCAACCTGCAGG
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

34
FV37/03 Y H A D W D T P L Y T H P S N C R
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

151
FV37/03 GACGATTCCTTTGTCCCGATTTCGACCGGCTCAACTCAGGTGTCCTCATGA
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

51
FV37/03 D D S F V P I R P A Q L R C P H E
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

201
FV37/03 ATTTGAAGACATAAACAAGGGACTGGTTTCCGTCCCAACCAGGATCATCC
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

68
FV37/03 F E D I N K G L V S V P T R I I
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

```

251  
 FV37/03 ATCTCCCGCTATCGGTCACCAGCGTCTCCGCGTAGCGAGTGGCCACTAC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24/04 .....

84  
 FV37/03 H L P L S V T S V S A V A S G H Y  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24/04 . . . . .

301  
 FV37/03 CTGCACAGAGTGACTTATCGAGTCACCTGTTTCGACCGGCTTCTTTGGAGG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....T.....

101  
 FV37/03 L H R V T Y R V T C S T G F F G G  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

351  
 FV37/03 GCAAACCATCGAAAAGACCATCTTGGAGGCGAAACTGTCCCGTCAGGAGG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

118  
 FV37/03 Q T I E K T I L E A K L S R Q E  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

401  
 FV37/03 CCTCAGACGAGGCAAGCAAGGATCACGAGTACCCGTTCTTCCCTGAACCC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

132  
 FV37/03 A S D E A S K D H E Y P F F P E P  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

451  
 FV37/03 TCCTGCATCTGGATGAAGGACAATGTCCATAAGGACATAA ACTCACTATTA  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

151  
 FV37/03 S C I W M K D N V H K D I T H Y Y  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

501  
 FV37/03 CAAGACCCCAAAAACCGTATCGGTGGATCTCTACAGCAGGAAATTTCTCA  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

168  
 FV37/03 K T P K T V S V D L Y S R K F L  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

551  
 FV37/03 ACCCTGATTTCATAGAGGGGGTTTGCACAACCTCGCCCTGTCAA ACTCAC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

184  
 FV37/03 N P D F I E G V C T T S P C Q T H  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

601  
 FV37/03 TGGCAGGGAGTCTATTGGGTTCGGTGACACACCCCAAAGCCCATTGCCCCAC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 .....

201  
 FV37/03 W Q G V Y W V G D T P K A H C P T  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . .

651  
 FV37/03 GCCAGAAACACTAGAAAGGACACCTGTTCCACCAGGACCCACGATCACAGGG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....  
 FV63-24 ..... **A** .....

218  
 FV37/03 P E T L E G H L F T R T H D H R  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .  
 FV63-24 . . . . . **E** . . . . .

701  
 FV37/03 TGGTCAAGGCAATTGTGGCAGGCCATCATCCCTGGGGACTCACAATGGCA  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

234  
 FV37/03 V V K A I V A G H H P W G L T M A  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

751  
 FV37/03 TGCACAGTGACATTCTGCGGGGAGCGTGGATTAAGACTGACCTGGGGGA  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** ..... **A** .....  
**FV50/04** ..... **A** .....

251  
 FV37/03 C T V T F C G G A W I K T D L G D  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . . **T** . . . . .  
**FV50/04** . . . . . **T** . . . . .

801  
 FV37/03 CCTGATCCAGGTGACAGGACCGGAGGGCAGGAAACTGACTCCAAACA  
 FV74/03 .....  
 FV37/04 .....  
 FV50/04 .....

268  
 FV37/03 L I Q V T G P E G T R K L T P N  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

851  
 FV37/03 AGTGTGTCAACACCGATGTCCAGATGAGGGGGCAACAGACGACTTCTCT  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

284  
 FV37/03 K C V N T D V Q M R G A T D D F S  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

