

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

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

**Untersuchungen zur Empfänglichkeit zweier Regenbogenforellen-
stämme gegenüber *Tetracapsuloides bryosalmonae*, *Yersinia ruckeri*
und dem Viralen Hämorrhagischen Septikämie-Virus***

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

vorgelegt von
Marianne Mattes
aus Spaichingen

München 2004

* Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projekts "Resistant Trout" durch die Whirling
Disease Foundation und den US Fish and Wildlife Service (USA) gefördert

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

Dekan: Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Prof. Dr. M. El-Matbouli
Korreferent: Prof. Dr. R. Korbel

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>Einleitung</u>	1
2	<u>Literaturübersicht</u>	3
2.1	Drehkrankheit der Salmoniden – Whirling Disease.....	3
2.2	Proliferative Kidney Disease – PKD.....	8
2.2.1	Einleitung.....	8
2.2.2	Vorkommen und Verbreitung.....	9
2.2.3	Ätiologie.....	11
2.2.3.1	Nomenklatur von <i>T. bryosalmonae</i>	11
2.2.3.2	Entwicklung des Erregers.....	13
2.2.3.3	Morphologie des Erregers.....	14
2.2.4	Pathogenese.....	16
2.2.4.1	Übertragung.....	18
2.2.5	Klinik.....	18
2.2.6	Hämatologie.....	19
2.2.7	Pathologie.....	21
2.2.8	Histopathologie.....	22
2.2.9	Diagnose, Differentialdiagnose.....	25
2.2.10	Therapie, Prophylaxe.....	26
2.3	Rotmaulseuche der Salmoniden.....	28
2.3.1	Einleitung.....	28
2.3.2	Verbreitung, Vorkommen und Wirtsspektrum.....	28
2.3.3	Ätiologie.....	31
2.3.4	Pathogenese.....	36
2.3.5	Klinik.....	38
2.3.6	Histopathologie.....	39

2.3.7	Diagnose, Differentialdiagnose.....	39
2.3.7.1	Bakteriologischer Nachweis.....	40
2.3.7.2	PCR.....	41
2.3.7.3	Serologischer Nachweis.....	41
2.3.8	Therapie, Prophylaxe.....	42
2.4	Virale hämorrhagische Septikämie – VHS.....	43
2.4.1	Einleitung.....	43
2.4.2	Verbreitung, Vorkommen und Wirtsspektrum.....	44
2.4.3	Ätiologie.....	47
2.4.4	Pathogenese.....	48
2.4.5	Klinik und Pathologie.....	49
2.4.6	Histopathologie.....	50
2.4.7	Diagnose.....	51
2.4.8	Therapie, Prophylaxe.....	52
3	<u>Eigene Untersuchungen</u>	53
3.1	Material	53
3.1.1	Versuchstiere und Haltung.....	53
3.1.2	Tierversuchsantrag.....	53
3.1.3	Infektionserreger.....	54
3.1.3.1	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	54
3.1.3.2	<i>Yersinia ruckeri</i>	54
3.1.3.3	VHS-Virus.....	55
3.1.4	Zellen für Zellkultur.....	55
3.2	Methoden	56
3.2.1	Versuche.....	56
3.2.1.1	PKD.....	56
3.2.1.2	Rotmaulseuche.....	56
3.2.1.2.1	Erregeranzucht und Herstellung der Injektionslösung.....	57
3.2.1.2.2	Erregerexposition.....	57

3.2.1.3	VHS.....	58
3.2.1.3.1	Virusvermehrung und Herstellung des Infektionsbades.....	58
3.2.1.3.2	Erregerexposition.....	58
3.2.2	Untersuchungsmethoden.....	59
3.2.2.1	Klinische Untersuchung.....	59
3.2.2.2	Tötung der Fische.....	59
3.2.2.3	Sektion.....	59
3.2.2.4	Histologische Untersuchungen.....	60
3.2.2.4.1	Anfertigen der Schnitte.....	60
3.2.2.4.2	Auswertung.....	60
3.2.2.5	Bakteriologische Untersuchung.....	60
3.2.2.6	PCR.....	61
3.2.2.6.1	PKD.....	61
3.2.2.6.2	Rotmaulseuche.....	62
3.2.2.6.3	VHS.....	62
3.2.2.7	Zellkultur.....	64
3.2.2.8	Immunofluoreszenz.....	64
3.2.2.9	Statistik.....	65
4	<u>Ergebnisse</u>	66
4.1	PKD.....	66
4.2	Rotmaulseuche.....	77
4.3	VHS.....	89

5	<u>Besprechung der Ergebnisse und Diskussion</u>	<u>97</u>
5.1	PKD.....	98
5.2	Rotmaulseuche.....	101
5.3	VHS.....	103
6	<u>Zusammenfassung</u>	<u>106</u>
7	<u>Summary</u>	<u>108</u>
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>110</u>
9	<u>Danksagung</u>	<u>142</u>
10	<u>Lebenslauf</u>	<u>144</u>

1 EINLEITUNG

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 sind eine kalifornische Arbeitsgruppe in Davis unter der Leitung von Prof. Dr. Hedrick und eine deutsche Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. El-Matbouli beteiligt.

Erforscht wird eine parasitäre Erkrankung der Salmoniden – die Drehkrankheit, Whirling Disease (WD). Seit mehr als einem Jahrhundert in Europa bekannt, wurde die Krankheit in den 50er-Jahren durch Import von Fischen in die USA eingeschleppt (HOFFMAN 1970, 1990). Dort verbreitete sie sich rasant und richtet seither in Forellenzuchtbetrieben und in freier Wildbahn Schäden von mittlerweile teils verheerendem Ausmaß an.

Der Erreger, *Myxobolus cerebralis*, ist ein mehrzelliger Parasit, der zum Stamm Myxozoa gehört. Er vermehrt sich im Knorpelgewebe des Wirtsfisches und verursacht ein charakteristisches Krankheitsbild. Die erkrankten Fische drehen sich schnell um die eigene Achse, und es kommt zur Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels und zu Deformationen des gesamten Skeletts.

Die Bestrebungen der Organisation richten sich darauf, möglichst viel über die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit und eventuell vorhandene Resistenzmechanismen herauszufinden, um diese Erkenntnisse für die Bekämpfung der Krankheit nutzen zu können. Ziel des Projekts ist es, einen Drehkrankheit-resistenten Regenbogenforellenstamm in Staatsbetrieben bzw. Wildgewässern der Vereinigten Staaten zu etablieren, und so die durch die Krankheit verursachte Dezimierung der Forellenbestände unter Kontrolle zu bringen.

Inzwischen wurde von der Arbeitsgruppe in Deutschland bereits ein deutscher Regenbogenforellenstamm (Stamm H) gefunden, der gegenüber der Drehkrankheit relativ unempfindlich ist.

Doch da der Transfer von Tieren von einem komplexen Ökosystem in ein anderes, noch dazu über verschiedene Kontinente hinweg, immer ein Risiko darstellt, bedarf es weiterer Untersuchungen, bevor an das Einsetzen dieses Stammes in amerikanische Gewässer gedacht werden kann. Es muss sichergestellt werden, dass die Fische keine Gefahr für die dortigen

Populationen darstellen, indem sie bislang unbekannte Krankheiten übertragen oder indem sie besonders empfänglich gegenüber anderen Erregern sind. Deswegen muss zunächst die Empfänglichkeit des Stammes gegenüber weiteren Krankheitserregern, die in Nordamerika auftreten können, erforscht werden.

Zu diesem Zweck werden in Amerika und in Deutschland parallel Versuche mit bedeutenden Krankheitserregern durchgeführt. Die kalifornische Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit IHNV (Infektiöse Hämatopoetische Nekrose-Virus), SalHV1 (Salmonid herpes-like Virus Typ 1), dem amerikanischen Stamm des VHS-Virus (Virale Hämorrhagische Septikämie-Virus) und mit *Ceratomyxa shasta*.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Empfänglichkeit des Drehkrankheit-resistenten Regenbogenforellenstammes (H) gegenüber der PKD (Proliferative Kidney Disease, Proliferative Nierenschwellung), der Rotmaulseuche (Enteric Redmouth Disease, ERM) und dem europäischen Stamm der VHS (Virale Hämorrhagische Septikämie) zu untersuchen. Zum Vergleich wird ein Drehkrankheit-empfindlicher amerikanischer Regenbogenforellenstamm (T) mituntersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Drehkrankheit der Salmoniden - Whirling Disease

Die Drehkrankheit ist eine parasitäre Erkrankung der Salmoniden, von der am stärksten die Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, betroffen ist (HOFER 1903, HOFFMAN & PUTZ 1969). Der Erreger, *Myxobolus cerebralis*, ist ein mehrzelliger Parasit aus dem Stamm der Myxozoa Grassé (1970). Diesem Stamm gehören auch andere wichtige fischpathogene Parasiten an, wie die Proliferative Nierenerkrankung (Proliferative Kidney Disease, PKD), die Schwimmblasenentzündung der Karpfen (Swimbladder Inflammation) und die infektiöse Nierenvergrößerung beim Goldfisch (Cystic Kidney Enlargement).

Die derzeit gültige Stellung von *M. cerebralis* in der systematischen Einteilung der Myxozoa nach LEVINE et al. (1980), LOM & NOBLE (1984) und LOM & DYKOVÁ (1992) ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1 Derzeit gültige Nomenklatur von *Myxobolus cerebralis*

<p>Stamm Myxozoa (GRASSÉ 1970), definiert von KENT, MARGOLIS & CORLISS (1994a)</p> <p>Klasse Myxosporea (BÜTSCHLI 1881)</p> <p>Ordnung Bivalvulida (SHULMAN 1959)</p> <p>Unterordnung Platysporina (KUDO 1919)</p> <p>Familie Myxobolidae (THÉLOHAN 1892)</p> <p>Gattung Myxobolus</p> <p><i>Myxobolus cerebralis</i></p>

Die Drehkrankheit ist seit einem Jahrhundert in Europa bekannt. Erstmals beobachtet wurde sie 1898 von HOFER bei Regenbogenforellen in Deutschland (HOFER 1903).

Durch den zunehmenden internationalen Fischhandel wurde die Erkrankung in die meisten forellenproduzierenden Länder eingeschleppt (HALLIDAY 1976).

In den USA trat die Erkrankung erstmals 1958 in Pennsylvania und in Nevada auf, kurz darauf in Connecticut (1961), Virginia (1965), Kalifornien und Massachusetts (1966).

Daher wurden in Amerika drastische Maßnahmen ergriffen, um diesen Seuchenzug aufzuhalten. Kalifornien vernichtete zwischen 1965 und 1984 660.000 kg Fisch und fast 2.300.000 Brütlinge und nicht fangbaren Fisch aus kontaminierten Fischzuchtbetrieben (MODIN 1998). In Michigan wurden betroffene Betriebe unter Quarantäne gestellt, und in den 70er Jahren wurde der Nordausläufer des Tobacco River mit Chlorid behandelt, um das Flusssystem zu desinfizieren (HNATH 1988).

Trotz Keulung, Quarantäne, Desinfektionsmaßnahmen und Verwendung von nicht-kontaminiertem Wasser in den Bruthäusern breitete sich der Parasit seither in zunehmendem Maße aus und richtet zum Teil verheerende Schäden in Fischzuchten und wilden Forellenpopulationen an. Inzwischen ist die Drehkrankheit bereits in 22 Staaten der USA beheimatet: Colorado, Connecticut, Idaho, Kalifornien, Maryland, Massachusetts, Michigan, Montana, Nebraska, Nevada, New Hampshire, New Jersey, New Mexiko, New York, Ohio, Oregon, Pennsylvania, Utah, Virginia, Washington, West Virginia und Wyoming. SCHISLER & BERGERSEN (1998) stellten fest, dass Gebiete mit intensivem Fischfang und Zuchtmanagement am gravierendsten von der Drehkrankheit betroffen sind. In großen Flüssen wie dem Colorado-River, wo die Krankheit sich nicht wie in Fischzuchten durch Verbesserung der Haltungsbedingungen eindämmen lässt, kommt es durch die Drehkrankheit zu Massensterben und zur kontinuierlichen Reduzierung der Regenbogenforellenbestände. Als man die Drehkrankheit 1988 in New York diagnostizierte, wurde die Keulung von 170.000 Zuchtforellen staatlich angeordnet.

Neuere Analysen ergaben einen Rückgang der Regenbogenforellenpopulation im Madison River (Montana) um 90 % (VINCENT 1996), und in Utah und in Colorado wurde eine Zunahme der Bachforellendichte zu Lasten der beheimateten Regenbogenforellenpopulation beobachtet.

Der genaue Entwicklungs- und Wirtszklus von *M. cerebralis* war lange Zeit unklar. Zunächst wurde ein direkter Infektionsweg vermutet (MOLNÁR 1979), aber Infektionsversuche von Fisch zu Fisch scheiterten wiederholt. MARKIW & WOLF (1983) fanden schließlich, dass die Entwicklung des Parasiten zu der für den Fisch infektiösen Triactinomyxonspore in Tubificiden (Genus *Tubifex tubifex*) erfolgt. Dieser Entdeckung zufolge existieren also zwei Arten von Sporen: Die Triactinomyxonspore als die für den Fisch infektiöse Form und die *Myxobolus cerebralis*-Spore als die für den Tubificiden infektiöse Form des Parasiten. 1989 bestätigten EL-MATBOULI & HOFFMANN diese Befunde und

bewiesen, dass der Oligochaet *Tubifex tubifex* als zweiter Wirt für die Entwicklung von *M. cerebralis* notwendig ist.

Die Infektion des Fisches mit Triactinomyxonsporen erfolgt über die Haut, Kiemen und zum Teil auch über die orale Aufnahme von infizierten Oligochaeten (WOLF & MARKIW 1984, EL-MATBOULI & HOFFMANN 1989). Nach der Penetration der Epidermis durch den Amöboidkeim findet eine Wanderung des Parasiten durch die Subcutis, über peripheres Nervengewebe zu größeren Ganglien und zum Zentralnervensystem statt. Nach 6-14 Tagen ist der Erreger im Rückenmark, nach 16-24 Tagen im Gehirn und nach 40 Tagen im benachbarten Knorpelgewebe angelangt (EL-MATBOULI et al. 1995). Die Entwicklung im Fisch ist zweiphasig mit präsporogonischer Vermehrung in Subcutis und Nervengewebe und sporogonischer Vermehrung im Knorpelgewebe (MANDOK 1993, EL-MATBOULI et al. 1995).

Wenn der infizierte Fisch gestorben ist, gelangen die reifen *M. cerebralis*-Sporen aus dem Knorpel ins Wasser und werden von Tubificiden aufgenommen (WOLF et al. 1986). In deren Darmepithel findet eine dreiphasige Entwicklung mit Schizogonie, Gametogonie und Sporogonie statt (EL-MATBOULI et al. 1998). Es entstehen Triactinomyxonsporen, welche vom Oligochaeten ausgeschieden werden. Diese Sporen schweben frei im Wasser und sind infektiös für den Fisch. Bei einer Wassertemperatur um 15 °C werden etwa 90 Tage nach der Infektion des Oligochaeten die ersten Triactinomyxon-Sporen frei, welche sich im Wasser osmotisch bedingt entfalten (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1998).

Das Krankheitsbild, das durch *M. cerebralis* hervorgerufen wird, ist charakteristisch und beinhaltet die drei Kardinalsymptome pathologisches Schwimmverhalten (ROSE et al. 2000), Schwarzverfärbung des kaudalen Körperdrittels (SCHÄPERCLAUS 1990) und Deformation der skelettalen Anteile von Kopf und Wirbelsäule (HOFFMAN et al. 1962).

Das pathologische Schwimmverhalten zeichnet sich aus durch schnelle, kreisförmige Drehbewegungen des Fisches, die spontan auftreten können, meist aber durch äußere Stimuli und Stresssituationen provoziert werden. ROSE et al. (2000) sehen die Ursache dafür in der granulomatösen Entzündung, die als Immunantwort des Fisches auftritt und zu ringähnlichen Kompressionen des Rückenmarks und Deformationen der äußeren Hirnregionen führt.

Die Ursache für die Dunkelverfärbung des kaudalen Körperdrittels ist nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass deformierte Knorpelanteile in der Wirbelsäule mechanischen Druck auf pigmentomotorische Nervenzellen des Nervus Sympathikus ausüben und sie

dadurch schädigen. Auf diese Weise soll es zur Hyperpigmentierung der Körperregionen kaudal der Schädigung kommen (SCHÄPERCLAUS 1990).

Die skelettalen Deformationen sind eine Folge der Parasitenvermehrung im Knorpelgewebe. Die Knorpelarchitektur wird zerstört und die enchondrale Ossifikation wird verzögert, wodurch es zur Ausbildung eines "Mopskopfes", verkürzter Kiemendeckel und massiver Wirbelsäulenverkrümmungen kommt. (HOFFMAN et al. 1962).

Drehbewegungen und Schwarzverfärbung treten durchschnittlich 60 Tage post infectionem auf, können sich mit der Zeit aber wieder abschwächen oder ganz verschwinden. Die Deformationen treten erst später auf und bleiben auch nach überstandener Erkrankung bestehen (PLEHN 1904, HOFFMAN et al. 1962).

Die meisten Salmoniden sind empfänglich für die Drehkrankheit. Im Vergleich zur Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, die sehr empfindlich auf den Parasiten reagiert (HOFER 1903, HOFFMAN & PUTZ 1969), ist die Bachforelle, *Salmo trutta*, sehr widersandsfähig gegenüber der Krankheit. Deswegen betrachtet HOFFMAN (1970) die Bachforelle als natürlichen Wirt und Sporenreservoir für *M. cerebralis*. Dies wurde durch Untersuchungen von HEDRICK et al. (1999) bestätigt.

Die Empfänglichkeit der Fische für eine Infektion mit *M. cerebralis* sinkt proportional zu ihrem Alter (SCHÄPERCLAUS 1931). Je älter der Fisch ist, desto weniger Knorpelgewebe steht dem Parasiten für seine Vermehrung zur Verfügung. Deswegen sind junge Fische, deren Knorpelanteil am Skelett noch sehr hoch ist, am stärksten von der Erkrankung betroffen. HALLIDAY (1976) geht davon aus, dass ab dem 6. Lebensmonat ein Kontakt mit dem Erreger keine klinisch manifeste Erkrankung mehr hervorrufen kann. Diese subklinisch infizierten Fische können jedoch als Träger des Parasiten zur Verbreitung der Krankheit beitragen (EL-MATBOULI et al. 1992).

Die Inkubationszeit für die Erkrankung ist abhängig von der Infektionsdosis. Bei Infektionsversuchen mit einer Dosis von 1.000 bzw. 10.000 *Triactinomyxon*-Sporen pro Fisch traten bereits nach 5 bzw. 6 Wochen erste Krankheitserscheinungen auf, bei einer Dosis von 100 Sporen pro Fisch waren die Symptome erst nach 7 Wochen zu beobachten (RYCE et al. 1998). Die Erkrankung wird durch äußere Stressfaktoren wie Handling, hohe Besatzdichte, schlechte Wasserqualität und Temperaturschwankungen begünstigt (PICKERING et al. 1982, FLOS et al. 1988, PUTZ & HOFFMAN 1970).

Die Diagnose der Drehkrankheit erfolgt durch den Nachweis der *M. cerebralis*-Sporen im Knorpelgewebe des infizierten Fisches. Die Sporen sind unter dem Lichtmikroskop als in der Lateralansicht linsenförmige und in der Frontalansicht runde, 8-10 µm große Gebilde zu erkennen, die zwei ovale Polkapseln enthalten. Die Sporen sind in Nativpräparaten von ausgestrichenen Schädelknorpelstücken zu sehen (HOFFMAN et al. 1968). In Giemsa- oder Hämatoxilin-Eosin (HE)-gefärbten Präparaten sind sie jedoch deutlicher zu erkennen (MARKIW 1992).

Es wurde eine PCR entwickelt, mit deren Hilfe schon in sehr frühen Stadien der Erkrankung 18S-RNA von *M. cerebralis* nachgewiesen werden kann (ANDREE et al. 1998). Eine weitere Methode zum Nachweis von Parasitenstadien im Oligochaeten und im Fisch stellt die in Situ-Hybridisierung dar (ANTONIO et al. 1998).

Differentialdiagnostisch müssen bezüglich des abnormen Schwimmverhaltens VHS, IPN und Enteritiden in Betracht gezogen werden (PLEHN 1904, HALLIDAY 1973). Weitere Ursachen für die Schwarzverfärbung der kaudalen Körperpartie sind Ascorbinsäure- und Tryptophanmangel oder Infektionskrankheiten, verursacht z.B. durch *Flexibacter psychrophilum* (MARGOLIS et al. 1996). Außerdem können Sauerstoffübersättigung, Stromeinwirkung (WALKER & NEHRING 1995) und intravenöse bzw. intramuskuläre Medikamentenapplikation ähnliche Symptome verursachen.

