

**Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
(Kommissarische Leitung: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Andreas Stolle)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

**Untersuchung der Empfänglichkeit einer deutschen Regenbogenforellen-
Linie (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger
der Drehkrankheit der Salmoniden***

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

Vorgelegt von
Mohamed Amine Oucible
Aus Rabat/ Marokko

München 2006

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

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. El-Matbouli

Korreferent(en): Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTVERZEICHNIS

1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Literaturübersicht</u>	3
2.1 Allgemeines zum Stamm der Myxozoa.....	3
2.1.1 Myxosporea.....	3
2.1.2 Actinosporea.....	4
2.1.3 Entwicklungszyklus der Myxozoa.....	5
2.2 Die Drehkrankheit der Salmoniden.....	7
2.2.1 Geschichte und Vorkommen.....	7
2.2.2 Wirtspektrum.....	8
2.2.3 Ätiologie.....	9
2.2.4 Entwicklungszyklus von <i>Myxobolus cerebralis</i>	11
2.3 Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit.....	15
2.4 Klinische Symptomatik und Pathogenese.....	17
2.5 Diagnose.....	18
2.6 Differentialdiagnosen.....	19
2.7 Bekämpfung, Prophylaxe und Therapie.....	19
2.8 Interaktion zwischen Parasit und Wirt.....	20
2.9 Rolle des Immunsystems bei der Abwehr einer Infektionskrankheit.....	22
2.9.1 Das unspezifische Abwehrsystem.....	23
2.9.2 Das spezifische Abwehrsystem.....	23
2.10 Immunologie der <i>Myxobolus cerebralis</i> Infektion.....	27
2.10.1 Unspezifische Abwehrmechanismen.....	27
2.10.2 Spezifische Abwehrmechanismen.....	29
2.11 Verbreitung der Drehkrankheit in der USA.....	30

3. Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Regenbogenforellen zur Gewinnung von <i>Myxobolus cerebralis</i>	32
3.1.2 Produktion von Triactinomyxon Sporen	32
3.1.3 Regenbogenforellenbrütlinge für die Infektionsversuche	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Gewinnung von <i>Myxobolus cerebralis</i> Sporen	33
3.2.2 Infektion der Oligochaeten und Gewinnung der Triactinomyxon Sporen	33
3.2.3 Infektionsversuche und Hälterung der Forellenbrütlinge	34
3.2.4 Überprüfung des Infektionsversuches	35
3.2.5 Beobachtung der klinischen Symptome	36
3.2.6 Post-mortem Untersuchungen	36
3.2.6.1 Präparation der Sporen mittels Verdauungsmethode	37
3.2.6.2 Histologie des Kopfkorpels	37
3.2.6.3 Transmissions-Elektronenmikroskopische Untersuchungen (TEM)	38
3.2.6.4 Molekularbiologische Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
4. Ergebnisse	43
4.1 Infektionsversuche der Forellenbrütlinge	43
4.2 Postexpositionelle Überprüfung des Infektionserfolges	43
4.2.1 Klinische Beobachtung	43
4.2.2 Veränderung der Triactinomyxon Sporen nach Exposition	43
4.2.3 Histologische Untersuchung der Fischepidermis	43
4.3 Beobachtung der klinischen Symptome	44
4.3.1 Inkubationszeit	45
4.3.2 Tag 60 post expositionem	45
4.3.3 Tag 90 post expositionem	46
4.3.4 Tag 120 post expositionem	48
4.3.5 Tag 150 post expositionem	49

4.4	Post mortem Untersuchungen.....	51
4.4.1	Gewicht und Größe.....	51
4.4.2	Infektionsprävalenz.....	53
4.4.3	Quantitative Erfassung der Sporen.....	54
4.4.4	Histopathologische Veränderungen.....	55
4.4.4.1	Histologie.....	56
4.4.4.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	64
4.4.5	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Myxobolus cerebralis</i>	66
5.	<u>Diskussion</u>	67
5.1	Triactinomyxon Sporen Produktion.....	67
5.2	Infektion der Regenbogenforellenbrütlinge.....	67
5.3	Vergleich der Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit.....	70
5.3.1	Klinische Symptomatik.....	71
5.3.1.1	Inkubationszeit.....	71
5.3.1.2	Symptomprävalenz.....	73
5.3.2	Post mortem Erhebungen.....	75
5.3.2.1	Gewicht und Größe.....	75
5.3.2.2	Infektionsprävalenz.....	77
5.3.2.3	<i>Myxobolus cerebralis</i> Sporenzahl pro Kopf.....	79
5.3.2.4	Histologische Untersuchungen.....	81
5.3.2.5	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	84
5.3.2.6	Molekularbiologische Untersuchung (PCR).....	84
5.4	Schlußfolgerung.....	85
6.	<u>Zusammenfassung</u>	87
7.	<u>Summary</u>	89
8.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	90
9.	<u>Literaturverzeichnis</u>	91
	<u>Danksagung</u>	109
	<u>Lebenslauf</u>	110

1 Einleitung

Der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden *Myxobolus cerebralis* wurde erstmals 1903 von HOFER beschrieben. Der Parasit bildet Sporen im noch nicht verknöcherten Skelett jüngerer Fische, wobei eine Affinität zum Knorpelgewebe des Kopfes und der Wirbelsäule besteht.

Durch Deformation und Zerstörung der Knorpel mit nachfolgender Nervenschädigung werden die typischen Symptome wie Drehbewegungen, Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie und Verformungen des Schädels (sog. Mopskopf) sowie der Wirbelsäule hervorgerufen.

Die von *Myxobolus cerebralis* ausgelöste Drehkrankheit stellt seit vielen Jahren weltweit in allen Salmoniden produzierenden Ländern ein wirtschaftlich bedeutsames Problem für die Forellenintensivhaltung dar. Vor allem in den Vereinigten Staaten von Amerika verbreitete sich die Drehkrankheit seit den 50er Jahren rasant und richtet bis zum heutigen Tag erhebliche wirtschaftliche Verluste an. Durch eine Optimierung der Haltungsvoraussetzungen konnten die Schäden in den Fischzuchtanlagen im Rahmen gehalten werden, nicht aber in den freien Gewässern, wo es weiterhin zu einer starken Dezimierung der dort heimischen Regenbogenforellen kommt.

Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand im Rahmen des Forschungsprojekts "Resistant Trout", das von der 1994 in Amerika gegründeten „Whirling Disease Foundation“ und dem "US-Fish and Wildlife Service" finanziert wird. An diesem Projekt ist sowohl eine kalifornische Arbeitsgruppe in Davis unter der Leitung von Prof. Dr. Hedrick, als auch die deutsche Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. El-Matbouli beteiligt.

Seit 1994 ist bekannt, dass sich der Erreger gleichfalls in Wildpopulationen einzelner Salmoniden ausgebreitet hat (VINCENT 1996, NEHRING & WALKER 1996). Er ist für Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) sehr pathogen (SCHÄPERCLAUS 1931, O'GRODNICK 1979, HEDRICK et al. 1999), befällt ferner aber auch eine Reihe anderer Salmonidenarten, wobei eine unterschiedlich starke Ausprägung der Krankheitssymptome eintritt (HEDRICK et al. 1998). Neue Studien von EL-MATBOULI et al (2002) und HEDRICK et al. (2003) haben jedoch gezeigt, dass es auch innerhalb der Regenbogenforellen-Linien Unterschiede in der Empfänglichkeit gibt. So erwies sich vor allem eine aus Deutschland stammende Regenbogenforellen-Linie (DtHo) als weitestgehend resistent gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion.

BENKER (2002) hält Wildstämme unter anderem wegen ihrer höheren genetischen Variabilität als widerstandsfähiger gegenüber Krankheitserregern als Zuchtstämme. Der Autor hat deshalb vorgeschlagen, lieber einen unempfindlichen Wildstamm in den amerikanischen Gewässern einzusetzen. Derzeit ist aber noch kein Wildstamm bekannt, der eine vergleichbare Resistenz

gegenüber *Myxobolus cerebralis* aufweist, wie die bereits untersuchte deutsche Linie (DtHo). Da es aber bei dieser Forellen-Linie um einen Zuchtform handelt, versuchte man in den letzten Jahren eine Wildform Forellen-Linie zu finden, die zumindest eine ähnliche Resistenz gegenüber der Drehkrankheit wie die deutsche Linie (DtHo) besitzt.

In der vorliegenden Arbeit sollen im Rahmen von kontrollierten Laborversuchen eine amerikanische (AmTI) Forellen-Linie und eine bis zum Zeitpunkt des Versuches unbekannt deutsche Wildform Forellen-Linie auf ihre Empfänglichkeit gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeines zum Stamm der Myxozoa

Der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, *Myxobolus cerebralis*, ist ein Vertreter aus dem Stamm der Myxozoa (GRASSÉ 1970). Bei den Vertretern dieses Stammes handelt es sich um obligate Parasiten bei Wirbellosen und wechselwarmen Wirbeltieren. Sie besitzen charakteristische, aus Schalenzellen, Polkapselzellen mit ausschleuderbaren Polfilamenten und infektiösem Amöboidkeim bestehende Sporen.

Insbesondere bei Fischen sind Vertreter der Myxozoa in den verschiedensten Geweben (Haut, Kiemen, Muskulatur, Knorpel, Niere, Leber, Herz, Gonaden, Nervensystem) (EL-MATBOULI et al. 1992a) zu finden. Ihr Vorkommen wurde aber auch in seltenen Fällen bei Plathelminthen (Plattwürmern), Reptilien und Amphibien dokumentiert. Im Jahr 2000 berichteten FRIEDRICH et al. über Myxozoa ähnliche Parasiten im Gehirn eines Maulwurfs (*Talpa europaea*), also erste Anzeichen für das Vorkommen auch bei Mammalia.

Die Systematische Einteilung der Myxozoa wurde lange Zeit immer wieder geändert. Im Jahre 1980 unterteilte die "International Commission on Protozoan Nomenclature" den ursprünglichen Stamm der Protozoa (LEVINE et al. 1980) in 7 eigenständige Stämme.

So wurden nun die Myxozoa als eigener Stamm eingruppiert, zusammengesetzt aus den Klassen Myxosporea (BÜTSCHLI 1881) und Actinosporea (LEVINE et al 1980) (Tabelle 1).

Trotz einer großen Anzahl von Studien, konnte die systematische Einteilung der Myxozoa bisher nicht revidiert werden. Während molekularbiologische Untersuchungen von SMOTHERS et al. (1994) und SCHLEGEL et al. (1996) die Verwandtschaft der Myxozoa mit den Bilateria aufzeigen konnten, schlugen im Gegensatz dazu SIDALL et al. (1995) vor, die Myxozoa in den Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) einzuordnen.

2.1.1 Myxosporea

Nach LOM und DYKOVA (1995) werden den Myxosporea ca. 1350 Arten angerechnet, die sich in 52 Genera einteilen lassen (KENT et al. 2001). Die systematische Einteilung dieser Gruppe basiert im Wesentlichen auf den Unterschieden der Sporenmorphologie. Diese bestehen je nach Art aus zwei bis sieben Schalenzellen, eine bis sieben Polkapselzellen und dem Amöboidkeim, der gewöhnlich aus zwei einkernigen oder einer zweikernigen Zelle besteht (LOM & NOBLE 1984).

Größe und Gestalt der Sporen variieren je nach Spezies. Ihre Form kann rund, oval oder lang gezogen sein, Fortsätze können ausgebildet sein oder auch fehlen.

Bei den vorwiegend ichtyoparasitologisch lebenden Myxozoa kann man Spezies unterscheiden, die histozoisch leben, d.h. in Geweben wie Interzellularspalten, Blutgefäßen oder Zellen vorkommen und andere, die coelozoisch in präformierten Hohlorganen wie der Gallen- oder Schwimmblasen zu finden sind (LOM 1987; KENT et al. 2001).

Trotz der großen Artenvielfalt der Myxozoa, sind nur wenige Arten als hoch pathogen anzusehen. Neben der durch *Myxobolus cerebralis* verursachte Drehkrankheit (Whirling Disease) der Salmoniden, gehören die proliferative Nierenerkrankung der Salmoniden (Proliferative Kidney Disease), die Schwimmblasenentzündung der Karpfen (Swimmlader Inflammation) und die infektiöse Nierenvergrößerung beim Goldfisch (Cystic Kidney Enlargement) zu den bedeutsamsten Ichthyoparasitosen der Süßwasserfische.

2.1.2 Actinosporea

Die Actinosporea sind Parasiten aquatischer Oligochaeten und Sipunculiden. Dieser Gruppe werden derzeit ca. 44 Arten, die in 14 Gattungen und sechs Familien eingegliedert sind, zugerechnet (MARQUES 1984).

Die Entwicklung der Actinosporea vollzieht sich im Darmepithel oder in der Leibeshöhle der Wirte. Nach mehreren Teilungsschritten entstehen die für Actinosporea charakteristischen Sporen. Diese ermöglichen nach der Freisetzung aus dem Wirt eine Verbreitung im Wasser und die Übertragung auf einen anderen Wirt (JANISZEWSKA 1955; MARQUES 1984).

Die Spore der Actinosporea hat eine dreistrahlige, radiärsymmetrische Gestalt und besteht aus drei Schallenzellen, drei apikal liegenden Polkapselzellen mit ausschleuderbaren Polfilamenten und dem infektiösen Amöboidkeim. Sowohl die Form der Schallenzellen, als auch die Ausprägung des Amöboidkeims sind artspezifisch und können stark variieren.

Die Schallenzellen bilden unterschiedliche, und für die jeweilige Art charakteristische Fortsätze, die bei einigen Arten einen Stiel ausbilden. Dieses Bauprinzip dient zur Erhöhung der Flotationsfähigkeit im umgebenden Wasser. Der Amöboidkeim stellt den eigentlich infektiösen Bestandteil der Spore dar. Er besteht aus einer Zelle, die je nach Art differierende Anzahl von Kernen bzw. Sekundärzellen beinhaltet (JANISZEWSKA 1955).

Stamm	Myxozoa GRASSÉ	1970
Klasse	Myxosporea BÜTSCHLI	1881
Ordnung	Bivalvulida SHULMAN	1959
Unterordnung	Sphaeromyxina	
Familie	Sphaeromyxidae fam. n.	
Unterordnung	Variisporina	
Familie	Myxidiidae THELOHAN	1892
Familie	Ortholineidae	
Familie	Sinuolineidae SHULMAN	1959
Familie	Fabesporidae NAIDENOVA & ZAIKA	1969
Familie	Ceratomyxidae DORFLEIN	1899
Familie	Sphaerosporidae DAVIS	1917
Familie	Chloromyxidae THELOHAN	1892
Familie	Auerbachiiidae EVDOKIMOVA	1973
Familie	Alatosporidae SHULMAN et al.	1979
Familie	Parvicapsulidae SHULMAN	1953
Unterordnung	Platysporina KUDO	1919
Familie	Myxobolidae THELOAN	1892
Gattung	Myxobolus	
Art	<i>Myxobolus cerebralis</i>	
Ordnung	Mutivalvulida SHULMAN	1959
Familie	Trilosporidae SHULMAN	1959
Familie	Kudoidae MEGLITSCH	1960
Familie	Pentacapsulidae NAIDENOVA & ZAIKA	1970
Familie	Hexacapsulidae SHULMAN	1959
Klasse	Actinosporea NOBLE	1980
Unterklasse	Actinomyxina STOLC	1899
Ordnung	Actinomyxida LOM	1980
Familie	Teractinomyxidae POISSON	1953
Familie	Sphaeractinomyxidae JANISZEWSKA	1957
Familie	Triactinomyxidae JANISZEWSKA	1957
Familie	Siedleckiellidae fam. n.	
Familie	Poliactinomyxidae JANISZEWSKA	1957
Familie	Ormieractinomyxidae fam. n.	

Tabelle 1: Übersicht über die Stellung von *Myxobolus cerebralis* in der systematischen Einteilung der Myxozoa nach LEVINE et al. (1980), LOM & NOBLE (1984) und LOM & DYKOVA (1992).

Gestalt und Abmessungen der Fortsätze und des Stieles, sowie die Anzahl der Kerne bzw. Zellen des Amöboidkeims können daher zur Artbestimmung herangezogen werden (MACKINNON & ADAM 1924; JANISZEWSKA 1955, 1957; MARQUES 1984).

2.1.3 Entwicklungszyklus der Myxozoa

Trotz einer großen Anzahl von Studien blieb der Entwicklungszyklus der Myxozoa bis in das Jahr 1984 unbekannt. Direkte Übertragungsversuche von Myxosporea-Sporen auf Fische (BOND 1936, 1938; HOFFMAN et al. 1962, HOFFMAN et al. 1965; WALLIKER 1968; WYATT 1971; SPALL 1973; MOLNAR 1979) brachten genauso wenig Erfolg wie Infektionsversuche von Actinosporea Sporen auf Oligochaeten (JANIZEWSKA 1955). Daraufhin diskutierten HOFFMAN und PUTZ (1969) und PUTZ und HOFFMAN (1970) dass eine drei- bis sechsmonatige Reifungsphase der Sporen im Bodensediment notwendig sein könnte, um eine Infektiosität zu bedingen. Nachfolgende Infektionsversuche konnten jedoch diese Hypothese nicht bestätigen (SCHÄFER 1968; FENDRICK 1980; JOHNSON et al. 1979; JOHNSON 1980).

1983 gelang es schließlich MARKIW und WOLF den Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* zu beschreiben, in dem sie nachwiesen, dass für die Entwicklung der Sporen von *M. cerebralis* (*M. cerebralis*) Oligochaeten des Genus Tubifex notwendig sind. Ein Jahr später konnten WOLF und MARKIW(1984) zeigen, dass durch *M. cerebralis* Sporen Oligochaeten infiziert werden können und es darüber hinaus zu einer Entwicklung von Triactinomyxon Sporen im Tubifiziden kommt. Allein die frei werdenden Triactinomyxon Sporen erwiesen sich als infektiös für Salmoniden. Infektionsversuche mit unterschiedlichen Tubifex Spezies konnten zeigen, dass nur *Tubifex tubifex* als Wirbellosenwirt für *M. cerebralis* in Frage kommt (WOLF et al. 1986). EL-MATBOULI (1988) und EL-MATBOULI & HOFFMANN (1989) konnten die Ergebnisse von WOLF und MARKIW (1984) durch eigene Versuche bestätigen und zusätzlich zeigen, dass für den Lebenszyklus eines weiteren Vertreters der Myxobolidae, *Myxobolus cotti*, ebenfalls *Tubifex tubifex* notwendig ist. In den darauf folgenden Jahren konnten 13 solcher Zwei-Wirt-Zyklen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Man kann scheinbar annehmen, dass der Zwei-Wirte-Zyklus auf alle Vertreter der Myxozoa übertragbar ist, da sich ein direkter Infektionsweg weder bei den Myxosporea noch bei den Actinosporea nachweisen ließ.

Aktuell sind 1350 Myxosporea Arten und nur ca. 44 Actinosporea Arten bekannt. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Actinosporea fast ausschließlich nur im Süßwasserbereich einiger Länder aufgenommen wurden, während die Myxosporea Arten weitgehend global erfasst wurden (ODENING 1991). Aufgrund dieser neusten Erkenntnisse stellen also die Myxosporea und die Actinosporea lediglich unterschiedliche Entwicklungsphasen ein und desselben Taxons dar.

Myxosporea Spezies	Fischwirt	Actinosporea Genus	Oligochaeten- Wirt	Autoren
<i>Ceratomyxa shasta</i>	Regebogenforelle <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Auranti-actinomyxon	Nais sp.	BARTHOLOMEW et al. (1992)
<i>Hoferellus carassii</i>	Goldfisch <i>Carassius auratus</i>	Auranti-actinomyxon	unbekannt	EL-MATBOULI et al. (1992b)
<i>Hoferellus cyprini</i>	Karpfen <i>Cyprinus carpio</i>	unbekannt	Nais sp.	GROßHEIDER & KÖRTING (1992)
<i>Myxobolus arcticus</i>	Sockeyelachs <i>Oncorhynchus nerca</i>	Triactinomyxon	<i>Stylodrilus Heringianus</i>	KENT et al. (1993)
<i>Myxobolus carassii</i>	Goldorfe <i>Leuciscus idus</i>	Triactinomyxon	<i>Tubifex tubifex</i>	EL-MATBOULI & HOFFMANN (1993)
<i>Myxobolus cerebralis</i>	Regenbogenforelle <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Triactinomyxon	<i>Tubifex tubifex</i>	WOLF & MARKIW (1984); EL-MATBOULI & HOFFMANN (1989)
<i>Myxobolus cotti</i>	Mühlkoppe <i>Cottus gobio</i>	Triactinomyxon	<i>Tubifex tubifex</i>	EL-MATBOULI & HOFFMANN (1989)
<i>Myxobolus pavlovski</i>	Silberkarpfen <i>Hypophthal-mychthis mollitrix</i>	Hexactinomyxon	<i>Tubifex tubifex</i>	RUIDISCH et al. (1991); EL-MATBOULI & HOFFMANN (1991a)
<i>Myxobolus sp.</i>	Goldfisch <i>Carassius auratus</i>	Raabeia	<i>Branchiura Sowerbyi</i>	YOKOHAMA et al. (1991)
<i>Myxidium giardi</i>	Aal <i>Anguilla anguilla</i>	Auranti-actinomyxon	<i>Tubifex sp.</i>	BENAJIBA & MARQUÉS (1993)
<i>Myxobolus hungaricus</i>	Brachse <i>Abramis brama</i>	Triactinomyxon	<i>Tubifex tubifex</i> und <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	EL-MANSY & MOLNÁR (1997)
<i>Thelohanellus hovorkai</i>	Karpfen <i>Cyprinus carpio</i>	Auranti-actinomyxon	<i>Branchiura Sowerbyi</i>	YOKOHAMA (1997)
Zschokella sp.	Karausche <i>Carassius carassius</i>	Siedleckiella	<i>Tubifex tubifex</i>	USPENSKAYA (1995)

Tabelle 2: Übersicht über die derzeit bekannten Myxosporea/Actinosporea Zwei-Wirt-Zyklen.

2.2 Die Drehkrankheit der Salmoniden

2.2.1 Geschichte und Vorkommen

Die Drehkrankheit (Whirling Disease) ist eine parasitäre Erkrankung der Salmoniden, die durch *Myxobolus cerebralis* (früher *Myxosoma cerebralis*), eine Myxosporea-Art, verursacht wird und erstmalig 1903 von HOFER, bei der aus Nordamerika nach Europa eingeführten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in Deutschland beobachtet und beschrieben wurde (HOFER 1903).

In den folgenden Jahrzehnten hat sich die Krankheit mit der schnellen Entwicklung der Forellenzucht und mit dem internationalen Fischhandel weltweit verbreitet. Aus diesem Grund

wurde die Drehkrankheit in die Liste der wichtigsten infektiösen Fischkrankheiten durch die internationale Gesellschaft für Epizootiologie aufgenommen (HALLIDAY 1976).

Durch den weltweiten Handel mit infizierten lebenden oder tiefgefrorenen Regenbogenforellen stellt heute die Drehkrankheit ein großes Problem dar. Über ihr Vorkommen wurde bereit in vielen Forellen produzierenden Regionen West- und Osteuropas, der ehemaligen Sowjetunion, der vereinigten Staaten von Amerika, Australiens, Neuseelands und Südafrika berichtet (HOFFMAN 1970; HALLIDAY 1976). Lediglich Südamerika dürfte derzeit eines der wenigen Gebieten mit intensiver Aquakultur darstellen, in dem die Drehkrankheit bis jetzt noch nicht beobachtet wurde (HEDRICK et al. 1998).

Land	Autoren	Land	Autoren
Deutschland	HOFFER 1903	Schweden	JOHANSSON 1966
Dänemark	BRUHL 1926	Schottland	ELSON 1969; ROBERTS & ELSON 1970
Finnland	DOGEL 1932; USPENSKAYA 1957	Norwegen	HASTEIN 1971
Frankreich	VANCO 1952; HOFFMAN 1970	Südafrika	VAN-WYK 1968
Italien	SCOLARI 1954	Marokko	PREUDHOMME 1970
ehem. Sowjetunion	USPENSKAYA 1955	Österreich, Belgien, Ungarn Irland, Lichtenstein, Luxemburg, Niederlande	HALLIDAY 1976
ehem. Tschechoslowakei	DYK 1954	Spanien	CORDERO-DEL- CAMPILLO et al. 1975
Polen	KOCYLOWSKI 1953	Neuseeland	HEWITT & LITTLE 1972
USA	HOFFMAN 1962	Libanon	HALLIDAY 1976
ehem. Jugoslawien	TOMASEC 1960		

Tabelle 3: Übersicht über die geographische Verbreitung der Drehkrankheit seit ihrer Entdeckung (HOFFER 1903) bis zum heutigen Tag. Nach BARTHOLOMEW & RENO (AFS 2002).

2.2.2 Wirtspektrum

Bisher konnte eine Infektion mit *Myxobolus cerebralis* bei 18 Salmonidenarten aus den Gattungen *Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Salmo* und *Hucho* nachgewiesen werden. Es wird jedoch angenommen, dass alle Salmonidenarten infiziert werden können (WOLF et al. 1986). Mit Ausnahme des Huchens (*Hucho hucho*) weisen europäische Arten eine geringere Empfänglichkeit auf als amerikanische (HALLIDAY 1976; EL-MATBOULI et al. 1992a). Ein kurzer Überblick über das Vorkommen der Drehkrankheit bei einigen Salmonidenarten ist in Tabelle 4 dargestellt.

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

Tabelle 4: Vorkommen der Drehkrankheit bei verschiedenen Salmonidenarten nach abnehmender Empfänglichkeit (O'GRODNICK 1979).

2.2.3 Ätiologie

Der Erreger der Drehkrankheit war die erste Myxosporea Spezies, für die ein Myxosporea/Actinosporea-Zyklus nachgewiesen werden konnte (WOLF & MARKIW 1984).

Sporen von *Myxobolus cerebralis* lassen sich in allen Knorpelteilen des Wirtes finden. Jede Spore besteht aus 2 Schalenzellen, 2 Polkapselzellen, in denen sich die in fünf bis sechs Windungen aufspiralisierten Polfilamente befinden, und dem zweikernigen Amöboidkeim (LOM & HOFFMAN 1971).

Im frischen Zustand sind die reifen Sporen in der Aufsicht in der Regel oval, manchmal länglich. In der Seitenansicht sind sie im Allgemeinen linsenförmig (Abbildung 1). Ihre Länge beträgt 8,7 (7,4 - 9,7) µm, die Breite 8,2 (7,0 - 10,0) µm und die Dicke 6,3 (6,2 - 7,4) µm. Die beiden eiförmigen Polkapseln sind 5,1 (5,0 - 6,0) auf 3,2 (3,0 - 3,5) µm groß.

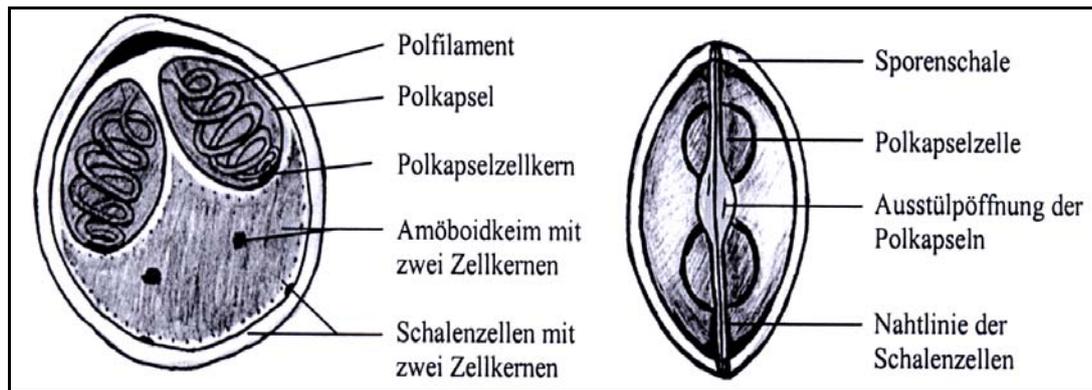


Abbildung 1 Schematische Darstellung einer Spore von *Myxobolus cerebralis*. Nach EL-MATBOULI, 1996.

Nach dem Tod des Wirtes werden die sehr widerstandsfähigen *Myxobolus cerebralis* Sporen freigesetzt. Im Flusssediment können sie bis zu 30 Jahren überleben (HOFFMAN & PUTZ 1969). Eine Lagerung der Sporen für fünf Monate im Schlamm, eine Aufbewahrung bei -20°C oder Darmpassagen bei Hecht (*Esox lucius*) oder Stockente (*Anas platyrhynchos*) haben keinen Einfluss auf ihre Infektiösität (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1992).

Oligochaeten der Art *Tubifex tubifex* infizieren sich mit den *Myxobolus cerebralis* Sporen (WOLF et al. 1986). Dabei nehmen sie die Sporen zufällig oral mit dem Schlamm auf. Nach einer dreimonatigen Entwicklungsphase entstehen die Triactinomyxon Sporen. Diese gelangen dann über den Darm des Wirtes ins Wasser (EL-MATBOULI 1988; EL-MATBOULI et al. 1991a).

Die Triactinomyxon Sporen sind im Vergleich zu den sehr widerstandsfähigen Myxosporen extrem empfindlich. Ihre Überlebenszeit beträgt bei einer Temperatur von 7°C nur ca. 7 Tage (HEDRICK et al. 1998), bei einer Temperatur von $12,5^{\circ}\text{C}$ sogar nur 3 bis 4 Tage (MARKIW 1992a). Die Morphologie der Sporen ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die Länge des Stiels beträgt $146,67$ ($135,25$ - $155,83$) μm , die der Fortsätze $193,62$ ($147,38$ - $214,21$) μm .

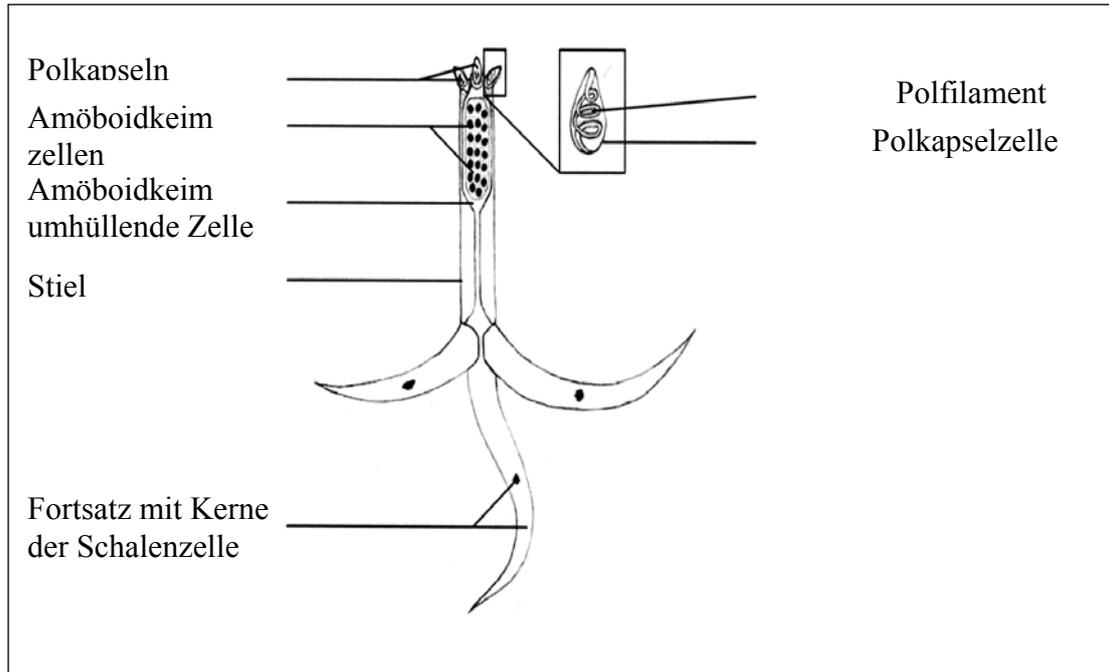


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer reifen entfalteten Triactinomyxon-Spore. Nach EL-MATBOULI et al. 1996.

2.2.4 Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis*

Die Sporen von *M. cerebralis* werden vermutlich erst nach dem Tod des Fisch-Wirtes aus dem Knorpelgewebe freigesetzt. Dies kann durch Verwesung nach dem Tod der Fische oder nach Aufnahme und Verdauung erkrankter Salmoniden durch Raubfische oder Vögel geschehen. Die Sporen werden dann mit dem Kot ausgeschieden und so teilweise über weite Strecken transportiert. Es ist aber nicht auszuschließen, wie Untersuchungen von NEHRING und THOMPSON (1998) mit Bachforellen gezeigt haben, dass auch lebende, chronisch infizierte Forellen in der Lage sind, *M. cerebralis* Sporen auszuschleiden. Ähnliche Beobachtungen konnte ebenfalls EL-MATBOULI mit Regenbogenforellen machen (persönliche Mitteilung).

Entwicklung in *Tubifex tubifex* (Schizogonie, Gametogonie, Sporogonie)

Die freigesetzten *M. cerebralis* werden von *Tubifex tubifex* zufällig oral aufgenommen. Im Darmkanal des Wurms schleudern die Sporen, vermutlich durch taktile und chemische Reize, ihre Polfilamente aus und heften sich an das Darmepithel an. Der aus der Spore freiwerdende Amöboidkeim dringt zwischen den Epithelzellen ein und beginnt eine vegetative Vermehrung (**Schizogonie**) (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1991a). Die entstehenden Einzellstadien

teilen sich weiter, so dass am Ende des vegetativen Vermehrungsprozesses alle Darmepithelzellen in bis zu 10 benachbarten Wurmsegmenten befallen sein können.

Ab dem 25. Tag post expositionem (pe.) sind zweikernige Stadien, die wahrscheinlich durch **Plasmogamie** zweier Einzellstadien entstehen, in den Darmepithelzellen nachweisbar (EL-MATBOULI 1996).

Zu Beginn der nun folgenden **Gametogonie** werden die vierzelligen Pansporozysten gebildet. Hierbei umschließen zwei äußere somatische Hüllzellen zwei innere generative Zellen. Die generativen Zellen durchlaufen je drei mitotische Teilungen, die Hüllenzellen jeweils zwei. Die Pansporozyste besteht dann aus acht Hüllenzellen und sechzehn generativen Zellen (Gameten). Durch Reduktionsteilungen entstehen aus den 16 diploiden Gameten, 16 haploide Gameten (acht α und acht β -Gameten) und 16 Polkörper.