```

901
FV37/03 TATCTCAACCATCTCATCACCAACATGGCTCAAAGAACCGAGTGCCTAGA
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

301
FV37/03 Y L N H L I T N M A Q R T E C L D
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

951
FV37/03 TGCCCATAGTGATATCACCGCTTCTGGGAAAGTATCCCATTTCTCCTCT
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

318
FV37/03 A H S D I T A S G K V S P F L L
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

1001
FV37/03 CAAAGTTTCGTCCCAGCCACCCTGGGCCTGGCAAGGCACACTATCTTCTC
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

334
FV37/03 S K F R P S H P G P G K A H Y L L
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

1051
FV37/03 GACGGCCAAATCATGCGAGGTGACTGTGACTATGAGGCAGTAGTCAGCAT
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

351
FV37/03 D G Q I M R G D C D Y E A V V S I
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

1101
FV37/03 CAACTACAATAGCGCTCAATACAAGACGGTGAACAACACATGGAAATCAT
FV74/03 .....
FV37/04 .....
FV50/04 .....

368
FV37/03 N Y N S A Q Y K T V N N T W K S
FV74/03 . . . . .
FV37/04 . . . . .
FV50/04 . . . . .

```

1151  
 FV37/03 GGAAACGGGTGGACAACAACACAGATGGGTACGATGGGATGATATTTGGG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

384  
 FV37/03 W K R V D N N T D G Y D G M I F G  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1201  
 FV37/03 GACAAATTGATCATCCCGGACATCGAAAAGTATCAGAGTGTCTATGACAG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

401  
 FV37/03 D K L I I P D I E K Y Q S V Y D S  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1251  
 FV37/03 TGGAATGCTCGTTCAAAGAAACCTTGTGGAAGTCCCTCATCTGAGCATTG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

418  
 FV37/03 G M L V Q R N L V E V P H L S I  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1301  
 FV37/03 TGTTTCGTCTCCAACACATCTGACCTTTCCACTAATCACATCCACACCAAC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

434  
 FV37/03 V F V S N T S D L S T N H I H T N  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1351  
 FV37/03 CTAATCCCTTCGGATTGGTCATTCAACTGGAGTCTTTGGCCATCATTATC  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

451  
 FV37/03 L I P S D W S F N W S L W P S L S  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1401  
 FV37/03 GGGGATGGGGGTTGTGGGAGGGGCCCTCCTTCTACTGGTACTCTGCTGTT  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

468  
 FV37/03 G M G V V G G A L L L L V L C C  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1451  
 FV37/03 GCTGCAAGGCGTCCCCTCCCATTCCAAATTACGGGATTCCGATGCAGCAG  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

484  
 FV37/03 C C K A S P P I P N Y G I P M Q Q  
 FV74/03 . . . . .  
**FV37/04** . . . . .  
**FV50/04** . . . . .

1501  
 FV37/03 TTCTCCAGAAGTCAGATGGTCTGA  
 FV74/03 .....  
**FV37/04** .....  
**FV50/04** .....

501  
 FV37/03 F S R S Q M V \*  
 FV74/03 . . . . . \*  
**FV37/04** . . . . . \*  
**FV50/04** . . . . . \*

## 9 Literaturverzeichnis

Ahne W. (1978). Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener Viren. Tierärztl. Umsch. 11, 584-594

Ahne W. (1981). European Reference Strains for Fish Virology. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. Vol. 1: 10-12

Ahne W. (1982). Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). Zbl. Vet. Med. B, 29, 457-476

Ahne W., Jørgensen P. E. V. (1993). Prevalence of neutralizing antibodies to IHNV and VHSV in free-living and cultured rainbow trout in Germany. Bull. Eur. Fish Pathol. 13(1), 7-9

Ahne W., Thomsen I. (1985). Occurrence of VHS virus in wild white fish (*Coregonus* sp.). Zbl. Vet. Med. B, 32, 73-75

Amend D. F. (1970). Control of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Disease by Elevating the Water Temperature. J. Fish. Res. BD. Canada 27(2), 265-270

Amlacher E. (1992). Taschenbuch der Fischkrankheiten. Grundlagen der Fischpathologie ; 6., überarbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart; S. 145-177

Ariel E., Olesen N.J. (2001). Assessment of a Commercial Kit Collection for Diagnosis of the Fish Viruses: IHNV, IPNV, SVCV, VHSV. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 21 (1), 6-11

Arkush K. D., Mendoca H. L., McBride A. M., Hedrick R. P. (2004). Susceptibility of captive adult winter-run Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* to waterborne exposures with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Dis. Aquat. Org. 59: 211-216

ATV (Abwassertechnische Vereinigung) 1998. Disinfection of biological treated wastewater. Regelwerk Abwasser Abfall Hinweisblatt M205

- De Avila J., Steiner S., Ristow S. (1992). The Presence of Low Titers of anti-IHNV Antibody in the Serum of Steelhead Trout and Chinook Salmon Broodstock Spawmed at Dworshak National Fish Hatchery during 1990-1991. FHS/AFS Newsletter 20(2), 6-8
- Baur W. H., Rapp J. (2003). Gesunde Fische. Praktische Anleitung zum Vorbeugen, Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten. 2., neubearbeitete Auflage. Parey Buchverlag, S. 187-197
- Basurco B., Vende P., Monnier A. F. Winton J. R., de Kinkelin P., Benmansour A. (1995). Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Vet. Res. 26, 460-463
- Baudin Laurencin F. (1987). IHNV in France. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 7(4), 104
- Benmansour A., Basurco B., Monnier A. F., Vendre P., Winton J. R., de Kinkelin P. (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. J. Gen. Virol. 78, 2837-2846
- Benmansour A., Paubert G., Bernard J., de Kinkelin P. (1994). The Polymerase-Associated Protein (M1) and the Matrix Protein (M2) from a Virulent and Avirulent Strain of Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV), a Fish Rhabdovirus. Virology 198, 602-612