Skelettale Deformationen können ebenfalls durch Ascorbinsäure- und Tryptophanmangel hervorgerufen werden (WOLF et al. 1981).

Um die Drehkrankheit in betroffenen Fischzuchtbetrieben unter Kontrolle zu bringen, gibt es mehrere Methoden. Die Bekämpfung des Oligochaeten-Wirtes durch Verwendung betonierter Anlagen anstelle von natürlichen Erdteichen und durch Behandlung kontaminierter Teiche mit ungelöschtem Kalk (380 g/m² Teichfläche) (HOFFMAN & HOFFMAN 1972) kann dazu beitragen, den Infektionsdruck zu verringern. Durch den nötigen Frischwasserzulauf kann jedoch weiterhin sporenhaltiges Wasser in den Betrieb gelangen. Dieses Wasser sollte gefiltert oder mit UV-Licht bestrahlt werden, bevor es dem Bestand zugeführt wird (HOFFMAN 1974, HEDRICK et al. 2000).

Unter Laborbedingungen wurde das Antibiotikum Fumagillin erfolgreich zur Therapie Drehkrankheit-erkrankter Regenbogenforellen eingesetzt (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1991). Diese Ergebnisse wurden 1992 durch LUTZ bestätigt.

2.2 Proliferative Kidney Disease – PKD

2.2.1 Einleitung

Die Proliferative Nierenerkrankung (Proliferative Kidney Disease, PKD) ist eine bedeutende parasitäre Erkrankung, von welcher Salmoniden, vor allem in Intensivhaltung, betroffen sind (CLIFTON-HADLEY et al. 1986b, O'FLYNN & MULCAHY 1995). Sie kommt in Westeuropa und Nordamerika vor und verursacht dort in den Fischzuchten zum Teil große wirtschaftliche Verluste (HEDRICK et al. 1993).

Den Namen PKD erhielt die Krankheit von ROBERTS & SHEPHERD (1974). Die frühesten Krankheitsfälle konnten anhand der Untersuchung von Gewebeproben aus dem Jahr 1958 bestätigt werden (HEDRICK et al. 1984). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass es sich auch schon bei früheren Berichten über derartige Krankheitsausbrüche um die PKD handelte (PLEHN 1924).

Erst vor kurzem wurde das große Rätsel um den Entwicklungszyklus des Parasiten gelöst.

Die PKD ist eine saisonal auftretende Krankheit, deren Infektiosität im Mai/Juni am höchsten ist (FERGUSON & BALL 1979). Krankheitsausbrüche treten zwischen Juli und September auf (FERGUSON & ADAIR 1977, ELLIS et al. 1985). Oft sind bis zu 100 % der Fische in den betroffenen Beständen infiziert, die Mortalität kann bis zu 80 % erreichen (CLIFTON-HADLEY et al. 1986b, O'FLYNN & MULCAHY 1995).

Die infizierten Fische verwerten Futter schlechter, und sie sind anfälliger für Stress und Sekundärinfektionen. Der Stress, dem die Tiere in Fischzuchten mit Intensivhaltung ausgesetzt sind, trägt zu den hohen Sterblichkeitsraten bei (HOFFMANN & LOMMEL 1984, HEDRICK et al. 1993, MORRIS & ADAMS 2002). Die Verbreitung und die Schwere der PKD-Erkrankung nimmt mit sinkender Wasserqualität zu (FEIST et al. 2002).

Durch gutes Zuchtmanagement und stressarme Haltung können Verluste wesentlich reduziert werden. Faktoren, die nicht kontrollierbar sind, wie zum Beispiel hohe Wassertemperaturen im Sommer und schwankende Wasserqualität, können jedoch trotzdem Krankheitsausbrüche mit hohen Verlusten verursachen (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, GAY et al. 2001, EL-MATBOULI & HOFFMANN 2002).

2.2.2 Vorkommen und Verbreitung

Mit dem Bekanntwerden der Krankheit und der Entwicklung von Diagnosemöglichkeiten häuften sich in den letzten 20 Jahren Berichte über das Auftreten der PKD (HEDRICK et al. 1985, FOOTT & HEDRICK 1987). Aus Europa liegen bisher gesicherte Berichte über Krankheitsausbrüche in Frankreich (BESSE 1956, DE KINKELIN & GERARD 1976, SCHLOTFELDT 1985), Irland (FERGUSON & ADAIR 1977, O'BRIEN et al. 1977), Italien (GHITTINO et al. 1977, CLIFTON-HADLEY et al. 1984b), Norwegen (ROBERTS 1978a), Schottland (FERGUSON & NEEDHAM 1978, ELLIS et al. 1982), England und Wales (SCOTT 1979, SEAGRAVE et al. 1981), Deutschland (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981), Dänemark (OLESEN et al. 1983, OLESEN & JORGENSEN 1986), Schweden (CLIFTON-HADLEY et al. 1984b), Holland (CLIFTON-HADLEY 1986) und Spanien (CASTILLO & PERIBANEZ 1992, MARIN DE MATEO & SANZ 1993) vor.

In den USA gibt es Berichte aus Kalifornien (HEDRICK et al. 1984), Washington (HEDRICK et al. 1986), Idaho (HEDRICK et al. 1985, SMITH et al. 1982) und Montana (MACCONNELL & PETERSON 1992).

Das Auftreten von PKD wurde außerdem in der kanadischen Provinz British Columbia (HOSKINS 1985) und im Osten Neufundlands (HICKS & FERGUSON 1986, BROWN et al. 1991) beobachtet.

Die Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* ist die am häufigsten infizierte Spezies in den Aquakulturen Europas (PLEHN 1924, CLIFTON-HADLEY 1986b). Der Erreger wurde jedoch auch bei einer Vielfalt von anderen Salmoniden-Spezies, wie Bachforelle, *Salmo trutta* (PLEHN 1924, ELLIS et al. 1982), Bachsaibling, *Salvelinus fontinalis*, (ROBERTS & SCHLOTFELDT 1985) und Atlantischer Lachs, *Salmo salar*, (SEAGRAVE et al. 1981) nachgewiesen (siehe Tabelle 1).

Parasiten, die morphologisch identisch sind mit dem Erreger der PKD, wurden außerdem in der Niere vom Hecht, *Esox lucius*, (SEAGRAVE et al. 1981, BUCKE et al. 1991) und bei der Äsche, *Thymallus thymallus* (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, SEAGRAVE et al. 1981) beobachtet.

Tabelle 1 Fischarten, in denen *T. bryosalmonae* nachgewiesen wurde und deren Erstbeschreiber in den jeweiligen Ländern.

Fischarten	Lateinischer Name	Land	Erstbeschreiber
Regenbogenforelle (Rainbow trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Deutschland	PLEHN 1924
		Frankreich	BESSE 1956
		Großbritannien	FERGUSON & ADAIR 1977
		Irland	
		Italien	GHITTINO et al. 1977
		Norwegen	ROBERTS 1978a
		USA	SMITH et al. 1982
Spanien	CASTILLO & PERIBANEZ 1992		
Bachforelle (Brown trout)	<i>Salmo trutta</i>	Deutschland	PLEHN 1924
		Großbritannien	SEAGRAVE et al. 1981
Cutthroat-Forelle (cutthroat trout)	<i>Oncorhynchus clarki</i>	Kanada	HOSKINS & KIESER 1986
		USA	MACCONNELL & PETERSON 1992
Steelheadforelle (Steelhead trout)	<i>Salmo gairdneri</i>	USA	HEDRICK et al. 1984
Bachsaibling (Brook trout)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Norwegen	ROBERTS & SCHLOTFELDT 1985
Binnenlachs (landlocked Atlantic salmon)	<i>Salmo salar ouananiche</i>	Kanada	BROWN et al. 1991
Atlantischer Lachs (Atlantic salmon)	<i>Salmo salar</i>	Großbritannien	ELLIS et al. 1982
Silberlachs (Coho salmon)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	USA	HEDRICK et al. 1984
		Kanada	HOSKINS & KIESER 1986
Königslachs (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	USA	HEDRICK et al. 1984
Hakenlachs (Kokanee salmon)	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Kanada	HOSKINS & KIESER 1986
		USA	ARKUSH & HEDRICK 1990
Arktischer Saibling (Arctic char)	<i>Salvelinus alpinus</i>	Großbritannien	BUCKE et al. 1985
Hecht (Northern pike)	<i>Esox lucius</i>	Großbritannien	SEAGRAVE et al. 1981
Äsche (Grayling)	<i>Thymallus thymallus</i>	Großbritannien	SEAGRAVE et al. 1981
		Deutschland	HOFFMANN & DANGSCHAT 1981

Die Auswirkungen des Erregers auf die Fischzuchtbestände sind gut dokumentiert, aber über das Vorkommen und den Einfluss von PKD in wilden Fischpopulationen wurden bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht. Untersuchungen an wilden Salmoniden haben gezeigt, dass sie empfänglich für eine PKD-Infektion sind. In Europa wurden infizierte wilde Bachforellen, *Salmo trutta*, (BUCKE et al. 1991, EL-MATBOULI & HOFFMANN 2002) und Seesaiblinge, *Salvelinus alpinus*, (BROWN et al. 1991) gefunden, in Nordamerika Cutthroat-Forellen, *Oncorhynchus clarki*, (HOSKINS & KIESER 1986, MACCONNELL & PETERSON 1992) und nicht-wandernde Vertreter der Hakenlachse, *Oncorhynchus nerka* (KENT et al. 1995).

Epidemiologische Daten über die Auswirkungen der Krankheit auf wildlebende Salmonidenpopulationen sind jedoch nicht vorhanden (MORRIS & ADAMS 2002). Es wird vermutet, dass viele Fische nicht an der Erkrankung selbst sterben. Vielmehr werden sie durch die mit der Infektion verbundene Schwächung anfälliger für andere äußere Faktoren wie Sekundärerreger und Fressfeinde (FEIST & BUCKE 1993).

2.2.3 Ätiologie

Der Parasit, welcher die PKD verursacht, wurde erstmals identifiziert von FERGUSON & ADAIR (1977). Erste Untersuchungen der Ultrastruktur zeigten die endogene Entwicklung von Zellen, was darauf schließen ließ, dass es sich entweder um einen Haplosporidien- oder einen Myxosporea- Parasiten handelte (FERGUSON & NEEDHAM 1978).

Um den unklaren taxonomischen Status des Erregers zu veranschaulichen, wurde er PKX, “Proliferative Kidney Organism X“ genannt (SEAGRAVE et al. 1980b). Diesen Namen behielt der Erreger für fast 20 Jahre, bis er von CANNING et al. (2002) als *Tetracapsuloides bryosalmonae* klassifiziert wurde.

2.2.3.1 Nomenklatur von *Tetracapsuloides bryosalmonae*

KENT & HEDRICK (1985a,b, 1986) untersuchten die Entwicklung des Parasiten in der Regenbogenforelle. Sie beschrieben Sporen im Tubuluslumen der Niere und stellten fest, dass es sich um einen Myxosporea-Parasiten handelte.

1996 wurde von CANNING, OKAMURA & CURRY ein neues Genus *Tetracapsula* innerhalb der Familie Saccosporidiae vorgeschlagen, zunächst mit *Tetracapsula bryozoides* als einziger Spezies. Als man den Zusammenhang zwischen dem Parasiten in den Bryozoen

und der Proliferativen Nierenerkrankung entdeckte, wurde er unter dem Namen *Tetracapsula bryosalmonae* als zweite Spezies dem Genus *Tetracapsula* zugeordnet (CANNING et al. 1999).

KENT et al. (1998) wiesen anhand der 18S rDNA-Sequenzen nach, dass die aus Fischen gewonnenen PKX-Organismen mit keinen der bisher beschriebenen Myxozoen der Ordnungen Bivalvulida und Multivalvulida nahe verwandt sind. Sie nahmen an, dass innerhalb des Stammes Myxozoa eine frühe phylogenetische Trennung von *T. bryosalmonae* und diesen Ordnungen erfolgt war.

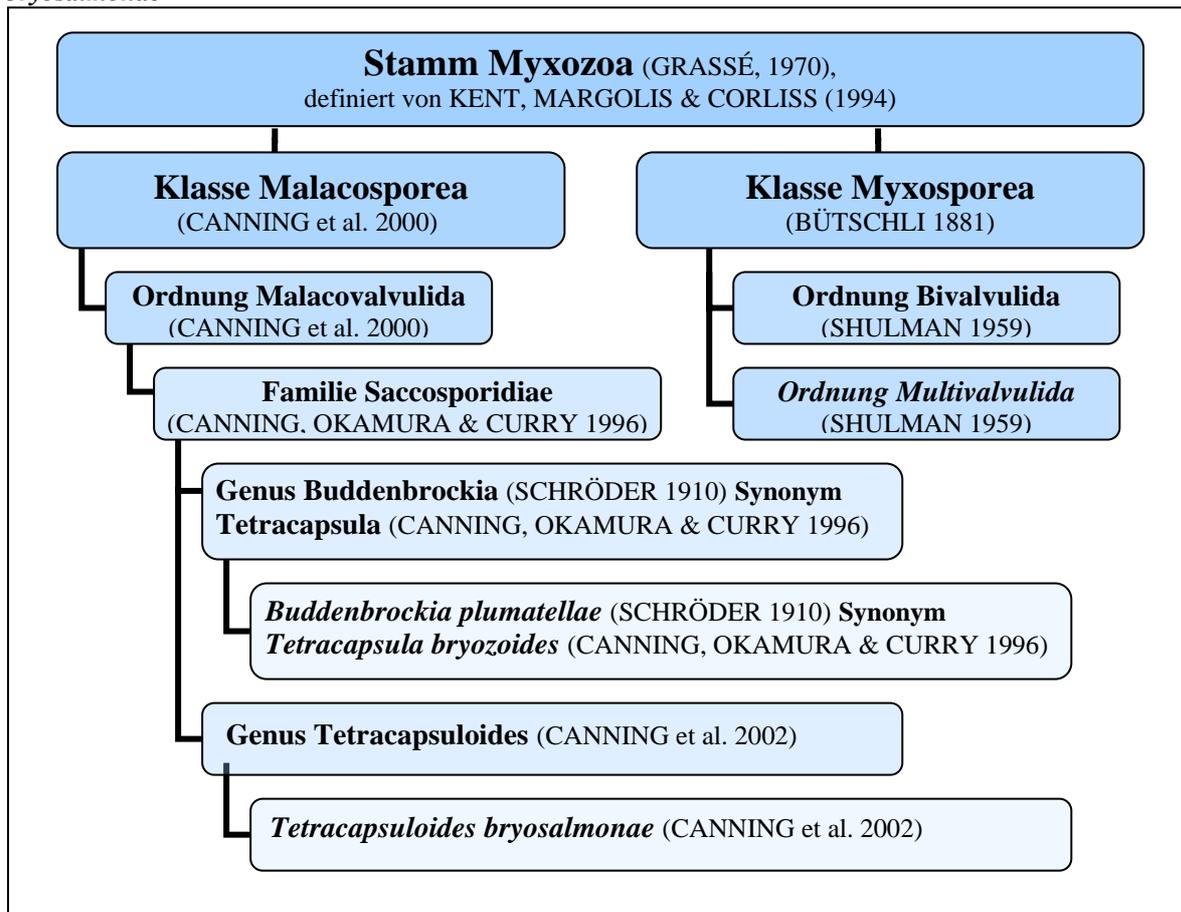
Auch die Untersuchungen von ANDERSON et al. (1999b), CANNING et al. (1999) und KENT et al. (2000) zeigten, dass diese Spezies schon früh in der Evolution der Myxozoa einen eigenen Zweig bildete.

Anhand dieser Erkenntnisse, und aufgrund der signifikanten morphologischen Unterschiede der Erreger zu anderen Myxozoa-Gattungen schlugen CANNING et al. (2000) vor, die Familie Saccosporidiae mit den Gattungen *T. bryozoides* und *T. bryosalmonae* aus der Ordnung Multivalvulida herauszunehmen und in einer neuen Ordnung Malacovalvulida innerhalb des Stammes Myxozoa einzugliedern.

Inzwischen wurden zahlreiche weiterführende Untersuchungen über den Stamm Myxozoa durchgeführt, und es stellte sich heraus, dass *T. bryozoides* identisch ist mit dem von SCHRÖDER (1910) erstmals beschriebenen *Buddenbrockia plumatellae* (OKAMURA et al. 2002, CANNING et al. 2002). Gemäß den Regeln des internationalen Code für zoologische Nomenklatur hat der Name, der als erstes für eine neue Spezies vergeben wurde, Priorität. *T. bryozoides* wird also künftig *Buddenbrockia plumatellae* genannt. Da *T. bryozoides* die Referenzspezies des Genus *Tetracapsula* darstellte, ist dessen ab jetzt geltendes Synonym *Buddenbrockia*.

Bei der näheren Untersuchung der Ultrastruktur des Erregers wurden außerdem beträchtliche morphologische Unterschiede zwischen *T. bryozoides* und *T. bryosalmonae* gefunden (CANNING et al. 2002). Deswegen wurde von CANNING et al. (2002) ein neues Genus *Tetracapsuloides* mit *Tetracapsuloides bryosalmonae* als Referenz-Spezies vorgeschlagen (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Von CANNING et al. (2002) vorgeschlagene Nomenklatur für *Tetracapsuloides bryosalmonae*



2.2.3.2 Entwicklung des Erregers

Der Entwicklungszyklus von *T. bryosalmonae* war lange Zeit unklar, insbesondere die Frage nach weiteren Wirten. In fast allen der bisher beschriebenen Entwicklungszyklen von Myxosporea-Parasiten werden Wirbellose als Wirt für die Entwicklung benötigt. Daher wurden zunächst Oligochaeten als mögliche Wirte des PKD-Erregers in Betracht gezogen, aber es konnte keine Parasiten-DNA in ihnen nachgewiesen werden (RAFFERTY 1986, DIEROLF 1995, O'FLYNN 1998). 1996 wurde *T. bryozoides* im Coelom des Süßwasserbryozoen *Cristatella mucedo* gefunden (CANNING et al. 1996). Daraufhin wurden weitere Bryozoa-Arten (Moostierchen) untersucht, und in den USA konnte schließlich aus *C. mucedo*, *Pectinatella magnifica* und *Plumatella rugosa* Parasiten-DNA isoliert werden, deren Sequenz identisch war mit derjenigen von Parasitenstadien in der Niere von PKD-infizierten Regenbogenforellen (ANDERSON et al. 1999a, b).

LONGSHAW et al. (1999) zeigten, dass Bryozoen aus Fischzuchten in Großbritannien mit endemischem Vorkommen von PKD ebenfalls diesen Myxozoa-Parasiten enthielten und dass

die DNA-Sequenz identisch mit der Sequenz von Entwicklungsstadien des PKD-Erregers im Nierengewebe war.

Studien haben gezeigt, dass der Parasit von Bryozoen auf gesunde Fische übertragen werden kann und bei diesen zum klinischen Auftreten der PKD führt (LONGSHAW & FEIST 2000, LONGSHAW et al. 2002).

Der Beweis, dass Bryozoen Wirte von 'PKX' sind, wurde durch rDNA-Sequenzen von Bryozoen aus verschiedenen aquatischen Habitaten erbracht (ANDERSON et al. 1999b, LONGSHAW et al. 1999).

Ursprünglich ging man davon aus, dass Myxozoa Diploblasten sind (SIDALL et al. 1995). Deshalb wurde angenommen, dass Fische die Primärwirte von *T. bryosalmonae* sind (KENT et al. 2000). Andere Untersuchungen ergaben dagegen, dass Myxozoa stark degenerierte Triploblasten sind (SMOTHERS et al. 1994, SCHLEGEL et al. 1996, ANDERSON et al. 1998). Die frühe phylogenetische Abspaltung von *Tetracapsula spp.* in der Entwicklung der Myxozoa führte zu der Vermutung, dass Bryozoen die ursprünglichen Wirte waren und die Fische später in der Entwicklung der Myxozoa als Wirte hinzugekommen sein könnten (ANDERSON et al. 1999b). Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass die geschlechtliche Vermehrung in den Bryozoen erfolgt (CANNING et al. 2000). Die Autoren berufen sich hier auf die Arbeit von EL-MATBOULI et al. (1998), in der die geschlechtliche Vermehrung von *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* nachgewiesen wurde.

Dies würde bedeuten, dass die Spezies der Klasse Malacosporea ihren Entwicklungszyklus vollenden können, indem sie entweder nur einen Bryozoen-Wirt verwenden, oder, wie bei *T. bryosalmonae*, Fische infizieren und sich in ihnen weiterentwickeln (CANNING et al. 2000). CANNING et al. (2000) halten es für möglich, dass *T. bryosalmonae* nicht in der Lage ist, die Sporogonie im Fisch zu vollenden, da es aufgrund der durch Selbstbefruchtung verursachten Homozygotie zur Bildung von schadhafte Zygoten kommt. Dieses Erkenntnis unterstützt die Theorie, dass Fische Fehlwirte für *T. bryosalmonae* darstellen.