Je ein α und ein β -Gamet verschmelzen und bilden eine **Zygote**. Es beginnt dann die dritte Entwicklungsphase im Oligochaeten, die **Sporogonie**. Aus jeder Zygote entsteht durch zwei mitotische Teilungen ein Vierzellstadium mit drei peripheren und einer zentralen Zelle (Ursprung des Amöboidkeims).

Aus den drei peripheren Zellen bilden sich nach einmaliger mitotischer Teilung drei Polkapselzellen und drei Schalenzellen. Die vierte zentrale Zelle durchläuft mehrere mitotische Teilungen und bildet dann das Sporoplasma der Triactinomyxon Sporen. Auf diese Weise entstehen nach Vollendung der Sporogenese aus jeder einzelnen Pansporozyste acht reife Triactinomyxon mit drei Schalenzellen, drei Polkapselzellen und einem Amöboidkeim (ca. 64 Zellen) (Abbildung 3). Die Triactinomyxon Sporen gelangen schließlich nach Platzen der Pansporozystenwand in das Darmlumen des Wurmes und werden von dort mit dem Kot in das Wasser abgegeben (EL-MATBOULI 1988; EL-MATBOULI et al. 1992a).

Bei einer Wassertemperatur von $15 \pm 2^\circ\text{C}$ werden ca. 90 Tage nach Infektion der Oligochaeten die ersten Triactinomyxon Sporen ausgeschieden. Diese Ausscheidung kann über ein Jahr lang andauern, wobei das Ausscheidungsmaximum zwischen dem 120. und dem 140. Tag liegt (MARKIW 1986).

Im Wasser erfolgt dann eine osmotisch bedingte Entfaltung der Sporen zu ihrer charakteristischen Ankerform (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1989).

Die Infektion der Fische erfolgt entweder durch den Kontakt mit frei im Wasser schwebenden Triactinomyxon Sporen oder durch die orale Aufnahme von infizierten Oligochaeten (WOLF & MARKIW 1984; EL-MATBOULI & HOFFMANN 1989). Bereits eine Minute nach dem Kontakt, wandern die Sporen vermutlich chemotaktisch zu den sekretorischen Öffnungen der

Epidermisschleimzellen und des respiratorischen Epithels der Kiemen. Hier schleudern die Triactinomyxon-Sporen (TAM-Sporen) ihre Polfilamente aus, penetrieren mit diesen die Epidermiszellen und ermöglichen somit die Penetration des Amöboidkeims in die Epidermis. Der weitere Invasionsweg konnte von MANDOK (1993), EL-MATBOULI et al. (1995) und EL-MATBOULI (1996) aufgeklärt werden (Abbildung 3).

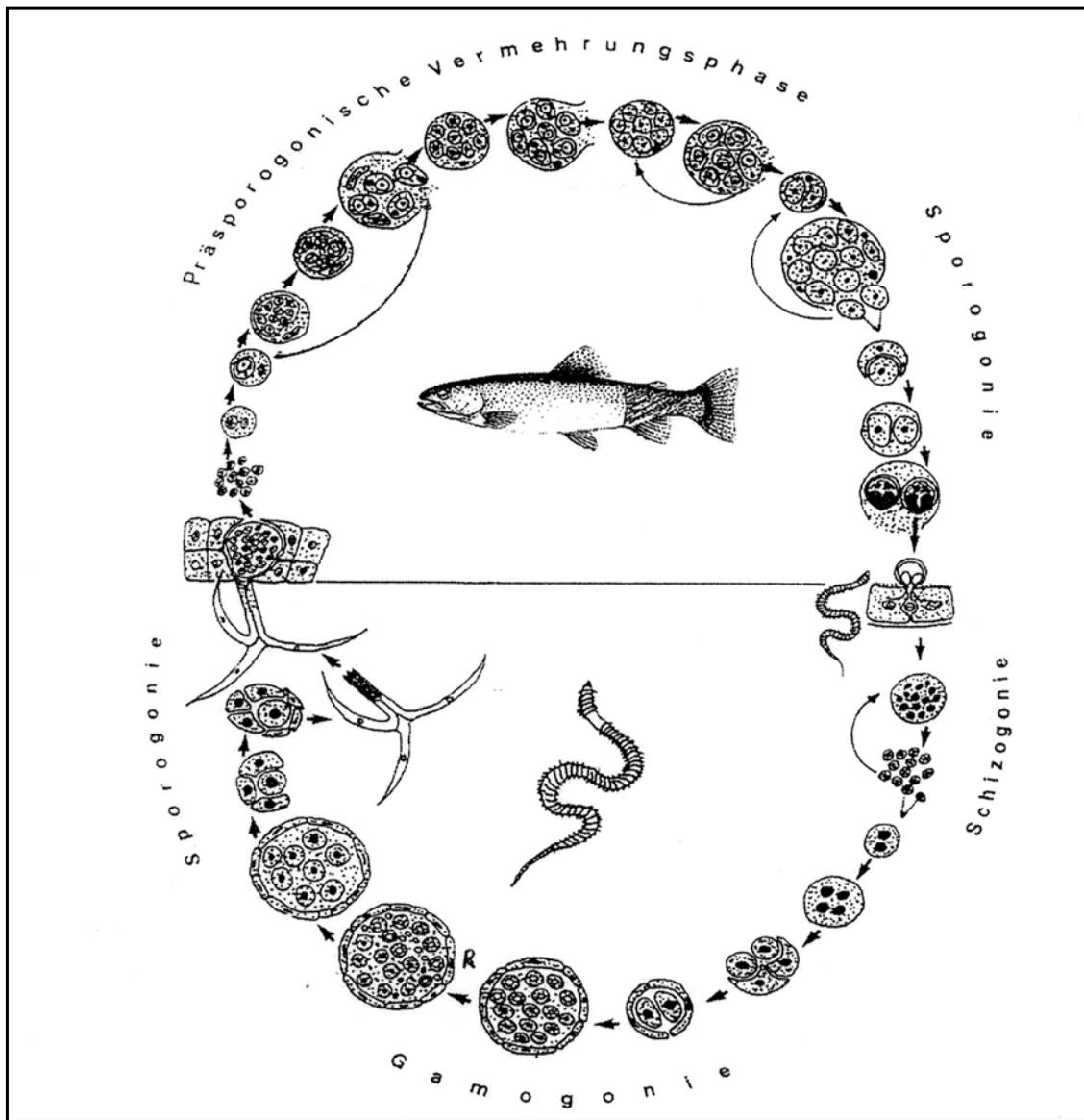


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis*. Nach EL-MATBOULI et al. (1998).

Entwicklung im Fischwirt (präsporogonische und sporogonische Vermehrungsphase)

Die interzelluläre Wanderung des Amöboidkeims in die Epidermis dauert bis zu 60 Minuten. Nach Auflösung der Zelle, die die diploiden Amöboidekeimzellen umhüllt (zwei bis vier Stunden pe.), erfolgt die Penetration des Amöboidkeims in einzelne Epidermis- bzw. Kiemenepithelzellen.

Es folgt die präsporogonische Vermehrungsphase.

Durch endogene Zellteilung entstehen Sekundärzellen, die in einer Primärzelle eingeschlossen sind. Die Sekundärzellen teilen sich ebenfalls mehrfach mitotisch, dadurch entstehen sog. Doppelzellstadien (sieben Stunden pe.). Nach Ruptur der Primärzellen und Platzen der Wirtszellmembran werden die Doppelzellstadien frei und infizieren entweder neue benachbarte Epithelzellen oder dringen in tiefere Schichten der Dermis und Subkutis ein. Bereits 24 Stunden pe. sind keine Entwicklungsstadien mehr in der Epidermis nachweisbar (EL-MATBOULI et al. 1995).

In der Subkutis kommt es durch weitere endogene Zellteilungen zur interzellulären Vermehrung der Doppelzellstadien (zwei bis vier Tage post pe.).

Entlang der peripheren Nerven erfolgt die Wanderung zum Zentralnervensystem, wobei es hier auch zu einer weiteren Vermehrung durch Teilung der Entwicklungsstadien und Ruptur der umgebenden Wirtszellen kommt. Während von Tag 6-14 post pe. die meisten Parasitenstadien im Rückenmark gefunden werden, befinden sich zwischen Tag 16 und 24 pe. die meisten im Gehirn (EL-MATBOULI et al. 1995).

Die Sporogonie findet anschließend im benachbarten Knorpelgewebe statt.

Die Entwicklungsstadien liegen hier zuerst in Form eines Plasmodiums vor, welches ein mehrzelliges Parasitenstadium mit vegetativen und generativen Kernen darstellt und ab dem 40. Tag pe. im Knorpelgewebe histologisch nachweisbar ist (EL-MATBOULI et al. 1995). Nach Desintegration der umhüllenden Zelle, kann es entweder zur Wiederholung des Zyklus mit Bildung neuer Plasmodien oder, zur Bildung von Sporoblasten durch aus den Plasmodien freigewordenen Einzellstadien kommen. Bei diesem letzten Prozess umschließt eine äußere (somatische) und so genannte perizyete Zelle eine innere (generative) so genannte Sporoblast-Zelle. Nach mehrfacher Teilung der Sporoblast-Zelle entstehen zwölf Zellen, aus denen sich zwei *M. cerebralis* Sporen bilden. Reife *M. cerebralis* Sporen können ab dem 90 Tag post infectionem (pi.) im Knorpelgewebe nachgewiesen werden.

2.3 Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit

Die Anfälligkeit der Fische für einen Befall mit *Myxobolus cerebralis* hängt von vielen Faktoren ab. Dabei sind als wichtigstes die Art des Fisches, das Fischalter, der Infektionsdruck und die natürlichen Umweltstressoren zu nennen.

Fischspezies

Myxobolus cerebralis konnte bis jetzt bei 18 Salmonidenarten nachgewiesen werden. Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gilt dabei als die empfänglichste Salmonidenart (HOFER 1903; HOFFMAN & PUTZ 1969). Während die Regenbogenforelle am stärksten befallen wird und die deutlichsten Symptome zeigt, scheint die Bachforelle (*Salmo trutta*) weitgehend resistent zu sein. Untersuchungen von HOFFMAN et al. (1962) zeigten, dass es bei der in Europa einheimischen Bachforelle zwar zur Infektion mit *M. cerebralis* kommt, sich jedoch keine sichtbare Erkrankung entwickelt.

Aus diesem Grund sah HOFFMAN (1970) die Bachforelle als natürlichen Wirt und Erregerreservoir an. Weitere Untersuchungen von HALLIDAY (1976) und O'GRODNICK (1979) zeigen, dass sich in der Bachforelle nach einer Infektion mit *M. cerebralis* weniger Sporen entwickeln als in der Regenbogenforelle.

Im Gegensatz dazu konnten neuere Untersuchungen in Deutschland und im Westen der USA zeigen, dass es nach einer Infektion auch bei der Bachforelle zu Deformationen und zur Dunkelfärbung der kaudalen Körperpartie kommt (NEHRING et al. 2002; EL-MATBOULI pers. Beobachtungen). Im Jahr 1999 gelang es schließlich HEDRICK et al. die Ergebnisse von HOFFMAN (1970) zu bestätigen. Der Autor konnte anhand von Infektionsversuchen zeigen, dass die Bachforelle bezüglich der klinischen Symptome, der Infektionsprävalenz und der Sporenproduktion resistenter zu sein scheint als die Regenbogenforelle. Lediglich bei hohen Infektionsdosen (1.000- 10.000 TAM-Sporen/Fisch) konnte der Parasit das Immunsystem der Bachforelle überwinden um bei dem Tier Krankheitssymptome auszulösen. Erkrankte Bachforellen zeigten jedoch zu keinem Zeitpunkt das typische Drehverhalten, auch wurde kein zur Infektionsdosis proportionaler Anstieg der gebildeten Sporenmengen nachgewiesen.

Andere Untersuchungen zeigen, dass die Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit nicht nur interspezifisch (zwischen zwei Spezies) sondern auch intraspezifisch (innerhalb einer Spezies) stark variieren kann (MARKIW et al. 1992a; DENSMORE et al. 2001).

EL-MATBOULI et al (2002) konnten in Feld- und Laborversuchen die unterschiedlichen Empfänglichkeiten verschiedener Regenbogenforellen-Linien und der Bachforelle demonstrieren. Nach einer Infektion mit steigender TAM-Sporendosis erwiesen sich drei deutsche Linien und in besonderem Maße die deutsche Zuchtlinie (DtHo) als sehr widerstandsfähig. Demzufolge wurde die Resistenzlage dieser Linie als ähnlich gut eingeschätzt wie bei der Bachforelle, während sich die amerikanische Linie (AmTl) als hoch empfänglich erwies. Infektionsversuche aus der University of California Davis haben ebenfalls gezeigt, dass es bei der amerikanischen Linie AmTl zu schweren Krankheitssymptomen, höherer Infektionsprävalenz, stärkeren histologischen Veränderungen und bis zu einer 100mal höheren Sporenzahl im Vergleich zur deutschen Linie DtHo kommt (HEDRICK et al. 2003).

Fischalter

Die starke Abhängigkeit der Empfänglichkeit vom Alter des betroffenen Fisches wurde bereits im Jahr 1931 von SCHÄPERCLAUS beschrieben.

Das Knorpelgewebe stellt für *M. cerebralis* das Zielgewebe dar. Mit zunehmendem Alter der Fische sinkt aufgrund des Ossifikationsprozesses, der für den Parasit zur Verfügung stehende Anteil an Knorpelgewebe. Somit minimiert sich mit dem Alter die vorhandene Angriffsfläche für den Parasiten. Dennoch bleiben im Schädelskelett knorpelige Anteile, die auch zu einem späteren Zeitpunkt dem Parasit als Target dienen. Die durch eine Infektion entstandenen Skelettdeformationen erreichen bei adult infizierten Fischen niemals das Ausmaß der juvenil infizierten Tiere. So geht HALLIDAY (1976) davon aus, dass es bei Kontakt mit dem Erreger ab dem sechsten Lebensmonat zu keinem Anzeichen der Erkrankung mehr kommt. Eine Ausbreitung der Sporen kann aber durch diese symptomlosen Fischen trotzdem ermöglicht werden (EL-MATBOULI et al. 1992a).

Infektionsdosis

Je höher die Infektionsdosis ist, umso stärker und früher erkranken die Fische an der Drehkrankheit. So beobachteten RYCE et al. (1998) bei Regenbogenforellen, die mit einer Triactinomyxon Sporendosis (TAM-Sporendosis) von 1.000 bzw. 10 000 pro Fisch infiziert worden waren, bereits nach fünf respektive sechs Wochen pe. erste klinische Symptome der Drehkrankheit, jedoch erst sieben Wochen nach Sporenexposition bei Forellen, die mit 100 TAM-Sporen infiziert wurden.

Umweltstressoren

Fische sind sowohl unter natürlichen als auch unter künstlichen Haltungsbedingungen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, die Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung haben können. In der Natur spielen z.B. Temperaturschwankungen und endogene Rhythmen wie das Laichen und das Abwandern der Salmoniden ins Meer eine Rolle.

ANDERSON (1990) bezeichnet solche Ereignisse nicht als Stressoren im eigentlichen Sinne sondern als „natürliche“ Stressoren. Akute Stressfaktoren sind die Folge einzelner oder mehrfacher Expositionen auf einen Reiz. Chronischer Stress ist dagegen häufiger und resultierte aus einer kontinuierlichen oder immer wiederkehrenden Auseinandersetzung gegenüber milden Stressoren über eine gewisse Zeit (ADAMS 1990).

Akuter Stress tritt laut PICKERING et al. (1982) und FLOS et al. (1988) beim Umsetzen und Sortieren der Fische auf („handling stress“). Beispiele für Chronischer Stress sind die Haltung bei schlechter Wasserqualität oder Überbesatz bei Fischen in Gefangenschaft. Unter solchen Bedingungen zeigen die Tiere erhöhte Kortisolwerte und damit eine höhere Krankheitsanfälligkeit (BOLLARD et al. 1993).

2.4 Klinische Symptomatik und Pathogenese

Zu den drei klinischen Leitsymptomen der Drehkrankheit gehören die spiralförmige Drehbewegung, die Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie sowie die Deformation des Wirbel- und Schädel skeletts. Diese Symptome können bereits ab dem 60. Tag nach der Infektion beobachtet werden (SCHÄPERCLAUS 1990).

Deformation

Die massive Vermehrung der Entwicklungsstadien und die Sporenbildung im Knorpelgewebe des Wirtes führen zur Auflösung der Knorpelstruktur sowie zur Störung der enchondralen Ossifikation. Dieses äußert sich in deformierten Schädeln (Mopskopf), in missgebildeten Kiefern, in Kiemendeckelverkürzungen, sowie in Deformationen der Wirbelsäule (PLEHN 1904; SCHÄPERCLAUS 1931; HOFFMAN et al. 1962).

Schwimmverhalten

Die spiralförmigen Drehbewegungen, bei denen die Fische scheinbar ihren eigenen Schwanz jagen, treten vor allem bei Aufregung in Erscheinung, beispielsweise bei der Fütterung der Fische oder beim Klopfen gegen die Aquariumscheibe. Als Ursache wird eine Beeinträchtigung

des Vestibularsapparates vermutet, die entweder durch endogene Toxine, die während der Entwicklung von *M. cerebrales* gebildet werden (PLEHN 1904, 1924), oder durch mechanische Druckschädigungen hervorgerufen wird (PLEHN 1904; HOFFMAN & DUNBAR 1961).

In jüngerer Zeit wurden auch Dysfunktionen im Bereich des Hirnstammes und der spinalen Nerven als Ursache für die Koordinationsstörungen diskutiert (ROSE et al. 2000).

Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie.

Als Ursache für die Schwarzfärbung wird die Irritation des Sympathikus durch Deformationsvorgänge vermutet (SCHÄPERCLAUS 1990). Die im Sympathikus enthaltenen pigmentmotorischen Neuronen regulieren die Kontraktion der Pigmentzellen des Schwanzes, was zur umgebungsbedingten Farbanpassung führen kann. Als weitere Ursache der Verfärbung wären auch hier toxische Stoffwechselprodukte des Parasiten in Betracht zu ziehen (SCHÄPERCLAUS 1990).

Während die beiden Symptome Schwarzfärbung und Drehbewegung reversibel sein können (EL-MATBOULI et al. 1992b), sind die Skelettdeformationen irreversibel (PLEHN 1904).

2.5 Diagnose

Die klinischen Erscheinungen der Drehkrankheit (Skelettdeformationen, Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie, Drehbewegungen) sind alleingesehen nicht pathognomonisch, treten jedoch Kombinationen der Symptome auf, kann eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (WOLF & MARKIW 1985).

Eine sichere Diagnose der Drehkrankheit kann durch den Nachweis von *M. cerebrales* Sporen gestellt werden. Dazu kann ein Stück Knorpel aus dem Kopfskelett entnommen, zerkleinert und mit einem Wassertropfen auf einem Objektträger ausgestrichen werden (HOFFMAN et al. 1968).

M. cerebrales Sporen können auch in histologischen Schnittpräparaten, nach Färbung mit Giemsa oder Methylenblau, gut diagnostiziert werden (SCHÄPERCLAUS 1931). Eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) ist ebenfalls möglich. Bei geringgradigen Infektionen empfiehlt sich eine Anreicherung der Sporen. Dafür wurden verschiedene Methoden entwickelt, die beispielsweise die Nutzung einer Planktonzentrifuge (O'GRODNICK 1975), die Verdauung mit Trypsin und Pepsin (MARKIW & WOLF 1980), oder eine Kombination aus beiden Methoden beinhaltet (MARKIW & WOLF 1980).

Eine indirekte Fluoreszenzantikörpertechnik (IFAT) ermöglicht den Sporennachweis am toten Fisch (WOLF & MARKIW 1975). GRIFFIN und DAVIS stellten 1978 eine serologische Nachweismethode mittels IFAT am lebenden Fisch vor. HOFFMANN et al. (1991) nutzten die Immunperoxidasetechnik zum Antikörpernachweis.

Von ANDREE et al. (1997a) wurde in Form der Polymerase Chain Reaction (PCR) das erste molekularbiologische Verfahren zur Diagnostik von *M. cerebralis* entwickelt. Unter Verwendung universeller und Myxosporea spezifischer Primer gelang es den Autoren, die 18S rDNA von *M. cerebralis* zu amplifizieren und zu sequenzieren. Anhand der erhaltenen Sequenzen konnten primer designt werden, mittels derer sich sowohl Actinosporea-, als auch Myxosporea Stadien nachweisen lassen.

ANTONIO et al. (1998) konnten eine Technik zur in-situ-Hybridisierung entwickeln, die den Nachweis von Parasitenstadien sowohl im Oligochaeten als auch im Salmonidenwirt selbst in sehr geringer Anzahl ermöglicht und ihre genaue Lokalisation im Gewebe zulässt. Besonders bei den frühen Entwicklungsstadien in der Epidermis erwies sich diese Methode als sehr sensitiv.

2.6 Differentialdiagnosen

Abnormes Schwimmverhalten und Drehbewegungen können auch als Begleiterscheinungen anderer Erkrankungen, wie beispielsweise bei Enteritiden, bei der infektiösen Pankreasnekrose oder der viralen hämorrhagischen Septikämie beobachtet werden (PLEHN 1904; HALLIDAY 1973). Schwarzfärbungen und Skelettdeformationen können, wie die Untersuchungen von WOLF et al. (1981) in mehreren Forellenzuchten in Portugal zeigten, bei Tryptophan- bzw. Ascorbinsäuremangel vorkommen. Bakterielle Infektionen, z.B. mit *Flexibacter psychrophilus* können ebenfalls solche Symptome hervorrufen (MARGOLIS et al. 1996).

Auch bei Sauerstoffübersättigung und Einwirkung von elektrischem Strom werden Schwarzfärbungen beobachtet (WALKER & NEHRING 1995). Ebenso kann die subkutane oder intramuskuläre Injektion bestimmter Medikamente in der Umgebung der Injektionsstelle zur Schwarzfärbung führen, die sich, je nach Lage der Injektionsstelle, über die gesamte Schwanzpartie erstrecken kann (HOFFMANN et al. 1998).

Im Schädel von Salmoniden werden zwar auch andere Arten der Myxospora gefunden, jedoch nicht im Knorpel- oder Knochengewebe. Vor allem bei den nativmikroskopischen Untersuchungen kann es zu Verwechslungen mit folgenden Myxosporea kommen:

M. neurobius, *M. Kisutchi* und *M. articus* die im Zentralnervensystem parasitieren und *M. insidiosus* in der Muskulatur (MARKIW 1992a).

2.7. Bekämpfung und Prophylaxe

Für die Sanierung eines mit der Drehkrankheit infizierten Bestandes wurden von verschiedenen Autoren folgende Schutzmaßnahmen zusammengestellt:

- Vernichtung und unschädliche Beseitigung aller Fische, bei denen akute oder überstandene Erkrankung diagnostiziert wurde (SCHÄPERCLAUS 1931; HOFFMAN 1962).
- Desinfektion von Bruthäusern und Gerätschaften sollte mit Natronlauge, Kalilauge oder Branntkalk erfolgen. Da es in solchen basischen Milieus zum Ausschleudern der Polfilamente kommt (HOFFMAN & HOFFMAN 1972), erhofft man sich eine Inaktivierung der Sporen.
- Verseuchte Teiche sollten mit Kalkstickstoff oder Chlorkalk behandelt werden (SCHÄPERCLAUS 1931; HOFFMAN et al. 1962).
- Behandlung des Wassers mit UV-Licht kann gegen die Bekämpfung von *M. cerebralis* und *Triactinomyxon* Erfolg versprechend sein (HOFFMAN 1975; HEDRICK et al. 2000).

Zur prophylaktischen Behandlung der Drehkrankheit kamen verschiedene Chemotherapeutika zum Einsatz. 1973 haben O'GRODNICK und GUSTAFSON 10 verschiedene Medikamente getestet. Sie fanden heraus, dass Amprolium die Sporenzahl bei Versuchsfischen verringern konnte, allerdings zeigte diese Substanz eine hohe Toxizität.

Im selben Jahr konnten TAYLOR et al. die Wirksamkeit von Furazolidon belegen. ALDERMANN (1986) beschrieb, dass Proguanil (Malaria-therapeutikum) und Clamoxyquin (ein Therapeutikum gegen die Darmamöbe) eine Verringerung der Sporenzahl bei geringen Nebenwirkungen bringen können.

1991 wurde erstmals von EL-MATBOULI und HOFFMANN Fumagillin zur Bekämpfung der Drehkrankheit erfolgreich getestet. Durch das Antibiotikum wird die Entwicklung von *M. cerebralis* im Fisch unterbrochen. LUTZ (1992) konnte diese Ergebnisse bestätigen, fand aber heraus, dass es bei Überdosierung bzw. längerer Applikationszeit zu Nierenschäden und erhöhter Infektanfälligkeit kommt.

2.8 Interaktion zwischen Parasit und Wirt

Es ist noch nicht restlos aufgeklärt, wie flottierende TAM-Sporen von *M. cerebralis* empfängliche Wirte erkennen, und durch welche Mechanismen es zu einer initialen Interaktion kommt. YOKOHAMA et al. (1995) hält verschiedene Substanzen in Fischsekreten, wie beispielsweise Mucin für wichtige Faktoren für das Zustandekommen einer Interaktion zwischen *Myxobolus cultus* und dem Goldfisch. EL-MATBOULI (1996) konnte nach Versuchen mit präparierter Fischhaut diese Ergebnisse für *Triactinomyxon* von *M. cerebralis* nicht bestätigen.

Nach EL-MATBOULI et al. (1998) könnte eine Kombination aus mechanischen und chemischen Reizen für das Eindringen des Amöboidkeims in die Haut der Fische verantwortlich sein. Diese Vermutung stützt sich auf Versuche, bei denen sowohl frisch geschlachtete, als auch lebende Forellenbrütlinge einer äquivalenten Dosis von TAM-Sporen ausgesetzt wurden. Während erstere keine oder nur ganz vereinzelte Amöboidkeime in der Epidermis aufwiesen, konnte bei allen lebend infizierten Fischen Amöboidkeime nachgewiesen werden.

Der weitere Invasionsweg des Parasiten vom Epithel in das Zielorgan ruft Abwehrmechanismen beim Wirt hervor. Ab dem fünften Tag pi. werden die Parasitenstadien in der Subkutis gefunden und sind von Rundzellen und Makrophagen umgeben (HOFFMANN & EL-MATBOULI 1996). Die Autoren fanden jedoch keine zellulären Reaktionen im Nerven- und Knorpelgewebe. Sie vermuten, dass diese Gewebe aufgrund des fehlenden direkten Kontaktes zum Blutgefäßsystem schwer zugänglich für das Immunsystem des Wirtes sind. Es wäre also möglich, dass sich Parasitenstadien, die das Nervengewebe vor dem fünften Tag pi. erreichen einer Abwehrreaktion entziehen.

Im Gegensatz dazu assoziieren HEDRICK et al (1998) eine zelluläre Abwehraktivität erst mit der aktiven Phase der Knorpelzerstörung. Zu einem Zeitpunkt, zu dem sich bereits Nekrosen im Knorpelgewebe gebildet hatten, fanden die Autoren dort große Mengen an Makrophagen und, in geringem Umfang, auch Lymphozyten und andere Typen von Leukozyten. Außerdem wurde eine massive Infiltration von Makrophagen und Anzeichen einer fokalen bis diffusen, granulomatösen Entzündung in der Peripherie der infizierten Knorpelareale beobachtet.

Neben diesen zellulären Abwehrmechanismen konnte auch die Bildung spezifischer Antikörper gegen *M. cerebralis* nachgewiesen werden. Dazu wurde von GRIFFIN und DAVIS (1978) ein indirekter Fluoreszenztest entwickelt.

HOFFMANN et al. (1991) stellten eine weitere serologische Nachweismethode vor. Mit Hilfe der Immunperoxidasetechnik gelang es den Autoren ab dem 40. Tag pi. Antikörper

nachzuweisen. Ob diese einen wirksamen Schutz gegenüber einer Reinfektion darstellen ist noch unklar. ADKINSON et al. (1997) konnten bei Fischen, die über Antikörper verfügten und erneut infiziert wurden, keine starke Immunreaktion feststellen.

Bereits 1974 beobachtete PAULEY das Fehlen einer Immunantwort und führte dies auf eine enge antigenetische Verwandtschaft der Sporen mit forellenartigen Antigenen zurück. ADKINSON et al. (1997) halten es auch für möglich, dass die Sporen allein aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung keine gute Antigenwirkung zeigen.

Im Jahr 1996 exponierten HOFFMANN und EL-MATBOULI acht Wochen zuvor infizierte Regenbogenforellenbrütlinge ein zweites Mal mit *Triactinomyxon* Sporen. Hierbei konnte keine Reinfektion der Fische nachgewiesen werden. Alle *Triactinomyxon* Sporen wiesen nach einstündiger Exposition noch intakte Amöboidkeime auf. Auch KNAUS & EL-MATBOULI (2005) konnten Differenzen im Lektin-Blot zwischen infizierten und nicht infizierten Forellen feststellen. Nach Versuchen von HEDRICK et al. (1997) entwickelt sich bei Regenbogenforellenbrütlingen, die einer niedrigen Dosis von *Triactinomyxon* (200 pro Fisch) ausgesetzt wurden, keine Resistenz gegenüber einer Reinfektion. Bei dieser Infektionsdosis traten darüber hinaus auch keine Krankheitssymptome auf und es waren keine Sporen von *M. cerebralis* im Knorpelgewebe nachweisbar. Dagegen entwickelten Fische, die einer höheren Dosis (1350 pro Fisch) ausgesetzt wurden, 24 bis 36 Tage nach der Infektion eine Resistenz gegenüber einer Reinfektion.

2.9 Rolle des Immunsystems bei der Abwehr einer Infektionskrankheit

Dem Fisch stehen in der Auseinandersetzung mit Erregern bzw. Substanzen verschiedene Immunmechanismen zur Verfügung, die denen der höheren Wirbeltiere ähnlich sind (SCHÄPERCLAUS 1979; ELLIS 1982). Sie unterscheiden sich insofern, als sie bei Heterothermen naturgemäß temperaturabhängig sind (BISSET 1948; AVTALION et al. 1973; ELLIS 1982). Analog dem Säuger, sind sowohl die Milz als auch der Thymus bei Fischen die bevorzugten Bildungsstätten von Zellen der lymphatischen Reihe. Die Niere stellt bei Knochenfische ein weiteres, wichtiges lymphoides Organ dar. Sie besitzt Funktionen sowohl des Knochenmarkes als auch der Lymphknoten höherer Vertebraten, beides Organe, die den Knochenfische fehlen (INGRAM & ALEXANDER 1981; ELLIS 1982).

Eine genaue Kenntnis der Abwehrmechanismen der Fische ist schon aus wirtschaftlichem Interesse notwendig. Mit der ansteigenden Weltbevölkerung wächst auch die Bedeutung diese Tiere als Quelle biologisch hochwertigen Proteins. In der kommerziellen Fischhaltung mit

großen Besatzdichten müssen verlustreiche Krankheitsausbrüche vermieden werden. Neben artgerechter Haltung und optimaler Fütterung hilft das Wissen über das Immunsystem der Fische, negative Einflüsse zu vermeiden und die unspezifische Resistenz der Tiere zu steigern. Die Entwicklung effektiver Vakzine setzt auch eine möglichst genaue Kenntnis des spezifischen Immunsystems voraus.

Im Folgenden soll in Kürze zuerst das unspezifische und das spezifische Abwehrsystem bei Fischen allgemein beleuchtet werden. Anschließend werden diese beiden Abwehrsysteme bei der Immunreaktion einer *M. cerebralis* Infektion vorgestellt.

2.9.1 Das unspezifische Abwehrsystem

Das unspezifische Abwehrsystem setzt sich aus einer Reihe von Mechanismen zusammen, die die erste Verteidigungslinie des Organismus gegen potentielle Krankheitserreger bilden. Sehr häufig reicht die Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems bereits aus, um den Ausbruch einer Krankheit zu verhindern. Auch nach einer überstandenen Infektion bleibt die Wirkung dieser angeborenen, und im Gegensatz zum spezifischen Immunsystem nicht erworbenen Mechanismen, unverändert, da kein Immungedächtnis ausgebildet wird (MALE & ROITT 1991).

Die unspezifische Abwehr bei Fischen besteht aus zwei funktionell eng miteinander verbundenen Mechanismen, nämlich die zelluläre und die humorale Abwehrmechanismen.

Träger der **zellulären** Abwehr sind die **Phagozyten** und die **Granulozyten**, die bei infektiösen Prozessen in der Lage sind, in das Gewebe auszuwandern um Pathogene zu phagozytieren (ALEXANDER 1985; ELLIS 1982). Die **Phagozytose** kann bei der Regenbogenforelle ab dem vierten Lebenstag nachgewiesen werden (MANNING et al., 1982).

Zu den humoralen Abwehrfaktoren zählen beim Fisch das **Komplementsystem**, das **Properdin** (alternativer Komplementweg), sowie das **C-reaktive Protein**, **Lysozyme**, **Interferon** und natürliche **Hämolysine** (ALEXANDER 1985; ANDERSON et al. 1979; ELLIS 1982) (Tabelle 5).

Proteine	Funktion
Interferon Transferin	Hemmung bzw. Verlangsamung des Wachstums von Mikroorganismen
Alpha 2- Makroglobulin	Neutralisierung der Aktivität von Enzymen
Komplementsystem Lysosym; Chitinase	Lysieren von Zellen und Mikroorganismen
C-reaktive Protein (CRP) Präzipitine, Agglutinine (Lektine), Opsonine	Agglutination von Zellen oder Moleküle Phagozytose-Stimulation

Tabelle 5: Einteilung der im Serum und andere Körperflüssigkeiten enthaltenen Proteine, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen können. Nach ALEXANDER (1985).

2.9.2 Das spezifische Abwehrsystem

Das spezifische Abwehrsystem reagiert im Gegensatz zum unspezifischen System in einer spezifischen Reaktion auf jedes einzelne Antigen. Nach einer überstandenen Infektion wird ein Immungedächtnis ausgebildet was zur Folge hat, dass der Erreger bei einem erneuten Kontakt eine verbesserte Immunabwehr vorfindet. Es bildet sich somit eine erworbene Immunität aus. Man unterscheidet die Entstehung einer humoralen Immunität, die auf Antikörpern basiert und eine zellvermittelte Immunität, deren Grundlage vor allem zelluläre Vorgänge sind (MALE & ROITT 1991).