- Bergmann S. M., Ariel E., Skall H. F., Fichtner D., Schlotfeldt H. J., Olesen N. J. (2002a). Vergleich von Methoden zum Nachweis einer Infektion mit verschiedenen Isolaten des Virus der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHNV). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 115, 385-389
- Bergmann S., Einer-Jensen K., Skall H. F., Fichtner D., Lorenzen N., Enzmann P.-J., Olesen N. J. (2002b). Entwicklung und Prüfung einer RT-PCR zum Nachweis von VHSV und IHNV aus Zellkultur und Gewebe. 4. Riemser Seminar, "Diagnose virusbedingter Krankheiten der Fische"
- Bergmann S., Fichtner D., Skall H. F., Schlotfeldt H.-J., Olesen N.-J. (2003). Age- and weight-dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence. Dis. Aquat. Org. 55: 205-210

Bernard J., Bremont M., Winton J. (1992). Nucleocapsid gene sequence of a North American isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J.Gen. Virol.* 73, 1011-1014

Bovo G., Giorgetti G. Jørgensen P.E.V., Olesen N.J. (1987). Infectious Haemato-poetic Necrosis: First detection in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7 (5), 124

Bretzinger C. H. P. (2001). Einfluss unterschiedlicher Betäubungsmethoden auf Stressbelastung und Produktqualität bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

Bruchhof B., Marquardt O., Enzmann P.-J. (1995). Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 55, 111-119

Brudeseth B. E., Castric J., Evensen Ø. (2002). Studies on Pathogenesis Following Single and Double Infection with Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Pathol.* 39: 180-189

Brudeseth B. E., Øystein E. (2002). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Dis. Aquat. Org.* 37: 21-28

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2005). Verordnung zum Schutz gegen Fischseuchen, Muschelkrankheiten und zur Schaffung seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe und Gebiete (Fischseuchen-Verordnung). *BGBI. Jahrgang 2005 Teil I Nr. 74, 3563-3572*

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2001). Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen. *BGBI. Jahrgang 2001 Teil I, 547* Geändert durch: Artikel 15 der Verordnung vom 20. Dezember 2005 (*BGBI. I S. 3499*)

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2004). Tierseuchengesetz (TierSG). *RGBl 1909, 519.* Neugefasst durch Bekanntmachung vom 22. Juni 2004; *BGBI. I, S. 1260; 3588*

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2001). Verordnung über das Innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und

Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung – BmTierSSchV). BGBl. Jahrgang 2005 Teil I Nr. 21, 997-1046

Burke J., Grischowsky R. (1984). An epizootic caused by infectious haematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska. J. Fish. Dis. 7, 421-429

Cannon R. M., Roe R. T. (1990). Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen. Deutsche Übersetzung Lorenz R. J., BFAV Tübingen. Herausgeber: Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (AID) e.V. Bonn

Castric J., Jeffroy J., Bearzotti M., de Kinkelin P. (1992). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild elvers *Anguilla anguilla*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12 (1), 21-23

Center of Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (2003a). Animal Disease Information: Infectious Hematopoietic Necrosis. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/default.htm>

Center of Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (2003b). Animal Disease Information: Viral Hemorrhagic Septicemia. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/default.htm>

Cossarini-Durnier M. (1985). Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to titrate Rainbow Trout Serum Antibodies against two Pathogens: *Yersinia ruckeri* and Edgved Virus. Aquaculture 49, 197-208

De Avila J., Steiner S., Ristow S. (1992). The Presence of Low Titers of ant-IHNV Antibody in Serum of Steelhead Trout and Chinook Salmon Broodstock Spawmed at Dworshak National Fish Hatchery during 1990-1991. FHS/AFS Newsletter 20(2), 6-8

De Kinkelin P., Castric J. (1984). An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry, *Salmo salar* L., to viral haemorrhagic septicaemia. J. Fish. Dis. 5, 57-65

Dixon P. F. (1999). VHSV came from the marine environment: clues from literature, or just red herrings? Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19, 60-65

Dixon P. F., Avery S., Chambers E., Feist S., Mandhar H., Parry L., Stone D. M., Strømmen H. K., Thurlow J. K., Tsin-yea Lui C., Way K. (2003). Four years of monitoring for viral haemorrhagic septicaemia virus in marine waters around the United Kingdom. *Dis. Aquat. Org.* 54: 175-186

Dixon P. F., Feist S., Kehoe E., Parry L., Stone D.M., Way K. (1997). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.* 30: 81-89

Dopazo C. P., Bandin I., López-Vazquez C., Lamas J., Noya M., Barja J. L. (2002). Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught at the Flemish Cap. *Dis. Aquat. Org.* 50: 171-179

Dorson M., de Kinkelin P., Torchy C., Monge D. (1987). Sensibilité du brochet (*Esox lucius*) a differents virus de salmonides (NPI, SHV, NHI) et au rhabdovirus de la perche. *Bulletin français de la pêche et pisciculture* 307, 91-101

Drolet B. S., Rohovec J. S., Leong J. C. (1994) The route of entry and progression of infectious haematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). A sequential immunohistochemical study. *J. Fish. Dis.* 17, 337-347

Drolet B. S., Chiou P. P., Heidel J., Leong J.A. C. (1995). Detection of Truncated Virus Particles in a Persistent RNA Virus Infection in vivo. *J. Virol.* 69 (4), 2140-2147

Einer-Jensen K., Ahrens P., Forsberg R., Lorenzen N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85, 1167-1179