2.2.3.3 Morphologie des Erregers

CANNING et al. (2000) führten elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur des Erregers durch. Sie beschrieben folgenden Aufbau des Parasiten:

In Bryozoen entwickelt sich *T. bryosalmonae* als frei in der Coelomhöhle schwimmende Blase, die aus 2 verschiedenen Zelltypen besteht: somatische Zellen und generative Zellen. 8

somatische Zellen differenzieren sich aus zu 4 Polkapselzellen und 4 Schalenzellen, welche eine einzelne generative Zelle umgeben. Diese durchläuft Meiose und Zytoplasmateilung. Dabei entstehen 2 Amöboidkeim-Zellen mit haploidem Kern, welche Sekundärzellen enthalten.

Die Zellen, die die Wand der Blase bilden, sind bis zu 350 µm groß und stellen die proliferative Phase der Entwicklung dar, während welcher die Blase sich vergrößert. Die Wand besteht aus einer einzelnen Schicht von abgeflachten Zellen, welche in Blasen mit reifenden Stadien zum Teil degeneriert und pyknotisch sind. Bei voll ausgereiften Stadien im Bryozoen stellt die Wand schließlich nicht mehr viel mehr als eine Doppelmembran dar.

Innerhalb der Blase verbindet ein fibröses Sekret die Wandzellen mit den eingeschlossenen Zellen. Es existieren hier 2 Typen von Zellen, große, unregelmäßige generative Zellen von niedriger Dichte (Ø ca. 12µm) und kleine, dichtere somatische Zellen.

Die Kerne in allen Zellen sind groß und in den somatischen Zellen auffallend gelappt. In den somatischen Zellen bleibt die Kernhülle intakt und es gibt keine Anzeichen von Kernteilung, aber einige der generativen Zellen zeigen Stadien der Meiose.

Aus den Zellen im inneren der Blase bilden sich die Sporen. Jede generative Zelle ist von 8 somatischen Zellen umgeben, welche anfangs einzeln vorkommen und später miteinander verbunden sind.

Die somatischen Zellen werden weniger dicht und differenzieren schließlich zu 4 Polkapselzellen, welche die Polkapseln bilden, und 4 Schalenzellen aus.

Die Reifung der Stadien ist synchron, am Ende sind hundert oder mehr Entwicklungsstadien des Parasiten zu erkennen, die in einer wahrscheinlich flüssigen Matrix von einer dünnen Wand umgeben sind.

CANNING et al. (2000) beschreiben außerdem morphologische Unterschiede zwischen den Parasitenstadien in Bryozoen und im Fisch:

Die Mitochondrien vom Crista-Typ des Parasiten sind im Fisch tellerartig und in den Bryozoen tubulär. In Fischen haben die Stadien 2 Polkapseln, in Bryozoen jedoch 4. Die zelluläre Anordnung der Parasitenstadien im Fisch ist schwach, in den Bryozoen dagegen sind die Stadien klar angeordnet als Schalen-, Polkapsel- und generative Zellen.

Die Entwicklungsstadien des Parasiten, die in histologischen Gewebeschnitten gefunden werden können, sind 5-20µm groß und rundlich (DIEROLF 1995). Bei HE-gefärbten

Präparaten ist das Zytoplasma der Parasitenstadien eosinophil angefärbt und enthält Granula, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und vesikuläre Körper (SMITH et al. 1984, FERGUSON & NEEDHAM 1978, SEAGRAVE et al. 1980a, b, FEIST & BUCKE 1987).

2.2.4 Pathogenese

Fische jeden Alters können an der PKD erkranken (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, HEDRICK et al. 1985, MACCONNELL & PETERSON 1992), es sind jedoch meistens Tiere betroffen, die jünger als 1 Jahr alt sind (KENT et al. 1994b). Bei Erstkontakt mit dem Erreger sind die Verluste weitaus höher als in Beständen, in denen die PKD endemisch auftritt (HOSKINS & KIESER 1986).

Krankheitsausbrüche treten zwar nur saisonal zwischen Juli und September auf (FERGUSON & ADAIR 1977, ELLIS et al. 1985), aber es wurde bewiesen, dass der Erreger auch im Winter in überlebenden Bryozoen-Kolonien gefunden werden kann und infektiös bleibt (GAY et al. 2001). Die klinische Manifestation der Erkrankung hängt also primär von der Höhe der Wassertemperatur ab. Die schwersten Fälle von PKD treten bei Wassertemperaturen von 15 °C oder darüber auf. Mit abnehmender Temperatur verringert sich auch die Gefahr einer Erkrankung, obwohl auch von natürlichen Krankheitsausbrüchen bei einer Wassertemperatur von 10°C berichtet wurde (GAY et al. 2001), Bei Temperaturen von 9 °C und darunter entwickelt sich die Krankheit kaum noch bzw. gar nicht mehr (FERGUSON 1981, CLIFTON-HADLEY et al. 1984a, FOOTT & HEDRICK 1987, GAY et al. 2001).

Die Inkubationszeit nach Kontakt mit *T. bryosalmonae* beträgt gewöhnlich 3 bis 5 Wochen (KENT & HEDRICK 1986, CLIFTON-HADLEY & FEIST 1989). Klinische Symptome sind 6 bis 20 Wochen p.e. zu beobachten, die Infektion kann aber auch subklinisch verlaufen. Bei überlebenden Fischen setzt anschließend die Regenerationsphase ein, in der entstandene Läsionen und Gewebeveränderungen zurückgebildet werden (KENT et al. 1994b).

Die Höhe der Verluste, die durch PKD entstehen, wird nicht von der Befallsintensität und der Anzahl der Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* im Gewebe bestimmt, sondern von der Stärke der durch den Parasiten verursachten Immunreaktion, die massive Zellhyperplasie und die damit verbundene schwere Anämie (SEAGRAVE & BUCKE 1979, CLIFTON-HADLEY et al. 1984b, KLONTZ et al. 1986). Die Morbidität bei einem Krankheitsausbruch kann bis zu

100 % erreichen (SEAGRAVE & BUCKE 1979, SEAGRAVE et al. 1981, ELLIS et al. 1982, ALDERMANN & RODGERS 1984). Unabhängig von der Morbidität beträgt die Mortalität je nach Wassertemperatur, Alter der Fische und Immunitätsstatus zwischen 7% und 95 % (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, ELLIS et al. 1982, SEAGRAVE & BUCKE 1979, CLIFTON-HADLEY et al. 1984b, HEDRICK 1984, 1985). Die PKD verursacht allerdings die größten wirtschaftlichen Verluste nicht nur durch Todesfälle bei den infizierten Fischen, sondern auch durch andere Faktoren, wie zum Beispiel dadurch, dass die betroffenen Tiere Futter schlechter verwerten (SEAGRAVE & BUCKE 1979, SEAGRAVE et al. 1981, ELLIS et al. 1982) und deshalb reduziertes Wachstum zeigen (BUCKE et al. 1981). Die Fische haben eine schlechte Kondition und werden so leicht zur Beute von Fressfeinden (KENT et al. 1995). Außerdem reagieren infizierte Tiere empfindlich auf Stress. Stressfaktoren wie Handling, Umsetzen, Transport, niedriger Sauerstoffgehalt im Wasser, schlechte Wasserqualität und zu intensive Fütterung begünstigen Krankheitsausbrüche (SEAGRAVE & BUCKE 1979, BUCKE et al. 1981, EL-MATBOULI & HOFFMANN 2002). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass durch die krankheitsbegleitende Immunsuppression die Anfälligkeit für Sekundärinfektionen erhöht ist (BUCKE et al. 1981, WOOTTEN & MCVICAR 1982). Es steigt beispielsweise die Gefahr eines Ausbruches von VHS (SEAGRAVE & BUCKE 1979, SEAGRAVE et al. 1981), IPN (SMITH et al. 1984, BUSCH 1985, HEDRICK et al. 1984), Rotmaulseuche (RAFFERTY 1986), Furunkulose (HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, KENT et al. 1994b) oder einer Infektion mit *Flavobacterium columnare*, *Ichthyophthirius* oder *Costia* (SMITH et al. 1984, HEDRICK et al. 1984, BUSCH 1985). Werden diese Sekundärinfektionen mit Antibiotika oder Antiparasitika behandelt, kann es im Anschluss daran zur Verschlimmerung der PKD-Erkrankung kommen (DALTON 1980).

Der Weg, über den der Erreger in den Wirtskörper gelangt, war lange Zeit unbekannt. GIHITTINO et al. (1977) vermuteten Kiemen oder Verdauungstrakt als Eintrittspforte, von wo aus der Parasit sich über Blutkreislauf und Lymphbahnen im Körper ausbreiten und verschiedene Organe besiedeln könnte. Auch FERGUSON & NEEDHAM (1978) betrachteten die Kiemen als mögliche Eintrittspforte. FERNÁNDEZ DE LUCO et al. (1997) erscheint die Verbreitung des Parasiten über das Blut am wahrscheinlichsten. Für HEDRICK et al. (1992) kommen Kiemen, Haut und Schleimhäute in Frage. MORRIS et al. (2000b) konnten schließlich mit Hilfe von in Situ-Hybridisierung beweisen, dass *T. bryosalmonae* die Kiemen als Eintrittspforte in den Wirtsorganismus benutzt, und LONGSHAW et al. (2002)

halten es für wahrscheinlich, dass der Erreger sowohl über die Kiemen als auch über die Haut in den Fisch gelangt.

2.2.4.1 Übertragung

Studien haben gezeigt, dass der Parasit von Bryozoen auf gesunde Fische übertragen werden kann und bei diesen zum Auftreten der klinischen Erkrankung führt (LONGSHAW & FEIST 2000, LONGSHAW et al. 2002). LONGSHAW et al. (2002) fanden heraus, dass schon 10 Minuten Kontakt mit dem Erreger ausreichen, um eine Erkrankung auszulösen, und dass schon nach 1-minütiger Erregerexposition infektiöse Parasitenstadien im Fisch gefunden werden können.

In Versuchen ist eine Übertragung der PKD von Fisch zu Fisch nicht gelungen (FERGUSON & BALL 1979). CANNING et al. (2000) vermuten einen obligaten Wirtswechsel, bei dem die Sporen vom Fisch nur für Bryozoen infektiös sind.

2.2.5 Klinik

Die klinischen Anzeichen der PKD können abhängig von der Schwere der Erkrankung stark variieren und sind weitgehend unspezifisch (KÖRTING et al. 1989). Leichte Infektionen können subklinisch verlaufen, ansonsten sind die klinischen Anzeichen 9 bis 12 Wochen p.e. am deutlichsten ausgeprägt (CLIFTON-HADLEY et al. 1985). Das auffälligste makroskopisch sichtbare Symptom ist die geschwollene, vergrößerte Niere (FERGUSON & NEEDHAM 1978). Die Milz ist ebenfalls oft vergrößert, die Gallenblase kann erweitert sein (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a). Erkrankte Tiere können Symptome wie Dunkelverfärbung des Körpers, ein- oder beidseitigen Exophthalmus, aufgetriebenes Abdomen, zum Teil blutigen Aszites, Blässe der Kiemen und/oder der Organe und eine erhöhte Mortalitätsrate zeigen (PLEHN 1924, HEUSCHMANN-BRUNNER 1966, ROBERTS & SHEPHERD 1974, DE KINKELIN & GERARD 1977, GHITTINO et al. 1977, FERGUSON & NEEDHAM 1978, HEDRICK et al. 1984). In späteren Stadien der Erkrankung können Läsionen seitlich am Körper auftreten (FERNÁNDEZ-DE-LUCO et al. 1997). Auch schlechte Wachstumsraten können ein Anzeichen für eine Infektion darstellen (HOSKINS & KIESER 1986). Die Blässe der Organe, insbesondere der Kiemen und der Leber, wird durch die fortschreitende Anämie verursacht (PLEHN 1924, GHITTINO et al.

1977, FERGUSON & NEEDHAM 1978, SMITH et al. 1984, CLIFTON-HADLEY et al. 1987a). Auf Stress, z.B. durch Umsetzen, Transport (SEAGRAVE & BUCKE 1979), falsche Fütterung, Behandlung mit Antibiotika (ROBERTS & SHEPHERD 1974, DALTON 1980) oder Antiparasitika, reagieren infizierte Tiere empfindlich (SEAGRAVE et al. 1981, HOFFMANN & EL-MATBOULI 1994). Bei fortgeschrittener Erkrankung stellen die Fische die Futterraufnahme ein, zeigen zum Teil abnormales Schwimmverhalten mit spiraligen oder drehenden Bewegungen (DE KINKELIN & GERARD 1976, GHITTINO et al. 1977), schnappen nach Luft und sterben schließlich aufgrund des auftretenden Sauerstoffmangels (PLEHN 1924). Die infizierten Tiere werden durch die Schwächung anfällig für Sekundärinfektionen aller Art (HEDRICK et al. 1993), welche zahlreiche weitere klinische Symptome verursachen können.

Untersuchungen an Königslachsen zeigten, dass die PKD nach im Süßwasser erfolgter Infektion auch im Salzwasser bestehen bleibt und sich weiterentwickeln kann. Die Osmoregulation der infizierten Fische im Meerwasser ist beeinträchtigt, und sie haben eine geringere Überlebenschance, weil sie leichter zur Beute ihrer Fressfeinde werden (KENT 1992, KENT et al. 1995).

2.2.6 Hämatologie

Die bei starkem Befall mit Parasitenstadien häufig auftretende Anämie wird durch die Veränderungen des hämatopoetischen Anteils der Niere und der Milz verursacht. Als Reaktion auf den Parasitenbefall kommt es zu Entzündungsreaktionen und zur Hyperplasie der hämatopoetischen Zellen (ROBERTS 1978a).

Die Anämie wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich charakterisiert – als hypoplastische Anämie (ROBERTS 1978a, ROBERTS & SCHLOTFELDT 1985), chronisch-hämolytische Anämie (HOFFMANN & LOMMEL 1984) oder als Mischform aus beiden Typen (CLIFTON-HADLEY et al. 1987b).

Je ausgeprägter die histologischen Veränderungen sind, desto stärker weichen die Blutwerte von denen gesunder Fische ab (CLIFTON-HADLEY et al. 1987b). Der Hämatokrit der Tiere sinkt während des klinischen Höhepunktes der Infektion auf 11,2 – 28,3 % (HOFFMANN & LOMMEL 1984, KLONTZ et al. 1986, MACCONELL et al. 1989, FOOTT & HEDRICK 1990). Hämoglobin und Erythrozytenzahl nehmen ab, es treten vermehrt unreife und

missgestaltete Erythrozyten auf. Letztere haben ein hypo- oder polychromatisches Zytoplasma, Poikilozytose und ein erniedrigtes Kern-Zytoplasma-Verhältnis (HOFFMANN & LOMMEL 1984, CLIFTON-HADLEY et al. 1987b, FOOTT & HEDRICK 1990).

In den Makrophagen der Milz und intravaskulär werden Hämosiderinablagerungen gefunden (HOFFMANN & LOMMEL 1984, CLIFTON-HADLEY et al. 1987b, FOOTT & HEDRICK 1990). Es wurde diskutiert, ob eventuell vorhandene Erregertoxine für die Eisenablagerung und die Anämie verantwortlich sind (HOFFMANN & LOMMEL 1984, ANGELIDIS et al. 1987).

Die Berichte über Veränderungen im weißen Blutbild sind nicht einheitlich. Während HOFFMANN & LOMMEL (1984) keine Abweichungen von den Normalwerten fanden, berichteten CLIFTON-HADLEY et al. (1987b) von einer Leukopenie, ANGELIDIS et al. (1987) und FOOTT & HEDRICK (1990) sahen dagegen eine Leukozytose. CLIFTON-HADLEY et al. (1987b) sahen dies als Hinweis für Schwankungen der Blutwerte während des Krankheitsverlaufes.

Auch beim Differentialblutbild gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Während HOFFMANN & LOMMEL (1984) keine bedeutenden Abweichungen von den Normalwerten fanden, berichteten CLIFTON-HADLEY et al. (1987b) über eine Abnahme von Lymphozyten und Thrombozyten, eine Zunahme von eosinophilen Granulozyten, Lymphoidzell- und Monozytenkonzentration und eine Neutrophilie.

Die Serumproteinwerte können durch die mit der Nierenschädigung einhergehende Osmoregulationsstörung beeinträchtigt werden. Meist werden niedrige (HOFFMANN & LOMMEL 1984, CLIFTON-HADLEY et al. 1987b, KLONTZ et al. 1986) bis normale (SCOTT 1984), zum Teil aber auch erhöhte Werte (FOOTT & HEDRICK 1990) gefunden.

Die Konzentrationen der Proteinfractionen verändern sich im Verlauf der Erkrankung. Bis der Heilungsprozess einsetzt, sinken die Präalbumin- und die Albuminwerte (SCOTT 1984, KLONTZ et al. 1986, FOOTT & HEDRICK 1990). Danach kann eine erhöhte Globulinproduktion (FOOTT & HEDRICK 1990) bzw. eine Hypergammaglobulinämie (OLESEN & JØRGENSEN 1986) beobachtet werden.

Die Osmoregulationsstörung der Niere macht sich außerdem durch die erhöhte Plasmakonzentration von Calcium und Magnesium bemerkbar (FOOTT & HEDRICK 1990, KENT et al. 1994b, 1995).

2.2.7 Pathologie

Die ausgeprägtesten makroskopischen Veränderungen sind in der Niere zu beobachten. Sie sind laut FOOTT & HEDRICK (1987) am deutlichsten, wenn die Anzahl der Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* im Gewebe am höchsten ist. Die Niere ist, abhängig vom Krankheitsstadium, zum Teil stark geschwollen. Die Schwellung beginnt meist im exkretorischen, hinteren Teil der Niere und ist dort am ausgeprägtesten, kann aber im Verlauf der Erkrankung auch zum kranialen, hämatopoetischen Anteil fortschreiten (PLEHN 1924, FERGUSON & NEEDHAM 1978, HOFFMANN & DANGSCHAT 1981, Körting et al. 1989).

CLIFTON-HADLEY et al. (1987a) beobachteten eine farbliche Veränderung der Niere in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung. Sie beschrieben ein einheitliches, dunkles Rot zu Beginn der Infektion, welches in verwaschenes Rosa und Grau übergeht, bis die Niere schließlich blass mit gräulichen Arealen erscheint.

Das Gewebe der betroffenen Stellen ist oft weißlich-grau bis dunkelrot oder bräunlich verfärbt (PLEHN 1924, ROBERTS & SHEPHERD 1974, CLIFTON-HADLEY et al. 1985, HEDRICK et al. 1986, Körting et al. 1989) und zum Teil ödematös (CLIFTON-HADLEY et al. 1985) oder knotig aufgetrieben (Körting et al. 1989). Die Konsistenz der Niere ist derb, und die Oberfläche kann gewellt sein (PLEHN 1924, SCHÄPERCLAUS 1954).

Die Veränderungen entsprechen dem Bild einer granulomatösen interstitiellen Nephritis (KENT 1992).

Da die geschwollene Niere mehr Platz benötigt, kann es in schwereren Fällen zur Ventralverschiebung der Luftblase kommen, was die Ursache für die Abdomenschwellung entlang der Seitenlinie ist (FERGUSON & NEEDHAM 1978).

In anderen Organen, vor allem in Leber und Milz, können bei schwerer Infektion ähnliche Veränderungen wie in der Niere beobachtet werden (HOFFMANN & LOMMEL 1984). Die Milz kann vergrößert, geschwollen und verfärbt sein und hat oft eine raue Oberfläche bis hin zu knotigen Auftreibungen (ROBERTS & SHEPHERD 1974, GHITTINO et al. 1977, CLIFTON-HADLEY et al. 1987a). Leber, Muskulatur, Kiemen, Peritoneum und Abdominalfett können ebenfalls fleckige Verfärbungen, Petechien (CLIFTON-HADLEY et al. 1985) und knotige Veränderungen aufweisen (GHITTINO et al. 1977).

Als Folge der fortschreitenden Anämie (SMITH et al. 1984) erscheinen die Organe häufig blass und das Blut wässrig-hell (HOFFMANN et al. 1984). Anhängig von der Schwere der Erkrankung kann es aufgrund der Nierenfunktionsstörung zu Aszites kommen, der auch blutig sein kann (ROBERTS & SHEPHERD 1974, GHITTINO et al. 1977, CLIFTON-HADLEY et al. 1985).

2.2.8 Histopathologie

Die durch die Infektion mit *T. bryosalmonae* verursachten Veränderungen können histologisch zuerst und am ausgeprägtesten in der Niere beobachtet werden. Erste Parasitenstadien sind etwa drei (KENT & HEDRICK 1986) bis fünf Wochen (CLIFTON-HADLEY & FEIST 1989) p.e., manchmal aber auch schon nach 8 Tagen (CHILMONCZYK et al. 1989) in der Niere zu sehen. Der Krankheitsverlauf kann in vorklinische, klinische Phase und Organisationsphase eingeteilt werden.