Lymphoide Gewebe und Lymphozyten

Die Immunkompetenten Organe (sog. lymphoides Gewebe) bei den Knochenfischen sind hauptsächlich im Thymus, in der Milz, in der Kopfniere, in diffusen retikuloendothelialen und in knochenmarksäquivalenten Geweben lokalisiert (Tabelle 6).

Die Lymphozyten der Fische kommen im Blut und in den lymphatischen Organen vor (Thymus, Milz und Kopfniere). Sie sind denen der Mammalia in ihren färberischen Eigenschaften und der Morphologie sehr ähnlich (ELLIS 1976; ELLIS et al. 1989). Im Fischblut sind morphologisch große (8-12 μm) und kleine (4-5 μm) Lymphozyten unterscheidbar, die vermutlich unterschiedliche Funktionszustände repräsentieren (ELLIS 1976). AMIN et al. (1992) sind der Ansicht, dass große Lymphozyten zumindest bei Regenbogenforellen unreife Formen darstellen. Die absolute Anzahl an Lymphozyten (Tabelle 7) liegt bei Fischen im Allgemeinen höher als bei Säugertieren (ELLIS et al. 1989).

	Thymus	Knochenmarksäquivalente
Cyclostomata	Inger: Evtl. Vorläuferorgan in der Gaumenmuskulatur. (RIVIERE et al. 1975)	Inger: Vorniere: Zentralmasse aus lymphohämoepoetischen Zellen.(ZAPATA et al. 1984)
Knorpelfische	Rochen: Teilung in Mark und Rinde, Lymphozyten in einem Netzwerk. (ZAPATA 1980)	Lymphomyeloides Gewebe im Bereich von Kopf, Schulter Oesophagus (Leydig'sches Organ) und Gonaden (epigonales Organ). (FÄNGE 1982; ZAPATA & COOPER 1990)
Knochenfische	Abgrenzung von Mark und Rinde je nach Fischart. (TATNER et al. 1982; CHILMONCZYK 1983)	Lymphohämoepoese in der Vorniere (ZAPATA & COOPER 1990)
	Milz	GALT (Lymphoides Gewebe im Bereich des Intestinums)
Cyclostomata		Inger: Granulozyten in der Submucosa, intraepitheliale Leukozyten. (TOMONAGA et al., 1973; OSTBERG et al. 1975; ZAPATA et al., 1984)
Knorpelfische	Hundshai, Trennung in roter und weißer Pulpa, weißer Pulpa als PELS. (PULSDORF et al. 1982)	Subepitheliale Lymphozytenaggregate (TOMANAGA et al. 1986)
Knochenfische	Trennung von roter und weißer Pulpa je nach Art unterschiedlich scharf oder kaum zu erkennen. (ZAPATA 1982)	Im Epithel: Ig-negative Lymphozyten, in der Lamina propria: Ig-positive Lymphozyten außerdem Granulozyten und Plasmazellen, keine Aggregatbildung. (ROMBOUT et al. 1991)

Tabelle 6: Übersicht über die lymphoiden Gewebe bei verschiedenen Fischgruppen.

Im Blut von Regenbogenforellen stellen die Lymphozyten den häufigsten Zelltyp der weißen Zellreihe dar (BLÜM et al. 1998). Die Morphologie der Lymphozyten wird bei allen Fischarten einheitlich beschrieben (ELLIS et al. 1989). Es sind runde Zellen mit einem großen Zellkern und mehr oder weniger dichtem Chromatin.

Humorale Immunität

Die humorale Immunität zeichnet sich durch die Bildung von Immunglobulinen, so genannten Antikörpern aus. Antikörper sind Proteinmoleküle, die von Plasmazellen und deren Vorstufen als Folge der Wechselwirkung zwischen antigenempfindlichen B-Lymphozyten und spezifischem Antigen gebildet werden (TIZARD 1981).

Die Immunglobuline

Antikörper können je nach ihrer biologischen Aktivität in Kategorien eingeteilt werden.

Agglutinierende Antikörper isolieren Antigene wie Bakterien, Viren oder fremde Erythrozyten und bilden Aggregate, von denen anzunehmen ist, dass sie weniger toxisch und leichter

phagozytierbar sind. Agglutinierende Antikörper können auch das Komplementsystem aktivieren und so zur Partikellysis führen.

Fischart	Gewicht (g)	Anzahl [$\times 10^4/\mu\text{l}$] oder [%]*	Autor
Karpfen	75-116	2,00	LEHMANN et al. (1994)
Bachforellen	160	56-100%	BLAXHALL & DAISLEA (1973)
Regebogenforellen	50	1,34-2,16 (große Lymphozyten) 1,26-2,72 (kleine Lymphozyten)	BRUNO & MUNRO (1986)
Atlantische Lachs	20	1,41-1,79 (große Lymphozyten) 1,40-2,22 (kleine Lymphozyten)	BRUNO & MUNRO (1986)
Schollen	o.A.	4,80	ELLIS et al. (1989)

Tabelle 7: Normalwerte für Lymphozyten bei Knochenfischen nach verschiedenen Autoren. (o.A. = ohne Angaben; *= Prozentwert, bezogen auf Gesamtleukozytenzahl ohne Thrombozyten).

Präzipitierende Antikörper verursachen die Präzipitation von löslichen Antigenen. Sie neutralisieren die Toxizität des Antigens und erleichtern ebenfalls die Phagozytose.

Virusneutralisierende Antikörper haften an der Oberfläche des Viruspartikels und verhindern dadurch, dass Zellen infiziert werden können (ELLIS & SCHLOTFELDT 1985).

Bereits die Cyclostomata bilden Immunglobuline mit der typischen H_2L_2 - Konfiguration des Antikörpers.

Bei den Chondrichthyes finden sich zwei Antikörperklassen, die HMW-Ig und die LMW-Ig. Die HMW-Ig ist ein pentameres Molekül und wird wegen seiner Ähnlichkeit zu dem Säugetiermolekül auch als IgM bezeichnet. Es ist immer mit einer J-Kette assoziiert. Bei allen Arten scheinen auch LMW-Ig vorzukommen, die bei den Rochen als IgR bezeichnet werden (Tabelle 8).

Auffällig ist, dass das IgM der Knochenfische tetramere Strukturen hat. Eine J-Kette konnte nur bei manchen Arten gefunden werden. Die intramolekulare Struktur ähnelt den Verhältnissen bei den Säugetierantikörpern. Unklar ist noch, ob zwei unterschiedliche Typen der L-Ketten eine Anordnung der L-Ketten in Kappa- und Lambda-Klassen wie bei den Säugetieren rechtfertigen. LMW-Ig ist nicht bei allen Fischarten vorhanden. Bei manchen Arten kommen im Hautschleim dimere Antikörper vor, die mit einer sekretorischen Komponente versehen sind (Tabelle 8).

Tierart	Molekül- Bezeichnung	MG intakt in kDa	MG. d. H-Kette in kDa
Inger	Keine Angabe	150-160	68
Meerneunauge	Keine Angabe	Keine Angabe	68-70
Krausenhai	HMW-Ig/IgM IMW-Ig/IgR	900 300	Keine Angaben Keine Angaben
Kabeljau	HMW-Ig/IgM	851	80
Katzenwels	HMW-Ig/IgM	700	70
Atlant. Lachs	HMW-Ig/IgM	800	72
Tierart	MG. d. L-Kette in kDa	Polymerisations- grad	Quelle
Inger	22-25	(H ₂ L ₂) _x	KOBAYASHI et al. 1985
Meerneunauge	22	Keine Angabe	SCHULTER et al. 1991
Krausenhai	22-24 22-24	Pentamer Dimer	KOBAYASHI et al. 1992
Kabeljau	27,5	Tetramer	PILSTRÖM und PETTERSEN 1991
Katzenwels	22-24-26	Tetramer	LOBB et al. 1984
Atlant. Lachs	27	Keine Angaben	HAVARSTEIN et al. 1990

Tabelle 8: Kleine Übersicht über Immunglobuline bei einigen Fischarten.

Zellvermittelte Immunität

Der Ausdruck zellvermittelte Immunität wurde anfangs für diejenigen Immunreaktionen verwendet, die in erster Linie durch Lymphozyten und Phagozyten und weniger durch Antikörper (humorale Immunität) hervorgerufen werden.

Mittlerweile wird dieser Ausdruck für jede Immunantwort gebraucht, bei der Antikörper eine untergeordnete Rolle spielen (ROOK 1991b).

Nach THOMAS und WOO (1990) manifestiert sich die zellvermittelte Immunität in mehreren Vorgängen: in der Transplantatabstoßungsreaktion, in der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, in der zellulären Zytotoxizität, in der gemischten Lymphozytenreaktion, in der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ und in der Makrophagenmigrationshemmung.

Für die Interaktionen der beteiligten Zellen sind die Zytokine und die Produkte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) von großer Wichtigkeit (OWEN 1991; ROOK 1991b).

Ein **Haupthistokompatibilitätskomplex** (major histocompatibility complex, MHC), der bei den Säugetieren für die Kontrolle und Regulation der T-Zellaktivierung verantwortlich ist, existiert auch bei Fischen. MHC-Klasse-I und II-Moleküle sind bei Vertretern der Fische gefunden worden. Beim Karpfen hat man Sequenzen isoliert, die MHC-Ketten vom Menschen homolog sind.

2.10 Immunologie der *Myxobolus cerebralis* Infektion

2.10.1 Unspezifische Abwehrmechanismen

Nach Untersuchungen von NAKANISHI und OTOTAKE (1997) induziert eine Antigenaufnahme über die Haut bei Fischen vor allem zelluläre Abwehrmechanismen. Dabei sollen nicht nur Makrophagen, sondern auch verschiedene Typen von Epithelzellen in der Lage sein, Antigene aufzunehmen.

Auch andere Autoren beschrieben eine Phagozytoseaktivität von Epithelzellen. So konnte PHROMSUTHRIAK (1977) beim Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) Epidermiszellen beobachten, die in der Lage waren Kohlepartikel zu phagozytieren.

PELETEIRO und RICHARDS (1990) fanden in der Haut von Regebogenforellen filamenthaltige Zellen, die Melanin und Phagosomen enthielten und zur Phagozytose befähigt sein sollen. IGER und ABRAHAM (1990) konnten in Epidermiszellen, die Zelldebris phagozytiert hatten, enzymatische Aktivität in Form von Peroxidase und alkalischer Phosphatase nachweisen. Da die bei den Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* beobachteten Degenerationserscheinungen ausschließlich bei intrazellulären Zellagregaten auftraten, wäre auch hier eine Phagozytoseaktivität der Epidermiszellen, verbunden mit enzymatischer Aktivität, in Betracht zu ziehen. Dies würde bedeuten, dass die Amöboidkeimzellen nicht nur aktiv in Epithelzellen, sondern auch passiv von diesen aufgenommen, also phagozytiert werden.

Durch die kurze Aufenthaltsdauer in der Epidermis wo sie bereits 5 Stunden pe. in deutlich geringerer Anzahl und 24 Stunden nicht mehr nachweisbar waren, bieten die Parasitenstadien in diesem Eintrittsgewebe wohl nur wenige Angriffspunkte für das Immunsystem des Wirtes. Über die Reaktionszeit zellulärer Abwehrmechanismen beim Fisch liegen erst wenige

Untersuchungen vor. So konnte SMITH (1982) vier bis acht Stunden nach Badimmersion mit bovinem Serum-Albumin zelluläre Reaktionen in der Haut von Regenbogenforellen nachweisen. IGER und ABRAHAM (1990) konnten bei einer durch Traumatisierung der Haut von Karpfen induzierten Entzündung etwa drei Stunden nach Wundsetzung eine vermehrte Aktivität neutrophiler Granulozyten feststellen, eine deutliche Zunahme der Lymphozyten war erst nach 12 Stunden zu bemerken.

Erst fünf Tage pe. konnten HOFFMANN und EL-MATBOULI (1996) in der Umgebung von Parasitenstadien in der Subkutis Rundzellen und Makrophagen finden, was bedeutet, dass diese ihre Wanderung fortsetzen und sich im Knorpelgewebe zu reifen Sporen entwickeln können.

Nach HOFFMANN et al. (1991) sind Myxosporea, die in Organen parasitieren, welche keinen direkten Kontakt zum Blutgefäßsystem aufweisen (wie Nerven- oder Knorpelgewebe), weitgehend vor Immunreaktion des Wirtes geschützt.

Im Gegensatz dazu berichten HEDRICK et al. (1998), dass definitiv nachweisbare Auseinandersetzungen von Immunzellen mit den Parasitenstadien erst im Knorpelgewebe stattfinden. Die Autoren beschreiben eine massive Makrophagen-Infiltration und eine fokale bis diffuse granulomatöse Entzündung in der Peripherie der Knorpelläsionen. Möglicherweise sind solche Reaktionen auf den Kontakt des Perichondriums mit dem Blutgefäßsystem zurückzuführen. Allerdings fanden die Autoren auch in der Umgebung der Parasitenstadien im nekrotischen Bereich des Knorpels große Mengen von Makrophagen und, in geringerer Zahl auch verschiedene Typen Leukozyten. Diese Reaktionen wurden aber erst beobachtet, nachdem bereits ausgedehnte Schäden im Knorpelgewebe entstanden waren.

2.10.2 Spezifische Abwehrmechanismen

Bei Fischen konnte bislang nur eine, dem Immunglobulin M der Mamalia ähnliche Antikörperklasse nachgewiesen werden. Solche Antikörper wurden sowohl im Blut als auch im Darm- und Hautschleim gefunden (AMLACHER 1992).

Auch im Blut drehkranker Regenbogenforellen konnten Antikörper gegen *M. cerebralis*-Antigene nachgewiesen werden (GRIFFIN & DAVIS 1978; HOFFMANN et al. 1991), auch wenn deren Wirksamkeit noch nicht belegt wurde.

Auch wenn einigen Parasitenstadien offensichtlich die Überwindung dieser ersten Barriere und sogar eine Vermehrung in der Epidermis gelang, bedeutet dies nicht, dass sie ihren weiteren Invasionsweg nun ungestört fortsetzen können. Ihr mehrtägiger Aufenthalt in der Subkutis bietet einen nicht zu vernachlässigenden Angriffspunkt für das Immunsystem des Wirtes. Es wäre

sicherlich aufschlussreich, weiterführende Untersuchungen über eine Immunantwort in diesem Durchgangsgewebe des Parasiten durchzuführen.

Für den Eintritt einer Reinfektionsimmunität gegenüber *M. cerebralis* sprechen auch die Ergebnisse von Feldversuchen mit dem Antibiotikum Fumagilin DCH. Dieses Medikament ist in der Lage die Sporenentwicklung bei mit *M. cerebralis* infizierten Regenbogenforellenbrütlingen zu unterdrücken, wodurch die Zahl der Krankheitsausbrüche deutlich gesenkt wird (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1991b; LUTZ 1992).

Interessanterweise wurden auch nach Absetzen des Antibiotikums bei in zwei verschiedenen Teichwirtschaften in Erdteichen gehaltenen Fischen kaum neue Krankheitsausbrüche beobachtet, obwohl die Fische immer noch den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt waren und unterstellt werden darf, dass sie weiterhin mit Triactinomyxonsporen Kontakt hatten (HOFFMANN & EL-MATBOULI, 1996).

2.11 Vorkommen der Drehkrankheit in den USA

Die Einschleppung von *M. cerebralis* in die USA erfolgte möglicherweise in den 50er Jahren durch die Einfuhr gefrorener Forellenfilets aus Dänemark (HOFFMAN 1990; MATTHEWS 1995). Im Jahr 1956 wurde die Drehkrankheit zum ersten Mal in Pennsylvania auf der „Benner Spring Fish Research Station“ und fast simultan in Nevada diagnostiziert. Danach trat sie 1961 in Connecticut, 1965 in Virginia und schließlich 1966 in Kalifornien und Massachusetts auf (HOFFMAN 1990). Bis heute hat die Erkrankung 22 Bundesstaaten der USA erfasst (VINCENT 1996) (Tabelle 9). Sie stellt dort somit eine der ernstesten Bedrohungen sowohl für Wild- als auch für Zuchtpopulationen von Salmoniden dar (ROGNILE & KNAPP 1998).

Trotz der teilweise explosionsartigen Ausbreitung der Drehkrankheit in den USA scheinen die betroffenen Gewässer nicht mit gleicher Intensität durchseucht zu sein. Die Ursache für diese unterschiedlichen Befallsstärken der verschiedenen Gewässersysteme konnte bis jetzt nicht ganz geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass eine Infektion mit *M. cerebralis* bzw. der Ausbruch der Drehkrankheit durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird.

Dazu zählen neben der Wasserqualität und -temperatur, den im Wasser gelösten atmosphärischen Gasen, den verfügbaren Nahrungsquellen und der Artenzusammensetzung im Habitat, vor allem auch Einflussnahmen durch den Menschen (SCHISLER & BERGERSEN 1998). Den Autoren fiel auf, dass die am schwersten befallenen Gewässer auch gleichzeitig bevorzugte Ziele für die Forellenfischerei darstellen und einem intensiveren Management unterliegen.

Während man die Krankheit in den Fischzuchten durch Optimierung der Haltungsbedingungen weitgehend in den Griff zu bekommen scheint, verursacht die Drehkrankheit in den großen Flüssen wie beispielsweise dem Colorado River ein Massensterben der Forellen und trifft die Bevölkerung der USA, die traditionell dem Fliegenfischtourismus sehr verbunden ist, ganz besonders. Demzufolge entstand 1994 durch eine Bürgerinitiative die 'Whirling Disease Foundation'. Seitdem wird der Drehkrankheit in den Vereinigten Staaten von sowohl in emotionaler als auch ökonomischer Hinsicht eine ganz besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Staat	Autoren	Staat	Autoren
Arizona	LOPEZ 2000	New Jersey	HALLIDAY 1976
California	YASUTAKE & WOLF 1970	New Mexico	GOEDE 1987
Colorado	BARNEY et al. 1988; WALKER & NEHRING 1995	New York	HOFFMAN 1990
Connecticut	HOFFMAN 1962; HNATH 1970	Ohio	TIDD & TUBB 1970
Idaho	HAUCK et al. 1988	Oregon	HOLT et al. 1987
Maryland	GESEKER 1995	Pennsylvania	HOFFMAN 1962
Massachusetts	HOFFMAN 1990	Utah	HECKMAN 1992
Michigan	YODER 1972	Virginia	HOFFMAN 1970
Montana	VINCENT 1996	Washington	AMOS 1996
Nevada	YASUTAKE & WOLF 1970; TAYLOR et al. 1973	West Virginia	MEYERS 1969
New Hampshire	HENDEE, 1981	Wyoming	MONEY 1988

Tabelle 9: Übersicht über die Staaten in den USA, wo bis zum heutigen Tag *M. cerebralis* in Fischzuchtanlagen, stehende und fließende Gewässern gefunden werden konnte. Nach BARTHOLOMEW & RENO (American Fisheries Society Symposium. AFS 2002).

3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Regenbogenforellen zur Gewinnung von *Myxobolus cerebralis* Sporen

Zur Gewinnung der Sporen von *Myxobolus cerebralis* (*M. cerebralis*) für die Infektion der Tubifiziden wurden ausschließlich institutseigene, drehkranke Regenbogenforellen verwendet. Die Fische wurden bei einer Wassertemperatur von 12 °C und mit permanentem Frischwasserzulauf (0,5 bis 1 l pro Minute) in 200 l großen Plastiktonnen gehalten. Eine Anreicherung des Wassers mit Sauerstoff erfolgte mit Kieselgurausströmer. Für die Fütterung wurde handelsübliches Forellenfutter verwendet.

3.1.2 Produktion von *Triactinomyxon* Sporen

Für die Produktion von *Triactinomyxon* Sporen wurden institutseigene parasitenfreie Tubifiziden der Gattung *Tubifex tubifex* verwendet. Die Oligochaeten wurden in einer ca. 200 l fassenden Tonne (Stammbecken) mit permanenter Wasserzufuhr von 1,5 l/min und Sauerstoffzufuhr gehalten. Die Wassertemperatur wurde bei konstant 12 °C gehalten.

3.1.3 Regenbogenforellenbrütlinge für die Infektionsversuche

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Regenbogenforellen-Linien verwendet. Es handelte sich zum einen um eine, als besonders empfänglich geltende amerikanische Linie (AmTl) und zum anderen eine bis zum Zeitpunkt des Versuchs noch unbekannt deutsche Wildlinie (DtWf). Aus Datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Zuchtanlagen, aus denen das Fischmaterial bezogen wurde, anonymisiert. Die deutsche Wildlinie wird im Folgenden als Linie „DtWf“, die amerikanische als „AmTl“ bezeichnet

Die Infektionsversuche wurden mit Tieren durchgeführt, die im Eipunktstadium bezogen wurden und in einem SPF-Raum (spezifisch pathogenfrei) des Instituts zum Schlüpfen gebracht und vorgestreckt wurden. Die Regenbogenforellenbrütlinge wurden bei einer Wassertemperatur von ca. 12 bis 14 °C in Glasaquarien mit 60 l Fassungsvermögen gehalten. Es fand eine permanente Belüftung mit einem Kieselgurausströmer statt. Zur Fütterung wurde handelsübliches Forellenfutter benutzt.

Sowohl bei der Hälterungen als auch der Versuchsdurchführungen wurde Münchner Leitungswasser mit einem Härtegrad von 16,8° dH verwendet.

3.2. Methoden

Für die Durchführung aller Infektionsversuche war es notwendig, ausreichend Sporenmaterial aus infizierten Fischen/Oligochaeten zu isolieren. Zunächst wurden aus drehkranken Regenbogenforellen reife *M. cerebralis* Sporen isoliert, mit denen empfängliche Oligochaeten der Spezies *Tubifex tubifex* infiziert wurden. Nach ca. drei Monaten begannen diese mit der Ausscheidung von TAM-Sporen, die wiederum zur Infektion von Regenbogenforellenbrütlingen verwendet wurden.

3.2.1 Gewinnung von *Myxobolus cerebralis* Sporen

Zur Gewinnung von *M. cerebralis* Sporen wurden drehkranke, institutseigene Regenbogenforellen verwendet. Die Tiere wurden mit einer 0,007% MS 222 (Tricain-Methan-Sulfat) -Lösung betäubt und anschließend durch Genickschnitt getötet. Die Köpfe wurden abgetrennt, die Augen entfernt und die Wirbelsäulen freigelegt. Die so präparierten Knorpel- und Knochenteile wurden dann in einem Alleszerkleinerer der (Fa Moulinex®) mit etwas Leitungswasser so lange zerkleinert bis sich eine homogene Sporensuspension ergab. Um grobe Bestandteile, v.a. Muskelanteile, zurückzuhalten, wurde die Sporensuspension schließlich durch eine Gaze mit einer Maschenbreite von 200 µm filtriert. Das weitere Vorgehen erfolgte dann nach der Methode von O'GRODNICK (1975) mittels Planktonzentrifuge.

Das so gewonnene Sporenmaterial wurde auf 100 ml mit Leitungswasser aufgefüllt. Von dieser Suspension wurden 50µl entnommen, auf einen Objektträger verbracht und mit einem Deckglas bedeckt. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte dann die Auszählung der Sporen bei 400-facher Vergrößerung. Nach anschließender Hochrechnung konnte dann die Gesamtzahl der isolierten *M. cerebralis* Sporen auf das Gesamtvolumen der Suspension ermittelt werden.

3.2.2 Infektion der Oligochaeten und Gewinnung der *Triactinomyxon* Sporen

Vorrätig gehaltene Oligochaeten wurden mit den zuvor gewonnenen *M. cerebralis* Sporen bei einer Dosierung von ca. 3.000 bis 5.000 Sporen je *Tubifex tubifex* in einer kleinen Wassermenge exponiert. Das Wasservolumen des Beckens wurde im Laufe einer Woche sukzessiv aufgefüllt.

Die Becken wurden in einem Brutschrank (Fa. Binder®) bei einer Temperatur von 15°C und mit Sauerstoffzufuhr durch ein Kieselgurausströmer gehalten. Als Bodensediment diente keimfreier Sand. Nach wöchentlichen Wasserwechseln und Fütterung der Oligochaeten mit Spirulina konnten erstmals ab drei Monate post expositionem die ersten TAM-sporen aus dem Wasser isoliert werden. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte zweimal wöchentlich eine Filtration des Wassers durch ein Siebgewebe mit einer Maschenweite von 20 µm. Aus dem gewonnenen Sporenkonzentrat wurde ein definiertes Volumen auf einen Objektträger gebracht und bei 100-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgezählt. Anschließend wurde die Zahl der intakt erhaltenen Sporen auf das Ausgangsvolumen hochgerechnet. Die Haltung mehrerer, nachfolgend infizierter Oligochaetenbecken sollte zu jedem Zeitpunkt eine ausreichende Menge an Triactinomyxon Sporen zur Infektion der Forellenbrütlinge sicherstellen.

3.2.3 Infektionsversuche und Hälterung der Forellenbrütlinge

Da die klinische Symptomatik ganz entscheidend vom Fischalter zum Infektionszeitpunkt abhängt und nur bei sehr jung infizierten Forellen deutlich ausgeprägt ist, war der Zeitraumen zur Infektion der Forellenbrütlinge begrenzt. Deshalb wurden die Infektionsversuche so durchgeführt, dass Alter, Gewicht und Größe der Versuchstiere soweit wie möglich übereinstimmten. Die genauen Angaben zum Schlüpfdatum, zum Körpergewicht, zur Körpergröße und zu den Tagesgraden der beiden Regenbogenforellen-Linien zum Infektionszeitpunkt sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Forellenlinie	Schupfdatum	Infektionsdatum	Körpergewicht (g)	Körpergröße (cm)	Tagesgrade
DtWf	14.05.2004	14.06.2004	0,4-0,5	2-2,5	480
AmTl	29.06.2004	02.08.2004	0,3-0,4	1,5-2	525

Tabelle 10: Übersicht über die Regenbogenforellen-Linien des Infektionsversuchs. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf). Amerikanische Forellen-Linie (AmTl).

Für die Infektion der Forellenbrütlinge wurden pro Linie fünf Infektionsbäder a 500ml mit den fünf verschiedenen Konzentrationen 0, 10, 100, 1.000 und 5.000 TAM- Sporen pro Einzelfisch hergestellt. Die Forellenbrütlinge wurden dann in den Infektionsbädern eingesetzt und dort für drei Stunden unter ständiger Kontrolle und Sauerstoffzufuhr gehalten.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Fische mitsamt der Sporen in die vorbereiteten 60 l Glasaquarien umgesetzt. Die Hälterung der Forellenbrütlinge erfolgte anschließend bei etwa 13°C in Glasaquarien mit einem Fassungsvermögen von 60 Litern. Die Aquarien verfügten über einen Wasserdurchlauf von ca. 1 l/min. Dabei wurde entchlorte Münchener Leitungswasser der Härte 16,8 °dH verwendet. Die Sauerstoffanreicherung des Wassers wurde mittels Kieselgurasströmer gewährleistet.

Infektionsdosis (TAMs/Fisch)	Forellen-Linie	
	DtWf	AmTl
0	40 Fische	30 Fische
10	40 Fische	30 Fische
100	40 Fische	30 Fische
1000	40 Fische	30 Fische
5000	40 Fische	30 Fische

Tabelle 11: Übersicht über die Anzahl der Fische und die Infektionsdosen des Infektionsversuches. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf). Amerikanische Forellen-Linie (AmTl). Anzahl der Triactinomyxon-Sporen je Fisch (TAMs/Fisch).

3.2.4 Überprüfung des Infektionserfolges

Um den Erfolg des Infektionsversuchs überprüfen zu können fanden zwei Methoden Verwendung. Zum einem durch eine mikroskopische Untersuchung des Infektionsbads post-expositionem. Dafür wurde nach der dreistündigen Expositionszeit eine Wasserprobe aus dem Infektionsbad entnommen. Diese wurde dann lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von intakten Triactinomyxon Sporen (Amöboidkeime vorhanden) sowie Sporen mit ausgeschleuderten Amöboidkeime untersucht. Daraufhin wurde das Verhältnis zwischen diesen zwei Parametern gebildet und somit konnte der Erfolg des Infektionsversuches bewertet werden. Die zweite Methode bestand darin, die Fischepidermis vor Ablauf der Inkubationszeit histologisch nach eingedrungenen Amöboidkeimen zu untersuchen. Dafür wurde eine Stunde nach Expositionsbeginn ein Tier pro Gruppe aus dem Infektionsbad entnommen durch Genickschnitt getötet und in 5%igem Formalin fixiert. Nach mindestens 48 Stunden wurden die

fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden an einem Mikrotom (Modell 1140/Autocut, Fa. Reichert-Jung®) 4,0µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Nach erfolgter Hämatoxilin-Eosin-Färbung wurde die Epidermis lichtmikroskopisch auf penetrierte Amöboidkeime untersucht.

3.2.5 Beobachtung der klinischen Symptome

Die Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit wurde im klinischen Teil durch die Länge der Inkubationszeit (bis zum Auftreten der ersten Symptome), sowie den Prozentsatz der klinisch erkrankten Tieren über einen Fünf-Monats-Zeitraum ermittelt.

Nach erfolgreicher Infektion wurden die Forellenbrütlinge täglich auf beginnende Symptome der Drehkrankheit untersucht. Ab dem Zeitpunkt der ersten typischen Symptome wurde eine regelmäßige Dokumentation der symptomatischen Entwicklung durchgeführt.

Es wurden neben der Anzahl der Fische, vorwiegend die drei Hauptsymptome der Drehkrankheit im Einzelnen die Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie, die Drehbewegungen nach Reizsetzung und die Deformationen dokumentiert.

3.2.6 Post mortem Untersuchungen

Fünf Monate post infectionem wurden per Zufall aus jeder Gruppe 10 Forellen entnommen, mittels Tötungsbad (0,007 % MS 222, Tricain-Methan-Sulfat) getötet und sowohl Gewicht als auch Größe notiert. Der Kopf der Fische wurde am Ansatz der Rückenflosse sagittal in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für die später vorgesehene histologische Untersuchung in 5%igem, gepufferten Formalin fixiert, die andere Hälfte wurde für die Verdauungsmethode eingefroren. Die Empfänglichkeit der einzelnen Linien gegenüber einer Infektion mit *M. cerebralis* wurde anhand folgender Parameter validiert:

Zum einen durch die Ermittlung der Infektionsprävalenz, d.h. dem Prozentsatz der histologisch untersuchten Fische, bei denen Sporen im Kopfknochen gefunden werden konnten. Zum anderen wurde die Anzahl der *M. cerebralis* Sporen im Kopfknochen mittels Verdauungsmethode (MARKIOW & WOLF 1974) quantitativ erfasst und die durch die Wirtsreaktion und die Sporen hervorgerufenen pathologischen Veränderungen im Kopfknochen (BARTHOLOMEW et al. 2001) bewertet.

Um die bei den histologischen Untersuchungen am Lichtmikroskop erlangten Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich Proben der beiden Forellenzuchtlinien transmissions-

elektronenmikroskopisch (TEM) auf präsporogonische sowie sporogonische Entwicklungsstadien in der Haut, im ZNS und im Knorpelgewebe untersucht.

Fische aus beiden Stämmen, mit histologisch negativem Befund, d.h. bei denen keine Sporen nachgewiesen werden konnten, wurden molekularbiologisch mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf *M. cerebralis* untersucht (siehe Kapitel: 3.2.6.4).

3.2.6.1 Präparation der Sporen mittels Verdauungsmethode

Bei der Verdauungsmethode wurde nach MARKIW und WOLF (1974) zunächst der Knorpel von den anderen Geweben separiert. Die bei -21°C tiefgefrorenen Kopfhälften wurden aufgetaut, in Histologiegläser verbracht und dann in 40°C warmen Aqua. dest. mit 3 Glaskugeln (Durchmesser ca. 5mm, Fa. Riedel-de Hæn) für ca. ein bis drei Stunden (je nach Fischkopfgröße) inkubiert und bei einer Frequenz von 100 Umdrehungen pro Minute gerüttelt (Shaker KL2 von Fa. Edmund Bühler®).

Durch dieses Verfahren konnte aus jeder einzelnen Kopfhälfte die Muskulatur und die übrigen Weichebestandteile vom Knorpelmaterial entfernt werden. Dieses wurde anschließend in Zentrifugenröhrchen verbracht und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

In der zweiten Phase der Verdauungsmethode nach MARKIW und WOLF (1974) wurde das so gewonnene Knorpelmaterial zuerst aufgetaut nacheinander mit den Enzymen Pepsin und Trypsin verdaut und bei 37°C für 1 bis 3 Stunden im Wasserbad inkubiert, so dass eine reine Sporensuspension resultierte. Anschließend erfolgte die quantitative Erfassung der Sporensuspension mit Hilfe der Neubauerzählkammer. Das Prozedere der Gewinnung und Zählung der Sporen unterlag dem Standard "Protocol for Whirling Disease Research" (BARTHOLOMEW et al. 2001).

3.2.6.2 Histologie des Kopfkorpels

Die in 5%igem Formalin fixierten Kopfhälften wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. An einem Mikrotom (Modell 1140/Autocut, Fa. Reichert-Jung®), wurden anschließend von jeder Kopfhälfte mindestens drei $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, in Ebenen mit hohem Knorpelanteil zu schneiden. Nach Trocknung erfolgte die Färbung der histologischen Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE).

Zur Bewertung der Wirtsreaktion wurde das Gradierungsschema der MacCONNELL-Baldwin Numerical Scala (BARTHOLOMEW et al. 2001) verwendet. Bei dieser Beurteilungsmethode handelt es sich um eine Skala, über die Qualität und Quantität, der durch die Sporen und die Wirtsreaktion im Knorpelgewebe ausgelösten histopathologischen Veränderungen von null bis fünf graduiert werden können. Die Einteilung der verwendeten Skala in der Tabelle 12 zusammengefasst.

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

Tabelle 12: Gradierungsschema des MACCONNELL-BALDWIN Numerical Scale zur Bewertung der Wirtsreaktion (BARTHOLOMEW et al. 2001).