Einer-Jensen K., Olesen N.-J., Lorenzen N., Jørgensen P. E. V. (1995). Use of the polymerase chain reaction (PCR) to differentiate serologically similar viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus isolates from Europe and America. *Vet. Res.* 26, 464-469

Emmenegger E. J., Meyers T. R., Burton T. O., Kurath G. (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Org.* 40: 163-176

Engelking H. M., LaPatra S. E., Groberg W. J., Kaufman J. (1994). A ten year study of infectious hematopoietic necrosis virus vertical transmission and covert infection in

chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). International Symposium on Aquatic animal health; Seattle, Washington. S. 4

Enzmann P.-J. (1989). Die Virale Hämorrhagische Septikämie der Salmoniden: Die Bedeutung der Krankheit für die Aquakultur und die Gewässer. Tierärztl. Umsch. 44, 707-710

Enzmann P.-J., Dangschat H., Feneis B., Schmitt D., Wizigmann G., Schlotfeldt H.-J. (1992). Demonstration of IHN Virus in Germany. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(6), 185

Enzmann P. J., Fichtner D., Bergmann S. (2002a). Genotypisierung beim VHS-Virus: Rekombination bei fischpathogenen Rhabdoviren? IX. Gemeinschaftstagung der Deutschen und Österreichischen Sektion der EAAP in Mondsee. S. 64 -70

Enzmann P. J., Fichtner D., Bergmann S. (2002b). Molekulare Epidemiologie von VHS und IHN. 4. Riemser Seminar, "Diagnose virusbedingter Krankheiten der Fische"

Enzmann P. J., Konrad M. (1984). Die Virale Hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle (VHS) und ihre Bekämpfung in epidemiologischer Sicht. Tierärztl. Umsch. 11, 886-892

Enzmann P.-J., Konrad M. (1985). Inapparent Infections of Brown Trout with VHS-Virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5 (4), 81-83

Enzmann P.-J., Konrad M. (1993a). Longevity of antibodies in brown trout and rainbow trout following experimental infection with VHS-Virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13 (6), 193-194

Enzmann P.-J., Konrad M., Parey K. (1993b). VHS in wild living fish and experimental transmission of the virus. FISH RES (AMST) 17, 153-161

Enzmann P.-J., Konrad M., Parey K., Wetzlar H. (1987). Natürliches Wirtsspektrum des Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle. Tierärztl. Umsch. 42, 228-230

Enzmann P.-J., Konrad M., Rapp J. (1992). Epizootiological studies on viral haemorrhagic septicaemia in brown trout *Salmo trutta fario*. Dis. Aquat. Org. 12: 143-146

Enzmann, P.-J., Kurath G., Fichtner D., Bergmann, S. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American Genogroup M. *Dis. Aquat. Org.* 66: 187-195

Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union (2000). Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L327, 1-71

Evensen Ø., Meier W., Wahli T., Olesen N. J., Vestergård Jørgensen P. e., Håstein T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 20: 101-109

Fichtner D., Bergmann S., Enzmann P.-J., Granzow H., Schütze H., Mock D., Schäfer J.-W. Isolation and Characterization of a variant Strain of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 20 (3), 135-142

Fichtner D., Bergmann S., Enzmann P.-J., Weiland F., Granzow H. (1998). Charakterisierung von Isolaten des Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Forellen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 111, 93-99

Fichtner D., Enzmann P.-J., Bergmann S. (2005). Krankheiten nach dem „Aquatic Animal Health Code“ des OIE: Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und Infektiöse Hämatoetische Nekrose (IHN) – Viral haemorrhagic septicaemia and infectious haematopoietic necrosis. *Tiergesundheitsjahresbericht 2004*. Hrsg.: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, 5. Jg 2005, 72-83

Fischer U., Köllner B., Dijkstra J.M., Aoyagi K., Xia C., Ototake M., Nakanishi T. (2002). Spezifische zelluläre Abwehrmechanismen bei Fischen. 4. Riemser Fischseminar, Insel Riems.

Fleischer J., Schlafmann K., Otchwemah R., Botzenhart K. (2000). Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F-specific coliphages, somatic coliphages and *E. coli* in four sewage treatment plants of southern Germany. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 49.3, 127-138

- Floto A. (2001). Angaben zur Rolle der dentritischen Zellen bei granulomatösen Erkrankungen mit und ohne Immunschwäche. Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München
- Garver K. A., Troyer R. M., Kurath G. (2003). Two distinct clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia River basin. *Dis. Aquat. Org.* 55: 187-203
- Ghittino P. (1965). Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 126, 468-478
- Glass B., Kruse P., Neukirch M. (1991). Comparative infection studies in brown trout (*Salmo trutta fario*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using several VHS virus type 1 strains. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 11, 99-100
- Guillou J.-P., Ghislaine M., Hénault S., Hattenberger A. M. (1999). Détection du virus de la septicémie hémorragique virale (SHV) de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par une transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase. *Validations diagnostiques (1999). Vet. Res.* 30 (1999) 49-60
- Hattenberger-Baudouy A. M., Danton M., Merle G., de Kinkelin P. (1995a). Épidémiologie de la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) des salmonidés en France : suivi de l'infection naturelle par des techniques virologiques et sérologique et tentatives d'éradication. *Vet. Res.* 26, 256-275
- Hattenberger-Baudouy A. M., Danton M., Merle G., de Kinkelin P. (1995b). Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdovirus in France. *Vet. Res.* 26, 512-520