In der vorklinischen Phase sind die ersten vereinzelt Entwicklungsstadien des Parasiten (bzw. Primärzellen mit sich ausbildenden Sekundär- und Tertiärzellen) in den peritubulären Kapillaren der Niere und in den Sinusoiden, seltener im Interstitium, zu finden und rufen zunächst keine Gewebereaktion hervor (MACCONNELL et al. 1989). Sobald die Zahl der Parasiten zunimmt, treten in den Blutgefäßen zelluläre Aggregationen aus Parasitenstadien, angelagerten Lymphozyten, melaninhaltigen Makrophagen, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und Zellfragmenten auf, es kommt zur Thrombenbildung und zur Endothelschädigung durch Anlagerungen (CLIFTON-HADLEY et al. 1984a, 1987a).

Etwa 2 Wochen nach dem Auftreten der ersten Parasitenstadien zeigt sich eine zunächst milde Hyperplasie des Niereninterstitiums, von der vor allem die hämatopoetischen Zellen, welche die Nierentubuli umgeben, betroffen sind (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a). Die Parasiten befinden sich oft im Zentrum einer solchen Gewebereaktion. Sie werden von den großen, blastenähnlichen Makrophagen umgeben, welche sich zu Lasten aller anderen hämatopoetischen Zelltypen vermehren (FERGUSON et al. 1977, ROBERTS & SCHLOTFELDT 1985). Die Hyperplasie beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Umgebung von Parasitenstadien, sondern kommt überall im Nierengewebe vor und verursacht eine deutliche (relative) Abnahme der exkretorischen Elemente der Niere (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

Die klinische Phase beginnt etwa 3-4 Wochen nach dem Auftreten der ersten histologischen Veränderungen, wenn die ersten klinischen Symptome beobachtet werden (FERGUSON & BALL 1979). Sobald die höchsten Mortalitätsraten im gesamten Krankheitsverlauf erreicht werden (nach 11-13 Wochen), sind auch die histopathologischen Veränderungen am ausgeprägtesten (CLIFTON-HADLEY et al. 1985). Die diffuse Entzündungsreaktion weitet sich aus und wird makroskopisch als zunehmende Nierenschwellung und graue Flecken im Nierengewebe sichtbar (CLIFTON-HADLEY et al. 1985, 1987a). Es entwickelt sich eine chronische interstitielle granulomatöse Nephritis mit Verlust der Nierentubuli und der Glomeruli (CASTAGNARO et al. 1991, KENT 1992). Die Zellen um die Parasitenstadien herum sind oftmals wirbelförmig angeordnet und werden von Kollagenfäden gestützt (FERGUSON & NEEDHAM 1978). Es sind vermehrt Melanomakrophagen und Granulozyten vorhanden, und im proximalen Tubulusepithel bilden sich gelegentlich Vakuolen (MACCONNELL et al. 1989, CASTAGNARO et al. 1991). Die restlichen hämatopoetischen Zellen bilden zusammen mit exkretorischen Elementen kleine Inseln inmitten der Entzündungsreaktion, die makroskopisch als rote Flecken zu erkennen sind (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

MACCONNELL et al. (1989) betrachteten Makrophagen als denjenigen Zelltyp, der hauptsächlich für die Reaktion des Niereninterstitiums verantwortlich ist. In einer aktuellen Studie von CHILMONCZYK et al. (2002) wurden jedoch Lymphozyten als dominierende Zellpopulationen gefunden. Die Autoren sehen den Grund dafür in den verwendeten Methoden – mit der Flow-Zytometrie war ihnen die Analyse von hunderttausenden von Zellen möglich, während MACCONNELL et al. (1989) Gewebeschnitte unter dem Elektronenmikroskop auswerteten.

Ab der 7. Woche p.i. können die Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* auch gelegentlich zwischen den Tubulusepithelzellen und im Tubuluslumen oder in den Glomerula beobachtet werden (KENT & HEDRICK 1986, CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

Obwohl der Kollagengehalt der Niere reduziert scheint, kann es bei starkem Befall auch zur Ausbildung einer diffusen Fibrose kommen. Manchmal findet man auch eine Sklerose der Glomerula mit Verkalkung (FERGUSON et al. 1978).

Im weiteren Verlauf nehmen auch die Aggregationen in den Blutgefäßen an Größe zu. Dadurch kann es zu schweren Gefäßalterationen bis hin zum Verschluss einzelner Blutgefäße und zur Einlagerung von Hämoglobinkristallen kommen (KÖRTING et al. 1989).

Makroskopisch kann man die Gefäßverschlüsse als Petechien erkennen (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

Bei den Fischen, die die Erkrankung überstehen, beginnt die Regenerationsphase. Die Heilungsprozesse setzen um die 15. bis 20. Woche p.e. ein (KENT & HEDRICK 1986, CLIFTON-HADLEY et al. 1987a, MACCONNELL et al. 1989). Es kommt zur Degeneration der Parasitenstadien. Im Zytoplasma treten Vakuolen auf, die Nuclei und die Primär- und Sekundärzellen werden pyknotisch. Auch nach dem Verschwinden der Parasiten bleibt die Nierenschwellung durch die interstitielle Hyperzellularität noch etwa bis zur 25. Woche p.e. bestehen. Danach erreicht die Niere wieder ihr normales makroskopisches Aussehen, und das hämatopoetische Gewebe und die Nephronen regenerieren (FERGUSON 1989).

Sporogonische Stadien des Parasiten können in den Tubuli auch noch mehrere Monate nach überstandener Erkrankung persistieren (KENT & HEDRICK 1986, FOOTT & HEDRICK 1987), und es wurde vermutet, dass diese Stadien eventuell erst bei adulten Tieren ausreifen und somit über Jahre vorhanden sein können (KENT et al. 1993a,b).

Auch andere Organe sind von der Infektion betroffen:

Wie in der Niere kommt es auch in der Milz zuerst zur hämatopoetischen Hyperplasie, gefolgt von einer diffusen Entzündungsreaktion um die Parasitenstadien herum (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a). Das Granulationsgewebe aus Makrophagen, Lymphozyten und Histiocyten befindet sich hauptsächlich in der weißen Milzpulpa und um die Arteriolen herum (HOFFMANN & LOMMEL 1984), und es kann zu Gefäßalterationen mit Hämoglobinkristall-Einlagerungen kommen (SEAGRAVE et al. 1980b).

In der Leber tritt vor allem in den periportalen Bereichen oft eine ausgeprägte Hyperzellularität auf (ROBERTS & SCHLOTFELDT 1985). Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* sind im Parenchym seltener zu finden, aber wenn sie auftreten, dann bilden sie meist das Zentrum einer Entzündungsreaktion. Es treten die gleichen Veränderungen in den Blutgefäßen auf wie in Niere und Milz (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

In den Kiemen können Parasitenstadien hauptsächlich im Epithel gefunden werden, aber auch in den Primärlamellen, besonders in den zentralen Blutgefäßen (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

Stadien des Parasiten kommen außerdem im periazinären Fettgewebe des Pankreas und vereinzelt im Stratum spongiosum des Herzventrikels vor. Sehr selten können sie auch im

Gehirn, in der Skelettmuskulatur, der Submukosa des vorderen Intestinaltraktes, im Caecum und im Rektum beobachtet werden (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

2.2.9 Diagnose, Differentialdiagnose

Klinische Symptome wie Nierenschwellung und Blässe der Organe allein reichen für eine Diagnose nicht aus, weil auch andere Erreger, wie zum Beispiel *Renibacterium salmoninarum*, die gleiche klinische Symptomatik hervorrufen können (HEDRICK et al. 1993).

Differentialdiagnostisch müssen außerdem Krankheiten wie Nocardiose (GHITTINO et al. 1977), Bakterielle Nierenerkrankung, BKD (HEDRICK et al. 1986), Tuberkulose (KÖRTING et al. 1989), *Ichthyophonus hoferi* (HEDRICK et al. 1986), Nephrocalzinose (KÖRTING et al. 1989), VHS (KÖRTING et al. 1989) und Nephropathien neoplastischen oder karzinogenen Ursprungs (GHITTINO et al. 1977) ausgeschlossen werden.

Der Parasit kann histologisch in nativen Quetschpräparaten aus Nierengewebe unter dem Phasenkontrastmikroskop nachgewiesen werden, außerdem in gefärbten Nieren-Abklatschpräparaten und Gewebeschnitten (FERGUSON & ADAIR 1977, CLIFTON-HADLEY et al. 1983, KLONTZ & CHACKO 1983). Für Nierentupferpräparate sind Färbungen mit Methylenblau und nach Giemsa, Leishman-Giemsa, Pappenheim und Romanovsky (Rapid Diff™) geeignet (CLIFTON-HADLEY et al. 1983, KÖRTING et al. 1989, KLONTZ & CHACKO 1983, MORRIS & ADAMS 2002). Gewebeschnitte können mit Hämatoxilin-Eosin, Giemsa, Masson-Trichrom, Turnbull's Blau und PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) gefärbt werden, um die Parasitenstadien besser sichtbar zu machen (MACCONNELL et al. 1989).

Typische Parasitenstadien oder extrasporogonische Stadien, die im Gewebe gefunden werden können, sind 5-20 µm große Zellen mit deutlicher Zellmembran (FERGUSON & NEEDHAM 1978). Das Zytoplasma der äußersten Zelle (Primärzelle) enthält deutlich erkennbare Granula, und der Nucleus besitzt einen deutlichen Nucleolus (FERGUSON & NEEDHAM 1978). Der Parasitenoberfläche haften oft ein bis mehrere, von Leukozyten umgebene Makrophagen an (KÖRTING et al. 1989).

Die histologische Untersuchung ist eine nützliche und schnelle Methode zum Nachweis der PKD. Aber bei Fischen, die sich bereits wieder von der Erkrankung erholen, kann die Niere, obwohl sie noch geschwollen ist, nur noch wenige extrasporogonische Parasitenstadien

enthalten. Außerdem ist es oft schwierig, sporogonische Stadien mit dieser Methode zu identifizieren (MORRIS & ADAMS 2002).

In den letzten Jahren sind zahlreiche weitere Methoden entwickelt worden, um den Erreger nachzuweisen. Dazu gehören die Verwendung von Lektinen (MARIN DE MATEO et al. 1993) und monoklonalen Antikörpern (ADAMS et al. 1992), PCR und Sequenzierung der 18S rDNA (SAULNIER & DE KINKELIN 1997, KENT et al. 1998, ANDERSON et al. 1999a) und In-situ Hybridisierung (MORRIS et al. 1999).

Das verwendete Lektin GS 1 aus *Griffonia simplicifolia* wurde zwar erfolgreich für die Detektion von extrasporogonischen und intratubulären Stadien von *T. bryosalmonae* verwendet, ist aber nicht spezifisch für den Parasiten, weil es auch an sporogonische Stadien von *Sphaerospora oncorhynchi* und an die Nierentubuli von Regenbogenforellen bindet (MARIN DE MATEO et al. 1993, KENT et al. 1993b).

Es wurden mehrere monoklonale Antikörper entwickelt, die spezifisch für *T. bryosalmonae* sind (SAULNIER & DE KINKELIN 1996, MARIN DE MATEO et al. 1996, MORRIS et al. 1997). Die extrasporogonischen Stadien des Parasiten besitzen allerdings andere Antigene als die sporogonischen (SAULNIER & DE KINKELIN 1996, MORRIS et al. 1997). Deswegen kann mit ihnen die frühe Phase der Parasitenentwicklung nicht nachgewiesen werden.

Die PCR stellt die sensitivste Nachweismethode dar. Es wurden zahlreiche Primersets zur Diagnose von PKD entwickelt (SAULNIER et al. 1996, SAULNIER & DE KINKELIN 1997, KENT et al. 1998, ANDERSON et al. 1999a, MORRIS et al. 2002). MORRIS et al. (2000a) untersuchten die Spezifität der entwickelten Primer und stellten fest, dass nur die Primerpaare 3F – 4R und 5F – 6R (KENT et al. 1998) *T. bryosalmonae* relativ spezifisch nachzuweisen scheinen. Da bisher nur sehr wenige Arbeiten über die Spezifität dieser Primer auch im Hinblick auf andere Forellenkrankheiten veröffentlicht wurden, halten MORRIS & ADAMS (2002) es für sinnvoll, die Ergebnisse der PCR für sich alleine mit Vorsicht zu betrachten und gegebenenfalls durch weitere Untersuchungen zu bestätigen.

2.2.10 Therapie, Prophylaxe

Bisher wurde noch keine erfolgreiche Methode zur Bekämpfung der PKD gefunden, auch deswegen, weil ein vollständiges Verständnis der Wirt-Parasit-Verhältnisse noch immer fehlt. Es wurden Behandlungsversuche mit verschiedenen Medikamenten unternommen. Salzwasser (O'HARA 1985, HEDRICK & ARONSTIEN 1987) senkte zwar die Mortalitätsrate bei

erkrankten Fischen, doch dies wurde auf die Reduktion von Sekundärrerregern zurückgeführt. Die Verwendung von Malachitgrün als Wasserbad (40 min bei 1,6 ppm) 3-malig in wöchentlichen Abständen führte zwar zur Reduktion von Symptomen und Mortalitätsrate (CLIFTON-HADLEY & ALDERMAN 1987, ALDERMAN & CLIFTON-HADLEY 1988), konnte aber von anderen Autoren nicht nachvollzogen werden (IBARRA et al. 1990, MOLNÁR 1993) und war mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen und Umweltbelastungen verbunden (ADAMS et al. 1992, CLIFTON-HADLEY & ALDERMAN 1987, ALDERMAN & CLIFTON-HADLEY 1988).

Das Antibiotikum Fumagillin wurde bisher in Labor- und Feldversuchen getestet (HEDRICK et al. 1988b, WISHKOVSKY et al. 1990, LE GOUVELLO et al. 1993a, b, 1995a, b, CASTILLO et al. 1995). Es bedarf aber noch weiterer Untersuchungen, weil die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind, vor allem auch im Hinblick auf die Toxizität des Medikaments bei Überdosierung.

Durch Kontrolle und weitestmögliche Ausschaltung sämtlicher Stressfaktoren kann die direkt in Verbindung mit PKD stehende Mortalität auf bis unter 10 % gesenkt werden (HEDRICK et al. 1993). Es sollte auf niedrige Besatzdichte, gute Wasserdurchflussraten und optimale Wasserqualität (insbesondere Sauerstoffgehalt) geachtet werden (GHITTINO et al. 1977, SEAGRAVE & BUCKE 1979, SEAGRAVE et al. 1981)

Diejenigen Fische, welche die Krankheit überleben, sind resistent gegenüber einer Reinfektion. Dies weist darauf hin, dass Schutzimpfung eine brauchbare Kontrollmethode zur Verhinderung von Krankheitsausbrüchen sein könnte (FOOTT & HEDRICK 1987).

Eine in Fischzuchten verbreitete Methode zur Verringerung von Krankheitsausbrüchen und zur Erzielung von Immunität im Bestand ist es, die Jungfische den Sommer über in Gewässern zu halten, die nachweislich PKD-frei sind. Sobald die Wassertemperaturen im Herbst sinken, werden die Fische an Orte mit enzootischem PKD-Vorkommen verbracht und infizieren sich auf diese Weise mit *T. bryosalmonae*. Aufgrund der niedrigen Wassertemperatur verläuft die Infektion dann meist nur subklinisch, und die Fische entwickeln eine belastbare Immunität gegen den Erreger (LONGSHAW et al. 2002).

Auch die Senkung der Wassertemperaturen auf unter 12 °C während des Sommers wurde vorgeschlagen (CLIFTON-HADLEY et al. 1986a, HOSKINS & KIESER 1986).

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Verringerung des Infektionsdruckes sehen DE KINKELIN et al. (2002) in der Reduktion des Lebensraumes von Bryozoen (Gewächse, Hölzer unter Wasser) einige hundert Meter stromaufwärts von Fischzuchtbetrieben.

2.3 Rotmaulseuche der Salmoniden – Enteric Redmouth Disease

2.3.1 Einleitung

Die Rotmaulseuche (Enteric Redmouth-Disease ERM, Salmonid Blood Spot) ist eine durch das Bakterium *Yersinia ruckeri* verursachte generalisierte, akut oder chronisch verlaufende Infektionskrankheit, für die vor allem Salmoniden, insbesondere Regenbogenforellen empfänglich sind (ROSS et al. 1966, BULLOCK & SNIEZKO 1975). Viele Fischarten tragen den Krankheitserreger jedoch auch als symptomlose Carrier, und er bleibt solange unentdeckt, bis es durch Stress, vor allem in Zusammenhang mit Intensivhaltung und schlechter Wasserqualität, zu schweren Verlusten kommen kann (HORNE & BARNES 1999).

Erstmals diagnostiziert wurde die Krankheit von RUCKER in den frühen 50er Jahren des letzten Jahrhunderts im Hagerman Valley, Idaho, USA bei Regenbogenforellen. Als Krankheitserreger wurden aus den Nieren erkrankter Fische kleine, GRAM-negative, begeißelte, leicht gebogene Stäbchen isoliert und 1966 von ROSS et al. als Redmouth-Bakterium beschrieben (ROSS et al. 1966, RUCKER 1966). Erst 1978 wurde das Bakterium der Gattung *Yersinia* zugeordnet (EWING et al. 1978).

Inzwischen hat sich die Rotmaulseuche auf die meisten Teile Amerikas und Europas ausgebreitet, vor allem in Gebieten mit Intensivhaltung von Süßwasserfischen. Die Krankheit kann durch gute Haltungsbedingungen und hohe Wasserqualität unter Kontrolle gehalten werden. Obwohl die ERM auf Antibiotika und Impfstoffe gut anspricht, stellt sie trotzdem eine ständige Bedrohung dar, die in betroffenen Betrieben kostspielige Maßnahmen und Behandlungen notwendig macht und bei Ausbrüchen zu großen Verlusten führen kann (HORNE & BARNES 1999).

2.3.2 Verbreitung, Vorkommen und Wirtsspektrum

Seit der Erstbeschreibung der ERM in der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* (ROSS et al. 1966, RUCKER 1966) wurde das verursachende Agens, *Yersinia ruckeri*, aus vielen Süß- und Meerwasserfischen (Tabelle 2), aber auch aus Tierarten wie Flusskrebs (WARREN 1983), Bisamratte (STEVENSON & DALY 1982), Möwe (WILLUMSEN 1989) und Greif-

vogel (BANGERT et al. 1988) isoliert. Auch in Wasserproben aus Flüssen und Abwässern wurde das Bakterium gefunden (PRITCHARD et al. 1995).

Die ERM gilt zwar primär als Erkrankung der Salmoniden (BUSCH 1982), aber bei vielen anderen Fischarten konnte ebenfalls eine Infektion festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich, dass diese infizierten Spezies, die keine klinischen Symptome zeigen, unter ausreichend hoher Stresseinwirkung ebenfalls erkranken würden (HORNE & BARNES 1999).

Nach der Erstisolierung in Idaho wurde die ERM auch in großen Teilen der Rocky Mountains im Westen der USA einschließlich Alaska gefunden (MC DANIEL 1971).

Bis Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts trat die Krankheit in 18 Staaten der USA, in Kanada in den Provinzen British Columbia, Saskatchewan, Ontario und Nova Scotia (WOBESER 1973, BULLOCK et al. 1978, STEVENSON & DALY 1982) und in Australien (BULLOCK et al. 1978, GREEN & AUSTIN 1982) auf (dort Salmonid Blood Spot genannt). 1982 wurde von GREEN & AUSTIN nachgewiesen, dass es sich dabei tatsächlich immer um denselben Erreger handelte. 1986 wurde *Y. ruckeri* erstmals in Südafrika isoliert (BRAGG & HENTON 1986).

In Europa trat die Rotmaulseuche erstmals im März 1981 in einer Fischzucht in Südwestfrankreich auf (LESEL et al. 1983), bald darauf in Italien (GIORGETTI et al. 1985) und Südengland (ROBERTS 1983). Sie breitete sich weiter in Europa aus, unter anderem nach Norwegen (SPARBOE et al. 1986), Dänemark (DALSGAARD et al. 1984), Finnland (RINTAMÄKI et al. 1986), Schweiz (MEIER 1986) und Spanien (DE LA CRUZ et al. 1986). In der BRD trat der erste Fall von Rotmaulseuche im August 1981 in Niedersachsen bei Regenbogenforellen auf (FUHRMANN et al. 1983).

Die Ursache für die Verbreitung der Krankheit über mehrere Kontinente hinweg wird im Export von Regenbogenforellen, Brut und Eiern aus den USA gesehen. Allerdings konnten Variationen unter den Stämmen und Serotypen in unterschiedlichen geographischen Gebieten gefunden werden, und es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass das Bakterium eine größere natürliche Verbreitung besitzt als zuerst angenommen wurde (HORNE & BARNES 1999).