3.2.6.3 Transmissions-Elektronenmikroskopische Untersuchungen (TEM)

Für die spätere Analyse mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) wurden Proben aus beiden Forellen-Linien (Flossen, Haut mit Muskulatur, Knorpel) von ca. 2mm Kantenlänge entnommen und in 6,25% Glutaraldehyd fixiert. Nach ca. 3 Stunden wurden die Proben mit einer Sörensen-Saccharose-Puffer-Lösung gespült und bis zur Weiterverarbeitung in diesem Medium bei 6 °C aufbewahrt. Vor der Einbettung wurde mit Osmiumtetroxid für 2 Stunden nachfixiert (CAULFIELD 1957). Anschließend wurden die Proben erneut dreimal mit Sörensen-Saccharose-Puffer gespült. Die Entwässerung der Proben erfolgte über eine aufsteigende Azetonreihe zunächst in 75%igem Azeton für 20 Minuten, dann in 95%igem Azeton für erneut 20 Minuten und schließlich dreimal für je 20 Minuten in Absolutes Azeton (SITTE 1986). Die Proben wurden nach jeweils 10-minütigem Aufenthalt in aufsteigenden Aceton-Epon®-Gemischen (2:1, 1:1, 1:2) in reines Epon® 812 überführt und für 30 Minuten darin belassen. Anschließend erfolgte die Einbettung der Proben mit reinem Epon® 812 in vorgetrockneten Gelatine kapseln (LUFT 1969). Zur Polymerisation wurden die Kapseln vier Tage lang in einem Trockenschrank bei 60°C aufbewahrt.

Nach Entfernen der Gelatine kapseln im warmen Wasser wurden die Blöcke auf dem Gerät TM 60 (Fa. Reichert-Jung®) getrimmt. Mit einem MT-1-Ultramikrotom (Fa. Porter Blum®) wurden Semidünnschnitte von 1µm angefertigt. Diese wurden dann auf Objektträgern gebracht, bei 60 °C getrocknet und anschließend für vier Minuten bei 180 °C hitzefixiert. Die Beurteilung der Lokalisation dieser Semidünnschnitte erfolgte nach Färbung mit Toluidinblau am Lichtmikroskop und diente dem ermitteln geeigneter Stellen im Präparat für die Elektronenmikroskopie. Nach erneutem Zutrimmen der Blöcke wurden an einem Ultracut Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung®) Ultradünnschnitte von ca. 0,5-1,0 µm angefertigt. Diese wurden für 10 Minuten mit einer Uranylazetatlösung und für 2 Minuten mit einer Bleizitratlösung kontrastiert. Schließlich erfolgte die Auswertung der so vorbereiteten Präparate an einem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ EM-109 (Fa. Zeiss®) bei 60 bzw. 80 kV Betriebsspannung.

3.2.6.4 Molekularbiologische Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die molekularbiologische Untersuchung wurden sowohl die aus den untersuchten Kopfhälften entnommenen Knorpelstücke (zwischen 20 und 30 mg), als auch die aus der Verdauungsmethode gewonnenen Rückstände (20 µl) analysiert. In beiden Fällen wurde der DNA-Nachweis von *M. cerebralis* auf die Proben beschränkt, die histologisch sporenfrei erschienen.

DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA von *Myxobolus cerebralis* wurde das kommerziell erhältliche QIAamp® Mini Kit™ (Fa. Qiagen, Hilden) mit dem Protokoll für Gewebe nach Anleitung des Herstellers verwendet. Das Kit basiert auf einem Proteinase K-Verdau der Proben (3 Stunden bei 56°C) mit nachfolgender spezifischer Bindung der Nukleinsäuren an eine Silikagel-Membran. Durch mehrere Waschschriffe mit den entsprechenden Puffern wurde die gebundene DNA von Salzen, Proteinen und Lipiden gereinigt. Anschließend wurde sie mit 200 µl AE-Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde nach ANDREE et al. (1998) durchgeführt und ist ein in-vitro-Verfahren Amplifikation definierter DNA-Bereiche. Man nutzt hierzu die Fähigkeit der hitzebeständigen Taq-Polymerase, in Anwesenheit von dNTPs einen Einzelstrang in 5' → 3'-Richtung zum Doppelstrang polymerisieren zu können, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Starter (sequenzspezifischer Primer) zur Verfügung steht. Der DNA-Doppelstrang, der dem Reaktionsgemisch als Matrize (Template) beigelegt sein muss, wird im ersten Reaktionsschritt der Hitzedenaturierung, bei 94°C zu Einzelsträngen aufgetrennt. Die Taq-Polymerase hat hierbei gegenüber anderen DNA-Polymerasen den Vorteil, bei Temperaturen bis zu 96°C stabil zu sein, und muss daher nicht bei jedem Reaktionszyklus erneut zugegeben werden.

Im zweiten Reaktionsschritt folgt das Annealing (Hybridisierung der Primer an die komplementären Einzelstränge) bei einer Temperatur von normalerweise 50-68°C (abhängig von der Primerlänge). Diese doppelsträngigen Bereiche dienen als Startstelle für die Polymerasereaktion (Kettenverlängerung, 3. Reaktionsschritt bei 68°C-72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase). Die neu synthetisierten Doppelstränge werden im

nächsten Reaktionszyklus durch Erhitzen auf 94°C erneut in Einzelstränge getrennt. Bei jedem Reaktionszyklus kommt es so zur Verdopplung der Matrizen und somit auch zur Verdoppelung der von der Polymerase synthetisierten DNA. Dies führt zu einer exponentiellen Anreicherung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz. Um Fehlamplifikationen bzw. ein falsches Binden der Primern vor der initialen Denaturierung des Reaktionsgemisches zu verhindern, wurde die so genannte ``Hot Start``-Technik der PCR durchgeführt, bei welcher die Taq-Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt hinzugefügt wird.

Die verwendeten Primer (Fa. MWG-Biotech, Martinsried) sollten ein Amplifikat der Länge von 415 bp ergeben:

- Tr5-17 (GCCCTATTAAGTGGTAGTATAGAAGC)
- Tr3-17 (GGCACACTACTCCAACACTGAATTTG)

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

- Reddy-MixTM PCR Master Mix (Fa. ABGene, UK): 17,9 µl
- Primer Tr5-17: 0,8 µl
- Primer Tr3-17: 0,8 µl
- Proben-DNA: 0,5 µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) unter folgende Bedingungen:

- initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C für 2 min.
- 35 Reaktionszyklen bestehend aus:
 - Denaturierung bei 95°C für 45 sek.
 - Annealing bei 55°C für 30 sek.
 - Elongation bei 72°C für 1 min
- finale Extension bei 72°C für 10 min

Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle verschiedener Größe lassen sich durch Gelelektrophorese voneinander trennen. Dabei wird ein elektrisches Feld an ein Agarosegel angelegt, durch dessen Poren die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern. Kleinere DNA-Moleküle wandern schneller als größere, so dass es zur Auftrennung in verschiedene Banden kommt. Die Konzentration der Gele ist von der Größe der PCR-Produkte abhängig zu wählen. Die DNA-Moleküle werden durch das im Gel befindliche Ethidiumbromid, welches zwischen den Basen des DNA-Doppelstranges interkaliert

und im UV-Licht der Wellenlänge 312 nm durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Die Größe der DNA-Moleküle lässt sich anhand eines Längenstandards ungefähr ablesen.

Für die Gelherstellung wurde 1,2% Agarose (Fa. Sigma-Aldrich) in 1x 80 ml TAE-Puffer (Qiagen, Hilden) durch aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 40°C abgekühlt. Von einer 5 mg/ml Stammlösung Ethidumbromid wurde je nach Größe des Gels eine entsprechende Menge zugegeben um eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml im Gel zu erreichen. Das Gel wurde anschließend in die mit Kämmen versehene Elektrophoresekammer gegossen.

Sobald das Gel erstarrt war, wurden die Kämmen gezogen und die Kammer mit 1xTAE-Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden je 5 µl der PCR-Ansätze auf das Gel aufgetragen.

Als molekularer Standardmarker wurden 4 µl der "Reddy Run Super lader, low 100bp (50 µg/l)" (Fa. ABGene, UK) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 Volt/cm Elektrodenabstand. Nach Beendigung der Auftrennung der DNA-Banden wurde das Gel in einer UV-Kammer mit einer digitalen Fotoeinrichtung dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Infektionsversuche der Forellenbrütlinge

Für die Infektion der Forellenbrütlinge wurden Triactinomyxon Sporen aus dem instituteigenen Infektionskreislauf von *Myxobolus cerebralis* (*M. cerebralis*) verwendet. Die wöchentliche Produktion der Triactinomyxon Sporen lag durchschnittlich bei 500.000 bis 1.000.000, was eine zeitnahe Infektion der Forellenbrütlinge ermöglichte.

4.2 Postexpositionelle Überprüfung des Infektionserfolges

Für die Beurteilung des Infektionsverlaufs vor Ablauf der Inkubationszeit wurde das Verhalten der Fische beim Umsetzen in das Infektionsbad und die Anzahl der freien Amöboidkeime im Infektionsbad post expositionem (pe.) analysiert. Zusätzlich wurde eine histologische Untersuchung der Epidermis nach penetrierten Parasitenstadien durchgeführt.

4.2.1 Klinische Beobachtung

Während der Exposition der Regenbogenforellen-Linien AmTl und DtWf im sporenhaltigen Wasser, konnte das charakteristische Zucken (unregelmäßige ruckartige Bewegungen) nur bei den Infektionsgruppen mit 1.000 und 5.000 Triactinomyxon-Sporen je Fisch (TAM-Sporen/Fisch) beobachtet werden.

4.2.2 Veränderung der Triactinomyxon Sporen nach Exposition

Nachdem die Fische dem sporenhaltigem Wasser ausgesetzt waren, wurden exemplarisch Proben der Sporensuspension mikroskopisch untersucht und sämtliche Sporenveränderungen notiert. Nach dreistündiger Exposition besaßen ca. 50 bis 75 % der Sporen keine Amöboidkeimzellen oder keine Polkapseln mehr. Diese befanden sich als leere entfaltete Schalen in den untersuchten Wasserproben.

4.2.3 Histologische Untersuchung der Fischepidermis

Bereits nach einstündiger Sporenexposition wurde pro Forellen-Linie und pro Infektionsdosis je ein Fisch entnommen und histologisch auf penetrierende Amöboidkeime untersucht.

Aufgrund des vermehrten Auftretens der Parasitenstadien im Flossenbereich, ist ihre Anzahl stark von der jeweiligen Schnittebene abhängig und somit von einem Schnitt zum anderen verschieden. Eine lichtmikroskopische Auszählung der Amöboidkeimen konnte nur bei den beiden höheren Infektionsdosen erfolgen (Tabelle 13). Die Amöboidkeime stellten sich als

Anhäufung rundlicher, blau angefärbter Zellen dar, die in Verbänden von mindestens acht bis sechzehn Zellen (je nach Schnittebene), von einer Membran umgeben, in der Epidermis vorlagen. Durchschnittlich wurden pro Fisch sieben mikroskopische Schnittpräparate angefertigt und ausgewertet.

Sporendosis TAMs/Fisch	Deutsche Linie (DtWf)	Amerikanische Linie (AmTI)
1.000	1,25	2,75
5.000	3,33	8,66

Tabelle 13: Anzahl der durchschnittlich ausgezählten Amöboidkeimzellen pro Schnittpräparat in der Epidermis bei der deutschen Wildforellen-Linie (DtWf) und der amerikanischen Forellen-Linie (AmTI). Eine Stunde post expositionem.

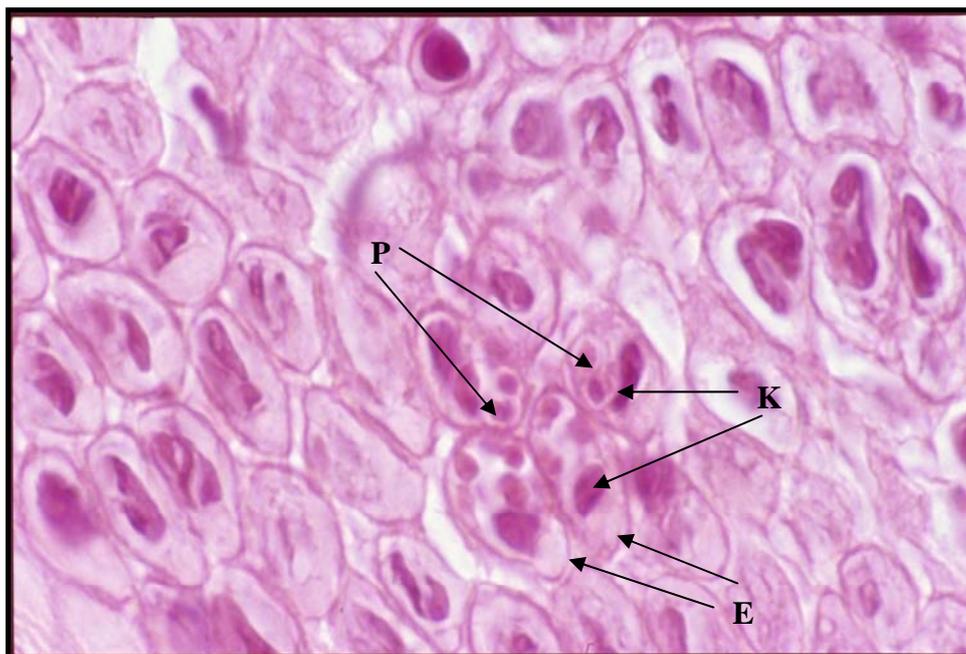


Abbildung 4: Amerikanische Linie (AmTI). 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch. Eine Stunde nach der Exposition. Parasitenstadien (P) liegen intakt intrazellulär in den Epidermis (E), deren Kerne (K) an den Rand verdrängt sind. HE-Färbung. Vergrößerung 1000x.

4.3 Beobachtung der klinischen Symptome

Nach der erfolgreichen Infektion der Forellenbrütlinge, wurden die Tiere bis zum ersten Auftreten einer Krankheitserscheinung täglich auf die typischen Symptome der Drehkrankheit (Schwarzfärbung; Drehverhalten; Deformation) beobachtet.

Die Chronologie der Symptomentwicklung wurde aufgrund der besseren Übersichtlichkeit zum 60. Tag, zum 90. Tag, zum 120. Tag und zum 150. Tag pe. durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der Fische, die Krankheitssymptome zeigen sowie Fischverluste dokumentiert.

Die Negativ-Kontrollgruppen beider Regenbogenforellen-Linien zeigten keine Symptome der Drehkrankheit und wurden deshalb in dieser Analyse nicht mit einbezogen.

4.3.1 Inkubationszeit

Die Inkubationszeit entspricht der Zeitpunkt des ersten Auftretens einer Krankheitserscheinung nach erfolgter Infektion. Hierfür werden die Infektionsdosen in aufsteigender Reihenfolge (10, 100, 1.000, 5.000 TAM-Sporen/Fisch) und die beiden Forellen-Linien beschrieben.

Infektionsdosis: Zehn Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bei den Vertretern der deutschen Forellen-Linie DtWf konnten bei dieser Infektionsdosis bis zum Versuchsende keine Krankheitserscheinungen beobachtet werden. Bei AmTl betrug die Inkubationszeit 53. Tage.

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bei DtWf konnten ebenfalls bei der Infektionsdosis 100 Triactinomyxon-Sporen je Fisch keine Anzeichen der Drehkrankheit festgestellt werden. Bei dieser Infektionsdosis waren in der Gruppe von AmTl am Tag 49 pe. erste Anzeichen der Drehkrankheit in Form von Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie sichtbar.

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Erste Anzeichen der Drehkrankheit wurden bei den Probanden der deutschen Linie DtWf in Form von Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie am Tag 78 pe.. Bei AmTl konnte das erste Symptom (Schwarzfärbung) am Tag 49 pe. registriert werden.

Infektionsdosis: 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Die Inkubationszeit betrug bei dieser Infektionsdosis 68 Tage bei den Vertretern der deutschen Forellenlinie DtWf und 46 Tage bei Tieren der amerikanischen Linie AmTl. Erstes Symptom hierfür war ebenfalls die Schwarzfärbung des hinteren Körperdrittels.

4.3.2 Tag 60 post expositionem

Die beobachteten Symptome der Drehkrankheit am Tag 60 post expositionem sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Infektionsdosis: Zehn Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bereits 60 Tage pe. zeigten Tiere der amerikanischen Linie AmTl Symptome der Drehkrankheit. Wie die Tabelle 14 verdeutlicht zeigten drei von 26 Fischen pathologisches Schwimmverhalten und acht von 26 Fischen Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie. Bei den Vertretern der deutschen Wildlinie DtWf konnten zu diesem Zeitpunkt keine Symptome der Drehkrankheit festgestellt werden (Tabelle 14).

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Vertreter der Linie DtWf zeigten 60 Tage pe. bei dieser zweitniedrigsten Infektionsdosis ebenfalls keine Symptome der Drehkrankheit. Bei den Vertretern von AmTl entwickelten hingegen zwei von 30 Fischen Deformationen. Pathologisches Schwimmverhalten konnte bei fünf von 30 Fischen beobachtet werden. Neunzehn von 30 Fischen zeigten eine Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie (Tabelle 14).

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bei dieser Infektionsdosis waren in der Gruppe von DtWf ebenfalls keine Anzeichen für Symptome der Drehkrankheit zu erkennen.

Bei AmTl zeigten drei von 20 Fischen Deformationen, vier von 20 pathologisches Schwimmverhalten und zwölf von 20 Tieren Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie (Tabelle 14).

Infektionsdosis: 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Auch bei der höchsten Infektionsdosis konnte am Tag 60 pe. bei den Vertretern der deutschen Linie DtWf keinerlei Symptome einer *M. cerebralis*-Infektion detektiert werden.

Bei AmTl wurde das Symptom des pathologischen Schwimmverhaltens bei zwei von 24 Fischen registriert. 22 von 24 Fischen zeigten eine Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie und fünf von 24 Fischen wiesen Deformationen im Schädel- bzw. Wirbelsäulenbereich auf (Tabelle 14).

4.3.3 Tag 90 post expositionem

Infektionsdosis: 10 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Auch am Tag 90 pe. konnte bei dieser Infektionsdosis keine klinischen Symptome der Drehkrankheit bei den Vertretern von DtWf registriert werden.

Bei AmTI zeigten insgesamt sieben Tiere von 25 pathologisches Schwimmverhalten, zwölf Tiere Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie und zwei Tiere Deformationen im Bereich der Wirbelsäule und/oder des Schädels (Tabelle 15).

Infektionsdosis (TAMs/Fisch)	Linie	SYMPTOM					
		Drehverhalten		Schwarzfärbung		Deformationen	
		Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)
10	DtWf (N=34)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTI (N=26)	3	11,5	8	30,8	0	0,0
100	DtWf (N=33)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTI (N=30)	5	16,7	19	63,3	2	6,7
1.000	DtWf (N=30)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTI (N=20)	4	20,0	12	60	3	15,0
5.000	DtWf (N=25)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTI (N=24)	9	37,5	22	91,7	5	20,8

Tabelle 14: Übersicht über die beobachteten Symptome 60 Tage post expositionem. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf), amerikanische Forellen-Linie (AmTI). (N= gesamte Fischzahl; A= Anzahl der Fische mit Symptome sowie der entsprechende prozentueller Wert).

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Es konnte bei der Regenbogenforellen-Linie DtWf am Tag 90 post expositionem keine klinischen Anzeichen der Drehkrankheit registriert werden.

Bei dieser Infektionsdosis zeigten von 30 Tieren der Linie AmTI zwölf Tiere pathologisches Schwimmverhalten. Zwei Tiere litten an Deformationen und insgesamt 26 Tiere hatten Schwarzfärbungen (Tabelle 15).

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

90 Tage nach der Infektion waren bei DtWf erstmals Merkmale der Drehkrankheit zu erkennen.

Bei einem von 30 Tieren konnte pathologisches Schwimmverhalten beobachtet werden. Zwei Tiere zeigten Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie.

Bei der Linie AmTI hatten 19 von 20 Tieren Schwarzfärbungen. 5 Tiere zeigten Deformationen und 12 Tiere wiesen pathologisches Schwimmverhalten auf (Tabelle 15).

Infektionsdosis: 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Am Tag 90 post expositionem zeigte ein Fisch von 25 in der Gruppe DtWf stressbedingte Drehbewegungen. Zwei Tiere hatten Schwarzfärbungen und ein Tier litt an Deformationen. Bei den Vertretern aus AmTl zeigten sechs Fische von 24 Deformationen im Wirbelsäulen- bzw. Schädelbereich. 22 Fische hatten Schwarzfärbungen und sechs Fische zeigten ein abnormales Schwimmverhalten (Tabelle 15).

Infektionsdosis (TAMs/Fisch)	Linie	SYMPTOM					
		Drehverhalten		Schwarzfärbung		Deformationen	
		Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)
10	DtWf (N=34)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=25)	7	28,0	12	48,0	2	8,0
100	DtWf (N=33)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=30)	12	40,0	26	86,6	2	6,6
1.000	DtWf (N=30)	1	3,3	2	6,6	0	0,0
	AmTl (N=20)	12	60,0	19	95,0	5	25,0
5.000	DtWf (N=25)	1	4,0	2	8,0	1	4,0
	AmTl (N=24)	6	24,0	22	91,6	7	29,0

Tabelle 15: Übersicht über die beobachteten Symptome 90 Tage post expositionem. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf), amerikanische Forellen-Linie (AmTl). (N= gesamte Fischzahl; A= Anzahl der Fische mit Symptome sowie der entsprechende prozentueller Wert).

4.3.4 Tag 120 post expositionem

Infektionsdosis: 10 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

120 Tage nach erfolgter Infektion konnten weiterhin keine Anzeichen für klinische Symptome der Drehkrankheit bei Fischen der Linie DtWf festgestellt werden.

Bei AmTl wiesen zwölf von 25 Tieren eine Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie auf. Acht von 25 Tieren zeigten pathologisches Schwimmverhalten und zwei von 25 Tieren litten an Deformationen (Tabelle 16).

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bei den Tieren der Regenbogenforellen-Linie DtWf konnte bei dieser Infektionsdosis ebenfalls keine Symptome der Drehkrankheit detektiert werden.

Bei den Vertretern der AmTl zeigten 26 von 30 Fischen Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie. Bei zwölf von 30 Fischen war durch Stressinduktion das charakteristische

pathologische Schwimmverhalten auszulösen. 16 von 30 Fischen wiesen Deformationen im Schädel- bzw. Wirbelsäulenbereich auf (Tabelle 16).

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Am Tag 120 nach der Infektion konnte bei zwei von 30 Fischen der Linie DtWf durch äußere Stimuli ein abnormes Schwimmverhalten ausgelöst werden. Ein Fisch von 30 zeigte Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie und zwei Fische litten an Skelettdeformationen.

Bei den Vertretern der Linie AmTl konnte bei zwölf von 30 Fischen pathologisches Schwimmverhalten beobachtet werden. 19 von 20 Tieren zeigten Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie und bei 15 von 20 Tieren konnten Deformationen festgestellt werden (Tabelle 16).

Infektionsdosis: 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Wie in Tabelle 16 zusammengefasst, zeigten bei der Linie DtWf drei von 25 Fischen Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie und Skelettdeformationen. Auf Stresssituationen reagierten vier von 25 Fischen mit abnormem Schwimmverhalten.

Bei den amerikanischen Regenbogenforellen AmTl konnte bei 17 von 24 Probanden das Symptom Drehverhalten, bei 20 von 24 das Symptom Deformationen und bei 22 von 24 das Symptom Schwarzfärbung festgestellt werden (Tabelle 16).

Infektionsdosis (TAMs/Fisch)	Linie	SYMPTOM					
		Drehverhalten		Schwarzfärbung		Deformationen	
		Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)
10	DtWf (N=34)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=25)	8	32,0	12	48,0	2	8,0
100	DtWf (N=33)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=30)	12	40,0	26	86,6	16	53,3
1.000	DtWf (N=30)	2	6,6	1	3,3	2	6,6
	AmTl (N=20)	12	60,0	19	95,0	15	75,0
5.000	DtWf (N=25)	4	16,0	3	12,0	3	12,0
	AmTl (N=24)	17	70,8	22	91,6	20	83,3

Tabelle 16: Übersicht über die beobachteten Symptome 120 Tage post expositionem. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf), amerikanische Forellen-Linie (AmTl). (N= gesamte Fischzahl; A= Anzahl der Fische mit Symptome sowie der entsprechende prozentueller Wert).

4.3.5 Tag 150 post expositionem

Infektionsdosis: Zehn Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Wie aus der Tabelle 17 ersichtlich, zeigten 34 Fische aus DtWf bei dieser Infektionsdosis keine Symptome der Drehkrankheit. Es konnte auch 150 Tage nach erfolgter Infektion weder Schwarzfärbungen und Drehbewegungen noch Deformationen beobachtet werden.

Bei der amerikanischen Linie AmTL waren sechs von 18 verbliebenen Fischen durch stressinduzierte Drehbewegungen und zwölf von 18 durch Schwarzfärbungen der kaudalen Körperpartie auffällig. Zwei Fische hatten zusätzlich Deformationen im Bereich des Schädels und der Wirbelsäule (Tabelle 17).

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Bei den 33 Fischen der deutschen Linie DtWf konnten 150 Tage nach Exposition mit den TAM-Sporen ebenfalls keine Anzeichen für klinische Symptome der Drehkrankheit diagnostiziert werden. Acht von 21 Fischen der amerikanischen Linie AmTL zeigten stressbedingte Kreisbewegungen, 17 Tiere hatten Schwarzfärbungen und acht Tiere wiesen die typischen Deformationen auf (Tabelle 17).

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

Am Tag 150 nach dem Infektionszeitpunkt waren in der Gruppe mit einer Dosis von 1.000 TAM-Sporen/Fisch der deutschen Linie DtWf zwei Tiere von 30 mit dem Symptom Schwarzfärbung und ebenfalls zwei Tiere mit pathologischem Drehverhalten zu erkennen. Bei dieser Infektionsdosis fielen keine Deformationen auf.

Bei Vertretern der amerikanischen Linie AmTL zeigten 13 von den 14 verbliebenen Fischen Schwarzfärbungen des kaudalen Körperdrittels. Sieben Fische reagierten mit den typischen Drehbewegungen auf Stresssituationen und zehn Tiere litten an Deformationen von Kiemendeckel, Kopf und/oder Wirbelsäule (Tabelle 17).

Infektionsdosis: 5.000 Triactinomyxon Sporen pro Fisch

150 Tage nach Exposition wurde bei der deutschen Linie DtWf folgende Krankheitssymptome beobachtet. Einer von 13 Fischen litt unter pathologischem Schwimmverhalten und zwei zeigten eine dunkle kaudale Körperpartie. Es konnte bei keiner Forelle die für die Drehkrankheit typischen Deformationen festgestellt werden.

Bei der amerikanischen Linie AmTl zeigten 16 von 16 Fischen Schwarzfärbungen des hinteren Körperdrittels. Neun Fische reagierten auf Stresssituationen (Fütterungszeiten, Klopfen an die Aquarienscheibe) mit schnellen drehenden Bewegungen und 14 Fische fallen durch Deformation im Bereich des Schädels und der Wirbelsäule auf.

Infektionsdosis TAMs/Fisch	Linie	SYMPTOM					
		Drehverhalten		Schwarzfärbung		Deformationen	
		Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)	Anzahl (A)	Prozent (%)
10	DtWf (N=34)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=18)	6	33,3	12	66,6	2	11,1
100	DtWf (N=33)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	AmTl (N=21)	8	38,1	18	85,7	8	38,1
1.000	DtWf (N=30)	2	6,6	2	6,6	0	0,0
	AmTl (N=14)	7	50,0	13	92,9	10	71,4
5.000	DtWf (N=13)	1	7,7	2	15,4	0	0,0
	AmTl (N=16)	9	56,2	16	100	14	87,5

Tabelle 17: Übersicht über die beobachteten Symptome 150 Tage post expositionem. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf), amerikanische Forellen-Linie (AmTl). (N= gesamte Fischzahl; A= Anzahl der Fische mit Symptome sowie der entsprechende prozentueller Wert).

4.4 Post mortem Untersuchungen

4.4.1 Gewicht und Größe

Fünf Monate nach der Infektion wurden aus jeder Gruppe der beiden Linien zehn Forellen heterogenen Gewichts, heterogener Größe und Krankheitsausprägung zur Untersuchung euthanasiert. Gewicht und Größe der Fische wurden erfasst und aus den enthaltenen Daten Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Gruppen errechnet.

Vergleich der Endgrößen

Die Größen der Fische bei beiden Forellen-Linien aller Infektionsgruppen variierten am Tag 150 post expositionem (pe.) zwischen 6,4 und 9,9 Zentimeter.

Wie in der Abbildung 5 dargestellt, lagen die Größen der Vertretern der deutschen Linie DtWf bei den Infektionsdosen von 100, 1.000 und 5.000 *Triactinomyxon*-Sporen je Fisch (TAM-Sporen/Fisch) höher als die der Vertretern aus AmTl. Lediglich bei der niedrigsten Infektionsdosis von zehn TAM-Sporen/Fisch war der Größenmittelwert bei AmTl höher als bei DtWf.

Der höchste Größenmittelwert wurde bei DtWf bei einer Infektionsdosis von 5.000 TAM-Sporen/Fisch gemessen und lag bei 9,9 cm. Der niedrigste betrug bei dieser Forelle-Linie in der Gruppe mit 100 TAM-Sporen/Fisch 6,7 cm.

Bei der amerikanischen Linie AmTl wurde der höchste Größenmittelwert bei der Infektionsgruppe mit zehn TAMs-Sporen/Fisch gemessen und lag bei 8,3 cm. Der niedrigste lag bei den Tieren mit einer Infektionsdosis von 100 TAM-Sporen/Fisch bei 6,4 cm.

Die größte Standardabweichung bezüglich der Größe fand sich bei AmTl in der Infektionsgruppe mit zehn TAM-Sporen/Fisch. Die niedrigste Abweichung vom Mittelwert wurde bei DtWf in der Gruppe mit zehn TAM-Sporen/Fisch gemessen.

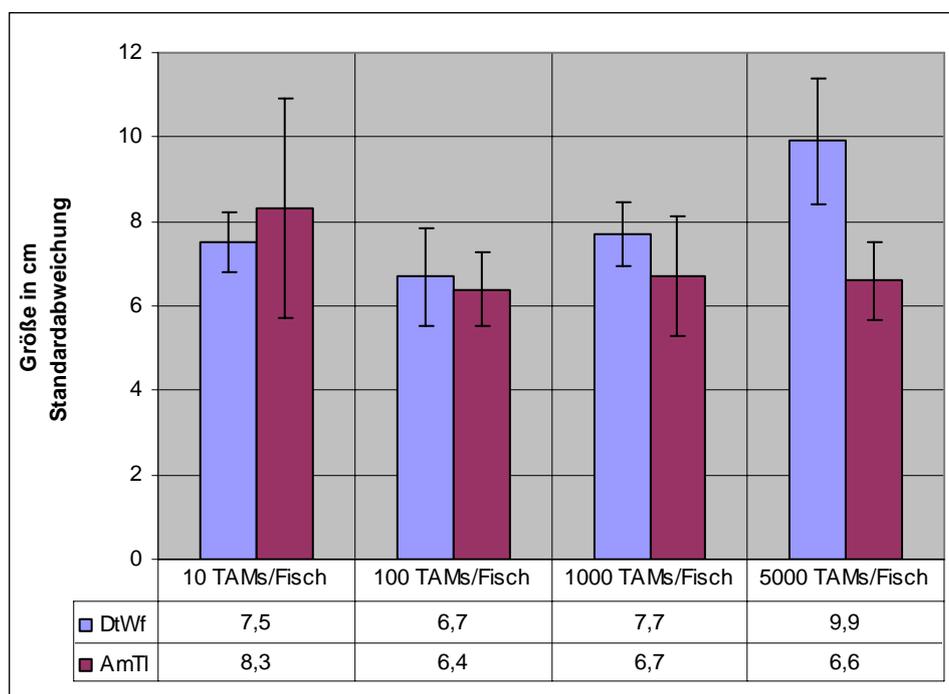


Abbildung 5: Mittlere Größe mit den entsprechenden Standardabweichungen der deutschen (DtWf) und der amerikanischen (AmTl) Regenbogenforellen-Linie. 150 Tage post-expositionem.

Vergleich der Endgewichte

Die Gewichtsmittelwerte der Fische schwankten am Tag 150 pe. bei beiden Forellenlinien aller Infektionsgruppen zwischen 2,7 und 9,7 Gramm.

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, waren die Gewichtsmittelwerte der Vertreter aus DtWf bei den Infektionsdosen 100, 1.000 und 5.000 Triactinomyxon Sporen je Fisch höher als die den Vertretern der Linie AmTl. Nur bei der Infektionsdosis von zehn Triactinomyxon Sporen je Fisch wurde bei der Linie AmTl ein höherer Mittelwert im Gewicht registriert.

Der höchste Gewichtsmittelwert wurde in der Gruppe mit 5.000 TAM-Sporen/Fisch der DtWf-Linie gemessen und lag bei 9,7 g. Der niedrigste Wert betrug bei dieser Forellen-Linie in der 100 TAM-Sporen Fischgruppe 4,3 g.

Bei AmTI wurde der höchste Mittelwert im Gewicht bei der Infektionsgruppe mit zehn TAM-Sporen/Fisch registriert. Dieser lag bei 8,4 g. Der niedrigste Wert wurde in der Gruppe mit 100 TAM-Sporen/Fisch mit 2,7 g gemessen.

Die größte Standardabweichung im Gewicht konnte bei AmTI in der Infektionsgruppe von zehn TAM-Sporen/Fisch gemessen werden. Die niedrigste Abweichung vom Mittelwert wurde ebenfalls bei der amerikanischen Linie AmTI bei den Tieren mit einer initialen Infektionsdosis von 100 TAM-Sporen/Fisch registriert.