- Hedrick R. P., Batts W. N., Yun S., Traxler G. S., Kaufmann J., Winton J. R. (2003). Host and geographic range extensions of North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 55: 211-220
- Hershberger P. K., Kocan R. M., Elder N. E., Meyers T. R., Winton J. R. (1997). Epizootiology of viral hemorrhagic septicemia virus in Pacific herring from the spawn-on-kelp fishery in Prince William Sound, Alaska; USA (1999). *Dis. Aquat. Org.* 37: 23-31

Hoeger B., Koellner B., Kotterba G., van den Heuvel M. R., Hitzfeld B., Dietrich D. R. (2004). Influence of Chronic Exposure to Treated Sewage Effluent on the Distribution of White Blood Cell Populations of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spleen. *Toxicol Sci* 82, 97-105

Hoffmann R. W. (2005). *Fischkrankheiten*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. S. 67-88

Hoppe K., Wernery U. (1985). Ergebnisse serologischer Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen die Viren der infektiösen Pankreasnekrose (IPN), der viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der Frühlingsvirämie (SVC) in Schleswig-Holstein sowie deren rechtlichen Auswirkungen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 92, 172-174

Hostnik Peter; Barliç-Maganja D., Štrancar M., Jeniç V., Toplak I., Grom J. (2002). Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods. *Dis. Aquat. Org.* 52: 179-184

Isshiki T., Nishizawa T., Kobayashi T., Nagano T., Miyazaki T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 47: 87-99

Jensen M. H. (1965). Research on the virus of Egdved disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, 422-426

Jørgensen P. E. V. (1972). Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralisation tests and by means of the fluorescent antibody technique. Mawdesley Thomas, L. E. (ed.) *Diseases of fish*. Academic Press, London; S. 333-339

Jørgensen P. E. V. (1982). Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish. Dis.* 5, 47-55

Jørgensen P. E. V. (1982). Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish. Dis.* 5, 251-255

Jørgensen P. E. V., Einer-Jensen K., Higman K. H., Winton J. R. (1995). Sequence comparison of the central region of the glycoprotein gene of neutralizable, non-neutralizable, and serially passed isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 23: 77-82

- Jørgensen P. E. V., Olesen N. J. (1987). Cod ulcus syndrom Rhabdovirus is indistinguishable from the Egtved (VHS) virus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7, 73-74
- King J. A., Snow M., Smail D. A., Raynard R. S. (2001). Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, north east Atlantic Ocean and Irish Sea. *Dis. Aquat. Org.* 47: 81-86
- de Kinkelin P., Le Berre (1977). Isolement d'un Rhabdovirus pathogène de la truite fario (*Salmo trutta*, L.). *C.R. Acad. Sc. Paris. Ser. D* 284, 101-104
- Knuesel R., Segner H., Wahli T. (2003). A survey of viral diseases in farmed and feral salmonids in Switzerland. *J. Fish. Dis.* 26, 167-182
- Koener J. F., Passavant C. W., Kurath G., Leong J. (1987). Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Carrying the Glycoprotein Gene of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus a Fish Rhabdovirus. *J. Virol.*, May, 1342-1349
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften (2001). Entscheidung (2001/183/EG) zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L* 67, 65-76
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften (2003). Entscheidung (2003/458/EG) zur Änderung der Anhänge I und II der Entscheidung 2002/308/EG zur Festlegung der Verzeichnisse der hinsichtlich der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und/oder der Infektiösen Hämatoetischen Nekrose (IHN) zugelassenen Gebiete und Fischzuchtbetriebe. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L* 154, 93-111
- Konrad M. (1986). Infektionsversuche im Zusammenhang mit epidemiologischen Untersuchungen zur viralen hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* RICHARDSON). *Diss. rer. nat.*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Konrad M., Enzmann P.-J. (1986). Infektionsversuche zur Übertragung des VHS-V von der Bachforelle (*Salmo trutta fario* L.) und vom Hecht (*Esox lucius* L.) auf die Regenbogenforelle (*S. gairdneri*) Richardson. *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Hrsg.) Tagung der Fachgruppe Fischkrankheiten der DVG, Gießen*, S. 23-29

Konrad M., Rapp J., Enzmann P.-J. (1984). Epidemiological studies on VHS in a wild fish population. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4 (4), 69

Kurath G. (2000). What's a Novirhabdovirus? Fish Health Newsletter Volume 23, Issue 3, 4-5

Kurath G., Garver K. A., Troyer R. M., Emmenegger E. J., Einer-Jensen K., Anderson E. D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. J. Gen. Virol. 84, 803-814

LaPatra S. E. (1998). Factors affecting pathogenicity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) for salmonid fish. Journal of Aquatic Animal Health 10: 121-131

La Patra S. E., Fryer J. L. (1990a). Susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) to infectious haematopoietic necrosis virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10: 125

LaPatra S. E., Groff J. M., Fryer J. L., Hedrick R. P. (1990b). Comparative pathogenesis of three strains of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 8: 105-112

LaPatra S. E., Groberg W. J., Rohovec J. S., Fryer J. L. (1990c). Size-Related Susceptibility of Salmonids to Two Strains of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. Trans. Am. Fish. Soc. 119: 25-30

LaPatra S. E., Jones G. R., Lauda K. A. (1995). White Sturgeon as a Potential Vector of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. Journal of Aquatic Animal Health 7: 225-230