Tabelle 2: Fischspezies, aus denen *Yersinia ruckeri* isoliert wurde (nach HORNE & BARNES 1999)

Regenbogenforelle (Rainbow trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	RUCKER (1966)
Rotlachs (Sockeye salmon)	<i>Oncorhynchus nerka</i>	DULIN et al. (1976)
Königslachs (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	MC DANIEL (1971)
Silberlachs (Coho salmon)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	
Cutthroat-Forelle (Cutthroat trout)	<i>Salmo clarkii</i>	
Bachforelle (Brown trout)	<i>Salmo trutta</i>	
Arktischer Saibling (Arctic char)	<i>Salvelinus alpinus</i>	EWING et al. (1978), SCHÄPERCLAUS (1979), AUSTIN & AUSTIN (1987)
Atlantischer Lachs (Atlantic salmon)	<i>Salmo salar</i>	
Bachsaibling (Brook trout)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	
Renke (Cisco)	<i>Coregonus artedii</i>	STEVENSON & DALY 1982
Peledmaräne (Whitefish)	<i>Coregonus peled</i>	RINTAMÄKI et al. 1986
Karpfen (Common carp)	<i>Cyprinus carpio</i>	FUHRMANN et al. 1984
Silberkarpfen (Silver carp)	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	XU et al. 1991
Marmorkarpfen (Bighead carp)	<i>Aristichthys nobilis</i>	
Quappe (Burbot)	<i>Lota lota</i>	DWILOW et al. 1987
Dickkopfritze (Minnow)	<i>Pimephales promelas</i>	MICHEL et al. 1986
Steinbutt (Turbot)	<i>Scophthalmus maximus</i>	
Seezunge (Sole)	<i>Solea solea</i>	
Gefleckter Wels (Channel catfish)	<i>Ictalurus punctatus</i>	LEWIS 1981

2.3.3 Ätiologie

Seit 1978 gehört der Erreger als “*Yersinia ruckeri*“ zur Gattung *Yersinia* der Familie Enterobacteriaceae (EWING et al. 1978).

Die taxonomische Stellung des Bakteriums ist umstritten (AUSTIN & AUSTIN 1993).

ROSS et al. (1966) ordneten den Erreger anfangs aufgrund seiner morphologischen und biochemischen Eigenschaften den Enterobacteriaceae zu, aber die Einteilung innerhalb dieser Gruppe zu *Yersinia* oder *Serratia* war unklar. Serologische und biochemische Studien zeigten auch Gemeinsamkeiten mit *Arizona* (= *Salmonella*) *arizonae* (EWING et al. 1978) und STEVENSON & DALY (1982) fanden serologische Kreuzreaktionen mit *Hafnia alvei*.

Der Guanin-Cytosin-Gehalt in der DNA beträgt 48 mol% (EWING et al. 1978), somit ist die DNA-Homologie von *Y. ruckeri* zu anderen Yersinienarten (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) nur 30-31%. Im Vergleich dazu ist die Homologie zu *Serratia marescens* 24-28%, zu *Serratia liquefaciens* ebenfalls 31% (STEIGERWALD et al. 1976).

GREEN & AUSTIN (1982) zeigten, dass eine größere phänotypische Verwandtschaft von *Y. ruckeri* zu *Salmonella choleraesuis* (=Arizona) Subsp. *arizonae* als zu *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis* besteht. BERCOVIER & MOLLARET (1984) regten an, dass *Y. ruckeri* richtiger als neue Art innerhalb der Familie Enterobacteriaceae betrachtet werden sollte.

Die Zuordnung des Erregers als Spezies *Yersinia ruckeri* zur Gattung *Yersinia* erfolgte 1978 durch EWING et al. und wurde unterstützt durch DNA-Analysen, die zeigten, dass *Y. ruckeri* (47,5-48 %) sich deutlich von *Serratia* (52-69%) und *S. arizonae* (50-53%) unterscheidet, aber nahe bei den anderen *Yersinia*-Spezies (46-50%) liegt (DE GRANDIS et al. 1988). Trotzdem scheint die Zuordnung des Erregers zu den Yersinien ungewöhnlich, und es wurde deshalb sogar vorgeschlagen, für den Erreger der Rotmaulseuche eine völlig neue Gattung zu schaffen (BERCOVIER und MOLLARET 1984).

Die biochemischen Eigenschaften von *Y. ruckeri* wurden von vielen Autoren beschrieben (ROSS et al. 1966, WOBESER 1973, BULLOCK et al. 1978, EWING et al. 1978, O’LEARY et al. 1979, BUSCH 1982, STEVENSON & DALY 1982, BERCOVIER & MOLLARET

1984, HASTINGS & BRUNO 1985, EWING 1986, DAVIES & FRERICHS 1989, AUSTIN & AUSTIN 1993), die wichtigsten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Das Bakterium ist GRAM-negativ, stäbchenförmig und leicht gebogen. Es hat einen Durchmesser von 1 µm und eine Länge von 2-3 µm. Etwa 80 % der Isolate sind beweglich mit 7 oder 8 peritrich angeordneten Geißeln, die bei Temperaturen unter 9°C nicht mehr funktionsfähig, über 35°C nicht mehr vorhanden sind (O'LEARY et al. 1979). Die wenigen unbeweglichen, nicht begeißelten Stämme treten nur in streng begrenzten geographischen Gebieten, vor allem in Großbritannien und Norwegen auf (DAVIES & FRERICHS 1989).

Tabelle 3: Biochemische Eigenschaften von *Yersinia ruckeri*

Beweglichkeit	+ (82%)	Pigment	-
Katalase	+	Amygdalin	-
Oxidase	-	Aesculin	-
O/F-Test	+	Arabinose	-
H ₂ S-Bildung	-	Fructose	+
Gelatinase	+	Galactose	-
Urease	-	Glucose	+
Citrat	+	Inosit	-
Lysin-Decarboxylase	+	Lactose	-
Ornithin-Decarboxylase	+	Maltose	+
Arginin-Decarboxylase	-	Mannit	+
β-Galaktosidase (ONPG)	+	Mannose	+
Salicin	-	Mellobiose	-
Voges-Proskauer (20 °C)	-	Rhamnose	-
Methylrot	+	Raffinose	-
Indol	-	Saccharose	-
Nitrat	+	Sorbit	+/-
Phenylalanin-Deaminase	-	Trehalose	+
Tryptophan-Deaminase	-	Adonitol	-
Xylose	-	Pektinase	-
Hämolyse	+	Nitritreduktion	-
Lipase: Tween 20	+	Lipase: Tween 60	+
Tween 40	+	Tween 80	+ (86%)

Die biochemischen Eigenschaften von Isolaten aus verschiedenen geographischen Gebieten sind so einheitlich, dass bis vor kurzem nur 1 Biotyp beschrieben wurde (BUSCH 1982, PYLE et al. 1987). Obwohl ein gewisser Grad an Antigenvariation zwischen verschiedenen Stämmen von *Y. ruckeri* vorhanden ist (O'LEARY 1977, STEVENSON & AIRDRIE 1984, DALY et al. 1986) konnte durch Multilocus-Isoenzymelektrophorese gezeigt werden, dass die genetische Variation innerhalb der Art niedrig ist (SCHILL et al. 1984).

AUSTIN et al. (2003) veröffentlichten eine Studie, in der das Auftreten einer neuen Biogruppe von *Y. ruckeri* in England beschrieben wurde. Sie untersuchten 11 Isolate, die seit 1993 in gegen Rotmaulseuche geimpften Regenbogenforellenbeständen Krankheitsausbrüche verursacht hatten. Die Isolate wurden durch 16S rRNA-Gen-Sequenzierung als *Y. ruckeri* identifiziert, aber sie unterschieden sich durch die generell fehlende Motilität und die positive Voges-Proskauer-Reaktion von sämtlichen bis dahin bekannten Serovaren. AUSTIN et al. (2003) schlossen daraus, dass diese 11 Isolate einer neuen Biogruppe angehören.

Es existieren Unterschiede zwischen verschiedenen *Y. ruckeri*-Isolaten, die unter anderem auf unterschiedlicher Fähigkeit zur Sorbitolfermentation und unterschiedlichen Lipopolysaccharid (LPS)-Strukturen in der äußeren Zellmembran basieren. Es wurden in den vergangenen Jahren mehrere Ansätze für eine Einteilung anhand der serologischen Eigenschaften gemacht. Aufgrund der zahlreichen Untersuchungsmethoden, die dafür verwendet wurden, ist die daraus resultierende Nomenklatur nicht übersichtlich (STEVENSON et al. 1993, HORNE & BARNES 1999).

Ursprünglich wurden 5 Serovare unterschieden:

- Serotyp I, (Hagerman) ist der am häufigsten vorkommende Serotyp mit der höchsten Virulenz (BULLOCK et al. 1978, MC CARTHY & JOHNSON 1982).
- Serotyp II (O'Leary) wird ebenfalls häufig isoliert und ist schwach virulent (O'LEARY 1977, O'LEARY et al. 1982, MC CARTHY & JOHNSON 1982, BULLOCK & ANDERSON 1984). Deswegen wurde ihm anfangs eine geringe Bedeutung beigemessen. Nachdem der Serotyp II auch bei schwereren Ausbrüchen isoliert worden war, wurde daraus geschlossen, dass dieser Serotyp für Fische pathogener ist als bisher angenommen (CIPRIANO et al. 1986, CIPRIANO et al. 1987).
- Serotyp III (Australia) gilt als avirulent (BUSH 1981).

- Serotypen IV und V wurden in Kanada und in südlichen Staaten der USA isoliert und gelten ebenfalls als avirulent (STEVENSON & AIRDRIE, 1984, DALY et al. 1986).

Inzwischen haben sich durch die Verwendung neuerer Untersuchungsmethoden einige Änderungen ergeben. Die momentan gültige Nomenklatur basiert auf Ganzzell-Serologie (nach STEVENSON et al. 1993):

- Serovar I: Hagermann (zeigt Kreuzreaktionen mit III und V)
- Serovar II: Oregon (schließt mindestens zwei weitere Gruppen ein)
- Serovar III: Australian (schließt Serovar I ein, das in Australien als “Salmonid Blood Spot“-Bakterium bekannt war (LLEWELLYN 1980))
- Serovar IV: mittlerweile ausgeschlossen aufgrund von Untersuchungen der DNA-Homologie
- Serovar V: Colorado
- Serovar VI: Ontario

Diese Haupt-Ganzzell-Serotypen können noch weiter unterteilt werden, je nachdem, welche Untersuchungsmethode verwendet wird. Lipopolysaccharidprofile, die durch Elektrophorese und Immunoblot-Technik dargestellt werden, sind die Basis für die weitere Einteilung, die basierend auf LPS O-Antigen 6 O-Serogruppen identifiziert (STEVENSON et al. 1993) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Lipopolysaccharid-O-Antigen Serotypen von *Yersinia ruckeri* (nach STEVENSON et al.1993)

O-Antigen Serogruppe	Ganzzell-Serovar
O1	I, III
O2	IIa
O3	IIb
O4	IIc
O5	V
O6	VI

ROMALDE et al. (1993) schlugen ein weiteres Schema für die serologische Zuordnung vor, basierend auf Studien mit absorbierten Seren und Antigenen (LPS und Membranproteine) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Schema der Serotypen von *Yersinia ruckeri* nach ROMALDE et al. (1993)

Neuer Serotyp	Subgruppe	Früheres Serovar
O1	a	I
	b	III
O2	a	II
	b	II
	c	II
O3	n/a	V
O4	n/a	VI

Die serologische Nomenklatur wird noch unübersichtlicher durch eine norwegische Einteilung in die Serogruppen I, II und III. Viele norwegische Isolate scheinen dem Serovar I verwandt zu sein (basierend auf Lipopolysaccharid-Profilen), aber sie unterscheiden sich serologisch (IBRAHIM et al. 1993).

Außerdem deuteten Kreuzimmunitäts-Studien auf antigenetische Ähnlichkeiten zwischen der norwegischen Serogruppe III und dem Hagermann-Serovar I hin, während die norwegischen Serogruppen II und III sich davon unterscheiden (ERDAL 1989).

Durch die vielen verschiedenen Methoden, die zur Untersuchung verwendet wurden und werden, ist es schwierig, eine einheitliche Einteilung innerhalb der Spezies *Yersinia ruckeri* zu finden. Weitergehende Untersuchungen ergaben bisher stets Ausnahmen und Abweichungen von den getroffenen Regeln. Deswegen ist auf diesem Gebiet weitere Forschung erforderlich (HORNE & BARNES 1999).

2.3.4 Pathogenese

Die Rotmaulseuche ist eine systemische Infektionskrankheit (ROSS et al. 1966, BULLOCK & SNIEZKO 1975, EWING et al. 1978, ROBERTS 1983), von der in erster Linie Salmoniden (BUSCH 1982), aber auch andere Fischfamilien betroffen sind (siehe auch Tabelle 2.2.1).

Für den Ausbruch der Erkrankung spielen außer der Empfänglichkeit des Wirtes und der Virulenz des Erregers Stressfaktoren wie hohe Besatzdichte, Futterwechsel, schlechte Wasserqualität mit hohem Ammonium- und/oder niedrigem Sauerstoffgehalt oder Transport eine entscheidende Rolle (BUSCH & LINGG 1975, DULIN et al. 1976, HUNTER et al. 1980, FRERICHS et al. 1985, ROBERTS 1985, RÜBSAMEN & WEIS 1985, SCHLODTFELDT et al. 1985). KNITTEL (1981) konnte zeigen, dass durch subletale Dosen von Kupfer die Anfälligkeit der Fische für ERM höher war als bei den Kontrolltieren.

Die Größe der Fische spielt für die Erkrankung eine Rolle (RUCKER 1966, DULIN et al. 1976, ROBERTS 1983, FRERICHS et al. 1985, AUSTIN & AUSTIN 1987). Fische mit einer Größe von 7,5-10 cm sind besonders empfänglich gegenüber dem Bakterium (ROBERTS 1983, AUSTIN & AUSTIN 1987). Bei größeren Tieren verläuft die Erkrankung weniger gravierend und eher chronisch (AUSTIN & AUSTIN 1987), es wurden aber auch seuchenhafte Ausbrüche bei Tieren von 17-20 cm (RÜBSAMEN & WEIS 1985) und 29,5 cm (FUHRMANN et al. 1983) Länge beschrieben. WARREN (1983) allerdings misst den äußeren, die Fische belastenden Stressfaktoren eine größere Bedeutung bei als der Größe der Tiere.

In Italien wurde die ERM ganzjährig beobachtet (GIORGETTI et al. 1985), und auch WARREN (1983) sieht keine saisonale Abhängigkeit der Erkrankung. Es wurde sowohl über Ausbrüche bei winterlichen Bedingungen mit sehr niedrigen Wassertemperaturen (SCHLODTFELDT et al. 1985) berichtet als auch über vermehrte Ausbrüche in Dänemark bei Temperaturen über 12°C (HORLYCK et al. 1985).

Ein seuchenhafter ERM-Ausbruch beginnt meist allmählich, die Inkubationszeit beträgt ca. eine Woche, ist jedoch abhängig von den Haltungsbedingungen. Die Mortalität ist anfangs gering, steigert sich jedoch im Verlauf, und es kann zu großen Verlusten kommen, wenn keine Gegenmaßnahmen ergriffen werden (NEWMAN & MAJRNARICH 1982, WARREN 1983).

Eintrittspforten für die Bakterien sind Haut, Kiemen und die inneren epithelialen Auskleidungen (MUNRO 1982, ALEXANDER et al. 1983).

Die Krankheit kann durch direkten Kontakt von Fisch zu Fisch übertragen werden (RUCKER 1966, BULLOCK et al. 1976), aber auch über kontaminiertes Wasser (ROSS et al. 1966), Geräte und Transportbehälter. Eine vertikale Übertragung konnte nicht nachgewiesen werden (DULIN et al. 1976). PHILLIPS et al. (1985) vermuteten Vögel als Vektor und tatsächlich wurde *Y. ruckeri* im Darminhalt von Greifvögeln (BANGERT et al. 1988) und Möwen (WILLUMSEN 1989) gefunden.

Fische, die die ERM-Erkrankung überleben, können zu symptomlosen Carriern werden und stellen somit ein bedeutendes Erregerreservoir dar (BUSCH & LINGG 1975). Bei Carrierfischen ist das Bakterium meist nur in den hinteren Darmabschnitten nachweisbar (RUCKER 1966). BUSCH und LINGG (1975) zeigten, dass 45 Tage post infectionem bis zu 25% der Fische einer Regenbogenforellenpopulation *Y. ruckeri* in den hinteren Darmabschnitten tragen, ohne Symptome zu zeigen. Das Bakterium wird periodisch mit den Fäzes ausgeschieden und dient so als Infektionsquelle für andere Fische (RODGERS 1992).

HUNTER et al. (1980) fanden heraus, dass vakzinierte Tiere nach einer Konfrontation mit dem Bakterium zwar kurzzeitig (bis zu 3 Tage) zu Trägern des Erregers werden, ihn aber nicht auf andere Fische übertragen.

Bei der Frage, inwieweit das Wasser als Erregerreservoir dient, gehen die Meinungen auseinander. Laut MC DANIEL (1972) ist *Y. ruckeri* ebenso gut wie ein Wassersaprophyt dem Leben im Wasser angepasst. KLONTZ & HUDDLESTON (1976) beschreiben dagegen, dass der Keim im Wasser keine längere Zeit überleben kann. RUCKER (1966) vertritt die Meinung, dass der Keim normalerweise im Sediment vorkommt. Dieser Meinung schließen sich DUDLEY et al. (1980) an. Es wurde im Sediment ein für *Y. ruckeri* spezifischer Bakteriophage gefunden (STEVENSON & AIRDRIE 1984).

In den letzten Jahren wurden weitergehende Untersuchungen durchgeführt, bei denen sich herausstellte, dass *Y. ruckeri* in nicht-supplementiertem Frisch- oder Brackwasser (Salzgehalt 0-20 ppt) mindestens 4 Monate überleben kann (THORSEN et al. 1992). ROMALDE et al. (1994) berichteten, dass der Keim mehr als 100 Tage lang in Fluss-, Seewasser und Sediment überlebensfähig ist.

Es wurde außerdem festgestellt, dass einige *Y. ruckeri*-Stämme die Fähigkeit besitzen, einen Biofilm zu bilden. Dies ermöglicht ihnen, an festen Oberflächen im Wasser anzuhaften und

zu wachsen, eine Eigenschaft, die im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Beweglichkeit des Bakteriums mittels Flagellen steht. Sie erhöht die Resistenz und Überlebensfähigkeit des Bakteriums im Wasser (COQUET et al. 2002).

Da Biofilm-bildende Bakterien nur sehr schwer bekämpft werden können, sind sie oft Ursache für hartnäckige Infektionen (LEWIS 2001), und es besteht deshalb auch nach erfolgreicher Behandlung mit Antibiotika immer die Gefahr eines erneuten Ausbruchs.

2.3.5 Klinik

Die frühen klinischen Symptome in der akuten Phase der Infektion finden sich auch typisch bei durch andere GRAM-negative Bakterien verursachten Septikämien. Anorexie, Dunkel-färbung der Haut und Lethargie sind fast immer krankheitsbegleitend, außer bei junger Brut, bei der Todesfälle ohne sichtbare Krankheitsanzeichen auftreten können (KAWULA et al. 1996). Die Rötung des Mauls und des Rachens wird durch subkutane Einblutungen verursacht und ist üblicherweise, aber nicht immer vorhanden. Viele Autoren berichten von akuten ERM-Ausbrüchen, bei denen die Kardinalsymptome nicht festgestellt wurden (FRERICHS et al. 1985, FUHRMANN et al. 1983, RÜBSAMEN & WEIS 1985, SCHLOTFELDT et al. 1985). Beim atypischen Verlauf der Infektion wird nur die Haut zunehmend dunkel und die Fische schwimmen nahe der Wasseroberfläche (FRERICHS et al. 1985). Wenn die Krankheit unbehandelt fortschreitet, können Erosionen an Kiefer und Gaumen auftreten (HORNE & BARNES 1999). Hämorrhagien treten auf der Körperoberfläche, den Kiemenspitzen, den Flossenbasen und entlang der Seitenlinie auf. In späteren Stadien der Infektion können oft ein- oder beidseitiger Exophthalmus und Blutungen in die Augenhöhle und die Iris, manchmal bis zur völligen Trübung des gesamten Auges, beobachtet werden (FUHRMANN et al. 1983, RÜBSAMEN & WEIS 1985). Die Tiere leiden an mangelnder Bewegungsintensität und Gleichgewichtsstörungen (LESEL et al. 1983, BULLOCK & ANDERSON 1984, SCHLOTFELDT et al. 1985). Die Blutgefäße im gesamten Peritoneum sind gestaut und es treten Hämorrhagien in Leber, Pankreas, Schwimmblase, Muskulatur und im Fettgewebe um die Pylorus-Schläuche auf (WOBESER 1973). Niere und Milz sind häufig geschwollen, und es können Flüssigkeitsansammlungen in Magen und Darm beobachtet werden (BUSCH 1982). Aszites und Enteritis sind weitere regelmäßige Befunde bei der Sektion (RÜBSAMEN & WEIS 1985, SCHLOTFELDT et al. 1985).