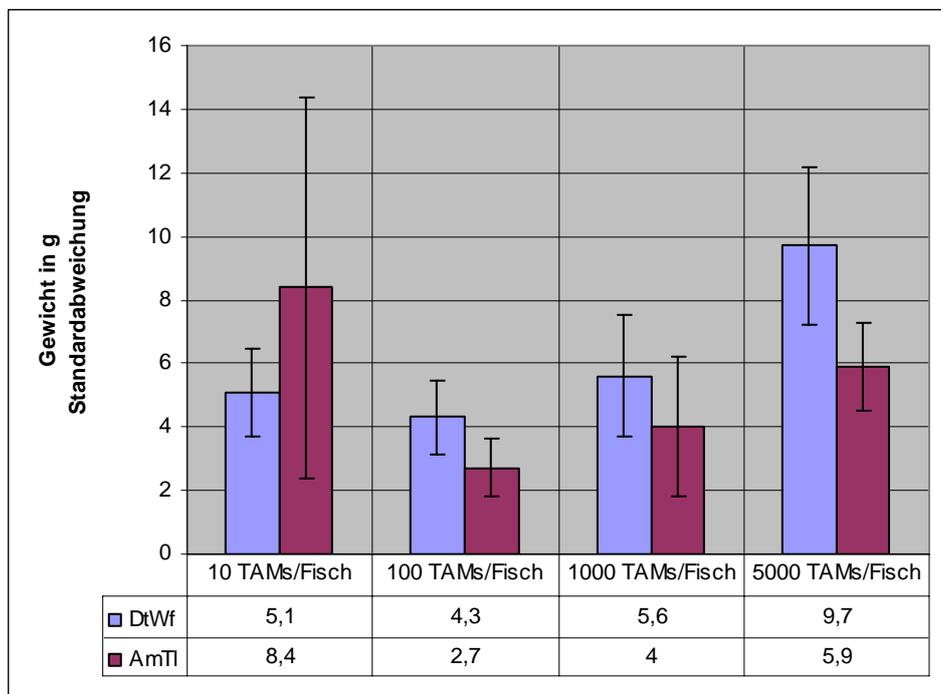


Abbildung 6: Mittleres Gewicht mit den entsprechenden Standardabweichungen der deutschen (DtWf) und der amerikanischen (AmTI) Regenbogenforellen-Linie. 150 Tage post-expositionem.

4.4.2 Infektionsprävalenz

Die Infektionsprävalenz gibt den Prozentsatz der histologisch untersuchten Fische jeder Infektionsgruppe an, bei denen Sporen im Kopfknorpel gefunden werden konnten.

Linie DtWf

Wie die Tabelle 18 darstellt, konnten bei der deutschen Forellen-Linie DtWf *Myxobolus cerebralis* Sporen erst ab einer Infektionsdosis von 1.000 TAM-Sporen/Fisch gefunden werden. In dieser Infektionsgruppe wurden bei drei von zehn untersuchten Forellen Sporen gefunden. In der höchsten Infektionsgruppe (5.000 TAM-Sporen/Fisch) fanden sich 150 Tage pe. bei sechs von zehn untersuchten Fischen reife *Myxobolus cerebralis* Sporen im Kopfknochen (Tabelle 18).

Linie AmTl

Bei der amerikanischen Regenbogenforellen-Linie AmTl konnten in allen Infektionsgruppen reife Sporen von *M. cerebralis* identifiziert werden.

Die höchste Infektionsprävalenz (100 %) wurde in den Infektionsgruppen 100, 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch gemessen. In der niedrigsten Infektionsgruppe (zehn TAM-Sporen/Fisch) konnten bei sechs von zehn untersuchten Forellen Sporen im Kopfknochen gefunden werden.

Infektionsdosis (TAMs/Fisch)	Linie	Anzahl Untersuchter Fische	Anzahl Infizierter Fische	Prozent Infizierter Fische (%)
10	DtWf	10	0	0
	AmTl	10	6	60
100	DtWf	10	0	0
	AmTl	10	10	100
1.000	DtWf	10	3	30
	AmTl	10	10	100
5.000	DtWf	10	6	60
	AmTl	10	10	100

Tabelle 18: Infektionsprävalenz der histologisch untersuchten Fische bei der deutschen (DtWf) und der amerikanischen (AmTl) Regenbogenforellen-Linie. 150 Tage post-expositionem.

4.4.3 Quantitative Erfassung der Sporen

Die Konzentration der *Myxobolus cerebralis* Sporen im Kopfknochen wurde mit Hilfe der Verdauungsmethode (MARKIW & WOLF 1974) erfasst. Die Sporen wurden separat aus jedem Fischkopf gewonnen und ausgezählt. Zur Auswertung wurde anschließend der Mittelwert für jede Infektionsgruppe gebildet.

Infektionsdosis: zehn Triactinomyxon Sporen je Fisch

In der niedrigsten Infektionsgruppe der deutschen Linie (DtWf) konnten keine *M. cerebralis* Sporen nachgewiesen werden. Bei den mit zehn TAM-Sporen/Fisch infizierten Regenbogenforellen der amerikanischen Linie (AmTl) wurden durchschnittlich 8.733 *M. cerebralis* Sporen pro Fischkopf gezählt (Abbildung 7).

Infektionsdosis: 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch

Bei den Vertretern der Linie DtWf, die mit 100 TAM-Sporen/Fisch infiziert worden sind, konnten ebenfalls keine *M. cerebralis* Sporen nachgewiesen werden.

Im Kopfknochen der mit 100 TAM-Sporen/Fisch infizierten Regenbogenforellen der Linie AmTl haben sich im Mittel 69.500 *M. cerebralis* Sporen pro Fischkopf entwickelt (Abbildung 7).

Infektionsdosis: 1.000 Triactinomyxon Sporen je Fisch

Bei dieser Infektionsdosis konnten Sporen bei den Vertretern der deutschen Linie DtWf nachgewiesen werden. Die Sporenauszählung ergab einen durchschnittlichen Wert von 20.420 *M. cerebralis* Sporen pro Fischkopf.

Bei der amerikanischen Linie AmTl wurden im Mittel 366.670 *M. cerebralis* Sporen pro Fischkopf gezählt (Abbildung 7).

Infektionsdosis 5.000 Triactinomyxon Sporen je Fisch

Bei dieser Infektionsdosis haben sich im Durchschnitt 31.260 *M. cerebralis* Sporen bei den Fischen der deutschen Linie (DtWf) entwickelt.

Die Fische der amerikanischen Linie AmTl, die mit 5.000 TAM-Sporen/Fisch infiziert waren, hatten eine mittlere *M. cerebralis* Sporenanzahl von 458.330 (Abbildung 7).

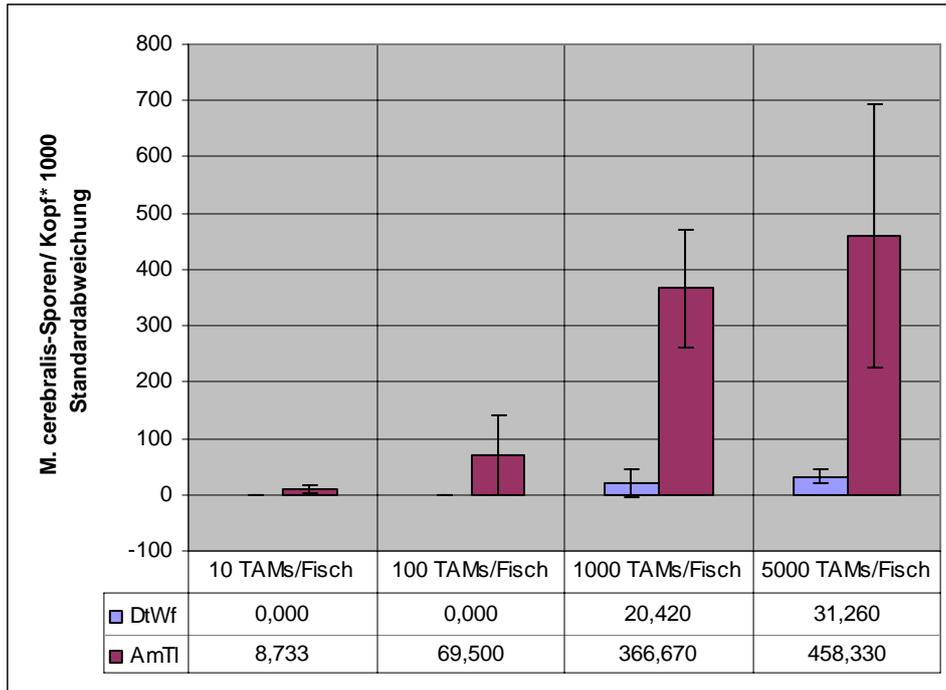


Abbildung 7: *Myxobolus cerebralis* Sporenanzahl pro Kopf bei der deutschen (DtWf) und der amerikanischen (AmTI) Regenbogenforellen-Linie. Mittelwert aus zehn Einzelwerten und Standardabweichung. 150 Tage post expositionem

4.4.4 Histopathologische Veränderungen

Die Beurteilung der durch die Sporenbildung hervorgerufenen pathologischen Veränderungen erfolgte nach dem MacConnell-Baldwin Numerical Scale (Sieh Kapitel 3.2.6.2). Die Mittelwerte der erhaltenen Histograde ($^{\circ}$ H) von jeweils zehn untersuchten Fischen aus jeder Infektionsgruppe und jeder Forellen-Linie sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Einteilung erfolgte in Graden von 0 bis 5, wobei aufsteigende Grade auch größere histopathologische Veränderungen widerspiegeln.

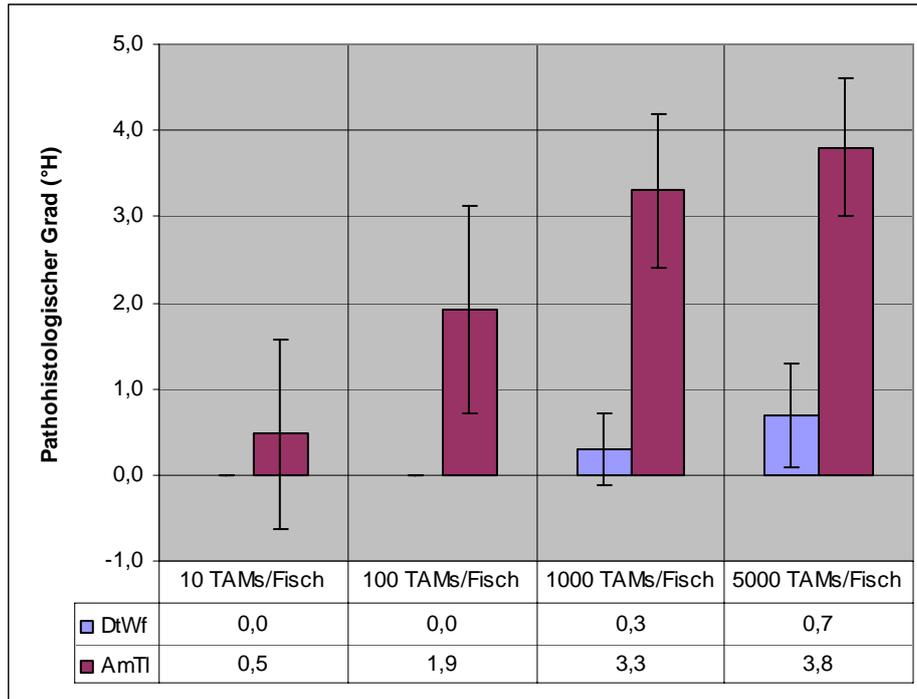


Abbildung 8: Überblick über die histopathologischen Veränderungen nach dem MacConnell-Baldwin Numerical Scale am Tag 150 post expositionem. Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf), amerikanische Forellen-Linie (AmTI). Mittelwert aus zehn Einzelwerten mit Standardabweichung.

4.4.4.1 Histologie

Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf)

Infektionsdosis zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag bei diesen beiden Infektionsgruppen bei null. Die histologisch untersuchten Kopfknochenstrukturen zeigten bei keinen der zehn untersuchten Forellen irgendwelche Spuren von Knorpelläsionen. Die Knorpelarchitektur war intakt und es konnten keine Herde einer parasitenbedingten Knorpeldegeneration festgestellt werden (Abbildung 9).



Abbildung 9: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); zehn TAM-Sporen/Fisch; HE-Färbung; Vergrößerung 100x. Übersichtsaufnahme intakter Knorpelarchitektur (K). Keine parasitenbedingten histo-pathologischen Veränderungen erkennbar. 150 Tage post expositionem.

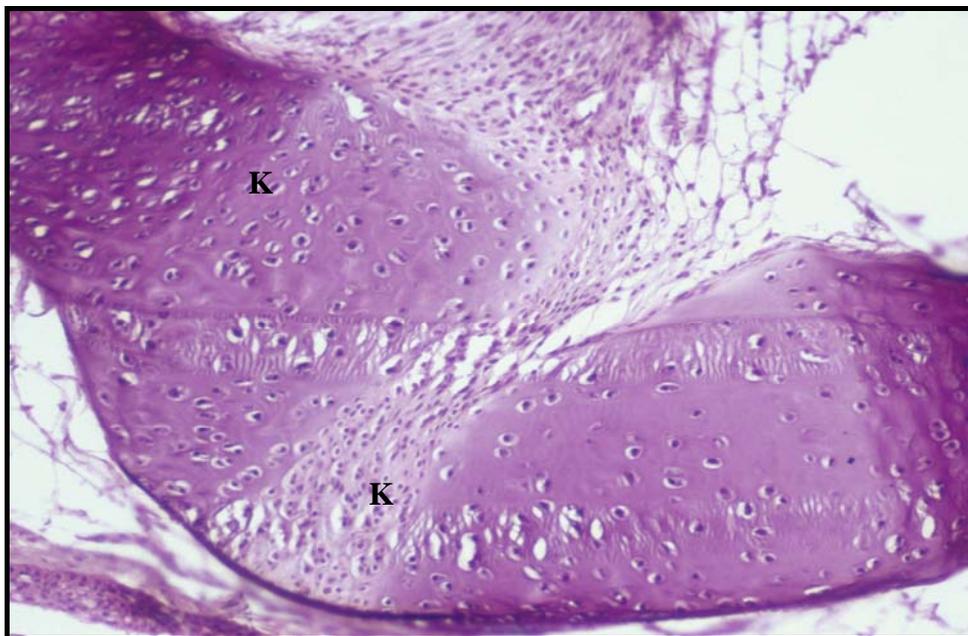


Abbildung 10: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); 100 TAM-Sporen/Fisch; HE-Färbung; Vergrößerung 100x. Übersichtsaufnahme über erhaltene Knorpelarchitektur (K). Keine parasitenbedingten histopathologischen Veränderungen erkennbar. 150 Tage post expositionem.

Infektionsdosis 1.000 TAM-Sporen/Fisch

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag in dieser Infektionsgruppe bei **0,3**. Drei von Zehn untersuchten Fischen, zeigten fünf Monate nach der Infektion leichte Knorpelläsionen in Form einer blasigen Degeneration (Abbildung 11).

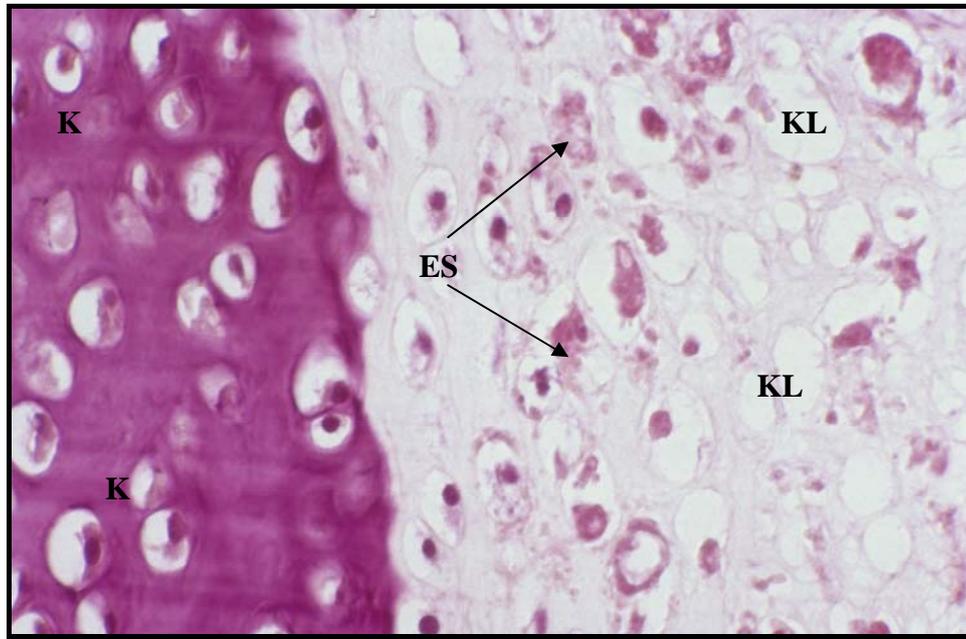


Abbildung 11: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); 1.000 TAM-Sporen/Fisch; HE-Färbung; Vergrößerung 400x. Übergangszone zwischen erhaltener Knorpelstruktur (K) und Bereiche der Knorpelolyse (KL) mit verschiedenen Entwicklungsstadien (ES) von *Myxobolus cerebralis*. 150 Tage post expositionem.

Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag in dieser Infektionsgruppe bei **0,7**. Die Hälfte der untersuchten Fische zeigte histopathologische Veränderungen in Form von kleinen Zonen einer zerstörten Knorpelarchitektur. Zwei von ihnen wiesen neben diesen Zonen auch umsäumende Entzündungszellen auf (Abbildung 12 und 13).

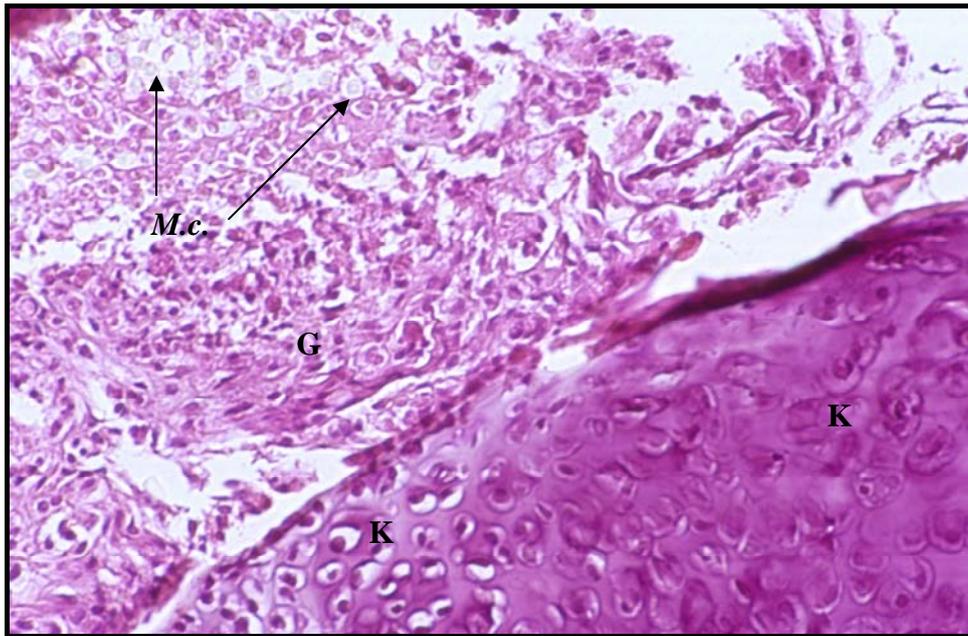


Abbildung 12: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); 5.000 TAM-Sporen/Fisch; HE-Färbung; Vergrößerung 200x. Gesundes Knorpelmaterial (K). Granulom (G) mit reifen *Myxobolus cerebralis* Sporen (M.c.). 150 Tage post expositionem.

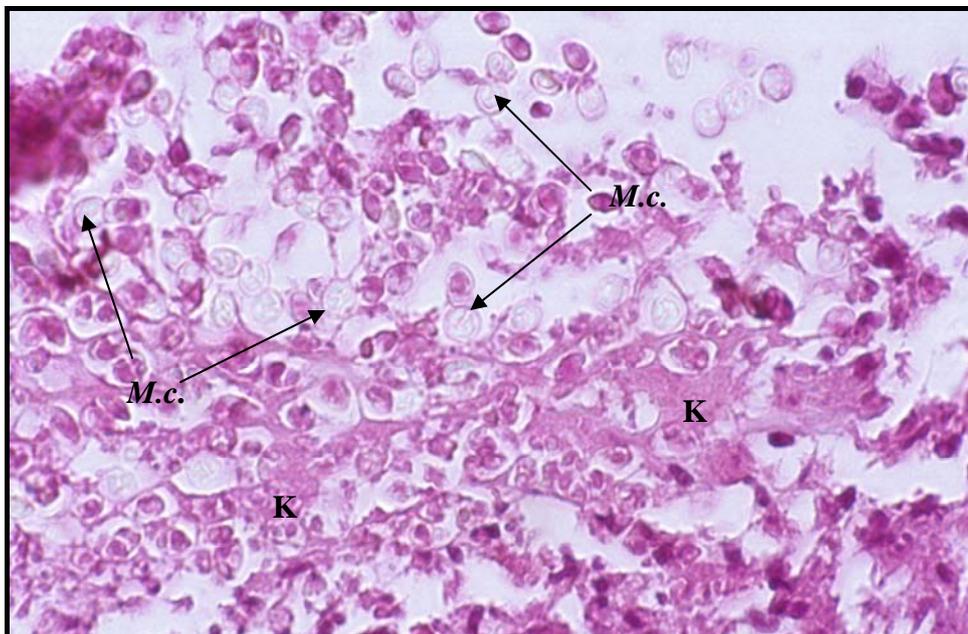


Abbildung 13: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); 5.000 TAM-Sporen/Fisch; HE-Färbung; Vergrößerung 400x. *Myxobolus cerebralis* (M.c.) lysieren den umliegenden Knorpel (K) und verursachen so das Bild einer blasigen Degeneration, 150 Tage post expositionem.

Amerikanische Forellenlinie (AmTl)

Infektionsdosis zehn TAM-Sporen/Fisch

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag in dieser Infektionsgruppe bei **0,5**.

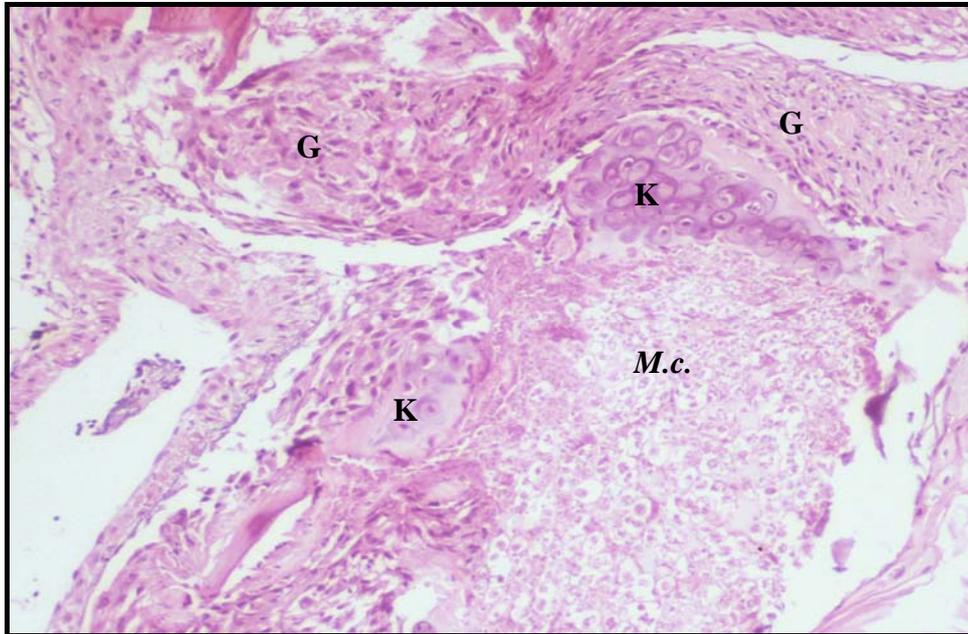


Abbildung 14: Amerikanische Forellen-Linie (AmTl); zehn TAM-Sporen/Fisch.; HE-Färbung; Vergrößerung 100x. Durch Granulom (G) verdrängte und zerstörte Knorpelarchitektur. Knorpelrest (K) umgeben von *Myxobolus cerebralis* Sporen (*M.c.*). 150 Tage post expositionem.

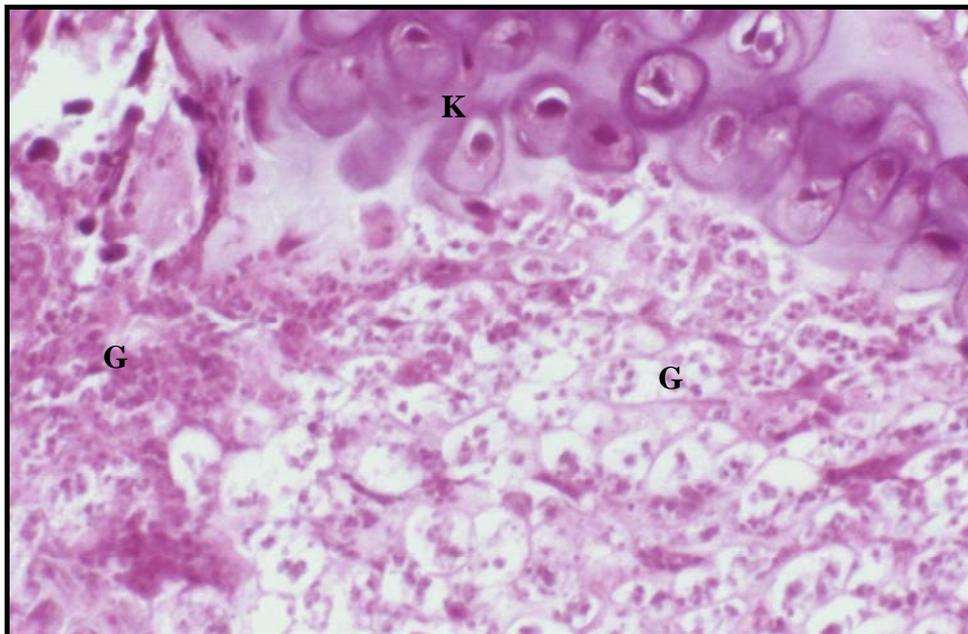


Abbildung 15: Amerikanische Forellen-Linie (AmTl); zehn TAM-Sporen/Fisch.; HE-Färbung; Vergrößerung 400x. Übersichtsaufnahme eines Granuloms G, welches das Knorpelgewebe (K) zerstört und verdrängt hat. 150 Tage post expositionem.

Bei drei der zehn histologisch untersuchten Fische waren vereinzelt Herde einer Knorpeldegeneration ohne Entzündungszellen zu sehen (Abbildung 14 und 15).

Infektionsdosis 100 TAM-Sporen/Fisch

Bei dieser Infektionsgruppe lag der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen bei **1,9**. Vier der Zehn untersuchten Fische zeigten kleine lokal ausgedehnte Bereiche der Knorpeldegeneration, die von einer mittleren Anzahl Entzündungszellen umgeben waren. Zwei andere Fische zeigten Bereiche der Knorpelnekrose mit stark ausgeprägter Granulozytenbeteiligung.

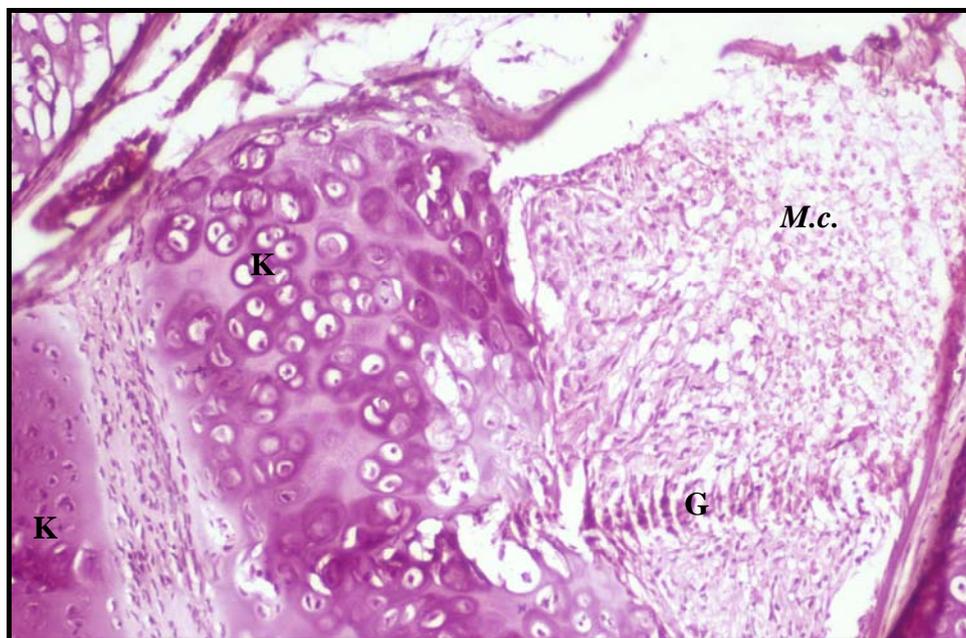


Abbildung 16: Amerikanische Forellen-Linie (AmTl); 100 TAM-Sporen/Fisch. HE Färbung; Vergrößerung 100x. Gesundes Knorpelmaterial (K). Granulom (G) mit Entwicklungsstadien sowie reife *Myxobolus cerebralis* Sporen (M.c.). 150 Tage post expositionem.

Infektionsdosis 1.000 TAM-Sporen/Fisch

Der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen lag in dieser Infektionsgruppe bei **3,3**. Nur zwei der zehn untersuchten Fischen zeigten lokale Bereiche der Knorpeldegeneration mit wenig ausgeprägtem Entzündungsgeschehen. Bei allen anderen Probanden konnten zusammenfließende Bereiche der Knorpelnekrose, die von mittlerer bis großer Anzahl von Leukozyten umgeben waren, beobachtet werden.

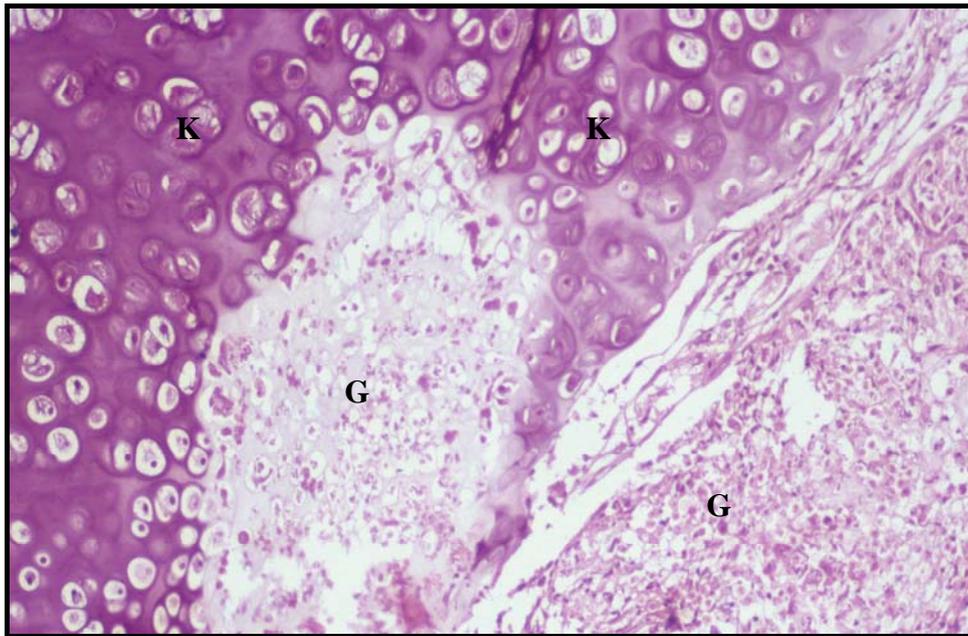


Abbildung 17: Amerikanische Forellen-Linie (AmTI); 1.000 TAM-Sporen/Fisch; HE Färbung; Vergrößerung 100x. Gesunde Knorpel (K) umgrenzt von Granulom (G) mit Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis*. 150 Tage post expositionem.

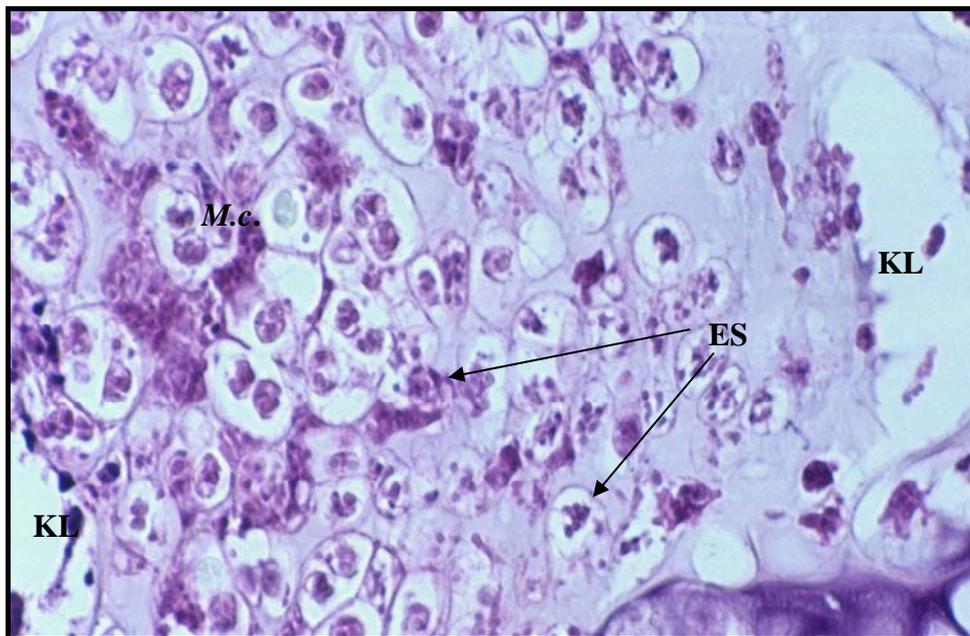


Abbildung 18: Amerikanische Forellen-Linie (AmTI); 1.000 TAM-Sporen/Fisch; HE Färbung; Vergrößerung 400x. Zerstörtes Knorpelareal mit Knorpellakunen (KL) und verschiedenen Entwicklungsstadien (ES) von *Myxobolus cerebralis* (*M.c.*). 150 Tage post expositionem.

Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch

Bei dieser Infektionsgruppe lag der Grad der histopathologischen (°H) Veränderungen bei **3,8**. Alle untersuchten Regenbogenforellen mit dieser Infektionsdosis wiesen für *Myxobolus cerebralis* typische Veränderungen der Knorpelarchitektur, verbunden mit einer deutlichen

Wirtsreaktion, auf. Vier Regenbogenforellen zeigten multifokale Abweichungen mit zahlreichen, in umliegendes Gewebe eindringenden Leukozyten. Bei vier weiteren liefen diese Veränderungen zu ausgedehnten Bereichen der Knorpelnekrose zusammen und bei Zweien war die Architektur des hyalinen Stützgewebes, wie in Abbildung 19 zu erkennen, zum größten Teil zerstört.