Lehmann J., Mock D., Stürenberg F. J., Ahne W. VHSV-Epizootics in adult pike (*Esox lucius* L.). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. Vol. 9 (3), 61

Liversidge J., Munro A. L. S., Schlotfeldt H.-J., Evelyn T. P. T. (1985). Fischpathogene Viren. In Roberts, R. J., Schlotfeldt H.-J. (Hrsg). Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, S. 112-173

Lorenzen E., Carstensen B., Olesen N. J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. Dis. Aquat. Org. 37: 81-88

McAllister, P. E. (1993). Salmonid fish viruses. Stoskopf M. K. (ed.) Fish Medicine. W. B. Saunders Company, Philadelphia, S. 391-396

- McCain, B. B., Fryer J. L., Pilcher K. S. (1971). Antigene relationships in a group of three viruses of salmonid fish by cross neutralization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 1042
- Meier W. (1981). Viral Hemorrhagic Septicemia in Non-Salmonid Fishes. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. Vol. 1: 15-17
- Meier W., Jørgensen P. E. V. (1980). Isolation of VHS-Virus from pike fry (*Esox lucius*) with Hemorrhagic Symptoms. Ahne W. (ed.) Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences. Springer Verlag, Berlin etc., S. 8-17
- Meier W. (1985). Virale Hämorrhagische Septikämie: Empfänglichkeit und epizootologische Rolle des Hecht (*Esox lucius* L.). J Appl Ichthyol 1, 171-177
- Meier W., Ahne W., Jørgensen P.E.V. (1986). Fish viruses: viral haemorrhagic septicaemia in white fish (*Coregonus* sp.). J Appl Ichthyol 2, 181-186
- Meier W., Pfister K. (1981). Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Pike (*Esox lucius* L.): Clinical, macroscopic, biological and electron-microscopical findings; Direct visualization of the Egdtvet-virus. Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 37-49
- Meier W., Schmitt M., Wahli T. (1994). Viral hemorrhagic septicaemia (VHS) of nonsalmonids. Ann Rev Fish Dis 4, 359-373
- Meier W., Wahli T. (1988). Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in grayling, *Thymallus thymallus* (L.). J. Fish. Dis. 11, 481-487
- Meier W., Wahli T. Schmitt M. (1991). Fischkrankheiten in der Schweiz. Eine statistische Auswertung des diagnostischen Materials der Fischuntersuchungsstelle (FUS) von 1979-1988. I. Allgemeine Aspekte: Schweiz. Arch. Tierheilk. 133, 441-449
- Meyers T. R., Short S., Lipson K. (1999). Isolation strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. Dis. Aquat. Org. 38: 81-86
- Meyers T. R., Short S., Lipson K., Batts W. N., Winton J. R., Wilcock J., Brown E. (1993). Isolation of North American Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from Alaskan Pacific Herring, *Clupea harengus pallasii*. FHS/AFS Newsletter 21:4, 1-2

Miller T. (1998). Entwicklung und Evaluierung einer RT-PCR zum Routineeinsatz für den Nachweis und die Differentialdiagnose der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der Infektiösen Hämato-poetischen Nekrose (IHN) der Salmoniden direkt aus Organmaterial und Blut. Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

Miller T. A., Rapp J., Wastlhuber U., Hoffmann R. W., Enzmann P.-J. (1998). Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquat. Org.* 34: 13-20

Modrow S., Falk D., Truyen U. (2003). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg / Berlin, S. 20-25 & 250-257

Mortensen H. F., Heuer O. E., Lorenzen N., Otte L., Olesen N. J. (1999). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.* 63, 95-106

Morzunov S. P., Winton J. R., Nichol S. T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.* 38, 175-192

Mulcahy D., Pascho R. J. (1985). Vertical transmission of infectious haemtopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum): isolation of virus from dead eggs and fry. *J. Fish Dis.* 8, 393-396

Mulcahy D., Wood J. (1986). A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis in imported Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the enzootic region. *J. Fish. Dis.* 9, 173-175

Munro A. L. S. (1996). Report on the first recorded outbreak of a viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in GB and subsequent actions to contain eradicate and investigate the origins of the infection. *Scottish Aquaculture Research Report* 3: 1-12

Muroga K. , Iida H., Mori K., Nishizawa T., Arimoto M. (2004). Experimental horizontal transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Org.* 58: 111-115

- Neukirch M. (1984a). An experimental study of the entry and multiplication of viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) after waterborne infection. J. Fish Dis. 7: 231-234
- Neukirch M. (1984b). Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Rich.): Einfluß von Wassertemperatur und Körpergewicht auf die Mortalität nach experimenteller Infektion über das Wasser. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 329-332
- Neukirch M. (1986). Demonstration of Persistent Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) Virus in Rainbow Trout after Experimental Waterborne Infection. J. Vet. Med. B, 33, 471-476
- Neukirch M. (1991). Die Rolle der Bachforelle als Überträger von VHS-Virus, Serotyp 1. Fisch. Teichwirt 1, 15-16
- Nichol S. T., Rowe J. E., Winton J. R. (1995). Molecular Epizootiology of the glycoprotein and non-virion protein of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. Virus Res. 38, 159-173
- Office International des Epizooties (OIE) (2004). Aquatic Animal Health Code 2004. Chapter 2.1.2. Infectious Haematopoietic Necrosis & Chapter 2.1.5. Viral Haemorrhagic septicaemia. [http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_sommaire.htm)