Im Verlauf der Erkrankung tritt eine akute Anämie mit einem durchschnittlichen Hämatokrit von 23 % und Gesamtserumprotein-Werten von 2,8 g / 100 ml auf (WOBESER 1973, QUENTEL & ALDRIN 1986, LEHMANN et al. 1987). Miller (1983) führt dies auf die Wirkung von Endotoxin auf die Gerinnung zurück, die letztendlich Thrombosen in den Kapillaren und generalisierte Hämorrhagien verursacht.

Gelegentlich verursacht die Rotmaulseuche in betroffenen Betrieben lediglich schleichende Dauerverluste geringen Ausmaßes, ohne dass Symptome zu erkennen sind (ROBERTS 1985, SCHLOTFELDT et al. 1985).

2.3.6 Histopathologie

Histologisch können eine akute generalisierte Bakteriämie und Entzündungsreaktionen in nahezu allen Geweben beobachtet werden, besonders in Niere, Herz, Leber und Kiemen. Die Bakterien sind besonders in vaskulärem Gewebe und in Gebieten mit petechialen Hämorrhagien vermehrt vorhanden (RUCKER 1966). Es treten Bakterienansammlungen in den Kapillaren gut vaskularisierter Gewebe auf, und es kommt zur Erweiterung kleiner Blutgefäße, petechialen Blutungen, Erythrozytenansammlungen und zu Ödemen in Niere, Leber, Milz, Herz und Kiemen.

In den Kopfläsionen tritt eine extreme Hyperämie der tiefergelegenen, dermalen Blutgefäße mit Ödem und fokalen Hämorrhagien auf (ROBERTS 1985).

Es können schwerwiegende Nekrosen mit ausgedehnter Zerstörung der Struktur des hämatopoetischen Nierengewebes und Nekroseherden in Leber und Milz auftreten (FRERICHS et al. 1985). Es entwickeln sich Hämorrhagien im Digestionstrakt, dessen Mukosa ödematisiert ist und zum Teil nekrotisch wird (BUSCH 1982, HORNE & BARNES 1999).

2.3.7 Diagnose, Differentialdiagnose

Die klinischen Symptome allein reichen für eine sichere Diagnose der Rotmaulseuche nicht aus, da sie auch bei Infektionen mit anderen GRAM-negativen Keimen beobachtet werden können. Auch die typische Rötung des Mauls muss nicht immer vorhanden sein und kann

ebenfalls durch andere Infektionserreger verursacht werden (HORNE & BARNES 1999). Differentialdiagnostisch müssen unter anderem folgende Krankheiten ausgeschlossen werden:

- Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (IHN) (YASUTAKE 1975, AHNE 1980a, AMLACHER 1986,)
- Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) (YASUTAKE 1975, AHNE 1980a, AMLACHER 1986,)
- akute Form der Vibriose (ROBERTS 1978b, AMLACHER 1986)
- Furunkulose (ROBERTS 1978b, AMLACHER 1986)
- Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD) (ROBERTS 1978b, AMLACHER 1986, SCHAUNER 1985)

Zur Diagnose der Rotmaulseuche stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

2.3.7.1 Bakteriologischer Nachweis

Das Bakterium lässt sich aus zahlreichen Geweben, insbesondere aus Milz, Niere und Herz, aber auch aus Leber, Kiemen, Augen, Herzblut und veränderten Bezirken der Maulhöhle isolieren und auf Nährböden anzüchten (ROSS et al. 1966, EWING et al. 1978, HUNTER et al. 1980, FUHRMANN et al. 1983, WARREN 1983, FRERICHS et al. 1985, DALY et al. 1986). Mittels Nierenbiopsie ist es möglich, das benötigte Probengewebe von lebenden Fischen zu entnehmen (NOGA et al. 1988).

Der Keim stellt keine hohen Ansprüche an das Medium. Die Anzucht kann daher beispielsweise auf TSA (Tryptose-Soja-Agar = CASO-Agar), (HASTINGS & BRUNO 1985, RODGERS & HUDSON 1985) evtl. unter Zusatz von 5 % Blut, oder auf Standardagar erfolgen (BERCOVIER & MOLLARET 1984, ROBERTS 1985, RÜBSAMEN & WEIS 1985). Um geringe Bakterienmengen im Gewebe nachweisen zu können, sollte auch eine Voranreicherung in Nährbouillon (TSB- Tryptose-Soja-Bouillon bzw. CASO-Bouillon) für 48 h bei 18°C durchgeführt werden (DALY & STEVENSON 1985).

Nach 24-48 h Bebrütung bei 22-25°C wachsen auf festen Nährböden 1-1,5 mm große, runde, glatte, glänzende, leicht erhabene Kolonien von blasser, braungelber Farbe (ROBERTS 1985, RÜBSAMEN & WEIS 1985). Für die endgültige Diagnose müssen die biochemischen Eigenschaften (siehe Tabelle 2.2.2) bestimmt werden (ROBERTS 1983, STEVENSON & AIRDRIE 1984, AUSTIN & AUSTIN 1987, DAVIES & FRERICHS 1989). Hierzu kann

beispielsweise der Identifizierungskit API 20E verwendet werden (SANTOS et al. 1993). Mit diesem Testkit kann allerdings *Y. ruckeri* nicht von nahe verwandten Spezies wie *Hafnia alvei* unterschieden werden, was eventuell weitere Untersuchungen nötig macht.

Es wurde versucht, Selektivmedien für die Diagnose von *Y. ruckeri* zu entwickeln (WALTMAN & SHOTTS 1984, RODGERS 1992). Der Nachteil bei diesen Medien ist allerdings, dass es neben der erwünschten Reduktion von anderen Bakterien auch zu einem verminderten Wachstum von *Y. ruckeri* kommen kann. Nur einige Isolate haben die für den Shotts-Waltman-Nährboden benötigte Fähigkeit, Tween 80 zu hydrolisieren (AUSTIN & AUSTIN 1993). In bestimmten geographischen Gebieten treten aber hauptsächlich unbewegliche Stämme auf, die nicht zur Tween-80-Hydrolyse befähigt sind (DAVIES & FRERICHS 1989). Dadurch ist die Verwendbarkeit dieses Mediums eingeschränkt.

Von FURONES et al. wurde 1993 ein weiteres Medium entwickelt, das die Unterscheidung zwischen virulenten und nicht-virulenten Yersinien-Stämmen anhand eines Virulenzfaktors ermöglicht (siehe auch 3. Eigene Untersuchungen).

Bei symptomlosen Carriern ist der bakterielle Nachweis durch Anzucht aus dem Gewebe erschwert, da bei 50-70 % dieser Tiere *Y. ruckeri* ausschließlich aus den hinteren Darmabschnitten isoliert werden kann (BUSCH & LINGG 1975).

2.3.7.2 PCR

Es wurden in den letzten Jahren einige Methoden entwickelt und verbessert, um *Y. ruckeri* mittels PCR in sehr geringer Anzahl nachzuweisen (ARGENTON et al. 1996, GIBELLO et al. 1999, LEJEUNE & RURANGIRWA 2000, TEMPRANO et al. 2001, COQUET et al. 2002, DEL CERRO et al. 2002, WILSON & CARSON 2003).

Es ist mittlerweile nicht nur möglich, den Erreger in verschiedenen Organen nachzuweisen, sondern auch im Blut infizierter Fische (ALTINOK et al. 2001). Dies bietet die Möglichkeit, die Krankheit zu diagnostizieren, ohne den Fisch töten zu müssen.

2.3.7.3 Serologischer Nachweis

Y. ruckeri kann auch mittels ELISA (EWALDSSON 1990), Agglutination (Objektträger-agglutination, Indirekte Hämagglutination, inerte Partikel-Agglutination) (HANSEN & LINGG 1976, MAYR et al. 1977, SEELIGER 1978) und Immunofluoreszenzfärbung (COONS et al. 1941, RIGGS & BROWN 1961) nachgewiesen werden.

2.3.8 Therapie, Prophylaxe

Bei Ausbruch der Erkrankung kann eine Behandlung mit Antibiotika wie Oxitetracyclin, Erythromycin, Quinolon und potenzierten Sulfonamiden (CESCHIA et al. 1987, BULLOCK et al. 1983) mit guten Erfolgen durchgeführt werden. Bei hohem Infektionsdruck sollte sich eine Vakzinierung anschließen, da sonst Wiederholungsausbrüche auftreten.

Um einem Ausbruch von Rotmaulseuche vorzubeugen, sollten krankheitsbegünstigende Faktoren, wie hohe Besatzdichte und schlechte Wasserqualität, möglichst vermieden werden. Durch Spuren von Chemikalien oder durch im Wasser gelöstes organisches Material in Verbindung mit hohen Wassertemperaturen und infolgedessen niedrigem Sauerstoffgehalt können Krankheitsausbrüche auch bei normaler Besatzdichte provoziert werden (BULLOCK & SNIESZKO 1975, KNITTEL 1981). Sauerstoffgehalt und Wassertemperatur sollten daher besonders in Gebieten, in denen die Yersiniose endemisch vorkommt, täglich überprüft werden. Durch niedrige Besatzdichte, Vermeidung von Stress (auch beim Handling), Behandlung des Wassers (LILTVED et al. 1995, LILTVED & LUNDVALD 1996) und Vakzination (BRUNO & MUNRO 1989, RODGERS 1991) kann das Risiko eines Krankheitsausbruches gering gehalten werden. ROSS & SMITH (1972) schlagen zur Abtötung des Bakteriums auf Fischeiern eine 5-minütige Behandlung mit Jodlösung (25 ppm) vor. BLAZER & WOLKE (1984) führten Versuche mit Vitamin-supplementiertem Futter bei Regenbogenforellen durch und fanden heraus, dass die Verabreichung von Vitamin C und E mit dem Futter die Immunantwort der Fische auf *Y. ruckeri* verstärkte.

Die Rotmaulseuche ist eine der ersten Fischkrankheiten, für die ein wirksamer kommerzieller Impfstoff entwickelt wurde (BUSCH 1978, COSSARINI-DUNIER 1986). Die Impfung stellt eine effektive Methode zur Eindämmung der Krankheit dar. Die durch die Krankheit verursachten Verluste und die Verwendung von Antibiotika zur Behandlung können so verringert werden (AMEND & ESHENOUR 1980). Wenn die Fische allerdings unter schlechten Hygienebedingungen gehalten werden, kann die Krankheit auch bei geimpften Tieren ausbrechen (AUSTIN & AUSTIN 1989).

2.4 Virale hämorrhagische Septikämie – VHS

2.4.1 Einleitung

Erstmals beschrieben wurde die VHS unter dem Namen „Nierenschwellung“ (SCHÄPERCLAUS 1938). SCHÄPERCLAUS vermutete ein Virus als Krankheitsursache. Er konnte den Erreger zwar nicht nachweisen, aber es gelang ihm 1941, die Krankheit mittels zellfreier Suspensionen aus dem Gewebe erkrankter Fische auf gesunde Regenbogenforellen zu übertragen (zitiert nach AMLACHER 1992).

Den Beweis dafür, dass es sich beim Erreger der VHS um ein Virus handelt, erbrachte JENSEN (1965), der das Virus erstmals isolierte. ZWILLENBERG et al. (1965) stellten den Erreger erstmals elektronenmikroskopisch dar.

Bevor die Ätiologie des Erregers genau geklärt wurde, war die Krankheit unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt – „Infektiöse Nierenschwellung und Leberdegeneration der Forellen“ (SCHÄPERCLAUS 1954), „Bauchwassersucht der Forellen“ (HEUSCHMANN 1952, LIEBMANN 1956), „Forellenseuche (TACK 1957), „Virusseuche“ bzw. „Egtved-Krankheit“ (RASMUSSEN 1965) – bis 1966 vom Office Internationale des Epizooties (OIE) der Name VHS empfohlen wurde.

In der BRD ist die VHS seit dem 27.03.1995 anzeigepflichtig. Innerhalb der EU gelten verschiedene Rechtsvorschriften zum Umgang mit der Krankheit:

- Richtlinie 91/67/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur, zuletzt geändert durch RL 98/45/EG (ABl. Nr. L 189 v. 03.07.98 S. 12)
- Entscheidung 2001/183/EG der Kommission vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG
- Richtlinie des Rates vom 24. Juni 1993 zur Festlegung von Mindestmaßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung bestimmter Fischseuchen 93/53/EWG (EG ABl. Nr. L 175, 19.07.1993, S.23, zuletzt geändert durch EK 2001/288/EG (EG ABl. Nr. L 99, 10.04.2001, S. 11)

In Deutschland werden diese Richtlinien durch folgende Verordnungen und Gesetze umgesetzt:

- Verordnung zum Schutz gegen Süßwasserfisch-Seuchen, Muschelkrankheiten und zur Schaffung seuchenfreier Fischhaltungsbetriebe und Gebiete (**Fischseuchen-Verordnung**) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Mai 2001, BGBl I S. 937, zuletzt geändert durch Artikel 46 des Gesetzes vom 21. August 2002, BGBl. I S. 3322
- **Tierseuchengesetz** (TierSG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Dezember 1995 (BGBl. I S. 2038), geändert durch Art. 2 § 24 G v. 22. Dezember 1997 (BGBl. I S. 3224).
- Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (**Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung - BmTierSSchV**) in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. August 1999 (BGBl. I S. 1820), zuletzt geändert durch Artikel 5, § 5 des Gesetzes zur Neuorganisation des gesundheitlichen Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit vom 6. August 2002 (BGBl I. S. 3082)
- **Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen** in der Fassung vom 11. April 2001 (BGBl. I S. 547)

2.4.2 Verbreitung, Vorkommen und Wirtsspektrum

In Europa ist die VHS zusammen mit der IHN (Infektiöse Hämatopoetische Nekrose) die Viruserkrankung mit der größten Bedeutung für die Regenbogenforellenzucht. Das Virus wurde in den meisten Ländern Kontinentaleuropas einschließlich der Britischen Inseln isoliert (WOLF 1988, ROSS et al. 1994). Besonders empfänglich sind Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), aber auch in Bachforellen (*Salmo trutta fario*), Äschen (*Thymallus thymallus*) und Hechten (*Esox lucius*) wurde das Virus nachgewiesen. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Verbreitung der VHS, da eine Infektion bei diesen Arten nicht zwangsläufig zum Krankheitsausbruch führt und die inapparente persistierende Infektion von Wildfischen eine besondere Gefahr für die Forellenzucht darstellt (DE KINKELIN & LE BERRE 1977, WIZIGMANN et al. 1980, MEIER & JØRGENSEN 1980, KONRAD & ENZMANN 1987).

Bis 1987 galt die VHS als eine kontinentale europäische Erkrankung der Süßwasserfische. Es wurde zwar von 2 Fällen bei in Meerwasser gehälterten Regenbogenforellen berichtet (CASTRIC & DE KINKELIN 1980, HORLYCK et al. 1984), bei diesen Ausbrüchen handelte es sich aber um Fische, die ursprünglich aus VHS-betroffenen Gebieten im Inland stammten. Diese anerkannte Epidemiologie änderte sich, als bewiesen wurde (JØRGENSEN & OLESEN 1987), dass ein Rhabdovirus, welches acht Jahre zuvor aus Kabeljau (*Gadus morhua*) aus dem baltischen Meer isoliert wurde (JENSEN et al. 1979), vom VHS-Virus nicht zu unterscheiden war. Seither wurde das VHS-Virus in vielen Fischarten aus den pazifischen nordwestlichen Küstenregionen der USA und dem Nord-Atlantik nachgewiesen (CASTRIC et al. 1992, ROSS et al. 1994, MEYERS & WINTON 1995, MORTENSEN et al. 1999). Die ersten amerikanischen VHS-Isolate wurden 1988 im westlichen Nordamerika aus Königslachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) gewonnen (BRUNSON et al. 1989, WINTON et al. 1989). In den letzten Jahren wurde immer wieder über die Isolierung des Virus aus einer zunehmenden Anzahl von Meeresfischarten (Tabelle 6) und geographischen Gebieten berichtet: Oregon und Kalifornien, USA (HEDRICK et al. 2003a), Kanada (TRAXLER et al. 1999), Frankreich (THIÉRY et al. 2002), Norwegen (BRUDERSETH & EVENSEN 2002), Nordsee, Nordost-Atlantik und Irische See (SMAIL 2000, KING et al. 2001a), Japan (ISSHIKI et al. 2001). Dies führte zu der Annahme, dass die VHS vornehmlich endemisch in Meeresfischen und anadromen Fischen vorkommt, sich aber im Süßwasser unter gezüchteten Salmoniden etablieren konnte (WINTON & EINER-JENSEN 2002).

Bis Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts stützte sich die Einteilung der europäischen VHS-Isolate nur auf serologische Untersuchungen. Es wurden 3 Serotypen unterschieden:

- **Serotyp 1, F1, Egtved I** (JØRGENSEN 1972) als der am weitesten verbreitete Subtyp, der für rund 90 % der Krankheitsausbrüche verantwortlich war
- **Serotyp 2, He, Egtved II** (JØRGENSEN 1972) mit Vorkommen vor allem in Dänemark
- **Serotyp 3, Isolat 23.75** (DE KINKELIN & LE BERRE 1977) mit Vorkommen vor allem in Frankreich

Tabelle 6: Beispiele für Meeresfischarten, aus denen das VHS-Virus in den letzten Jahren isoliert wurde

Kabeljau (Atlantic cod)	<i>Gadus morhua</i>	SMAIL (2000), MORTENSEN et al. (1999)
Hering (Atlantic herring)	<i>Clupea harengus</i>	DIXON et al. (1997), MORTENSEN et al. (1999)
Schellfisch (Haddock)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	SMAIL (2000)
Stintdorsch (Norway pout)	<i>Trisopterus esmarkii</i>	MORTENSEN et al. (1999)
Seequappe (Rockling)	<i>Rhinonemus cimbrius</i>	
Wittling, Weißling (Whiting)	<i>Merlangius merlangus</i>	
Blauer Wittling (Blue whiting)	<i>Micromesistius poutassou</i>	
Pazifischer Hering (Pacific herring)	<i>Clupea harengus pallasii</i>	MEYERS & WINTON (1995)
Kabeljau (Pacific cod)	<i>Gadus macrocephalus</i>	MEYERS et al. (1992)
Königslachs (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	BRUNSON et al. (1989), HOPPER (1989)
Silberlachs (Coho salmon)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	
Südamerikanische Sardine (Pilchard)	<i>Sardinops sagax</i>	TRAXLER et al. (1999)
Schwertfisch (Blackcod)	<i>Anoplopoma fimbria</i>	
Seehecht (Pacific hake)	<i>Merluccius productus</i>	MEYERS et al. (1999)
Pazifischer Pollack (Walleye pollock)	<i>Theragra chalcogramma</i>	
Japanischer Butt (Japanese flounder)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	TAKANO et al. (2000)
Makrele (Pacific mackerel)	<i>Scomber japonicus</i>	HEDRICK et al. (2003a)

Phylogenetische Untersuchungen der Nukleotidsequenz des G-Gens von VHS-Isolaten aus Süß- und Salzwasserfischen in zwei voneinander unabhängigen Studien führten zu einer Einteilung in die Genotypen I, II und III (BENMANSOUR et al. 1997, STONE et al. 1997).

Nach STONE gehören amerikanische Isolate aus Meeresfischen zur Gruppe I, schottische Isolate aus Meeresfischen zur Gruppe II und die klassischen europäischen Isolate aus Süß-

und Salzwasserfischen zur Gruppe III. BENMANSOUR wählte die umgekehrte Reihenfolge, indem er die europäischen Isolate zur Gruppe I, die der britischen Inseln zur Gruppe II und die amerikanischen zur Gruppe III zusammenfasste.

Es wird angenommen, dass die Differenzierung in die drei Genotypen schon sehr früh stattfand, lange bevor mit der extensiven Fischwirtschaft begonnen wurde (BENMANSOUR et al. 1997).

Obwohl die VHS schon seit den 30er-Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben wird, wurde der Genotyp III erstmals in den 60ern aus Süßwasserfisch und in den späten 70ern aus Meeresfisch isoliert. Die Genotypen I und II wurden erst in den späten 80er-Jahren gefunden, weil sie für Salmoniden nicht virulent sind (CASTRIC & DE KINKELIN 1980, DIXON et al. 1997, KOCAN et al. 1997). STONE et al. (1997) vermuten, dass alle marinen Fischarten potentielle VHS-Carrier sind, da das Virus häufig aus verschiedenen Atlantik- und Pazifikfischen isoliert wurde. Diese Aussage bekräftigt die Theorie, dass die Virale Hämorrhagische Septikämie ihren Ursprung im Meer haben könnte (SMAIL 1999).