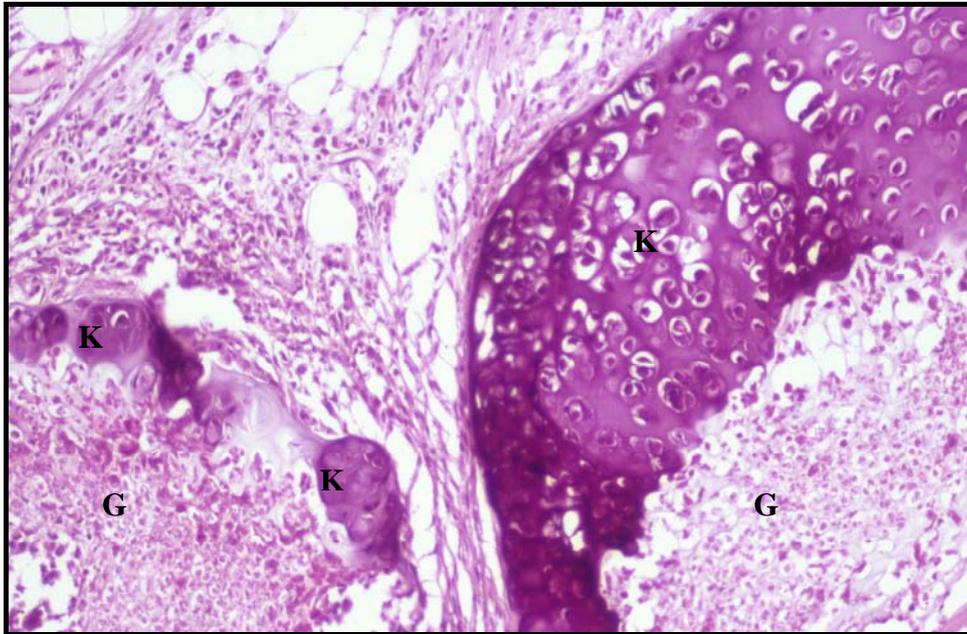


Abbildung 19: Amerikanische Forellen-Linie (AmTl); 5.000 TAM-Sporen/Fisch; HE Färbung; Vergrößerung 100x. Übersichtsaufnahme mit Resten vom gesunden Knorpel (K) und Granulome (G). 150 Tage post expositionem.

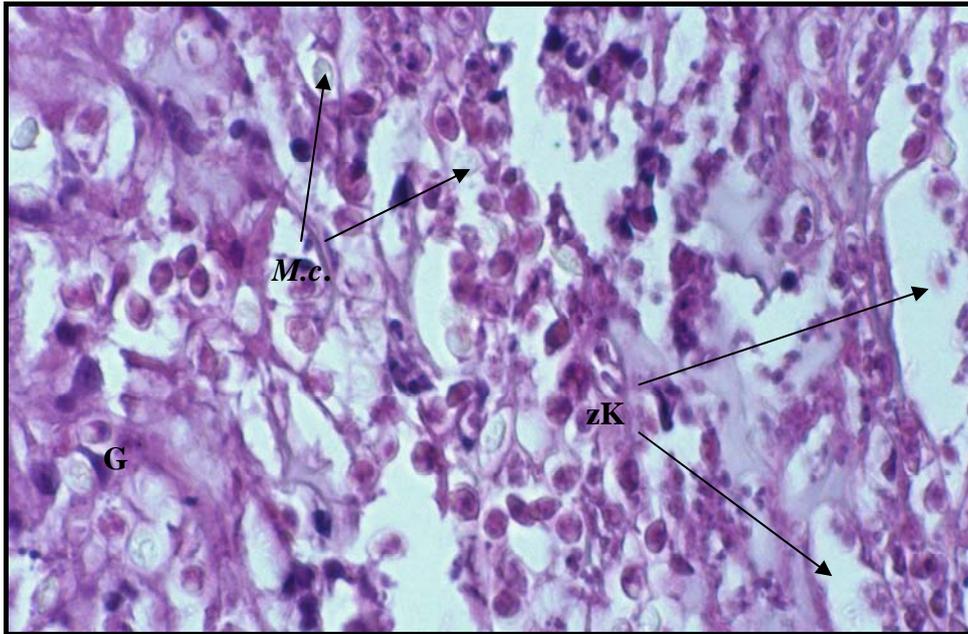


Abbildung 20: Amerikanische Forellen-Linie (AmT1); 5.000 TAM-Sporen/Fisch; HE Färbung; Vergrößerung 400x. Granulom mit *Myxobolus cerebralis* Sporen (M.c.) und zerstörter Knorpelstruktur (zK). 150 Tage post.expositionem.

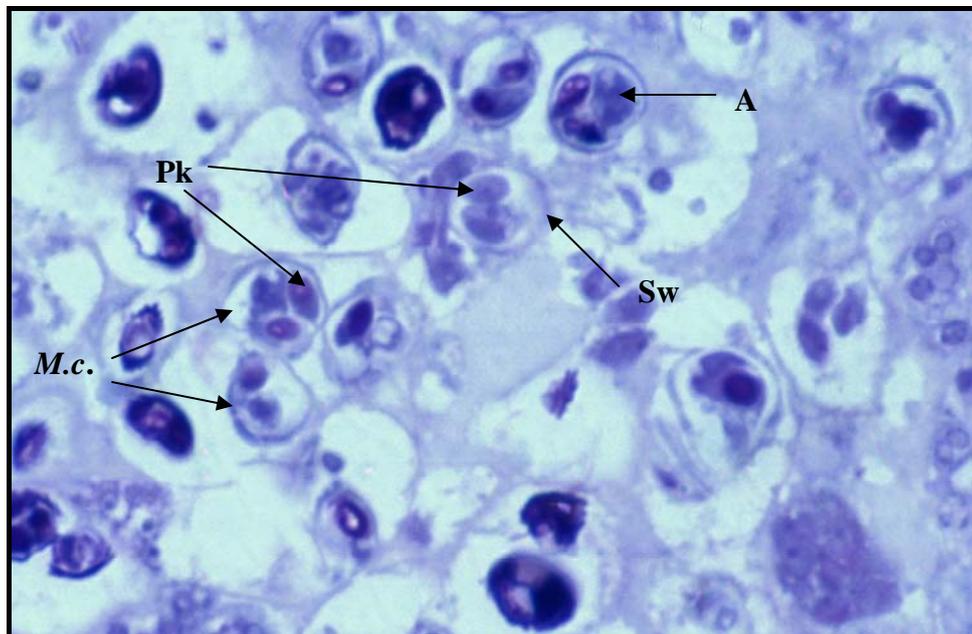


Abbildung 21: Amerikanische Forellen-Linie (AmT1); 5.000 TAM-Sporen/Fisch; Toluidinblau Färbung. Vergrößerung 1000x. Reife *Myxobolus cerebralis* Sporen (M.c.) mit Polkapselzellen (Pk), Amöboidkeimzelle (A) und Schalenwand (Sw). 150 Tage post.expositionem.

4.4.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die bei den histopathologischen Untersuchungen am Lichtmikroskop erlangten Ergebnisse sollten durch die Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Dafür wurden Proben der beiden Regenbogenforellen-Linien mit dem Transmissionselektronenmikroskop auf Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* untersucht.

Die Auswertung der Untersuchung mit dem TEM bezieht sich in diesem Kapitel lediglich auf die deutsche Wildforellen-Linie DtWf.

Infektionsdosis: zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch

Wie sich aus der Lichtmikroskopischen Untersuchung bereits ergab, wurden bei der Infektionsdosis zehn und 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch keine Anzeichen für Parasitenstadien im Kopfknorpel gefunden. Bei diesen beiden Konzentrationen konnten keine pathologischen Veränderungen registriert werden. Die Knorpelarchitektur war intakt (Abbildung 22).

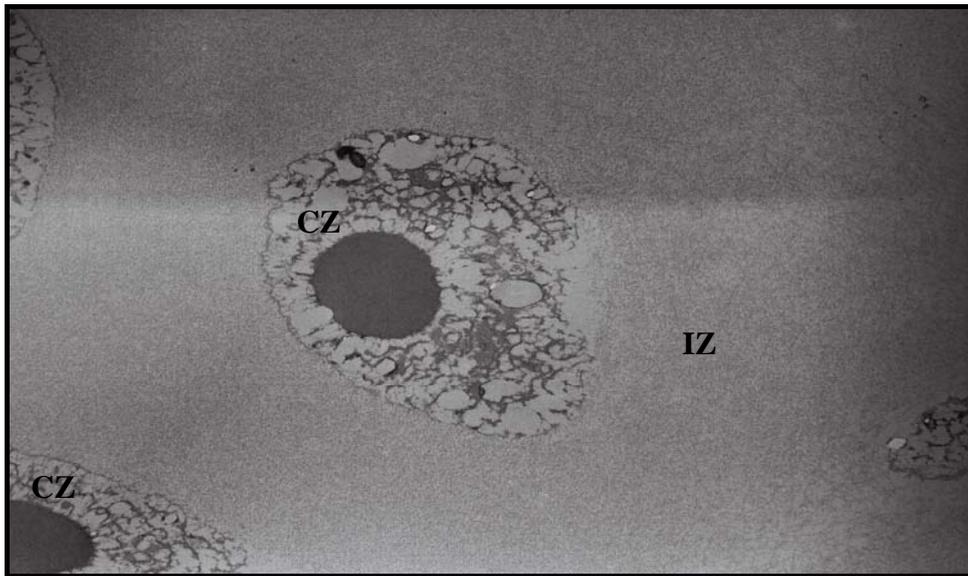


Abbildung 22: Deutsche Wildforellen-Linie (DtWf); 100 TAM-Sporen/Fisch; Vergrößerung 8.800x. 150 Tage post-expositionem. Intakter Schädelknorpel. Chondrozyt (CZ), Interzellularsubstanz (IZ).

Infektionsdosis 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Proben der deutschen Wildforellen-Linie konnten *Myxobolus cerebralis* im Kopfknorpel gefunden werden. Es wurden sowohl bei der Infektionsdosis von 1.000 als auch von 5.000 Triactinomyxon Sporen je Fisch, durch die

Parasitenstadien und die Wirtsreaktion hervorgerufene Knorpelläsionen in Form einer blasigen Degeneration registriert (Abbildung 23)

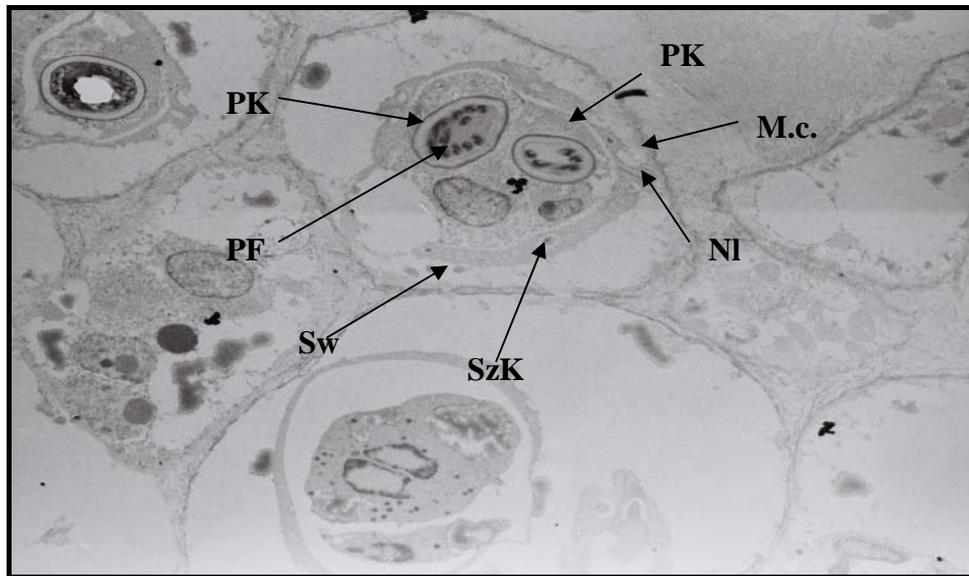


Abbildung 23: Deutsche Linie DtWf; 5.000 TAM-Sporen/Fisch; Vergrößerung 8.800x. An einer reifen *Myxobolus cerebralis* Spore sind Polkapselzellen (PK), angeschnittene Polfilamente (PF), Schalenwand (Sw), Schalenzellkern (SzK) mit Nahtlinie (NI) zu erkennen.

4.4.5. Molekularbiologischer Nachweis vom *Myxobolus cerebralis*.

Der molekularbiologischer Nachweis von *Myxobolus cerebralis* mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Bestätigung der Ergebnisse der histologischen Untersuchung durchgeführt. Dabei wurden nur Fische aus beiden Stämmen, die histologisch auf *M. cerebralis* negativ aufgefallen sind, untersucht. Versuchsfische der deutschen Linie DtWf, die mit der Infektionsdosis zehn und 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch infiziert worden sind, waren negativ bei der histologischen Untersuchung und wurden deshalb mittels PCR untersucht.

Die durchgeführte PCR ergab in den beiden Infektionsdosen 10 und 100 Triactinomyxon je Fisch bei DtWf keine Bande bei 435 bp. Das von den verwendeten Primern nachgewiesene Amplifikat dieser Länge ist *Myxobolus cerebralis* spezifisch.

Somit war die PCR also bei den Vertretern der deutschen Linie DtWf, die mit 10 und 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch infiziert worden sind negativ.



Abbildung 24: Negative PCR-Ergebnisse der Proben der deutschen Linie DtWf. Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5%iges Agarosegel. M=Marker; 1, 2, 3 = 10 TAMs/Fisch; 4, 5, 6 = 100 TAMs/Fisch; +ve = Positivkontrolle; -ve = Negativkontrolle. Zu sehen sind die für den verwendeten Primer spezifischen *Myxobolus cerebralis* Amplifikate als Banden mit einer Länge von 435 bp (Basenpaaren).

5 Diskussion

5.1 Triactinomyxon Sporen-Produktion

Die Infektion der Oligochaeten mit *Myxobolus cerebralis* (*M. cerebralis*) Sporen verlief erfolgreich. Ab dem 90. Tag post infectionem (pi.) konnten Triactinomyxon Sporen (TAM-Sporen) aus den Wurmbecken gewonnen werden. Allerdings variierte die Zahl der aus den einzelnen Becken filtrierten Sporen stark. Nach Untersuchungen von EL-MATBOULI (1996) sollten folgende Faktoren die Ausbeute an TAM-Sporen positiv beeinflussen: Die Anwesenheit und Dichte einer vitalen *Tubifex tubifex* Population, unbeschädigte, infektiöse *M. cerebralis*-Sporen und eine Umwelt, die den Erhalt der Oligochaeten sicherstellt.

EL-MATBOULI (1996) fand außerdem einen positiven Zusammenhang zwischen der den Tubificiden angebotenen *M. cerebralis* Sporen und einer optimalen Produktion an TAM-Sporen. Diese Beziehung hielt MARKIW (1986) in eigenen Versuchen für nicht gegeben. Die Autorin vermutete, eine zu hohe Sporenmenge könne den Würmern schaden oder sie sogar töten. Da die Faktoren Wassertemperatur und Fütterung in allen Wurmbecken identisch waren, können diese als Ursache für die Unterschiede bei der Sporenproduktion ausgeschlossen werden.

5.2 Infektion der Regenbogenforellenbrütlinge

Die Beurteilung der Infektion der Versuchsfische wurde anhand der folgenden Parametern durchgeführt, Zucken bei Expositionsbeginn im Infektionsbad, histologischer Nachweis von Amöboidkeimzellen in der Haut nach einer Stunde und Anteil der Triactinomyxon Sporen ohne Amöboidkeime im Infektionsbad.

Das charakteristische Zucken konnte bei Tieren beider Forellen-Linien DtWf und AmTl kurz nach Expositionsbeginn mit den TAM-Sporen nur bei den Infektionsgruppen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch beobachtet werden. Nach EL-MATBOULI et al. (1999) ist diese Reaktion als Abwehrverhalten der Fische auf die Injektion der Polfilamente in die Epidermis und das Eindringen der Amöboidkeimzellen in die Poren der Schleimzellen zu bewerten. Diese Beobachtung wurde als Zeichen für das Vorhandensein infektionstüchtiger Triactinomyxon Sporen gewertet.

Unterschiede zwischen der deutschen Linie DtWf und der amerikanischen Linie AmTl wurden jedoch nicht verzeichnet. Dies entspricht den Beobachtungen von HEDRICK et al. (2003), die ebenfalls keine Unterschiede innerhalb verschiedenen amerikanischen und deutschen Forellen-Linien feststellen konnten. Sie konnten das charakteristische Zucken lediglich bei den

Fischgruppen feststellen, die mit einer Dosis von 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch infiziert wurden.

Die Untersuchung des Infektionsbads ergab, dass 50% bis 70% der TAM-Sporen ihren Amöboidkeim und damit ihre Infektiosität nach drei Stunden verloren hatten. Untersuchungen von EL-MATBOULI et al. (1999) zufolge verloren bei erfolgreich verlaufenen Infektionen 60% bis 70% der TAM-Sporen ihre Amöboidkeimzellen. Bei Infektionsversuche von HEDRICK et al. (1999) verloren durchschnittlich 80% der Triactinomyxon Sporen nach Exposition ihre Infektiosität. Der histologische Nachweis von Amöboidkeimzellen in der Epidermis gelang nur bei den Infektionsdosen von 1.000 und 5.000 TAM/Fisch.

Die Empfänglichkeit der amerikanischen AmTl und der deutschen DtWf Forellen-Linie gegenüber der Drehkrankheit bereits nach der Anzahl der detektierten *M. cerebralis* Sporen in der Epidermis zu bewerten, empfahl sich nicht, da die Sporoplasmen nicht gleichmäßig in der gesamten Fischepidermis verteilt sind, sondern sich hauptsächlich in den Flossenbereichen sowie am Kiemendeckel befanden. Die Anzahl der gezählten Sporoplasmen hängt somit stark von der jeweiligen Schnittebene ab.

Es bleibt aber zu bemerken, dass bei den Infektionsdosen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch mehr Parasitenstadien in der Epidermis bei der amerikanischen Linie (AmTl) gefunden wurden als bei der deutschen Linie (DtWf). Bei der histologischen Untersuchung von Fischen beider Forellen-Linien (AmTl und DtWf), die mit zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch infiziert waren, konnten keine Amöboikeimzellen gefunden werden. Dies entspricht auch den Beobachtungen von KÜPPERS (2003) und MEIXNER (2004). Nach EL-MATBOULI et al. (1995) sind parasitäre Stadien bei Fischen, die mit weniger als 1.000 TAM-Sporen/Fisch infiziert sind, ohnehin sehr schwer zu identifizieren.

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

5.3 Vergleich der Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit

In den vergangenen Jahren wurden am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten (LMU, München) sowie an der Universität Kalifornien Davis (School of Veterinary Medicine, Department of Medicine and Epidemiology, Fish Health Laboratory, UCD, USA) mehrere Studien durchgeführt, um die Empfänglichkeit verschiedener amerikanischer und deutscher Forellinien und auch Bachforellen gegenüber der Drehkrankheit zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Die Untersuchungen von EL-MATBOULI et al. (2002) und HEDRICK et al (2003) haben gezeigt, dass die deutsche

Forellen-Linie DtHo bezüglich einer Infektion mit *M. cerebralis* widerstandsfähiger ist als die amerikanische Forellen-Linie AmTl.

Ziel der vorliegenden Arbeit, war es, erstmalig eine Wildform-Forellenlinie (DtWf) bezüglich der Empfänglichkeit zu evaluieren, die ähnlich wie die deutsche Zuchtform-Forellenlinie DtHo, eine natürlichen Anpassungsprozess an den Erreger der Drehkrankheit ausgesetzt war.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen zur Resistenz der Forellenlinien DtWf und AmTl gegenüber einer Infektion mit *M. cerebralis* diskutiert und diese anschließend mit vorangegangenen Arbeiten zur Empfänglichkeit dieser WildForellen-Linie DtWf und der als relativ resistent geltenden deutschen Forellen-Linie DtHo (EL-MATBOULI et al. 2002; HEDRICK et al 2003) gegenüber der Drehkrankheit verglichen. KÜPPERS (2003) bezog in ihrer Studie auch die Empfänglichkeit der Bachforelle mit ein, jedoch nur mit der Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch. Da aber die Bachforelle als ursprünglicher bzw. resistenterer Wirt für *M. cerebralis* angesehen wird (HOFFMAN et al. 1962), wurden an dieser Stelle die Ergebnisse der Untersuchung von KÜPPERS (2003) zum Vergleich herangezogen.

5.3.1 Klinische Symptomatik

Die Bewertung der Empfänglichkeit der amerikanischen Linie AmTl und der deutschen Linie DtWf bezüglich der klinischen Symptomatik vollzog sich zum einen anhand der Inkubationszeit und zum anderen anhand der Symptomprävalenz.

5.3.1.1 Inkubationszeit

Verhältnis Sporendosis zu Länge der Inkubationszeit

Beim Vergleich der Infektionsdosen konnte man eine negative Beziehung zwischen Infektionsdosis und Länge der Inkubationszeit feststellen. Je höher die Infektionsdosis war, desto kürzer war die Inkubationszeit. Die ersten beobachteten klinischen Symptome der Drehkrankheit traten in Form von Schwarzfärbungen des kaudalen Körperteils zuerst in den Gruppen mit 5.000 TAM-Sporen/Fisch gefolgt von den Gruppen mit 1.000, 100 TAM-Sporen/Fisch und schließlich von der Gruppe die Zehn TAM-Sporen/Fisch ausgesetzt wurde auf (Tabelle 19).

Vergleich zwischen der deutschen (DtWf) und der amerikanischen (AmTl) Forellen-Linien

Erste konkrete Hinweise darauf, dass sich die beiden Forellen-Linien in ihrer Empfänglichkeit gegenüber *M. cerebralis* unterscheiden, gab die klinische Beobachtung bezüglich der Entwicklung erster Krankheitsanzeichen. So wies die amerikanische Forellen-Linie AmTl in allen Infektionsdosen eine kürzere Inkubationszeit auf als die deutsche Forellenlinie DtWf. Erste Anzeichen der Drehkrankheit wurden in den Infektionsgruppen 5.000 TAM-Sporen/Fisch am Tag 46 pe. bei AmTl und am Tag 68 pe. bei DtWf registriert.

Während Vertretern der deutschen Forellen-Linie bei den Infektionsdosen zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch keine Symptome zeigten, entwickelten Probanden der AmTl bereits bei diesen zwei niedrigen Infektionsdosen Anzeichen der Drehkrankheit (Tabelle 19).

Vergleich zwischen den verschiedenen Forellen-Linien (AmTl, DtWf, DtHo) und der Bachforelle untereinander

Um Aufschlüsse über die Resistenz der deutschen Forellen-Linie DtWf zu gewinnen wird in diesem Abschnitt ein Vergleich mit der deutschen Forellen-Linie DtHo und der Bachforelle durchgeführt. Letztere werden als Referenzstämme aus der Untersuchung von KÜPPERS (2003) miteinbezogen. Die als hoch empfänglich geltende Forellen-Linie AmTl zeigte kürzere Inkubationszeiten im Vergleich zu DtHo und DtWf. Versuchstiere der Forellen-Linie DtHo zeigten kürzere Inkubationszeit als Vertretern der Forellen-Linie DtWf. In der Untersuchung von KÜPPERS (2003) wurden die Bachforellen lediglich mit einer Dosis von 5.000 TAM Sporen je Fisch infiziert. Hierbei konnte die Autorin am Tag 70 post-infectionem die ersten Symptome in Form von pathologischem Drehverhalten beobachten. Es bestand also kein bedeutender Unterschied zu der Linie DtWf, die bei entsprechender Infektionsdosis nach einer Inkubationszeit von 68 Tagen entsprechende Symptome zeigte (Tabelle 19).

Sporendosis (TAMs/Fisch)	Forellen-Linie			
	DtHo*	Bachforelle*	AmTl	DtWf
10	-	-	Tag 53	-
100	-	-	Tag 49	-
1.000	Tag 89	-	Tag 49	Tag 78
5.000	Tag 43	Tag 70	Tag 46	Tag 68

Tabelle 19: Vergleich der Inkubationszeiten drei verschiedener Forellen-Linien und der Bachforelle. (*: aus KÜPPERS 2003).

So zeigte die amerikanische Forellen-Linie AmTl die kürzeste Inkubationszeit unter allen untersuchten Forellen-Linien, gefolgt von der deutschen Linie DtHo und schließlich von der deutschen Linie DtWf. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass Vertretern der deutschen Linie DtWf bei einer Infektionsdosis von 5.000 TAM-Sporen/Fisch eine, mit der Bachforelle vergleichbare, Inkubationszeit aufweisen.

5.3.1.2 Symptomprävalenz

Beim Vergleich des primären Auftretens eines Symptoms der Drehkrankheit wurde jeweils bei beiden Forellenlinien das Symptom Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie als erstes beobachtet.

Der Vergleich der Symptomprävalenz wurde jedoch am Symptom der Deformationen durchgeführt, weil die beiden anderen Hauptsymptome, nämlich das pathologische Drehverhalten und die Schwarzfärbung der kaudalen Körperpartie reversibel sind (EL-MATBOULI et al. 1992) und somit am Ende der Versuchsdauer keine zuverlässige Aussage mehr liefern können. Die Beurteilung der Krankheitsausprägung anhand Deformationen wurde am Tag 120 p.e. durchgeführt, weil sich die Ausprägung dieses Symptoms der Drehkrankheit zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten zeigte.

Wie im vorigen Abschnitt werden zunächst die Forellen-Linien AmTl und DtWf die in dieser Arbeit untersucht wurden, miteinander verglichen und anschließend findet ein Vergleich mit der Forellenlinie DtHo und der Bachforelle aus der Studie von KÜPPERS (2003) statt.

Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Stärke der Deformation

Die meisten Deformationen waren bei AmTl und DtWf bei den Infektionsdosen 5.000 und 1.000 TAM-Sporen/Fisch zu beobachten. Wie die Abbildung 17 zeigt, bestand eine positive Beziehung zwischen Infektionsdosis und Stärke der Deformationen. Je höher die Infektionsdosis war, desto größer war der Anteil der Versuchesfische, die an Deformationen litten.

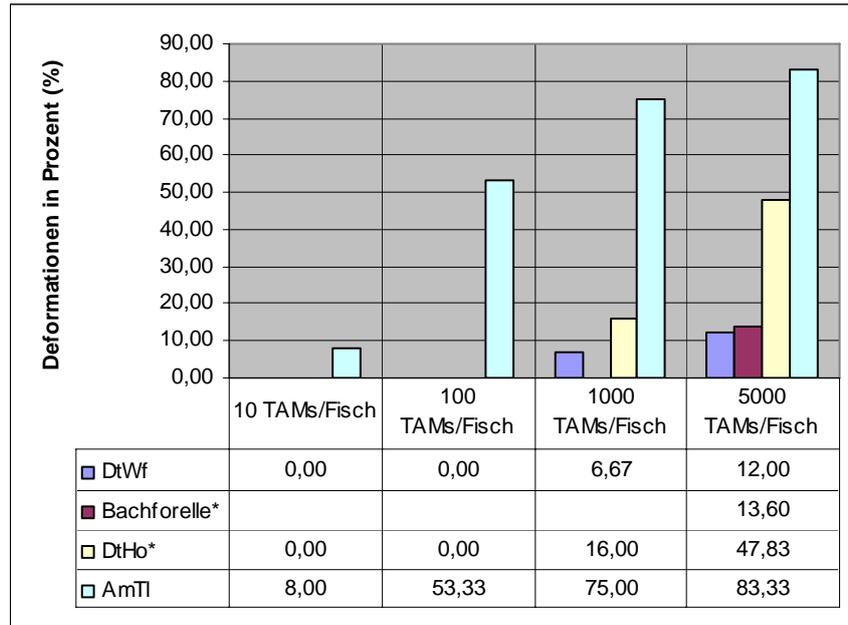


Abbildung 17: Vergleich der Deformationen zwischen drei verschiedenen Forellen-Linien und der Bachforelle am Tag 120 post expositionem. (*: aus KÜPPERS 2003).

Vergleich der verschiedenen Forellen-Linien (AmTl, DtWf, DtHo) und der Bachforelle untereinander

Während es bei Vertretern der amerikanischen Linie AmTl schon bei den geringen Infektionsdosen 10 und 100 TAM-Sporen/Fisch zu Deformationen kam, zeigten Tieren der Linien DtHo und DtWf bei diesen Infektionsdosen keinerlei Deformationen.

Es ergab sich bezüglich des Symptoms Deformation ein signifikanter ($P \leq 0,026$) Unterschied zwischen der deutschen Wildforellen-Linie (DtWf) und der amerikanischen Forellen-Linie (AmTl). Im Vergleich zu DtHo zeigten Fische der Linie DtWf deutlich weniger Deformationen bei den Infektionsdosen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch (Abbildung 17). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen DtWf und DtHo.

Schon bei den visuellen Beobachtungen (Inkubationszeit und Symptomprävalenz), erwies sich die deutsche Forellen-Linie DtWf als widerstandsfähiger gegenüber der Drehkrankheit als die amerikanische Linie AmTl und auch als die Zuchtlinie DtHo.

5.3.2 Post mortem Erhebungen

5.3.2.1 Gewicht und Größe

Schon PLEHN (1904) beschrieb bei der Drehkrankheit die verminderte Futteraufnahmefähigkeit der Fische auf Grund der Bewegungsstörungen und vor allem der Deformationen im Kopfbereich. Durch die schnellen Drehbewegungen, welche die Tiere in Fütterungszeiten (Stresssituationen) vollführten, konnte nur wenig Futter aufgenommen werden. Durch die Verformungen des Kiefers, welche bei einigen Individuen den Schluss der Maulspalte unmöglich machte, fielen oft die aufgenommenen Futterpellets wieder aus der Maulhöhle heraus. Solche Missgestaltungen (PLEHN 1904 & SCHÄPERCLAUS 1931) führen zu einem schlechteren Wachstum der Tiere, die schließlich wirtschaftlich nicht mehr tragbar werden. Zu erwarten wäre deshalb beim folgenden Vergleich der Endgrößen und der Endgewichte ein geringeres Wachstum derjenigen Tiere, die mit hohen Sporenzahlen infiziert worden sind, die deutliche klinische Ausprägung zeigten und die zu den empfindlichsten Gruppen zählen.

Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Endgröße-bzw.-gewicht

Während es keinen Zusammenhang zwischen Infektionsdosis, Größe und Gewicht bei der deutschen Linie DtWf gab, konnte man bei Fische der Linie AmTl eine negative Beziehung zwischen Größe und steigender Infektionsdosis feststellen.

Der Mittelwert der Größe betrug bei AmTl in der Infektionsgruppe zehn TAM-Sporen/Fisch 8,3 cm und lag somit deutlich über den Ergebnissen der Vertretern aus den Infektionsgruppen 1.000 (6,7 cm) und 5.000 (6,6 cm) TAM-Sporen/Fisch.

Auch im Vergleich der Endgrößen- und Endgewichte zwischen DtWf und AmTl zeigte sich eine Tendenz. Die Tiere der deutschen Linie DtWf brachten bei allen Infektionsdosen (Ausnahme 10 TAM-Sporen/Fisch) im Durchschnitt mehr Gewicht auf die Waage und waren größer als Vertreter der Linie AmTl. Am Tag 150 p.e. war die Anzahl der überlebenden Tiere bei den Infektionsdosen 100, 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch bei der Linie DtWf höher als bei AmTl. Darüber hinaus wäre theoretisch ein stärkeres Wachstum von Tieren in Aquarien mit einer niedrigeren Besatzdichte bei gleicher Infektionsdosis zu erwarten. Die Aquarien, welche mit Vertretern der Linie AmTl bestückt waren, hatten bei den Infektionsdosen 100, 1.000 und 5.000 TAMs/Fisch eine deutlich niedrigere Besatzdichte als Aquarien mit DtWf und dennoch ein geringes Wachstum.

Die Wachstumsraten werden aber zusätzlich von anderen Faktoren mitbestimmt. In den Fischeaquarien entsteht durch die beschränkten Raumverhältnisse Stress für die Fische, der sich beispielsweise während der Fütterungszeit noch verstärkt. Je höher die Besatzdichte in einem

Becken ist, desto schlechter ist die Wasserqualität und desto höher ist der Stress, dem die Tiere ausgesetzt sind. Schon BOLLARD et al. (1993) beobachteten bei in schlechter Wasserqualität gehaltenen Fischen eine erhöhte Kortisolausschüttung und in dessen Folge vermindertes Wachstum.

Untersuchungen bei der Stahlkopfforelle (*Oncorhynchus mykiss*; eng. steelhead trout) und dem Königslachs (*Oncorhynchus tshawytscha*; eng. chinook salmon) haben gezeigt, dass es während der Inkubationszeit zu einer Verminderung der Wachstumsrate bei den mit *M. cerebralis* infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Tiere kommt (HEDRICK et al. 2001). Die Autoren fanden ebenfalls heraus, dass es beim Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*; eng. coho Salmon) keine Unterschiede in der Wachstumsrate gab zwischen Tieren die mit einer mäßigen *M. cerebralis* Sporenzahl infiziert waren und Tieren, die nicht infiziert waren. Weiterhin konnten HEDRICK et al. in derselben Arbeit feststellen, dass sich die Wachstumsraten wieder auf ein normales Niveau stabilisierten, wenn die klinischen Symptome (Drehbewegungen, Schwarzfärbung) der Drehkrankheit verschwanden. Ausnahme bilden jedoch Tiere, die sehr stark an Deformationen im Schädelbereich leiden, so dass es zu einer Einschränkung der Futteraufnahme und somit zu einer Verminderung der Wachstumsrate kommt.

Die Mortalität bei jungen Salmoniden variiert sehr stark. Sie kann entweder als direkte Folge einer Exposition mit dem Parasit oder als Konsequenz der Infektion mit den daraus resultierenden Schäden eintreten. MARKIW (1991; 1992) konnte anhand Infektionsversuchen zeigen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit stark vom Fischalter zum Infektionszeitpunkt abhängt. Bei einer Sporendosis von 100 *Triactinomyxon* Sporen je Fisch konnten 90% der 60 Tage alten Tiere überleben. Wenn aber frisch geschlüpfte Brut mit derselben Sporendosis infiziert wurde, überlebten gerade einmal 50% der Tiere. Bei natürlichen Umweltbedingungen wird die Mortalität zusätzlich von verschiedenen Stressfaktoren und sekundären Krankheitserregern beeinflusst. Bei einer Infektion mit *M. cerebralis* Sporen kommt es z.B. bei einer Erhöhung der Wassertemperatur, zu einem Anstieg der Mortalitätsrate (SCHISLER et al. 2000).