- Office International des Epizooties (OIE) (2003a). Infectious Haematopoietic Necrosis. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)
- Office International des Epizooties (OIE) (2003b). Viral Haemorrhagic Septicaemia. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. [http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)
- Olesen N. J., Lorenzen N., Jørgensen P. E. V. (1991). Detection of rainbow trout to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50%PNT). Dis. Aquat. Org. 10: 31-38
- Olesen N. J., Lorenzen N., Jørgensen P. E. V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. Dis. Aquat. Org. 16: 163-170

Øye A. K.; Rimstad E. (2001). Inactivation of infectious salmon anaemia virus, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus in water using UVC irradiation. *Dis. Aquat. Org.* 48: 1-5

Øystein E., Meier W., Wahli T., Olesen N. J., Vestergård Jørgensen, Håstein T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral Haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 20: 101-109

Peters F., Neukirch M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.* 9, 539-544

Pintó R. M. Jofre J., Abad F. X., González-Dankaart J. F., Bosch A. (1993). Concentration of fish enveloped virus from large volumes of water. *J. Virol. Methods* 43, 31-40

Rapp J. (1991). Persönliche Mitteilung an die FUS am Institut für Tierpathologie Universität Bern, Herrn Dr. Meier.

Rapp J., Wachter H., Müller H., Neuhold S. (2004). Untersuchungen zur Epidemiologie am Beispiel von *Yersinia ruckeri* im Ablauf einer Kläranlage. X. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) zum Thema Fischkrankheiten. S. 110-118

Rasmusen, G. J. (1965). A biological study of the Egtved diseases (INuL). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126: 427-460

Rat der Europäischen Gemeinschaften (1991). Richtlinie 91/76/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L046, 1-18

Rat der Europäischen Gemeinschaften (1993). Richtlinie 93/53/EWG des Rates vom 24. Juni 1993 zur Festlegung von Mindestmaßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung bestimmter Fischseuchen. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L175, 23-33

Řehulka J. (2003). Haematological analyses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* affected by viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.* 56: 185-193

- Roberts R. J. (2001). Fish Pathology (3rd edition). 168-247
- Rösch R. (2002). Felchenlaichfischerei 2002 im Bodensee. Auf auf: Aquakultur- und Fischereiiinformationen 4, 3-5
- Rösch R. (2005). Fischzucht in Dänemark (DK) Bericht zu einer Studienfahrt der Berufsfischer und Teichwirte Baden-Württembergs. Auf auf: Aquakultur- und Fischereiiinformationen 2, 12-16
- Ross k., McCarthy U., Huntly P. J., Wood B. P., Stuart D., Rough E. I., Smail D. A., Bruno D. W. (1994). An Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14(6), 213-214
- Schlotfeldt H.-J.. Ahne W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. J. Appl. Ichthyol. 4, 147-148
- Schlotfeldt H.-J.. Ahne W., Jørgensen P. E. V., Glende W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. Bull. Eur. Fish Pathol. 11, 105-107
- Schütze H., Enzmann P.-J., Huchling R., Mundt E., Niemann H., Mettenleiter T. C. (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis virus. Journal of General Virology 76, 2519-2527
- Schütze H., Enzmann P.-J., Mundt E., Mettenleiter T. C. (1996). Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. J. Gen. Virol. 77, 1259-1263
- Schütze H., Mundt E., Mettenleiter T. C. (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish Rhabdovirus. Virus genes 19(1): 59-65
- Shall H. F., Kjaer T. E., Olesen N. J. (2004). Investigation of wild caught whitefish, *Coregonus lavaretus* (L.), for infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and experimental challenge of whitefish with VHSV. J. Fish Dis. 27, 401-408
- Skall H. F., Slierendrecht W. J., King J. A., Olesen N. J. (2004). Experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. Dis. Aquat. Org. 58: 99-110

Snow M., Bain N., Black J., Taupin V., Cunningham C. O., King J. A., Skall H. F., Raynard R. S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.* 61: 11-21

Snow M., Cunningham C. O. (2000). Virulence and nucleotide sequence of marine viral haemorrhagic septicaemia virus following *in vivo* passage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 42: 17-26

Snow M., Cunningham C. O., Bricknell I. R. (2000). Susceptibility of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild-caught Atlantic cod. *Dis. Aquat. Org.* 41: 225-229

Snow M., Cunningham C. O., Melvin W. T., Kurath G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.* 63, 35-44

St-Hilaire S., Ribble C., LaPatra S., Chartrand S., Kent M. (2001a). Infectious hematopoietic necrosis virus antibody profiles in naturally and experimental infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 46: 7-14

St-Hilaire S., Ribble C., Traxler G., Davies T., Kent M. L. (2001b). Evidence for a carrier state of infectious hematopoietic virus in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.* 46: 173-179

Stone D. M., Way K., Dixon P. F. (1997). Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J. Gen. Virol.* 78, 1319-1326

Stryer L. (1988). *Biochemie* (Völlig neubearbeitete Auflage). S. 972-976

Takano R., Nishizawa T., Arimoto M., Muroga K. (2000). Isolation of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10 (5), 186-192

Thiéry R., de Boisséson C., Jeffroy J., Castric J., de Kinkelin P., Benmansour A. (2002). Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999). *Dis. Aquatic. Org.* 52: 29-37

- Thiry M., Lecoq-Xhonneux F., Dheur I., Renard A., de Kinkelin P. (1991). Sequence of cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1090, 345-347