2.4.3 Ätiologie

Das VHS-Virus gehört zur Familie Rhabdoviridae (LENOIR & DE KINKELIN 1975), Genus Novirhabdovirus (VAN REGENMORTEL et al. 2000). Es ist ein behülltes RNA-Virus mit einer durchschnittlichen Länge von 180 nm und einem Durchmesser von rund 60 nm (ZWILLENBERG et al. 1965). Das Virusgenom besteht aus einem nicht-segmentierten einzelsträngigen RNA-Molekül in Negativstrang-Orientierung mit 11158 Nukleotiden. Das Genom wurde vollständig entschlüsselt und enthält den Code für 5 Strukturproteine: das **Nucleoprotein N**, das **Phosphoprotein P**, das **Matrix-Protein M**, das **Glykoprotein G**, die **Polymerase L**. Außerdem enthält es den Code für ein zusätzliches **Nicht-Virion-Protein NV**. Die Reihenfolge der codierten Proteine ist 3'-N-P-M-G-NV-L-5' (SCHÜTZE et al. 1999). Das Nicht-Virion-Protein NV kommt auch bei IHNV und dem Hirame Rhabdovirus beim Japanischen Butt vor und führte zur Einordnung dieser 3 Viren zum neu geschaffenen Genus Novirhabdovirus (VAN REGENMORTEL et al. 2000).

2.4.4 Pathogenese

Die Infektion mit VHS ist temperaturabhängig. Wassertemperaturen von 9-12°C sind für die Virusvermehrung im Fisch am günstigsten, bei Temperaturen über 15°C wird das Wachstum des Virus gehemmt und es treten in der Regel keine Krankheitsausbrüche mehr auf (VESTERGARD JØRGENSEN 1982).

Bei 8-10 °C Wassertemperatur ist die Mortalität am höchsten, und es treten vor allem bei den besonders empfänglichen Brütlingen und Jungfischen Verluste bis zu 100 % auf (LIVERSIDGE et al. 1985). Die Inkubationszeit beträgt bei einer Temperatur von 8-10 °C durchschnittlich 7 Tage (NEUKIRCH 1984).

Eintrittspforten und Orte der frühen Virusvermehrung sind die Kiemen (NEUKIRCH 1984, 1985), die Haut (YAMAMOTO et al. 1990) und die Flossen (QUILLET et al. 2001). Die Zielorgane für VHS sind hämatopoetisches Nieren- und Milzgewebe, in späteren Stadien der Erkrankung sind jedoch die meisten Organe und Gewebe befallen (DE KINKELIN et al. 1979, MEIER & PFISTER 1981, NEUKIRCH 1986). Die Endothelzellen der Niere als erstes betroffenes inneres Organ sind schon 1-3 Tage nach Erregerexposition infiziert, und im weiteren Verlauf breitet sich das Virus in das Interstitium aus und infiziert Leukozyten und Makrophagen /Melanomakrophagen. Es wird angenommen, dass Makrophagen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Virusvermehrung darstellen (BRUDERSETH et al. 2002). Auch in chronisch infizierten, symptomfreien Regenbogenforellen konnten VHS-befallene Makrophagen in der Milz gefunden werden (EVENSEN & OLESEN 1997), ohne dass Anzeichen für Zelldegeneration oder Nekrosen vorhanden waren.

Die Leber scheint kein primäres Zielorgan für das Virus zu sein, sie ist erst im späteren Verlauf der Infektion betroffen. Das Virus kann für gewöhnlich ab dem 5. Tag p.i. im Lebergewebe nachgewiesen werden, wo es typische multifokale Nekrosen verursacht. Die Endothelzellen, welche die Sinusoide auskleiden, werden allerdings interessanterweise nicht befallen, vielleicht deswegen, weil diesen Zellen ein Rezeptor für das Virus fehlt (BRUDERSETH et al. 2002).

Die Übertragung der VHS erfolgt durch Kontakt mit infizierten Fischen oder durch kontaminiertes Wasser, Gerätschaften etc. bei einer Wassertemperatur von 1-12°C, höchstens aber 15°C (VESTERGARD JØRGENSEN 1973). Die orale Übertragung durch Verfütterung infizierter Fische ist möglich (AHNE 1980b), die vertikale über das Ei dagegen ist extrem

selten oder kommt gar nicht vor (VESTERGARD JØRGENSEN 1970). Auf der Ei-Oberfläche kann das Virus allerdings anhaften und so verbreitet werden. Die Passage durch den Darmtrakt eines Vogels übersteht das VHS-Virus nicht, aber von piscivoren Vögeln regurgitierte Fische können ebenfalls zur Virusausbreitung beitragen (PETERS & NEUKIRCH 1986).

Fische, welche die Erkrankung überleben, können zu asymptomatischen Trägern werden. Sie scheiden das Virus mit dem Urin (NEUKIRCH 1985) und weiblichen Geschlechtsprodukten, nicht aber mit Fäzes oder Samenflüssigkeit aus (VESTERGARD JØRGENSEN 1970). Bei inapparent infizierten Fischen gelingt der Virusnachweis am besten während der Laichzeit und bei niedrigen Wassertemperaturen (VESTERGARD JØRGENSEN 1982b).

2.4.5 Klinik und Pathologie

Die Infektion führt zu einer Virämie mit nachfolgender Zerstörung innerer Organe, Beeinträchtigung des osmotischen Gleichgewichts, Ödemen und Hämorrhagien (WOLF 1988). Erkrankte Tiere sind sichtbar dunkler als gesunde, sie haben blasse Kiemen und meist Exophthalmus (SMAIL 1999).

Nach GHITTINO (1965) ist der Verlauf der Krankheit in drei Phasen einteilbar:

In der ersten, akuten Phase kommt es zu den größten Verlusten. Die Fische sind apathisch („Randsteher“), es treten Dunkelfärbung der Haut, Exophthalmus und Hämorrhagien in der Haut auf. Die Hautblutungen sind vor allem an den Ansätzen der paarigen Flossen und als periokuläre Blutungen zu sehen. Die Kiemen sind blass und zeigen oft ebenfalls Blutungen (punkt- bis streifenförmig).

Pathologisch-anatomisch sind punkt-, kommaförmige und flächenhafte Blutungen in der Muskulatur, im Fettgewebe, in den Organen und auf der Schwimmblase zu sehen.

Zum Teil sterben die Fische auch perakut, ohne dass Symptome vorhanden sind (LIVERSIDGE et al. 1985).

In der zweiten, subakuten bis chronischen Phase sinken die Verluste. Dunkelfärbung und Exophthalmus treten verstärkt auf, die Fische drehen sich zum Teil um die Längsachse („Blitzen“). Durch die zunehmende Anämie sind die Kiemen grauweiß, Hämorrhagien treten nur noch selten auf.

Pathologisch-anatomisch ist die allgemeine Anämie auffällig. Vor allem die Leber ist meist sehr blass und zum Teil mit Blutergüssen übersät. In der Muskulatur und den anderen inneren Organen sind jedoch nur noch selten Blutungen makroskopisch sichtbar.

Während der dritten Phase, der nervösen Endphase, gehen die genannten Symptome immer weiter zurück, die blitzartigen Schwimmbewegungen um die Längsachse können jedoch zunehmen. Bei der Sektion wird gelegentlich eine auffällig geschwollene und grau verfärbte Niere gefunden (LIVERSIDGE et al. 1985).

Der Krankheitsverlauf ist nicht immer in diese drei Phasen einteilbar, es gibt auch fließende Übergänge zwischen den einzelnen Stadien.

Fische, die die Krankheit überleben und keine Anzeichen einer Erkrankung zeigen, müssen als potentiell persistent infiziert betrachtet werden. Sie stellen ein signifikantes Infektionsrisiko dar, obwohl eine Virusisolierung aus solchen Carrierfischen nur selten erfolgreich ist (LIVERSIDGE et al. 1985).

2.4.6 Histopathologie

Die VHS ist eine endotheliotrope Virusinfektion, die eine hämorrhagische Diathese verursacht. Die degenerativen Veränderungen treten vor allem in Leber, Niere, Milz und Muskulatur auf und reichen von anfänglichen Kernpyknosen und Karyorrhesis bis zu flächenhaften Nekrosen bevorzugt in hämatopoetischen Geweben (HOFFMANN et al. 1979, AMLACHER et al. 1980).

In den Kiemen treten vermehrt vakuolisierte Epithelien (3.-14. Tag p.i.) und Melanomakrophagen (4.-8. Tag p.i.) auf, aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit des Gewebes jedoch keine tiefgreifenden nekrotischen Veränderungen (WIZIGMANN & HOFFMANN 1982).

Im hämatopoetischen Gewebe der Kopfniere treten schon ab dem 2. Tag nach der Infektion hydropische Schwellung und vakuolige Degeneration der Sinusendothelien auf, ab dem 6. Tag Nekrobiosen der Endothelien großer Blutgefäße. Das Parenchym wird bis auf wenige Bezirke reduziert. Erste Regenerationsvorgänge im Gewebe werden ab dem 16. Tag p.i. als Areale mit dicht gedrängten Hämozytoblasten sichtbar, und es findet eine diffuse Vermehrung von pigmenthaltigen Makrophagen statt (HOFFMANN et al. 1979).

Im sekretorischen Teil der Niere werden nur teilweise Degenerationen des Tubulusepithels (ab dem 7. Tag p.i.) gefunden (HOFFMANN et al. 1979).

Auch in der Milz sind von den degenerativen Veränderungen zunächst die Sinusendothelien und die Gefäßwände vor allem der Arteriolen betroffen. Infolge der aufgelockerten Gefäßwandstruktur treten perivaskuläre Ödeme auf. Ab dem 9. Tag p.i. breiten sich die Nekrosen auf die periarteriolen Retikulumzellen aus, bis schließlich ab dem 13. Tag p.i. die weiße Milzpulpa bis auf ein retikuläres Gefäßgerüst reduziert ist. Die Lymphozytenzahl ist stark reduziert, die verbleibenden Zwischenräume sind mit Erythrozyten gefüllt, und ab Tag 16 p.i. treten vermehrt Pigmentmakrophagen auf (HOFFMANN et al. 1979, WIZIGMANN & HOFFMANN 1982).

In der Leber treten zunächst einzelne Pigmentmakrophagen um die Gallengänge herum auf. Ab dem 5. Tag kommt es zu diffus im Parenchym verstreuten fokalen Nekrosen der Hepatozyten. Ab Tag 13 treten periarteriolen Ödeme auf, die sich teilweise auch nach drei Monaten noch nachweisen lassen (HOFFMANN et al. 1979).

Im Herzen kommt es ab dem 4. Tag p.i. zur vakuoligen Degeneration der Endokardzellen (WIZIGMANN und HOFFMANN 1982). Zwischen 7. und 77. Tag p.i. werden teilweise nichteitrig Myokarditiden beobachtet, die herdförmig oder diffus auftreten und zum Teil mit Pigmentmakrophagen durchsetzt sind (HOFFMANN et al. 1979).

Bei den Untersuchungen von HOFFMANN et al (1979) wurden bei experimentell infizierten Regenbogenforellen nur vereinzelt Gliaproliferate im Gehirn gefunden, im Darm wurden keine Veränderungen beobachtet.

Bei symptomlosen Carrierfischen treten auch histopathologisch keine bemerkenswerten Veränderungen auf (zitiert nach MC ALLISTER 1993).

2.4.7 Diagnose

Die VHS ist in der BRD seit dem 27.03.1995 anzeigepflichtig. In der Entscheidung 2001/183/EG (Kommission der Europäischen Gemeinschaften 2001) sind die gesetzlich vorgeschriebenen Methoden zum Virusnachweis aufgeführt:

NT Neutralisationstest (JØRGENSEN 1969 u. 1972)

IFAT Immunfluoreszenz-Antikörpertest (JØRGENSEN 1972, ENZMANN 1981)

ELISA Enzyme linked immunosorbent assay (OLESEN & JØRGENSEN 1991)

Als Probenmaterial sind Milz, Vorderniere und Herz oder Gehirn vorgeschrieben, das Virus kann jedoch auch in anderen inneren Organen, weiblichen Geschlechtsprodukten und im Urin nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren wurden außerdem verschiedene Reverse Transkriptase-PCRs zum Nachweis der VHS-RNA entwickelt (BRUCHHOF et al. 1995, EINER-JENSEN et al. 1995, MILLER et al. 1998, STROMMEN & STONE 1998, GUILLOU et al. 1999, WILLIAMS et al. 1999), die aufgrund ihrer hohen Sensitivität zum Teil auch die Identifizierung symptomfreier Carrierfische ermöglichen.

Differentialdiagnostisch kommen andere Hämorrhagien verursachende Krankheiten wie IHNV und Rotmaulseuche in Frage, die aber mit den oben aufgeführten Diagnosemethoden ausgeschlossen werden können.

2.4.8 Therapie, Prophylaxe

Bisher ist keine effektive Behandlungsmethode für VHS bekannt. Daher besteht der beste Schutz vor Krankheitsausbrüchen in der Prophylaxe. Es muss versucht werden, den Kontakt zwischen Virus und Fisch zu vermeiden. Hierzu ist die Kontrolle des in den Fischbestand einfließenden Wasser unerlässlich. Der Einsatz von UV-C-Strahlung, evtl. in Kombination mit anderen Desinfektionsmitteln, ist weit verbreitet und zur Inaktivierung von VHS-Viren geeignet (ØYE & RIMSTAD 2001).

Es wurden verschiedene Impfstoffe zum Schutz vor VHS entwickelt. Unter experimentellen Bedingungen waren sowohl die Injektion von inaktiviertem VHSV und die Immunisierung über das Wasser mit attenuiertem Lebendvirus (DE KINKELIN 1988) als auch die Verwendung von DNA-Vakzinen (BOUDINOT et al. 1998, LORENZEN et al. 1999, FERNANDEZ-ALONSO et al. 2001) erfolgreich und wirksam. In der BRD gilt ein generelles Impfverbot sowohl für VHS als auch für IHN und ISA (Fischseuchen-Verordnung, Fassung 16.5.2001).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere und Haltung

Für alle Versuche wurden spezifisch-pathogenfreie (SPF) Regenbogenforellen verwendet, ein amerikanischer und ein deutscher Stamm.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Teichzuchten, aus denen die verwendeten Regenbogenforellenstämme bezogen wurden, anonymisiert. Der deutsche Stamm wird im Folgenden als Stamm (H) bezeichnet, der amerikanische als Stamm (T).

Die Fische beider Stämme kamen als Eier im Punktstadium ans Institut. Sie schlüpften im institutseigenen SPF-Raum und wurden dort bis zum Versuchsbeginn in Rinnen bzw. Glasaquarien gehältert.

Während der Versuche wurden die Fische im Labor in 60 l Glasaquarien mit einem Wasserdurchlauf von 1-1,5 l pro Minute und einer Wassertemperatur, die abhängig vom Versuch 9-13°C betrug, gehältert. Das verwendete Wasser durchlief eine Entchlorungsanlage und hatte eine Härte von 16,4°dH.

Die Aquarien und die Rinnen wurden mittels Kieselgurausströmer permanent belüftet.

Die Fische wurden einmal täglich mit handelsüblichem Forellenfutter in einer Menge von ca. 1% des Körpergewichts gefüttert.

3.1.2 Tierversuchsantrag

Die durchgeführten Versuche dieses Dissertationsvorhabens wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 211-2531-37/2001 nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

3.1.3 Infektionserreger

3.1.3.1 *Tetracapsuloides bryosalmonae*

Aufgrund des komplexen Entwicklungszyklus von *Tetracapsuloides bryosalmonae* ist eine Infektion unter Laborbedingungen bisher noch nicht gelungen. Die Erregerexposition erfolgte deshalb in einem Teich, in dem seit Jahren Fische an PKD erkrankten, was einen ausreichenden Kontakt der Versuchsfische mit dem Parasiten erwarten ließ.

3.1.3.2 *Yersinia ruckeri*

Bei dem verwendeten Bakterienstamm handelte es sich um ein Feldisolat aus Bayern (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.).

Die Virulenz des *Y. ruckeri*-Isolates wurde zunächst durch Anzucht auf einem Selektivmedium (FURONES 1993) nachgewiesen.

Bei diesem Selektivnährboden handelt es sich um einen mit Coomassie-Brillantblau (100µg/ml) und Natrium-Dodecyl-Sulfat, SDS (1%) angereicherten TSA-(=CASO-)Agar (VWR international GmbH). Er ermöglicht die Unterscheidung zwischen virulenten und nicht virulenten Stämmen von *Y. ruckeri* durch den Nachweis eines virulenzgebundenen „Heat-Sensitive-Factor“ (HSF). Diejenigen *Y. ruckeri*-Stämme, die diesen HSF-Faktor besitzen (HSF⁺), sind virulent, ihr Wachstum auf dem Selektivagar unterscheidet sich von dem avirulenter Stämme (HSF⁻) wie folgt:

HSF⁺-Stämme wachsen unter Aufnahme von Farbstoff aus dem Nährboden. Sie bilden blaue Kolonien mit hellem Zentrum, der Agar wird durch die wachsenden Bakterien in zunehmendem Maße entfärbt (siehe Abbildung 3 a,c).

HSF⁻-Stämme bilden auf diesem Medium kleine, transparente Kolonien, es tritt keine Farbänderung des Agars auf (siehe Abbildung 3 b,d).

Nach 48 h Bebrütung bei 21°C bildeten sich typische dunkelblaue Kolonien mit cremig-weißem Zentrum, was das Vorhandensein des HSF-Faktors und somit die Virulenz des verwendeten *Y. ruckeri*-Stammes bestätigte.

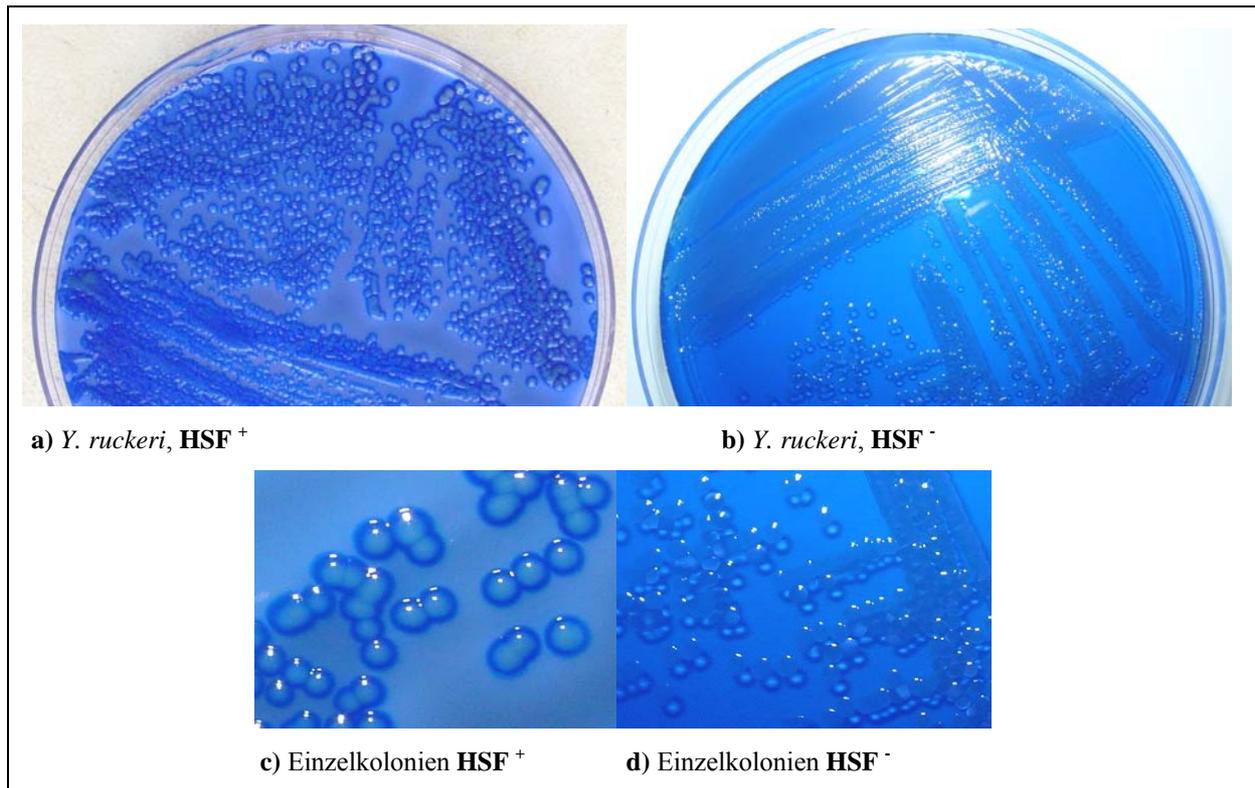


Abbildung 3 Unterschiedliches Wachstum verschiedener *Y. ruckeri*-Stämme auf Selektivnährböden (FURONES 1993). a) und c): HSF-positiver, virulenter *Y. ruckeri*-Stamm; b) und d): HSF-negativer, avirulenter *Y. ruckeri*-Stamm

3.1.3.3 VHS-Virus

Für den Infektionsversuch wurde der VHS-Stamm Fi 13, Serotyp I nach Olesen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV), Insel Riems) verwendet. Das Virus wurde nach Erhalt auf RTG2-Zellen angezüchtet (s. unten), und zur Bestätigung wurden Immunfluoreszenz und PCR durchgeführt.