RYCE et al. (2001) konnten bei Tieren, die sehr stark an Deformationen litten, eine starke Zunahme der Mortalitätsrate aufgrund der reduzierten Futteraufnahme feststellen.

Zusammenfassend kann man in den Versuchsaquarien aufgrund der starken Abhängigkeit der Parameter Infektionsdosis und Linie der Forellen von den verbleibenden Gruppengrößen nur vorsichtige Aussagen treffen. Die Tatsache, dass die Tiere bei hohen Infektionsdosen nicht stärker von der Drehkrankheit betroffen zu sein scheinen, lässt sich dadurch erklären, dass die

Besatzdichte in diesem Versuch bei den hohen Infektionsdosen deutlich geringer als bei den niedrigen Infektionsdosen waren.

Letztendlich kann man aufgrund der Analyse des Wachstumszustandes der Fische (Endgewichte und Endgrößen) am Tag 150 post-expositionem behaupten, dass die Tiere der deutschen Wildforellen-Linie im Durchschnitt weniger von der Drehkrankheit betroffen waren und deshalb ein größeres Wachstum als Vertretern der amerikanischen Linie AmTl erzielt haben.

5.3.2.2 Infektionsprävalenz

Die Infektionsprävalenz gibt die Prozentzahl der histologisch untersuchten Fische jeder Infektionsgruppe an, bei denen Sporen im Kopfknochen gefunden werden konnten.

Einfluss der Infektionsdosis auf die Infektionsprävalenz

Innerhalb der Infektionsgruppen waren die höchsten Infektionsprävalenzen sowohl bei AmTl als auch bei DtWf in den Infektionsdosen 5.000 gefolgt von 1.000, 100 und schließlich zehn TAM-Sporen/Fisch gemessen worden. Je höher die Infektionsdosis war, desto größer war die Infektionsprävalenz.

Vergleich der verschiedenen Forellen-Linien (AmTl, DtWf, DtHo) und der Bachforelle untereinander

In dieser Untersuchung zeigten Fische der deutschen Forellen-Linie DtWf bei allen Infektionsdosen niedrigere Infektionsprävalenzen als Vertretern der Linie AmTl (Abbildung 18). Bei DtWf betrug die Infektionsprävalenz bei der Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch 60%, nur 30% bei der Infektionsdosis 1.000 TAM-Sporen und sogar 0% bei den Infektionsdosen zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch.

Die Tieren der Linie AmTl zeigten hingegen die höchste Infektionsprävalenz (100%) bei den Infektionsdosen 100, 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch. Sogar bei der niedrigsten Infektionsdosis zehn TAM-Sporen/Fisch wurde eine Infektionsprävalenz von 60% gemessen (Abbildung 18). Es ergab sich einen hoch signifikanten ($P=0,0084$) Unterschied in der Infektionsprävalenz zwischen der deutschen Linie DtWf und der amerikanischen Linie AmTl.

KÜPPERS hat im Jahr 2003 bei Vertretern der Linie DtHo eine Infektionsprävalenz von 100% (in den Infektionsgruppen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch), 60% (bei der Infektionsgruppe 100 TAM-Sporen/Fisch) und 20% (bei der Infektionsgruppe zehn TAM-Sporen/Fisch) gemessen.

Der Vergleich der Infektionsprävalenz zwischen der deutschen Wildforellenlinie (DtWf) und der deutschen Linie DtHo ergab keinen signifikanten Unterschied. In ihrer Untersuchung hat Küppers (2003) ebenfalls bei der Bachforelle in der einzigen untersuchten Dosierung von 5.000 Triactinomyxon Sporen/Fischgruppe eine Höhe Infektionsprävalenz von 90 % feststellen können (Abbildung 18).

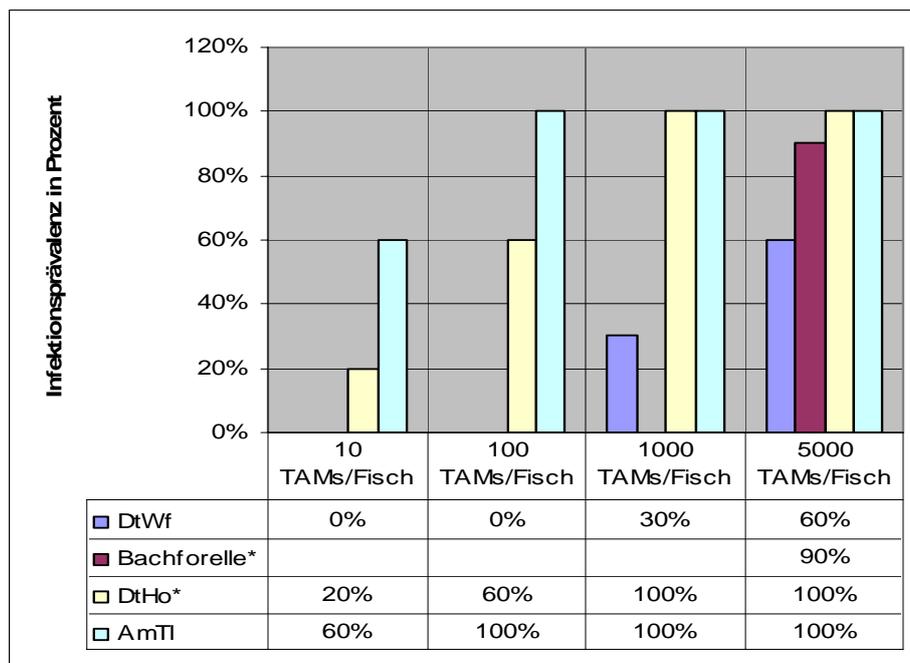


Abbildung 18: Vergleich der Infektionsprävalenz zwischen drei verschiedenen Forellen-Linien und der Bachforelle am Tag 150 post infectionem. (*: aus KÜPPERS 2003).

Bei der Analyse der Infektionsprävalenz ergab sich in dieser Laboruntersuchung die höchste Infektionsprävalenz bei der amerikanischen Forellen-Linie AmTl.

Verglichen mit den Ergebnissen der Untersuchung von KÜPPERS (2003), zeigte die zum ersten Mal untersuchte deutsche Linie (DtWf) deutlich niedrigere Infektionsprävalenzen bei allen Infektionsdosen als die deutsche Linie DtHo. Auch im Vergleich zu der Bachforelle, die als ursprünglicher bzw. resistenterer Wirt für *M. cerebralis* gilt (HOFER 1903; HOFFMAN 1962), zeigte die deutsche Linie DtWf in der Gruppe, die mit 5.000 TAM-Sporen/Fisch infiziert wurde, eine deutlich niedrigere Infektionsprävalenz.

Die Auswertung der Ergebnisse der Infektionsprävalenz bestätigen die Ergebnisse der klinischen Symptomatik, bei der es sich ebenfalls herauskristallisiert hat, dass die deutsche Forellen-Linie DtWf deutlich resistenter gegenüber einer *M. cerebralis* Infektion im Vergleich

zu der amerikanischen Forellen-Linie AmTl und ebenfalls relativ resistenter als die wenig empfänglich geltende deutsche Forellen-Linie DtHo ist.

5.3.2.3 *Myxobolus cerebralis* Sporenzahl pro Kopf

Effekt der Infektionsdosis auf die Sporenzahl

Beim Vergleich innerhalb der verschiedenen Infektionsgruppen wurden die meisten Sporen durchschnittlich bei der Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch gefolgt von der Infektionsdosis 1.000 TAM-Sporen/Fisch gefunden. Der Unterschied in der Sporenzahl zwischen diesen beiden hohen Infektionsdosen war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu waren in den beiden niedrigeren Infektionsdosen (zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch) deutlich weniger *M. cerebralis* Sporen zu finden als in den höheren Infektionsdosen.

Es konnte eine positive Beziehung zwischen Infektionsdosis und Anzahl der ausgezählten *M. cerebralis* Sporen gefunden werden. Je höher die Infektionsdosis war, desto größer war die Anzahl der *M. cerebralis* Sporen. KÜPPERS (2003) und MEIXNER (2004) haben ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Anzahl der *M. cerebralis* Sporen feststellen können. NEHRING und THOMPSON (1998) beschreiben den Infektionsdruck der nordamerikanischen Gewässer mit circa 1.000 TAM-Sporen/Fisch. Die höchste Sporenzahl wurde in diesem Laborversuch mit einer Anzahl von 458.330 *M. cerebralis* Sporen pro Kopf bei der amerikanischen Linie AmTl in der Infektionsgruppe 5.000 TAM-Sporen/Fisch erreicht.

Vergleich der verschiedenen Forellen-Linien (AmTl, DtWf, DtHo) und der Bachforelle untereinander

Der Vergleich der *M. cerebralis* Sporenzahl pro Kopf zeigte, dass die amerikanische Linie (AmTl) deutlich viel mehr Sporen pro Kopf entwickelt hat als die deutsche Linie (DtWf). Bei den Gruppen mit Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch wurden durchschnittlich bei DtWf 31.260 und bei AmTl 458.330 *M. cerebralis* Sporen pro Kopf ausgezählt, was einen Unterschiedsfaktor von 14,6 entspricht. Der Unterschiedsfaktor in der Sporenzahl lag zwischen DtWf mit 20.420 *M. cerebralis*-Sporen pro Kopf und AmTl mit 366.670 *M. cerebralis* Sporen pro Kopf bei der Infektionsdosis 1.000 TAM-Sporen/Fisch bei 17,9 und war damit höher als in der Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch (Abbildung 19).

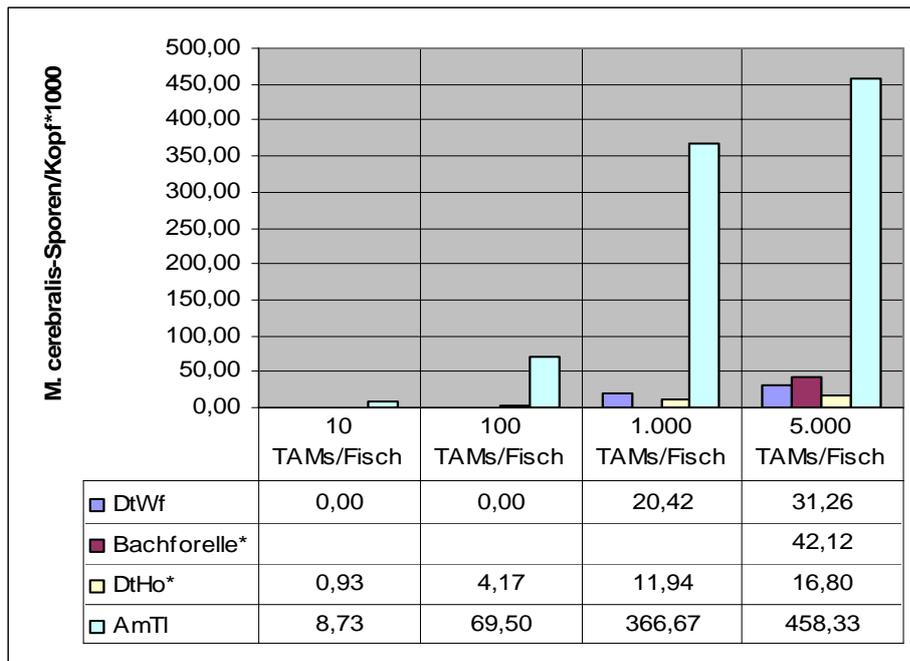


Abbildung 19: Vergleich der *Myxobolus cerebralis* Sporenzahl pro Kopf von drei verschiedenen Forellen-Linien und der Bachforelle am Tag 150 post expositionem. (*: aus KÜPPERS 2003).

Während die Sporenauszählung bei DtWf in den Infektionsdosen zehn und 100 TAM-Sporen je Fisch keine Sporen ergab, wurden bei der Linie AmTl in den Infektionsdosen zehn Triactinomyxon Sporen je Fisch bzw. 100 TAM-Sporen/Fisch im Durchschnitt respektiv 8.733 bzw. 69.500 *M. cerebralis* Sporen pro Kopf ausgezählt (Abbildung 19). Es ergab sich bezüglich der Sporenzahl zwischen DtWf und AmTl einen signifikanten ($P=0,093$) Unterschied. Somit erwies sich die deutsche Linie DtWf auch bezüglich der Sporenzahl im Kopfknochen deutlich resistenter als die amerikanische Linie AmTl.

Der Vergleich der *M. cerebralis* Sporenzahl im Kopfknochen, zwischen DtWf und DtHo (KÜPPERS 2003), ergab keine große Unterschiede in den Infektionsdosen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch jedoch einen relevanten Unterschied bei den Infektionsdosen zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch (Abbildung 19). Es bestand zwischen der deutschen Linie (DtWf) und der deutschen Linie (DtHo) keinen signifikanten ($P=0,100$) Unterschied.

In den zwei höchsten Infektionsdosen 1.000 und 5.000 TAM-Sporen/Fisch hätte man jedoch mehr Sporen bei DtHo als bei DtWf erwartet. Diese Diskrepanz kann entweder das Ergebnis der zufälligen Wahl der Versuchsfische bei der Probenentnahme oder durch die unterschiedliche Verteilung der Sporen im Wirtsgewebe (MARKIW 1992) zu erklären sein.

Verglichen mit der Untersuchung von KÜPPERS (2003) entwickelten Probanden der Bachforelle bei der Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch im Durchschnitt mit 42.119 *M. cerebralis* Sporen pro Kopf mehr Sporen als Vertretern der Linie DtWf (Abbildung 19).

5.3.2.4 Histologische Untersuchungen

Die histopathologische Beurteilung der Wirtsreaktion vollzog sich nach dem MacCONNELL-BALDWIN Numerical Scale, wobei aufsteigende Gradzahlen vermehrte Parasiten bedingte Veränderung bedeuten. Beurteilt wurde die Wirtsreaktion nach Anzahl und Ausprägung der Nekroseherde, und der Menge der assoziierten Entzündungszellen und deren Ausbreitung in umliegendes Gewebe. KÜPPERS (2003) führte bei verschiedenen Forellenlinien Korrelationsanalysen zwischen dem Grad der histopathologischen Veränderungen und der Sporenzahl in Kopfknochen durch. Dabei fand die Autorin eine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern und vermutet deshalb, im Gegensatz zu HEDRICK et al. (1999a), dass die granulomatöse Entzündung, die meist um die Parasiten assoziiert ist, nicht in der Lage ist die Infektion abzuschwächen. Aufgrund dieser Korrelation würde man in der vorliegenden Arbeit zu einem stärkeren histopathologischen Veränderungen bei Vertretern in den höheren Infektionsdosen 5.000 und 1.000 Triactinomyxon Sporen je Fisch Gruppen als in den niedrigeren Infektionsdosen 100 und zehn TAM-Sporen/Fisch Gruppen, und zum anderen mehr histopathologische Veränderungen bei den Tieren der amerikanischen Linie (AmTI) als bei den Vertretern der deutschen Linie (DtWf)

Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Grad der histopathologischen Veränderungen

Beim Vergleich der histopathologischen Veränderungen im Kopfknochen unterschied sich die höchste Infektionsdosis 5.000 TAM-Sporen/Fisch von allen anderen Infektionsdosen deutlich und wies die durchschnittlich schwersten Veränderungen in der Knochenarchitektur auf. Auch die übrigen Infektionsgruppen unterschieden sich untereinander, wobei folgende Hierarchie der histopathologischen Veränderungen in absteigender Reihenfolge entstand: 5.000, 1.000, 100 und zehn TAM-Sporen/Fischgruppe (Abbildung 20).

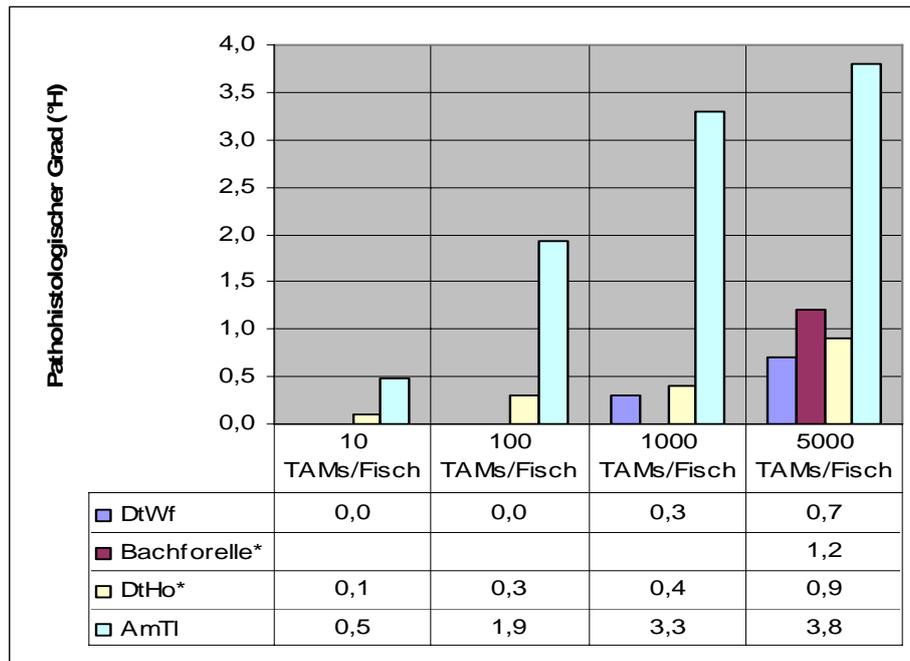


Abbildung 20: Vergleich der histopathologischen Veränderungen bei drei verschiedenen Forellen-Linien und der Bachforelle am Tag 150 post expositionem. (*: aus KÜPPERS 2003).

Empfänglichkeit der untersuchten Linien im Vergleich

Die deutsche Forellen-Linie DtWf wies bei den zehn und 100 TAM-Sporen/Fisch keine histopathologischen Veränderungen auf. Das entspricht auch den Ergebnissen der Infektionsprävalenz und der Sporenauszählung. Bei der amerikanischen Forellen-Linie AmTl wurden in den zehn und 100 Triactinomyxon Sporen/Fischgruppen respektiv Veränderungen von 0,5 °H und 1,9 °H registriert. Beim Vergleich zwischen DtWf und AmTl bestand ein signifikanter ($P=0,032$) Unterschied in den registrierten histopathologischen Veränderungen.

Im Vergleich zu der, in der Arbeit von KÜPPERS (2003) untersuchten deutschen Linie DtHo, wies die Linie DtWf vergleichbar geringe histopathologische Veränderungen bei den verschiedenen Infektionsdosen auf. Der Unterschied zwischen DtWf und DtHo war nicht signifikant ($P=0,48$). In der Untersuchung von KÜPPERS (2003) betrug der Grad der histopathologischen Veränderungen bei der Bachforelle in der einzigen untersuchten 5.000 Triactinomyxon Sporen Fischgruppe 1,2 °H und lag damit höher als bei DtWf (0,7 °H) (Abbildung 20).

Die Beurteilung der histopathologischen Veränderungen ergab in dieser Laboruntersuchung bei der deutschen Linie DtWf und bei der amerikanischen Linie AmTl eine im Kopfknochen proportional zur Infektionsdosis und Sporenkonzentration anwachsende Wirtsreaktion. Diese Verhältnisgleichheit zu den Sporenkonzentration anwachsender Ausprägung der

Knorpelläsionen bei der Regenbogenforelle erkannten auch HEDRICK et al. (1999a) und EL-MATBOULI et al (2002) in ihren Untersuchungen.

In den Untersuchungen von HEDRICK et al. (1999a) wurden ebenfalls Bachforellen mit verschiedenen TAM Sporen Konzentrationen infiziert. Hier konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Sporenkonzentration im Kopfknochen festgestellt werden, da die Sporenanzahl nicht proportional zur Infektionsdosis anstieg, sondern bei 10.000 Sporen je Fisch generell eine Art Plateau fand. Eine größere Präsenz an Entzündungszellen in Nerven- und Knochenknorpelgewebe der Bachforelle verglichen mit Regenbogenforellen sind für die Autoren ein Hinweis darauf, dass diese zelluläre Komponente des Immunsystems bei der Bachforelle auf effektivere Weise den Parasiten abzuschwächen vermag als bei der Regenbogenforelle.

Ziel dieser Studie, war es eine bis zum Zeitpunkt des Versuchs noch unbekannt deutsche Forellen-Linie DtWf, auf ihre Empfänglichkeit gegenüber einer *M. cerebralis* Infektion zu untersuchen und mit der hoch empfänglichen amerikanischen Forellen-Linie AmTl zu vergleichen. Es war deshalb wichtig, die Ergebnisse dieser Untersuchung mit den Ergebnissen aus der Studie von EL-MATBOULI et al. (2002) und HEDRICK et al. (2003) in Verbindung zu bringen, um die Resistenz der deutschen Forellen-Linie DtWf nicht nur mit der hoch empfänglichen Forellen-Linie AmTl sondern auch mit der relativ resistenten Forellen-Linie DtHo und mit der als widerstandsfähig geltenden Bachforelle vergleichen zu können.

Dieser Vergleich hat gezeigt, dass die deutsche Wildforellen-Linie (DtWf) relativ widerstandsfähiger als die deutsche Forellen-Linie DtHo ist. Im klinischen Teil hatten die Versuchsfische von DtWf längere Inkubationszeiten und niedrigere Symptomprävalenzen.

Post mortem haben die Ergebnisse der Infektionsprävalenz und der histologischen Beurteilung der Wirtsreaktion ergeben, dass DtWf relativ resistenter ist als DtHo. Die Ergebnisse der Sporenzählung haben ebenfalls zumindest bei den niedrigsten Infektionsdosen zehn und 100 TAM/Sporen pro Fisch gezeigt, dass die deutsche Linie DtWf resistenter als die deutsche Forellenlinie DtHo ist. Lediglich in den Infektionsdosen 1.000 und 5.000 TAMSporen/Fisch konnten keine relevante Unterschiede in der Sporenanzahl zwischen DtWf und DtHo registriert werden. Im Vergleich mit der Bachforelle, welche von HOFFMAN et al. (1962), HOFFMAN (1970), HALIDAY (1976) und O'GRODNICK (1979) als ursprünglicher und daher resistenterer Wirt für *Myxobolus cerebralis* eingestuft wird, zeigten sich Tiere der deutschen Forellen-Linie DtWf als relativ resistenter. Wobei diese Feststellung mit Vorsicht zu machen ist, da die Bachforellen in der Arbeit von KÜPPERS (2003) nur mit einer Infektionsdosis (5000 TAM-Sporen/Fisch) infiziert wurden.

5.3.2.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Myxobolus cerebralis, der Erreger der Drehkrankheit, macht im Salmonidenwirt im Verlauf der Infektion eine Wanderung durch die Haut und das Nervengewebe des Fisches, bis er schließlich sein Zielgewebe, den Knorpel erreicht. Im Knorpelgewebe findet eine Sporogonie statt, die ab dem 90. Tag post expositionem zur Bildung von reifen *Myxobolus cerebralis* führt (EL-MATBOULI et al. 1995). Für die Analyse mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurden aus Proben beider Forellenlinien alle Infektionsgruppen Kopfknorpelstücke von 2 mm Kantenlänge entnommen und wie im Kapitel 3.2.6.3 weiterbearbeitet.

Ziel der Untersuchung mit der Transmissionselektronenmikroskopie war es, die durch die *Myxobolus. cerebralis* Sporen hervorgerufene histopathologische Veränderungen zu erfassen, um dann einen Vergleich der Wirtsreaktion zwischen der amerikanischen Linie AmTl und der deutschen Linie DtWf zu ermöglichen. Dieser Schritt gelang in dieser Untersuchung leider nicht. Die angefertigten Ultradünnschnitte haben kein ausreichendes Material geliefert, um eine Lokalisierung der Gewebestellen mit histopathologischen Veränderungen der Knorpelstruktur, zu ermöglichen. Damit konnte letztendlich einen Vergleich der histopathologischen Veränderungen der Kopfknorpel-architektur zwischen der amerikanischen Linie (AmTl) und der deutschen Linie (DtWf) nicht durchgeführt werden.

5.3.2.6 Molekularbiologische Untersuchung (PCR)

Die molekularbiologische Untersuchung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) sollte dazu dienen, die Ergebnisse der Proben beider Linien, bei denen es sich sowohl histologisch als auch bei der Sporenzählung keinen Hinweis auf einer Infektion mit *Myxobolus. cerebralis* ergab, molekularbiologisch zu bestätigen. Es wurden lediglich Fische der deutschen Forellenlinie DtWf, die mit zehn und 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch infiziert worden sind, molekularbiologisch auf das Vorhandensein von *M. cerebralis* Sporen untersucht. Die durchgeführte PCR ergab bei den untersuchten Fischen keine Bande bei 435 bp. Das von den verwendeten Primern nachgewiesene Amplifikat dieser Länge ist *M. cerebralis* spezifisch. Somit war die PCR bei allen untersuchten Probanden der deutschen Forellenlinie DtWf, die mit einer Infektionsdosis von zehn und 100 Triactinomyxon Sporen je Fisch infiziert waren, negativ zu werten. Dieses Ergebnis entsprach den Ergebnissen der histologischen Untersuchung und der Sporenzählung. Die Ergebnisse zeigen damit eindeutig, dass die deutsche Wildforellen-Linie einen Infektionsdruck mit bis zu 100 TAM-Sporen/Fisch bewältigen kann. Diese Beobachtung spricht für die relative Widerstandsfähigkeit dieser deutschen Wildlinie gegenüber der Drehkrankheit.

5.4 Schlußfolgerung

Die Fehla ist ein im größtenteils bis zum Ufer bewachsener und ganz beschatteter Bach. Sie ist circa 1,5 m bis 2 m breit und erreicht an ihrer tiefsten Stelle maximal 1,50 m.

Die deutsche Linie DtWf, als bisher einzige Wildregenbogenforellen Population (Strubelt, Verband Deutscher Fischereiverwaltung, mündliche Mitteilung) bekannt, konnte sich in diesem Gewässer über eine lange Zeit etablieren, weitervermehrten und sich mit dem Erreger der Drehkrankheit *M. cerebralis* auseinandersetzen. Es kam im Laufe der Jahre höchstwahrscheinlich durch natürliche Selektionsprozesse zu gewisser Resistenz gegenüber *Myxobolus cerebralis*.

Die untersuchte deutsche Forellen-Linie DtWf nimmt in der Empfänglichkeit gegenüber einer *Myxobolus cerebralis* Infektion eine besondere Stellung ein. Sie ist bei der Symptomprävalenz, bei der Sporenzählung und bei der Einteilung nach histopathologischen Graden jeweils deutlich resistenter als die amerikanische Linie AmTl. Auch im Vergleich mit der als widerstandsfähig geltenden deutsche Forellen-Linie DtHo (El-MATBOULI et al. 2002; HEDRICK et al. 2003) zeigte sich die deutsche Forellen-Linie DtWf als relativ resistenter.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit den Beschreibungen von BEHNKE (2002) überein, der Wildstämme bzw. Wildforellenlinien für resistenter gegenüber Krankheitserreger als Zuchtstämme hielt. Somit könnte momentan der Forderungen von BEHNKE (2002) schon dadurch nachgekommen werden, eine unempfindliche Wildforellenlinie in den amerikanischen Gewässern auszusetzen, um der Selektion noch Raum zu lassen. Bis zur Erstellung dieser Arbeit konnten keine amerikanischen Forellenlinien ausfindig gemacht werden, die eine signifikante Resistenz gegenüber *M. cerebralis* aufweisen (HEDRICK et al. 1998; 1999b; DENSMORE et al. 2001). Begründet liegt dieses wahrscheinlich darin, dass ca. 55 Jahre der Koevolution der Regenbogenforelle mit dem Parasiten in den Vereinigten Staaten die Mechanismen der Selektion noch nicht in dem Maße wirken ließen wie in 110 Jahre in Deutschland.

Welche Faktoren die höhere Resistenz der deutschen Regenbogenforellen sowie der Bachforelle gegenüber der Drehkrankheit bedingen, ist bis heute ungeklärt.

Die Korrelationsanalysen, die KÜPPERS (2003) geführt hat ergaben, dass die Wirtsreaktion signifikant proportional zur Sporendichte im Knorpel, sowohl bei Bachforellen als auch bei Regenbogenforellen ansteigt, und ihr somit keine den Parasiten limitierende Wirkung zugesprochen werden kann. Dieselbe Beobachtung konnte ebenfalls in dieser Arbeit gemacht werden.

Es müssen andere, bisher unbekannte Mechanismen der zellulären oder humoralen Abwehr für die unterschiedliche Qualität der Krankheitsausprägung verantwortlich sein. Theoretisch könnte die Auswilderung resistenter deutscher Regenbogenforellen-Linien die Parasitenbürde von *M. cerebralis* in Nordamerikanischen Gewässern entscheidend verringern. Resistenz gegenüber einer einzigen Krankheit stellt jedoch nur ein Kriterium dar, welches bedacht werden muss, wenn Tiere und Pflanzen von einem komplexen Ökosystem in ein anderes verbracht werden.

Weiterführende Forschungsprojekte untersuchen zurzeit am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten die Resistenz dieser Regenbogenforellen-Linien gegenüber anderen Pathogenen, die vornehmlich in Nordamerika vorkommen.

6 Zusammenfassung

Untersuchung der Empfänglichkeit einer deutschen Regenbogenforellen-Linie (*Oncorhynchus mykiss*) gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden

Die Drehkrankheit ist eine wichtige parasitäre Erkrankung der Salmoniden. Durch ihre rasche Verbreitung in den letzten Dekaden wurden die Forellenbestände in vielen europäischen Ländern und den vereinigten Staaten von Amerika sowohl in der Wildnis als auch in den Zuchtanlagen sehr stark dezimiert. In vergangenen Untersuchungen wurde ein deutsche Regenbogenforellen-Linie DtHo gefunden, die sich gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion relativ unempfindlich gezeigt hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von kontrollierten Laborbedingungen sowohl eine amerikanische Linie (AmTI) als auch eine bis zum Zeitpunkt des Versuches noch nicht untersuchte deutsche Regenbogenforellen-Linie (DtWf) auf ihre Empfänglichkeit gegenüber *Myxobolus cerebralis* (Erreger der Drehkrankheit) untersucht. Dafür wurden in unserem SPF-Zuchtraum geschlüpfte und aufgezogene Forellen der beiden Linien in fünf Gruppen aufgeteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von *Triactinomyxon* Sporen infiziert.

Fünf Monate nach Infektion wurden aus jeder Gruppe eine bestimmte Fischanzahl heterogenen Gewichts und heterogener Größe ausgesucht, mittels Tötungsbad getötet und Gewicht und Größe notiert. Die Empfänglichkeit gegenüber der Drehkrankheit wurde anhand folgender Parameter untersucht. Im klinischen Teil durch die Länge der Inkubationszeit sowie den Prozentsatz der klinisch erkrankten Tieren über einen Fünf-Monats-Zeitraum.

Post mortem wurde die Infektionsprävalenz (Prozentsatz der histologisch untersuchten Fische jeder Infektionsgruppe, bei denen Sporen im Kopfknochen gefunden werden konnten) ermittelt. Außerdem wurde die Konzentration der *Myxobolus cerebralis*-Sporen im Kopfknochen quantitativ erfasst und die durch die Infektion hervorgerufenen pathologischen Veränderungen bewertet.

Den empirischen Beobachtungen entsprechend erwies sich die deutsche Wildforellen-Linie als deutlich widerstandsfähiger als die amerikanische Forellen-Linie (AmTI).

So zeigten die amerikanischen Regenbogenforellen im klinischen Teil die kürzesten Inkubationszeiten und höchste Symptomprävalenzen. Die deutsche Wildforellen-Linie erwies

sich bei allen Infektionskonzentrationen deutlich widerstandsfähiger als die amerikanische Forellenlinie Linie AmTl.

Laboruntersuchungen post mortem ergaben bei der Linie AmTl höchste Infektionsprävalenzen. Deutlich zeigten auch die Ergebnisse der quantitativen Sporenerfassung und der histopathologischen Beurteilung der Wirtsreaktion, dass die amerikanische Forellen-Linie signifikant empfänglicher war als die deutsche Wildforellen-Linie. So entwickelten sich im Kopfknochen der amerikanischen Linie AmTl bei einer dem natürlichen Infektionsdruck nordamerikanischer Gewässer entsprechenden *Triactinomyxon* Dosis die 18fache Anzahl reifer Parasitenstadien verglichen mit der deutschen Wildforellenlinie.

Im Diskussionsteil wurde einen Vergleich zwischen der zum ersten Mal untersuchter deutscher Wildforellenlinie und der als relativ resistent geltende deutsche Forellenlinie DtHo (EL-MATBOULI et al. 2002; HEDRICK et al. 2003) durchgeführt. Aus diesem Vergleich zeigte sich die deutsche Wildforellen-Linie DtWf deutlich unempfindlicher gegenüber einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion als die deutsche Linie DtHo.

7 Summary

Investigation into the susceptibility of a German wild rainbow trout strain (*Oncorhynchus mykiss*) to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in salmonids

Whirling disease is an important parasitic disease of salmonids that attains increasing importance in Europe and in the USA. Previous studies have shown that a hatchery rainbow trout strain from Germany (DtHo) is relatively resistant to whirling disease compared to three other German strains and one North American strain.

The focus of this work was to investigate the susceptibility of the German wild rainbow trout strain DtWf to *Myxobolus cerebralis* and compare it with an American rainbow trout strain (AmTl), known to be very susceptible to the parasite. For the laboratory exposure, the trout strains were divided into 5 groups, each with 30 to 40 fish. These groups were infected with different doses of triactinomyxon-spores.

The Susceptibility to whirling disease was gauged using the following two parameters, the incubation time and the percentage of fish exhibiting clinical signs of the disease over a five month period.

Five months post exposure, 10 fish from each group were randomly taken for histological evaluation and counting of the spores. Each fish was processed separately. They were anesthetized; the weight and the length of each fish were documented.

The present findings indicate that the German wild trout strain was less susceptible to whirling disease than the American AmTl strain. In the American strain, the disease had the shortest incubation time and lead to the most severe clinical symptoms. In the laboratory experiments, the American strain AmTl had the highest prevalence of infection. The spore count and the patho-histological assessments showed that the American strain was remarkably more susceptible to the disease than the German wild trout strain. Indeed, the American strain AmTl had 18 times more spores develop in their head than the German strain DtWf, at a dosage comparable to that present natural condition in North America.