- Traxler, G. S., Kieser D. (1994). Isolation of the North American strain of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from herring (*Clupea harengus pallasi*) in British Columbia. *FHS/AFS Newsletter* 22: 8.
- Traxler G. S.; Roome J. R., Lauda K. A., LaPatra S. (1997). Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during their migration period. *Dis. Aquat. Org.* 28: 31-38
- Troyer R. M., Kurath G. (2003). Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic an evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Org.* 55: 175-185
- Troyer R. M., LaPatra S., Kurath G. (200). Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture. *J. Gen. Virol.* 81, 2823-2832
- Walker P. J., Benmansour A., Calisher C. H., Dietzgen R. , Fang R. X., Jackson A. O., Kurath G., Leong J. C., Nadin-Davies S., Tesh R. B., Tordo N. (2000). Family Rhabdoviridae, In “ The seventh report of the international committee for taxonomy of viruses”. Springer Verlag, In Press.
- Wahli T., Meier W., Schmitt M. (1992). Fischkrankheiten in der Schweiz. Eine statistische Auswertung des diagnostischen Materials der Fischuntersuchungsstelle (FUS) von 1979-1988. II. Spezielle Aspekte: Schweiz. *Arch. Tierheilk.* 134, 309-315
- Way-Shyan W., Jainn-Shyan L., Mong-Teng S., Yea-Ling W., Chien-Jin H., Maw-Sheng C. (1996). Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from an outbreak in Taiwan by serological and polymerase chain reaction assays. *Dis. Aquat. Org.* 26: 237-239
- Williams K., Blake S., Sweeny A., Singer J. T., Nicholson B. L. (1999). Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of three Fish Viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 37(12), 4139-4141

Winton J. R., Batts W. N., Deering R. E., Brunson R., Hopper K., Nishizawa T., Stehr C. (1991). Characteristics of the first North American isolates of viral hemorrhagic septicemia virus. In: Proc 2<sup>nd</sup> Int Symp Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University Press, Corvallis, OR, 43-50

Witzigmann G., Ahne W., Schlotfeldt H.-J. (1983). Laboratoriumsdiagnose von Virusinfektionen bei Süßwasserfischen unter besonderer Berücksichtigung der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS), der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) und der Frühlingvirämie (SVC). Tierärztl. Umsch. 38, 44-49

Witzigmann G., Baath Ch., Hoffmann R. (1980). Isolierung des Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) aus Regenbogenforellen-, Hecht- und Äschenbrut. Zbl. Vet. Med. B, 27, 79-81

Witzigmann G., Dangschat H., Baath Ch., Pfeil-Putzien C. (1983). Untersuchungen über Virusinfektionen bei Süßwasserfischen in Bayern. Tierärztl. Umsch. 28, 250-258

Wolf K. (1988). Fish Viruses and Fish Viral Diseases, Cornell University Press, New York, NY, S. 83-114 & 217-249

Yoshinaka T., Yoshimizu M., Ezura Y. (2000). Adsorption and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) with Various Solids. Journal of Aquatic Animal Health 12, 64-68

## 10 Danksagungen

Besten Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rudolf Hoffmann für die Bereitschaft diese Arbeit anzunehmen und die unkomplizierte und gute Unterstützung bei der Erstellung des schriftlichen Teils.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Rapp für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung im praktischen Teil und die stets gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Elisabeth Nardy für ihre wissenschaftliche und praktische Unterstützung in Stuttgart sowie für die konstruktive Korrekturlesung.

Herrn Dr. Marc Hoferer für die wissenschaftliche Betreuung im virologischen Teil.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Rosemarie Schultheiss und Frau Petra Hagenmüller für die beste praktische und geduldige Unterstützung im virologischen Teil.

Herrn und Frau Glönkler sowie Herrn und Frau Meichle für die Möglichkeit zur Untersuchung und Beprobung der Felchen.

Herrn Hermann Wachter, Herrn Helmut Müller, Frau Stefanie Rossteuscher für die praktische Unterstützung bei den Feldversuchen und in der Kläranlage.

Herrn Schandelmeier und seinen Mitarbeitern Herrn Straten, Herrn Brachsmaier und Herrn Hönig vom Klärwerk FN für das freundliche Entgegenkommen und die bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung des Versuches in der Kläranlage.

Frau Dr. Andrea Höfle für "gewisse Insiderinformationen" und Herrn Dr. Thomas Miller für die Überlassung seiner „alten“ Literatur.

Herrn Manfred Klauß für die Unterstützung bei den Feldversuchen 2003 und 2004.

Herrn Dr. Frank Hartmann und Herrn Stefan Hüsgen von der Fischereibehörde am RP Karlsruhe, sowie dem FV Altensteig für die Elektroabfischungen.

Besonderen Dank gilt Dr. Peter-Joachim Enzmann vom FLI in Tübingen für die Fachgespräche, die Sequenzierung der Virusisolate und der PCR-Produkte, das Zusammenstellen der Alignments und fürs Korrekturlesen.

Frau Maria Roth und Herrn Dr. Reinhard Sting für die Geduld, das Entgegenkommen und die gewährte Flexibilität um diese Dissertation erstellen zu können.

Meinen Freunden, Kolleginnen und Kollegen, die mich während dieser Zeit in jeglicher Form unterstützt haben.

Frau Dr. Anja Floto für die „beste“ Unterstützung zum Rigorosum und fürs abschließende Korrekturlesen.

Meiner Familie für die jederzeit gewährte Unterstützung.

### **10.1 Projektfinanzierung**

Das Projektvorhaben wurde vom Fischgesundheitsdienst am CVUA Stuttgart und am STUA Aulendorf realisiert. Die Feldversuche wurde finanziert aus Mitteln der Fischereiabgabe vom Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, die Sachmittel für die virologischen Untersuchungen wurden vom CVUA Stuttgart getragen.