The investigation demonstrated that German strain of rainbow trout DtWf possess significantly greater resistance to whirling disease than the American strain AmTl.

8 Abkürzungsverzeichnis

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

9 Literaturverzeichnis

ADAMS SM (1990)

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

ADKINSON MA, LEVINE RP, HEDRICK RP (1997)

Investigations into the immune response of rainbow trout to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Proceedings Whirling Disease Symposium, Eccles Conference Center Logan, Utah, March 6-8: 137-146

ALDERMAN DJ (1986)

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

ALEXANDER JB (1985)

Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish.
In: Fish Immunology (Hrgs. Manning und Tatner), Academic Press Inc., London, 133-140

AMLACHER E (1992)

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

AMIN AB, MORTENSEN L, POPPE TT (1992)

Blood and Lymph. In: AB AMIN, L MORTENSEN und TT POPPE: Histology Atlas.
Verlag Akvapatologisk Laboratorium AS, Bodo-Norway: 84-93

ANDERSON DP (1990)

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

ANDERSON AA, FLETCHER TC, SMITH GM (1979)

The release of prostaglandin E_2 from the skin of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. Br. J. Pharmacol., 66, 547

ANDREE KB, MacCONNELL E, HEDRICK RP (1998)

A polymerase chain reaction test for detection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in fish, and a comparison to existing detection techniques.
Disease of Aquatic Organisms **34** (2): 145-154

ANDREE KB, MacCONNELL E, McDOWELL T, GRESOVIAC SJ, HEDRICK RP (1997a)

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

ANTONIO DB, ANDREE KB, McDOWELL TS, HEDRICK RP (1998)

Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete tissues by using a non radioactive *In situ* hybridization (ISH) protocol.
Journal of Aquatic Animal Health **10**: 338-347

AVTALION RR, WOJDANI A, MALIK Z, SHAHRABANI R, DUCSYMINER M (1973)
Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr. Topics microbial. Immun.* 61. 1-35

BARNEY P, ANDERSON DE, WALKER PG (1988)
Whirling disease identified in Colorado. *American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter* 16:3

BARTHOLOMEW JL, BALDWIN T, HEDRICK R, KATHMAN D, McMAHON T, MacCONNELL B, MOFFITT C, NEHRING B, WINTON J (2001)
Standard protocols for whirling disease research, 1. Standardized Protocols Advisory Committee, Whirling Disease Foundation, and Fish Health Section, American Fisheries Society. Whirling Disease Foundation, Bozeman, Montana.

BARTHOLOMEW JL, McDOWELL TS, MATTES M, EL-MATBOULI M, HEDRICK RP (2003)
Susceptibility of Rainbow Trout Resistant to *Myxobolus cerebralis* to Selected Salmonid Pathogens. *Uses of Propagated Fish in Resource Management*, American Fisheries Society, Article in press

BARTHOLOMEW JL & RENO PW (2002)
The history and dissemination of whirling disease. *American Fisheries Society Symposium* 29: 3-24

BARTHOLOMEW JL, STEVENS DG, ROHOVEC IS, FRYER JL (1992)
Ceratomyxosis is associated with an oligochaete and an actinosporean. NATO Advanced Research Workshops Program, International Workshop on Myxosporea, October 6-8, Ceske Budejovice, Czechoslovakia (Abstract)

BEHNKE R (2002)
The nature and nurture of trout behaviour. In: *Trout Unlimited*, Autumn 54-55

BENAJIBA MM & MARQUÉS A (1993)
The alternation of actinomyxidian and myxosporidian sporal forms in the development of *Myxidium giordi* (parasite of *Anquilla anguilla*) through oligochaetes. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 13: 100-103

BISSET KA (1948)
The Effect of Temperature upon antibody production in cold blooded vertebrate. *J. Pathol. Bacteriol.* 60, 87-92

BLAXHALL PC & DAISLEA KW (1973)
Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 771-781

BLÜM V, CASADO J, LEHMANN J, MEHRING E (1998)
Farbatlas der Histologie der Regenbogenforelle.
Herausgeber: Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen, Springer-Verlag.

- BOLLARD BA, PANKHURST NW, WELLS RMG (1993)
Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Spiradae). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **106**: 157-162
- BOND FF (1936)
Host Specificity of the myxosporidia of *Fundulus heteroclitus*. *J. Parasitology*. **23**: 540-542
- BOND FF (1938)
Cnidosporidia from *Fundulus heteroclitus* *Trans. Americ. Microsc. Soc.* **57**: 107-122
- BRUNO DW & MUNRO ALS (1986)
Haematological assesement of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and atlantic salmon, *Salmo salar* L.; infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Fish Diseases* **9**: 195-204
- BRUHL L (1926)
Bericht über die die Fischereitagung in Königsberg i. Pr. Von 2. Juli bis 1. August. *Fischereizeitung* **29**: 813-815
- BROWN V, SHURBEN D, MILLER W, CRANE M (1994)
Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicology and environmental safety* **29** (1): 38-46
- BÜTSCHLI O (1881)
Myxosporidia. *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Protozoa* 1, 590-603
- CAULFIELD JB (1957)
Effects of varing the vehicule for osmium tetroxide in tissue fixation. *J. Biophys. Bioch. Cytol.* **3**:827
- CHILMONCZYK S (1983)
The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Light and electron microscopic study. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 79-68
- CORDERO-DEL-CAMPILLO MA, DIEZ E, ALVAREZ-PELLITERO MP, ROJO VAZQUEZ FA (1975)
Torneo de la trucha (Myxosomosis). Revisión. *Suplemento Cientifico del Boletin Informativo Consejo General de Colegio Veterinarios de España, Madrid*
- DENSMORE CL, BLAZER VS, CARTWHRIGHT DD, SCHILL WB, SCHACHTE JH, PETRIE CJ, BATUR MV, WALDROP TB, MACK A, POOLER PS (2001)
A Comparison of Susceptibility to *Myxobolus cerebralis* among Strains of Rainbow Trout and Steelhead in Field and Laboratory Trials. *Journal of Aquatic Animal Health* **13** (3)
- DOGEL VA (1932)
Bor'ba s boleznymi ryb v prudovom khozyaistve
- DYK V (1954)
Nemoci y. Hasich ryb. Praha, Czechoslovakia

ELLIS AE (1976)

Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronecta platessa*.
Journal of Fish Biology **8**: 143-156

ELLIS AE (1982)

Histamine, mast cells and hypersensitivity responses in fish.
Dev. Comp. Immunol. Suppl. **2**, 147-155

ELLIS AE, ROBERTS RJ, TYTLER P (1989)

The Anatomy and Physiology of Teleosts. In: R.J. Roberts (Ed.): Fish Pathology, 2. Aufl.
Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto: 27-30

ELLIS AE, SCHLOTFELDT HJ (1985)

Immunologie der Knochenfische. In: Grundlagen der Fischpathologie (Hrsg. Roberts und Schlotfeldt), Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 98-111

EI-MANSY A, MOLNÁR K (1997)

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

EI-MATBOULI M (1988)

Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus. cotti*-
Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde.
Diss. rer.nat., Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI M (1996)

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

EL-MATBOULI M, FISCHER-SCHERL T, HOFFMANN RW (1992a)

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

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1989)

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

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1991b)

Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
by Fumagillin. Disease of Aquatic Organisms **10**: 109-113

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1991a)

Transmissionsversuche mit *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus. pavlovskii* und ihre
Entwicklung in Tubificiden. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde.
Zeitschrift für Fischereiforschung Rostock **29**: 70-75

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1992b)

Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the
viability of *Myxobolus cerebralis* spores. Journal of Aquatic Animal Health **3**: 260-262

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1993)

Myxobolus carassii Klokacewa, 1914 also requires an aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex* as intermediate host in its life cycle. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. **13**: 189-192

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW, MANDOCK C (1995)

Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. Journal of Fish Biology **46**: 919-935

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW, SCHOEL H, McCONNEL TS, HEDRICK RP (1999)

Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. Diseases of Aquatic Organisms **35**, 1-12

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1998)

Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. International Journal for Parasitology **28**: 195-217

EL-MABOULI M, HOLSTEIN TW HOFFMANN RW (1998)

Determination of nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease. Parasitology Research **84**: 694-699

EL-MATBOULI M, KÜPPERS MP, McDOWELL TS, HEDRICK RP (2002)

Comparative susceptibility of different rainbow trout strains to infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health. New Orleans, Louisiana, USA, September 1-5 (2002)

ELSON KGR (1969)

Whirling disease in trout. Nature **223**:968

FÄNGE R (1982)

A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. Dev. Comp. Immunol. Suppl. **2**: 23-33

FENDRICK J (1980)

Influence of "aging" on the maturation, examined by electron microscopy, and transmission of *Ceratosoma shasta* (Myxosporea), a protozoan parasite of salmonid fishes. Oregon, State Uni., Master thesis.

FLOS R, REIG L, TORRES P, TORT L (1988)

Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture **71**, 99-106

FRIEDRICH C, INGOLIC E, FREITAG B, KATSBERGER G, HOHMANN V, SKOFITSCH G, NEUMEISTER U, KEPKA O (2000)

A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L.; 1758 (Vertebrata, Mammalia). Parasitology **2000** Nov; **121** Pt 5: 483-92

- FUHRMANN H, BOHM KH, SCHLOTFELDT HJ (1983)
An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases* **6**: 309-311
- GEBHARD H, KINZELBACH R, SCHMIDT-FISHER S (Hrsg) (1996)
Gebietsfremde Tierarten; Auswirkungen auf einheimische Arten, Lebensgemeinschaften und Biotope. *Situationsannale*, Landsberg: ecomed Verlagsgesellschaft
- GRASSÉ PP (1960)
Les Myxosporidies sont des organismes pluricellulaires. *C. R. Ac. Sci.* 251, 2638-2640
- GRIFFIN BR & DAVIS EM (1978)
Myxosoma cerebralis: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **35**: 1186-90
- GROßHEIDER G & KÖRTING W (1992)
First evidence that *Hoferellus cyprini* (Doflein, 1898) is transmitted by Nais sp. *Bull. Eur. Ass. Fish Path.* **12**: 17-20
- HALLIDAY MM (1973)
Studies of *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. I. The diagnosis of infection. *Nordisk Veterinaermedicin* 25, 345-348
- HALLIDAY MM (1976)
The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease in salmonids. *Journal of Fish Biology* **9**: 339-357
- HASTEIN T (1971)
The occurrence of whirling disease (Myxosomiasis) in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavia* **12**:297-299
- HAUCK AK, LANDIN S, WAVRA S (1988)
Whirling disease in Idaho. *American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter* 16:5
- HAVARSTEIN LS & ENDRESEN C (1990)
Specific immunoglobulins in serum from Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, immunized with *Vibrio salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 13, 101-111
- HEDRICK RP, EL-MATBOULI M, ADKINSON MA, MacCONNELL E (1998)
Whirling Disease: Re-emergence among wild trout. *Immunological revue* **166**: 365-376
- HEDRICK RP, McDOWELL TS, GAY M, MARTY GD, GEORGIADIS MP, MacCONNELL E (1999a)
Comparative susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Diseases of Aquatic Organisms* **37**: 173-183

HEDRICK RP, McDOWELL TS, MUKKATIRA K, GEORGIADIS MP, MacCONNELL E (1999b)

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

Journal of Aquatic Animal Health **11**: 330-339

HEDRICK RP, McDOWELL TS, MUKKATIRA K, YUN SC (1997)

Recognition and initial interactions between *Myxobolus cerebralis* and its fish host. Proceedings Whirling Disease Symposium, Eccles Conference Center Logan, Utah, March 6-8: 129-132

HEDRICK RP, McDOWELL TS, MARTY GD, MAKKATIRA K, ANTONIO DB, ANDREE KB, BUKHARI Z, CLANCY T (2000)

Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. Diseases of Aquatic Organisms **42**, 53-59

HEDRICK RP, McDOWELL TS, MARTY GD, FOSGATE GT, MAKKATIRA K, MYKLEBUST K, EL-MATBOULI M (2003)

Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis*-infection. Diseases of Aquatic Organisms **55** (1): 37-44

HEWITT GC & LITTLE RW (1972)

Whirling disease in New Zealand trout caused by *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) (Protozoa: Myxosporidia). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research **6**:1-10

HNATH JG (1970)

Whirling disease in the state of Michigan. Journal of Parasitology **56**:149-150

HOFER B (1903)

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

HOFER B (1904)

Handbuch der Fischkrankheiten. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

HOFFMAN GL (1962)

Whirling disease of trout. United States Department of the Interior. Fishery Leaflet 508. Fish and Wildlife Service.

HOFFMAN GL (1970)

Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*).

American Fisheries Society Publication **5**: 69-81

HOFFMAN GL (1975)

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

HOFFMAN GL & DUNBAR CE (1961)

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

HOFMAN GL, DUNBAR CE, BRADFORD A (1962)

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

HOFFMAN GL Sr & HOFFMAN GL Jr (1972)

Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). I. The effects of chemicals on spores in vitro, and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds. Journal of Wildlife Diseases. **8**: 49-53

HOFFMAN GL & PUTZ RE (1969)

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

HOFFMAN GL, PUTZ RE, DUNBAR CE (1965)

Studies on *Myxosoma cartilaginis* n. sp. (Protozoa: Myxosporidia) of centrarchid fish and a synopsis of the *Myxosoma* of North American freshwater fish. Journal of Protozoology **12**: 319-332

HOFFMAN GL, SNIEZKO SF, WOLF KE (1968)

Approved procedure for determining absence of viral hemorrhagic septicaemia and Whirling disease in certain fish and fish products. U. S. Fish and Wildlife Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, West Virginia, Fish Disease Leaflet **9**

HOFFMANN RW (1998)

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

HOFFMANN RW, EL-MATBOULI M, HOFFMANN-FEZER G (1991)

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

HOFFMANN RW & EL-MATBOULI M (1996) Interaction between hosts and Parasite in whirling disease. Proceedings Whirling Disease Workshop, Denver, Colorado, Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, February 6-8: 105-113

HOFFMANN RW, FUCHS I, KÖLLE P, BRETZINGER A (1998)

Therapienstand bei Nutzfischen. Fischer und Teichwirt, Nr. 1, 140-143

HOLT RA, BANNER CR, KREPS TO (1987)

Whirling disease in Oregon. American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter 15:1

HORNE MT & BARNES AC (1999)

Enteric Redmouth Disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo, P. T. K., Bruno, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, New York, 455-477

IGER Y & ABRAHAM M (1990)

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

INGRAM GA & ALEXANDER JB (1981)

The primary immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to cellular and soluble antigens: Enumeration of antibody-secreting and antigen-binding cells, and the production of antibody. *Acta. Biol. Med. Ger* 40: 317-30

JANISZEWSKA J (1955)

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

JANISZEWSKA J (1957)

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

JOHANSSON N (1966)

First identification of *Myxosoma cerebralis* in Sweden. Swedish Salmon Research Institute. Report LFI.

JOHNSON K (1980)

Host susceptibility, histopathologic and transmission studies on *Ceratomyxa shasta*, a myxosporidian parasite of salmonid fish. *Fish Path.* 14: 183-184

JOHNSON K, SANDERS J, FRYER J (1979)

Ceratomyxa shasta in salmonids. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Fish Disease. Leaflet. 58, 11p

KENT ML, ANDREE KB, BARTHOLOMEW JL, EL-MATBOULI M, DESSER S, XIAO C, DEVLIN RH, FEIST SW, HEDRICK RP, HOFFMANN RW, KHATTRA L, HALLETT SL, LESTER RJG, LONGSHAW M, PALENZUELA O, SIDDAL M (2001)

Recent advances in our Knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 395-413

KENT ML, MARGOLIS L, CORLISS JO (1994)

The demise of a class of protists: Taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Canadian Journal of Zoology* 72: 932-937

KENT ML, WHITAKER DJ, MARGOLIS L (1993)

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

KNAUS M, EL-MATBOULI M (2005)

Lectin blot studies on proteins of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling disease. *Disease of Aquatic Organisms* 65: 227-235

KOBAYASHI K, TOMONAGA S, HAGIWARA K (1985)

Isolation and characterization of immunoglobulin of hagfish, *Eptatretus burgeri*, a primitive vertebrate. *Molec. Immun.* 22, 1091-1097

KOBAYASHI K, TOMONAGA S, TANAKA S (1992)

Identification of a second immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark *Chlamydoselachus anguineus*. Dev. Comp. Immunol. 16, 295-299

KOCYLOWSKI B (1953)

Choroby ryb i ich Knalkanie. Gospodarka ryb 5:24-26

KÜPPERS M (2003)

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

Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München

LEHMANN J, HAMERS R, STÜRENBERG FJ (1994)

Hämatologie des Karpfens (*Cyprinus carpio* L) Landesanstalt für Fischerei NRW, Fischphysiologie und Fischkrankheiten

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUC G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH AE, LOM J, LYNN D, MERINGFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG (1980)

A newly revised classification of the Protozoa.

Journal of Protozoology 27: 37-58

LOBB CJ, OLSON MOJ, CLEM LW (1984)

Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. Journal of Immunology 132: 1917-1923

LOM J (1987)

Myxosporea: a new look at long-known parasites of fish. Parasitology Today 3 (11): 327-332

LOM J & DYKOVA I (1992)

Protozoan Parasites of Fish 26. Elsevier, Amsterdam.

LOM J & DYKOVA I (1995)

Myxosporea (Phylum Myxozoa). In Woo (editor): Fish Disease and Disorders, 1 Protozoan and Metazoan infections, CAB International, Wallington: 97-148

LOM J & HOFFMAN GL (1971)

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

LOM J & NOBLE ER (1984) Revised classification of the class Myxosporea Bütschli, 1881.

Folia Parasitologica (Prague) 31: 193-205

LUFT JH (1961)

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Bioch. Cytol. 9, 409-414

LUTZ U (1992)

Bekämpfung der Drehkrankheit der Salmoniden mit dem Antibiotikum Fumagillin (DCH)

Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

MACKINON DL & ADAM DI (1924)

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

MALE D & ROITT I (1991)

Erworbene (adaptive) und angeborene Immunität. In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Hrsg. ROITT; BROSTOFF und MALE), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1-10

MANDOK C (1993)

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

MANNING MJ, GRACE MF, SECOMBES CJ (1982)

Ontogenetic aspects of tolerance and immunity in carp and rainbow trout: Studies on the role of the thymus. Developmental Immunology Supplements 2: 75-82

MARGOLIS ML, KENT ML & BUSTOS P (1996)

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

MARKIW ME (1986)

Salmonid whirling disease: dynamics of experimental production of the infective stage- the *Triactinomyxon* spore. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 43: 521-526

MARKIW ME (1991)

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

MARKIW ME (1992)

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

MARKIW ME & WOLF K (1974)

Myxosoma cerebralis: isolation and concentration from fish skeletal elements-sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation.
Journal of the Fisheries Research Board of Canada 31: 15-20

MARKIW ME & WOLF K (1980)

Myxosoma cerebralis: trypsinization of plankton centrifuge harvests increases optical clarity and spore concentration. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37: 2225-2227

MARKIW ME & WOLF K (1983)

Myxosoma cerebralis (Myxozoa: Myxosporea) etiological agent of salmonid whirling disease requires tubificid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle.
Journal of Protozoology 30: 561-564

MARQUÈS A (1984)

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

- MATTHEWS J (1995)
"Chassing Our Tails". Trout, Spring 1995: 24
- MAZZONI R (2003)
Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. Emerging infectious diseases 9 (8): 995-998
- MEIXNER MJ (2004)
Untersuchung der Resistenzmechanismen eines Regenbogenforellen-Stamms gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät der LMU München
- MEYERS TU (1969)
Whirling disease. FAO Aquaculture Bulletin 2:13
- MOLNÁR K (1979)
Myxobolus pavlovskii (AKHMEROV 1954) (Myxosporidia) infection in the silver carp and bighead. Acta Veterinaria Academia Hungarica 27: 207-216
- NAKANISHI T & OTOTAKE M (1997)
Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination.
Developmental-Biology-Standards 90: 59-68
- NEHRING RB & THOMPSON KG (1998)
Assessment of the *Myxobolus cerebralis* myxospore load of fish collected in Colorado streams or held as sentinel fish in the Colorado river and an analysis of the degree days required for myxospore formation. Proceedings Whirling Disease Symposium, Lory Student Center, Colorado State University Fort Collins, Colorado, Feb. 19-21: 47-52
- NEHRING RB, THOMPSON KG, TAURMAN KA, SHULER DL (2002)
Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* myxospores. American Fisheries Symposium 29, 125-134
- NEHRING RB & WALKER PG (1996)
Whirling disease in the wild: the new reality in the intermountain west
- Oedening K (1991)
Zum Generationswechsel der Myxosporidien/Actinomyxidien (Myxosporidia).
Zool. Anz. 266: 237-252
- O'GRODNICK J (1975)
Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. Journal of Wildlife. Dis. 11: 54-57
- O'GRODNICK J (1979)
Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*).
Trans American Fisheries Society 108: 187-190

O'GRODNICK J & GUSTAFSON CC (1973)

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

OSTBERG Y, FÄNGE R, MATTISON A, THOMAS NW (1975)

Light and electron microscopical characterization of heterophilic granulocytes in the intestinal wall and islet pycnochroma of the hagfish, *Myxine glutinosa* (Cyclostomata)
Acta Zool. 57, 89, zitiert nach Hart et al. (1988)

OWEN M (1991)

Haupthistokompatibilitätskomplex. In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Hrsg. ROITT; BROSTOFF und MALE), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 42-53

PAULEY GB (1974)

Fish Sporozoa: extraction of antigens from *Myxosoma cerebralis* spores which mimic tissue antigens of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Rafinesque).
Journal of the Fisheries Research Board of Canada **31**: 1481-1484

PELETERIO MC & RICHARDS RH (1990)

Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.
J. Fish Dis. 13, 225-232

PICKERING AD, POTTINGER TG, CHRISTIE P (1982)

Recovery of brown trout, *Salmo trutta* L.; from acute handling stress: a time-course study.
Journal of Fish Biology **20**: 229-244

PILSTRÖM L, PETERSSON A (1991)

Isolation and partial characterization of immunoglobulin from cod (*Gadus Morhua* L.) Dev.
Comp. Immunol. 15, 143-152

PHROMSUTHIRAK P (1977)

Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*.
Journal of Fish Biology **11**: 193-206

PLEHN M (1904) Über die Drehkrankheit der Salmoniden *Lentospora cerebralis* (Hofer).

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

PLEHN M (1924)

Praktikum der Fischkrankheiten. Verlag Schweizerbartsche, Stuttgart

PREUDHOMME JG (1970)

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

PULSFORD A, FÄNGE R, MORROW WJW (1982)

Cell types and interactions in the spleen of the dogfish *Scyliorhinus canicula* L: An electron microscopic study. J. Fish Biol. **21**: 649-662

PUTZ RE & HOFFMAN GL (1970)

Transmission of *Myxosoma cerebralis* (whirling disease).
Progressive Sport Fisheries Research, 1970: 93-99

RIVIERE HB, COOPER EL, REDDY AL, HILDEMANN WH (1975)

In search of the hagfish thymus. *Amer. Zool.* 15, 39-49

ROBERTS RJ & ELSON KGR (1970)

An outbreak of whirling disease in rainbow trout. *Veterinary Record* **86**:258-259

ROGNLIE MC, KNAPP SE, CLARK SM (1998)

Aspects of a host-parasite relationship- *Myxobolus cerebralis* and its oligochaete host. Proceedings Whirling Disease Symposium, Eccles Conference Center Logan, Utah, March 6-8: 83-90

ROMBOUT JWHM & TAVERNE-THIELE JJ (1991)

The mucosal lymphoid tissue of carp and its significance for disease control
Dev. Comp. Immunol. 15, No. 4, S.71

ROOK G (1991b)

Zellvermittelte Immunantwort. In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Hrsg. ROITT; BROSTOFF, MALE), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 102-115

ROSE JD, MARRS GS, LEWIS C, SCHISLER G (2000)

Whirling Disease Behavior and its Relation to Pathology of Brain Stem and Spinal Cord in Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* **12**: 107-118

RUANE NM, WENDELAAR BONGA SE, BALM PH (1999)

Differences between rainbow trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and comparative endocrinology.* 115 (2): 210-219

RUIDISCH S, EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW (1991)

The role of tubificid worms as an intermediate host in the life cycle of *Myxobolus pavlovskii* Achmerov, 1954. *Parasitological Research.* **77**: 663-667

RYCE E, MACCONNELL E, ZALE A (1998)

U.S. Fish and Wildlife Service Bozeman Fish Technology Center and Montana State University. Effects of age, dose, and environmental stress on the development of whirling disease in rainbow trout. Whirling disease Symposium, Research in Progress Booklet, Feb. 19-21: 33-36

SCHAFFER WE (1968)

Studies on the epizootiology of myxosporidian *Ceratosoma shasta* Noble.
Fish and Game **54**: 90-99

SCHÄPERCLAUS W (1931)

Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung.
Zeitschrift für Fischerei **29**: 521-567

SCHÄPERCLAUS W (1990)

Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin

SCHISLER GJ & BERGERSEN EP (1998)

The effect of electrofishing injury and *Myxobolus cerebralis* infection on fingerling rainbow trout. Proceedings Whirling Disease Symposium, Lory Student Center, Colorado State University Fort Collins, Colorado, February 19-21: 93-98

SCHISLER GJ, BERGERSEN EP, WALKER PG (2000)

Effects of multiple stressors on morbidity and mortality of fingerling rainbow trout infected with *Myxobolus cerebralis*. Transactions of the American Fisheries Society **129**: 859-865

SCHLEGEL M, LOM J, STECHMANN A, BERNHARD D, LEIPE D, DYKOVA I, SOGIN ML (1996)

Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa related to the Bilateria. Archiv für Protistenkunde **147**: 1-9

SCHLUTER SF, MARCHALONIS JJ, HOHMAN VS (1991)

Immunoglobulin of primitive Cyclostome vertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15, 82

SCOLARI C (1954)

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

SIDALL ME, MARTIN DS, BRIDGE D, DESSER SS, CONE DK (1995)

The demise of phylum of protests: phylogeny of myxozoa and other parasitic cnidaria. Journal of Parasitology **8**: 961-967

SITTE H, NEUMANN K, EDELMALMANN L (1986)

Cryosectioning according to Tokayasu vs. rapid freezing, freeze substitution and resin embedding. In: Immuno-gold labelling in cell biology. Verkleij AJ und Leunissen JLM (eds), CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida, 1989, pp. 64-94

SMITH PD (1982)

Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination-comparison of uptake of particulate and non particulate antigens. Dev. Comp. Immun. Suppl. 2, 233-238

SMOTHERS JF, von DOHLEN CD, SMITH LH Jr, SPALL RD (1994)

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

Spall R (1973)

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

TATNER MF & MANNING MF (1982)

The morphology of the trout, *Salmo gairdneri* Richardson, thymus: some practical and theoretical considerations J. Fish Biol. 21: 27-32

TAYLOR REL, COLI SJ, JUNELL DR (1973)

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

TIDD WM & TUBB RA (1970)

Investigations of whirling disease in Ohio. *Journal of Parasitology* 56:632

THOMAS PT, WOO PTK (1990)

In vivo and in vitro cell-mediated immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Cryptobia salmostica* Katz, 1951. (Sarcomastigophora: Kinetoplastida. *J.Fish Dis.* **13**: 423-433

TIZARD IR (1981)

Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie für Tiermediziner, Biologen und Agrarwissenschaftler. Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg

TOMASEC I (1960)

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

TOMONAGA S, HIROKANE T, SHINOHARA H, AWAYA K (1973)

The primitive spleen of the hagfish. *Zool. Mag.* 82, 215, zitiert nach Hart et al. (1988)

TOMONAGA S, KOBAYASHI K, HAGIWARA K, YAMAGUCHI K, AWAYA K (1986)

Gut-associated lymphoid tissue in elasmobranchs.
Zool. Sci. 3, 453, zitiert nach Hart et al. (1988)

USPENSKAYA AV (1955)

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

USPENSKAYA AV (1957)

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

VANCO F (1952)

Contribution a l'étude de la pathologie des alevins de truits. Foulon, Paris

VAN WYK GF (1968)

Jonkershoek Hatchery, Division of Inland Fisheries, Departement of Nature Conservation, Province of Good Hope, Republic of South Africa. Annual Report 24

VINCENT ER (1996)

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

WALKER PG & NEHRING RB (1995)

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

WALLIKER D (1968)

Studies of *Myxidium oviforme*, a myxosporidian parasite of Irish salmon, *Salmo salar*. Parasitology **58**: 839-844

WOLF K & MARKIW ME (1975)

Myxosoma cerebralis: Serological identification by indirect fluorescent antibody test. Fish Health **4**: 8

WOLF K & MARKIW ME (1984)

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

WOLF K & MARKIW ME (1985)

Salmonid whirling disease. U.S. Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center, Leetown. National Fish Health Research Laboratory. Fish Disease Leaflet **69**: 12pp

WOLF K, MARKIW ME, HILTUNEN JK (1986)

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

WOLF K MARKIW ME, CRUZ M, GALHANO MH, EIRAS J, HERMAN RL (1981)

Non-myxosporidian blacktail of salmonids. Journal of Fish Diseases **4**: 355-357

WYATT EJ (1971)

A biological and taxonomic study of selected Myxosporidia of some Oregon freshwater fishes. Oregon, State Univ. Diss.

YASUKATE WT & WOLF H (1970)

Occurrence of whirling disease of trout in the western United States. Second International Congress of Parasitology. Abstract 691. September 6-12. Washington, DC. Journal of Parasitology **56**: 375-376

YODER WG (1972)

The spread of *Myxosoma cerebralis* into natural trout populations in Michigan. The Progressive Fish Culturist **43**:103-106

YOKOHAMA H, OGAWA K & WAKABAYASHI H (1991)

A new collection method of actinosporeans- a probable infective stage of myxosporeans to fishes- from tubificids and experimental infection of Goldfish with the actinosporean *Raabeia* sp. Fish Pathol. **26**: 133-138

YOKOHAMA H (1997)

Transmission of *Thelohanellus hovorkai*. Achmerrov, 1960 (Myxosporea:Myxozoa) to common carp, *Cyprinus carpio*, through the alternate oligochaete host. Syst. Parasitology **36**: 79-84

YOKOHAMA H, OGAWA K, WAKABAYASHI H (1995) Chemoresponse of actinosporean spores of *Myxobolus cultus* to skin mucuos of goldfish *Carassius auratus*. Diseases of Aquatic Organisms **21**: 7-11

ZAPATA A (1980)

Ultrastructure of elasmobranch lymphoid tissue. 1. Thymus and spleen
Dev. Comp. Immunol. 4, 459-472, 595

ZAPATA A (1982)

Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*
Dev. Comp. Immunol. 6: 87-94

ZAPATA A & COOPER E (1990)

The Immune System: Comparative Histopathology. John Wiley and Sons, Chichester

ZAPATA A, FANGE A, MATTISSON A, VILLENA A (1984)

Plasma cells in adult Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*
Cell Tissue Res. 235, 691-693, zitiert nach Zapata und Cooper (1990) und Hart et al. (1988)

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. El-Matbouli für die Überlassung des interessanten Dissertations-Themas und die gute Betreuung.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Kühnhauser-Vogt für die Beratung und die Einweisungen bei den histologischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Herrn Dr. Martin Knaus gebührt ebenso mein herzlicher Dank für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit und für die stets freundschaftliche Hilfsbereitschaft bei allen Problemen, die bei der Fertigung dieser Arbeit auftraten.

Herrn Christoph Dörfler spreche ich meinen Dank für die wertvolle Unterstützung in den verschiedenen Untersuchungsmethoden, sowie bei der Hilfe während der Durchführung der Infektionsversuche aus.

M'hamed Oumouna danke ich für die moralische Unterstützung sowie für die netten abwechslungsreichen Gespräche auf Arabisch und Französisch.

André Hohenegger danke ich für die Betreuung der Versuchsfische.

Herrn André Michas danke ich ebenfalls für die äußerst wertvollen Hilfestellungen in Computerfragen.

Dem ganzen Team, Dr. Martin Knaus, Christoph Dörfler, M'hamed Oumouna, Dr. Peter Steinbauer, Vanessa Severin, Ute Meyer, Daniel Grabner, Hamed Coulibali, Dr. Dennis Kallert und Dr. Edith Eszterbauer, danke ich ganz herzlich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft und generell für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit der Dissertationsarbeit und auch darüber hinaus.

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre mir nicht möglich gewesen ohne die Hilfe und Unterstützung meiner Familie.

Ganz besonders danke ich meinen Schwestern Maria und Nawal Oucible sowie meinen Brüdern Kamal und Allae Oucible.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mutter Idrissia Benabdelouhad und meinem Vater El-Hadi Oucible, die mit Ihrer immensen moralischen und finanziellen Unterstützung mein Studium und diese Promotion erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Mohamed Amine Oucible
Geburtsdatum 08.10.1973
Geburtsort Rabat/Marokko
Vater El-Hadi Oucible
Mutter Idrissia Benabdelouahed

Schulbildung:

1979-1983 Grundschule: Ecole Notre d'ame de la paix
1984-1988 Hauptschule: College EL-Malqy
1988-1991 Gymnasium: Lyceé El-Malqy
Juni 1991: Abitur: Abiturabschluss (Baccalauréat Science de l'Enseignement Secondaire)

Studium in Marokko:

1991-1996 Studium an der Universität Mohamed V- Fakultät für Biologie in Rabat.
1996-1997 Ausbildung: Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Rabat

Abschlüsse:

Juni 1994 CUES (Certificat d'Etudes Universitaires Superieure)- Biologie/Geologie
Juni 1996 Diplom (Licence-es-Science/Biologie Animale)

Deutschkurse:

Juli 1997 ZDAF: Zertifikat Deutsch als Fremdsprache. Goethe Institut. Rabat/ Marokko
Januar 1998 DSH: Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang. (Studienkollege. Köthen/Sachsenanhalt)

Studium in Deutschland:

1998-2002 Studium an der LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT München.
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE. (Dep. BiologieII. Aquatische Ökologie)

2001-2002 Diplomarbeit: Einfluss von Durchmischungstiefe, Nährstoffgehalt und Hintergrundtrübung auf das Phytoplankton und Zooplankton im Epilimnion. Eine vergleichende Seenuntersuchung.

Dezember 2002 DIPLOM-BIOLOGE UNIV.

Juni 2003 Beginn des Promotionsstudiums am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München