3.1.3 Zellen für Zellkultur

Für die Anzucht des VHS-Virus und die Auswertung des Versuchs mittels Zellkultur wurden RTG2 (Rainbow Trout Gonad)-Zellen ATCC-Nr. CCL-55 (*Salmo gairdneri*) (Zellbank des Nationalen Referenzlabors in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV), Insel Riems) verwendet. Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 20 °C in MEM-EARLE's Medium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Antibiotikazusatz (Penicillin-Streptomycin) und 1% Hapes-Buffer (1M) (alles Biochrom AG).

3.2 Methoden

3.2.1 Versuche

3.2.1.1 PKD

Der Versuch wurde im Sommer in einem Fischzuchtbetrieb in Nord-Baden-Württemberg durchgeführt, in dem die PKD endemisch vorkommt und seit mehreren Jahren große Verluste verursacht.

Die verwendeten Fische waren bei Versuchsbeginn 6 Monate alt und im Durchschnitt 12 cm groß und 20 g schwer. Jeweils 35 Fische der beiden zu untersuchenden Stämme wurden in diesen Bestand verbracht. Dort wurden die beiden Gruppen in jeweils einem schwimmenden Netzgehege (100 x 50 x 50 cm, Maschenweite 3 mm) in den Teich eingesetzt. Das Maschengewebe ermöglichte den ungehinderten Durchfluß des Teichwassers und damit ausreichenden Kontakt mit den infektiösen Sporen. Die Dauer der Exposition betrug 7 Tage. Anschließend wurden die Fische ins Labor zurückgebracht und dort für die restliche Versuchsdauer bei einer Wassertemperatur von 13°C in Glasaquarien mit Durchlauf gehältert. Einschließlich der Expositionsdauer betrug die Gesamtdauer des Versuches 120 Tage.

Während dieser Zeit wurden die Fische täglich auf äußerliche Krankheitszeichen – wie Dunkelverfärbung, aufgetriebenes Abdomen und Exophthalmus – untersucht.

4, 6 und 8 Wochen nach Expositionsbeginn und danach weiterhin wöchentlich wurden je 2 Fische jeder Gruppe getötet und seziiert. Symptome wurden schriftlich festgehalten und es wurden Proben von Leber, Niere und Milz für PCR und Histologie entnommen. Mit den bei Versuchsende noch vorhandenen Fischen wurde ebenso verfahren.

3.2.1.2 Rotmaulseuche

Für den Versuch wurden für jede der 3 Bakteriendosen 20 Regenbogenforellen beider Stämme verwendet, die bei Versuchsbeginn 6 Monate alt und durchschnittlich 9,5 cm groß und 11g schwer waren. Die Kontrollgruppe bestand aus jeweils 5 Tieren beider Forellenstämme.

3.2.1.2.1 Erregeranzucht und Herstellung der Injektionslösung

Die Bakterien wurden auf Standard-I-Agar (Merck) bei einer Temperatur von 21 °C für 48 h bebrütet und anschließend mit steriler physiologischer Kochsalzlösung von den Platten abgewaschen.

Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Die Bakterienzahl wurde dann mit Hilfe einer speziell für *Yersinia ruckeri* angefertigten Messwerttabelle (ANDERSON 1988) bestimmt. Aus dieser Suspension wurden durch Verdünnen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung Bakteriensuspensionen mit Keimdichten von 2×10^7 (Dosis1), 2×10^6 (Dosis2) und 2×10^5 (Dosis3) koloniebildende Einheiten/ml (kbE/ml) hergestellt.

Um die Injektionslösung für die Fische der Kontrollgruppe herzustellen, wurden unbeimpfte Standard-I-Nährböden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült.

3.2.1.2.2 Erregerexposition

Die Erregerexposition erfolgte über intraperitoneale Injektion einer Bakteriensuspension. Die Fische erhielten in den letzten 24 h vor Versuchsbeginn kein Futter mehr. Beide Stämme wurden in jeweils 4 Versuchsgruppen (Dosis 1-3 und eine Kontrollgruppe) aufgeteilt.

Nachdem die Tiere im Wasserbad mit 0,007% MS 222 (Tricain-Methan-Sulfat, Thomson&Joseph Ltd.) betäubt worden waren, wurde ihnen 0,05 ml der beschriebenen Bakteriensuspensionen (siehe oben) intraperitoneal injiziert. Dieses Volumen entspricht einer Infektionsdosis von:

Dosis 1: 10^6 Keimen

Dosis 2: 10^5 Keimen

Dosis 3: 10^4 Keimen

Den Fischen der Kontrollgruppe wurde 0,05 ml physiologische Kochsalzlösung (zuvor auf unbeimpften Standard-I-Nährböden geschwenkt) injiziert.

Die Fische wurden für die gesamte Versuchsdauer von 21 Tagen in 60-l Glasaquarien mit Wasserdurchlauf und Belüftung gehalten.

In diesem Zeitraum wurden die Fische täglich auf äußerliche Krankheitszeichen – wie Dunkelverfärbung, Exophthalmus und Blutungen in der Haut und im Auge – untersucht.

Fische mit ausgeprägten Krankheitssymptomen wurden getötet und ebenso wie die akut gestorbenen Fische sezziert. Symptome wurden schriftlich festgehalten und es wurden Proben

von Leber, Niere, Milz und Herz für Bakterienkultur, PCR und Histologie entnommen. Mit den bei Versuchsende noch vorhandenen Fischen wurde ebenso verfahren.

3.2.1.3 VHS

Für den Versuch wurden jeweils 30 Regenbogenforellen beider Stämme verwendet, die bei Versuchsbeginn 5 Monate alt und durchschnittlich 9 cm groß und 10 g schwer waren. Die Kontrollgruppe bestand aus jeweils 10 Tieren beider Forellenstämme.

3.2.1.3.1 Virusvermehrung und Herstellung des Infektionsbades

Das Virus wurde in Zellkulturflaschen (VWR International GmbH, Darmstadt) mit RTG2-Zellen vermehrt. Als Anzuchtmedium diente MEM-EARLE's Medium, angereichert mit Nicht-essentiellen Aminosäuren, Antibiotikazusatz, Hepes-Buffer (je 1%) und fetalem Kälberserum (3%).

Die verwendeten Zellen waren zum Zeitpunkt der Beimpfung ca. 48 h alt und noch nicht vollständig zusammengewachsen. Nach 5 Tagen Inkubation bei einer Temperatur von 15 °C war ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) zu erkennen.

Die Zellkulturflaschen wurden eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu zerstören, die Virussuspension bei 3000 g für 20 min zentrifugiert und der zellfreie Überstand für die Ermittlung der Viruskonzentration durch Titration verwendet. Hierzu wurden eine Verdünnungsreihe der Flüssigkeit angelegt und im 8-fach Ansatz auf 24 h zuvor mit RTG2-Zellen beimpfte 96-Loch-Platten aufgebracht.

Nach fünf Tagen wurde abgelesen, bis zu welcher Verdünnungsstufe ein CPE aufgetreten war. Die Viruskonzentration wurde dann mit Hilfe der Methode nach Spearman und Kaerber (SPAERMAN 1908, KAERBER 1931) berechnet.

3.2.1.3.2 Erregerexposition

Die Fische erhielten in den letzten 24 h vor Versuchsbeginn kein Futter mehr.

Die Erregerexposition erfolgte über ein Wasserbad. Jeweils 30 Fische beider Stämme wurden bei einer Wassertemperatur von 13°C für 1 h in ein 10 l Wasserbad mit einer Erregerkonzentration von 10^4 kulturinfektiösen Dosen/ml (KID_{50}/ml) Wasser gesetzt. Die Kontrollgruppen wurden in 10 l-Wasserbäder ohne Zusatz von Virusmaterial gesetzt. Die

Becken wurden während der gesamten Expositionszeit mit Kieselgurausströmern belüftet. Danach wurden die Fische für die restliche Versuchsdauer von 21 Tagen in 60-l Glasaquarien mit Wasserdurchlauf und Belüftung bei einer Wassertemperatur von 12 °C gehältert.

In diesem Zeitraum wurden die Fische täglich auf äußerliche Krankheitszeichen – wie Dunkelverfärbung, Exophthalmus und petechiale Blutungen in der Haut – untersucht.

Fische mit ausgeprägten Krankheitssymptomen wurden getötet und ebenso wie die akut gestorbenen Fische seziiert. Symptome wurden schriftlich festgehalten und es wurden Proben von Leber, Niere, Milz Herz und Gehirn für Zellkultur, PCR und Histologie entnommen. Mit den bei Versuchsende noch vorhandenen Fischen wurde ebenso verfahren.

3.2.2 Untersuchungsmethoden

3.2.2.1 Klinische Untersuchung

Die Fische wurden während der Versuche täglich auf das Auftreten von visuell ohne Manipulation sichtbaren Krankheitserscheinungen untersucht.

3.2.2.2 Tötung der Fische

Die zu untersuchenden Fische wurden im Tötungsbad mit MS222 (Tricain-Methan-Sulfat, Thomson&Joseph Ltd., T&J House, 119 Plumstead Road, Norwich) in einer Dosierung von 0,1 g/l Wasser getötet.

3.2.2.3 Sektion

Die getöteten/gestorbenen Tiere wurden auf einer Digitalwaage (Sartorius GmbH, Göttingen) gewogen und mit dem Lineal gemessen (Gewicht in g, Gesamtkörperlänge in cm). Es wurden Haut- und Kiemenabstriche angefertigt, makroskopisch sichtbare Veränderungen an der

Körperoberfläche und in der Leibeshöhle festgehalten und Organe für weitere Untersuchungen entnommen:

PKD:	Leber, Niere, Milz
Rotmaulseuche:	Leber, Niere, Milz, Herz, Gehirn, Kiemen, Magen, Darm
VHS:	Leber, Niere, Milz, Herz, Gehirn, Kiemen, Darm

3.2.2.4 Histologische Untersuchung

3.2.2.4.1 Anfertigen der Schnitte

Die entnommenen Organproben wurden für mindestens 24 Stunden in 5%-igem gepufferten Formalin fixiert, danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin (Paraplast®) eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (Firma Reichert-Jung, Gerätetyp 1140) in einer Dicke von 4 µm geschnitten. Die Schnitte wurden getrocknet, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und abschließend mit Eukitt® (Kindler GmbH) eingedeckelt.

3.2.2.4.2 Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss) in 600- bis 1500-facher Vergrößerung.

PKD: Es wurden bei jeder Probe jeweils von Niere, Milz und Leber 15 Gesichtsfelder in 600-facher Vergrößerung ausgewertet. Dies entspricht einer Gesamtfläche von 11 mm². Die Parasitenstadien auf dieser Fläche wurden gezählt und die durchschnittliche Parasitenanzahl zum Entnahmezeitpunkt wurde ermittelt.

3.2.2.5 Bakteriologische Untersuchung

Von den steril entnommenen Organen (Leber, Niere, Milz) wurden mit Einmal-Impfösen (VWR International GmbH, Darmstadt) Ausstriche auf Standard-I-Nährböden und auf CASO-Agar angefertigt. Die Beurteilung erfolgte nach 48 h Bebrütung bei 22°C.

3.2.2.6 PCR

Die Extraktion der Parasiten- und Bakterien-DNA erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden), die Extraktion der Virus-RNA mit dem QIAamp® Viral RNA MiniKit (QIAGEN, Hilden) nach dem jeweiligen beiliegenden Arbeitsprotokoll.

3.2.2.6.1 PKD

Die PCR wurde nach KENT et al. (1998) aus Nierengewebe durchgeführt. Die verwendeten Primer (MWG-Biotech AG, Oligo Production, Ebersberg) sollten ein Amplifikat der Länge von 435 bp ergeben:

PKX5f (CCT ATT CAA TTG AGT AGG AGA)

PKX6r (GGA CCT TAC TCG TTT CCG ACC)

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

- 1.1x Reddy MixTM PCR Master Mix (ABgene, Hamburg) 25 µl
- Primer PKX5f und PKX6r je 20 pmol
- Proben-DNA 1 µl

Das Gemisch wurde mit sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt.

Der Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurde wie folgt programmiert:

- initiale Denaturierung: 94°C für 3 min
- 35 Reaktionszyklen mit jeweils
 - Denaturierung: 94°C für 1 min
 - Annealing: 55°C für 1 min
 - Elongation: 72°C für 1 min
- finale Extension: 72°C für 5 min

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese auf Integrität kontrolliert.

3.2.2.6.2 Rotmaulseuche

Die PCR wurde nach COQUET et al. (2002) aus Milz-, Nieren- und Lebergewebe durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer (MWG-Biotech AG Oligo Production, Ebersberg) sollten ein Amplifikat der Länge von 550 bp ergeben:

YER1 (5'-ACG AAT CAG GCT GTT ACC G-3')

YER2 (5'-TGC CTG TGC CAA TGT TGG C-3')

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

- 1.1x Reddy MixTM PCR Master Mix (ABgene, Hamburg) 25 µl
- Primer YER1 und YER2 je 20 pmol
- Proben-DNA 1 µl

Das Gemisch wurde mit sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt.

Der Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurde wie folgt programmiert:

- initiale Denaturierung: 94°C für 5 min
- 30 Reaktionszyklen mit jeweils
 - Denaturierung: 94°C für 45 sec
 - Annealing: 60°C für 1 min
 - Elongation: 72°C für 1 min
- finale Extension: 72°C für 5 min

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese auf Integrität kontrolliert.

3.2.2.6.3 VHS

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) wurde nach MILLER et al. (1998) durchgeführt. Als Probenmaterial diente der durch Einfrieren, Auftauen und Zentrifugieren gewonnene zellfreie Überstand der beimpften Zellkulturröhrchen (siehe 3.2.2.7 Zellkultur).

Die verwendeten Primer (MWG-Biotech AG, Oligo Production, Ebersberg) sollten Produkte von 1524 bp (RAINBOW TROUT-PCR) bzw. bei 440 bp (nested PCR) ergeben.

Die bei den einzelnen Amplifikationsschritten gebildeten Produkte wurden gelelektrophoretisch auf Integrität untersucht.

RT-PCR:

VG1 (5'-ATG GAA TGG AAC ACT TTT TTC-3') und

VGR (5'-TCA GAC CGT CTG ACT TCT GGA-3') verwendet,

semi-nested PCR:

VD5 (5'-TCC CGC TAT CAG TCA CCA G-3') und

VD3 (5'-TGT GAT CAT GGG TCC TGG TG-3') verwendet

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

RT-PCR:

- | | |
|---|-------------|
| - 1.1x Reddy Mix TM PCR Master Mix (ABgene, Hamburg) | 25µl |
| - Primer VG1 u. VGR je | 20 pmol |
| - Reverse Transcriptsae Blend (ABgene, Hamburg) | 50 U (1 µl) |
| - Proben-RNA | 1 µl |

Das Gemisch wurde mit sterilem destilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt.

nested PCR:

- | | |
|--|---------|
| - Reddy Mix TM PCR Master Mix (ABgene, Hamburg) | 45 µl |
| - Primer VD5 u. VD3 je | 20 pmol |
| - Produkt von RT-PCR | 3µl |

Der Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurde wie folgt programmiert:

RT-PCR:

- reverse Transkription: 42°C für 1 h
- initiale Denaturierung: 95°C für 1 min
- 40 Reaktionszyklen mit jeweils
 - Denaturierung: 95°C für 30 sec
 - Annealing: 52°C für 40 sec
 - Elongation: 72°C für 40 sec
- finale Extension: 72°C für 5 min

nested PCR:

- initiale Denaturierung: 95°C für 1 min
- 25 Reaktionszyklen mit jeweils
 - Denaturierung: 93°C für 30 sec
 - Annealing: 52°C für 40 sec
 - Elongation: 72°C für 40 sec
- finale Extension: 72°C für 5 min

3.2.2.7 Zellkultur

Die verwendeten RTG2-Zellkulturen (Rainbow Trout Gonad Cells; permanente Zell-Linie aus den Gonaden von Regenbogenforellen) waren zum Zeitpunkt der Beimpfung ca. 48 h alt und noch nicht vollständig zusammengewachsen.

Die entnommenen Organe (Leber, Niere, Milz und Gehirn) wurden im Mörser mit sterilem Seesand homogenisiert und mit steriler PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Diese Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand als log₁₀-Verdünnungsstufe für die Beimpfung von Zellkulturröhrchen (VWR International GmbH, Darmstadt) verwendet. Aus der Suspension wurde außerdem eine log₂-Verdünnungsstufe hergestellt. Mit beiden Verdünnungen wurden jeweils 2 Röhrchen mit RTG2- Zellen beimpft (je 0,2 ml).

Die Röhrchen wurden bei 15°C inkubiert und täglich auf das Auftreten eines CPE (Cytopathischer Effekt) kontrolliert.

Wenn kein CPE auftrat, wurde von den Proben eine 2. Passage wiederum in je 2 Röhrchen durchgeführt. Wenn durch die Toxizität des Impfmateri als bereits nach 1-2 Tagen ein starker CPE auftrat, wurde die Beimpfung mit höheren Verdünnungsstufen wiederholt.

3.2.2.8 Immunofluoreszenz

Die infizierten Zellen der Zellkulturröhrchen wurden durch Schütteln mit dem Vortex-Mixer (VWR International GmbH, Darmstadt) oder durch Abkratzen mit einem Spatel abgelöst und durch Zentrifugieren pelletiert. Mit einer Pipette wurden sie auf Objektträger verbracht (beides VWR International GmbH, Darmstadt), 30 min bei 37 °C getrocknet, dann 15 min in Aceton fixiert und nochmals getrocknet (15 min). Anschließend wurden die Objektträger mit

VHS-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern (BFAV, Insel Riems) überschichtet, 1 h bei 37 °C inkubiert, mit PBS gewaschen (3x 5 min), luftgetrocknet und danach mit Fluoreszein-markiertem Ziegen-Anti-Maus-Konjugat (BFAV, Insel Riems) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Objektträger erneut mit PBS gewaschen (3x5 min), mit 50%igem Glycerin-Phosphatpuffer eingedeckelt und bis zur Auswertung bei 4°C gelagert.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop war bei positiven Präparaten an Orten der Virusvermehrung eine leuchtend-grüne Färbung zu sehen.

3.2.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der χ^2 -Test verwendet (explorativ). Mit diesem Test wurden diejenigen Werte untersucht, die sich bei den beiden Stämmen um mehr als 15 % unterschieden, um festzustellen, ob zwischen den Ergebnissen von Stamm H und Stamm T signifikante Unterschiede existieren.

4 ERGEBNISSE

4.1 PKD

Während der Dauer des Versuchs verstarb kein Fisch an den Folgen der Infektion mit *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Es wurden nach 4, 6 und 8 Wochen und danach weiterhin wöchentlich je 2 Fische beider Stämme entnommen und untersucht.

Die insgesamt bei der Sektion gefundenen Symptome und Veränderungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst, das Auftreten der Symptome im zeitlichen Verlauf wird aus Tabelle 8 und 9 ersichtlich.

Symptome wie aufgetriebenes Abdomen, geringgradiger Exophthalmus und Nierenschwellung waren bei beiden Stämmen hauptsächlich in den ersten 12 Wochen p.e. zu beobachten (siehe Abbildung 4, 5). Von den 35 untersuchten Fischen hatten bei Stamm H 15 Tiere (42%) eine gering- bis mittelgradig geschwollene Niere, 11 davon innerhalb der ersten 12 Wochen p.e.. Bei 14/35 Fischen von Stamm H fiel bei der Sektion eine gering- bis mittelgradige Milzschwellung auf (siehe Abbildung 5). Eine geringgradige Auftreibung des Abdomens wurde nur innerhalb der ersten 13 Wochen p.e. beobachtet, ebenso der geringgradige Exophthalmus. Bei Stamm T war bei 16 von 35 Fischen (45,7%) eine Nierenschwellung zu sehen, 10 davon innerhalb der ersten 12 Wochen p.e.. Eine gering- bis mittelgradige Milzschwellung wurde bei 16/35 Fischen beobachtet. Geringgradiger Exophthalmus (3/35) und geringgradig aufgetriebenes Abdomen (9/35) traten (bis auf eine Ausnahme) innerhalb der ersten 12 Wochen p.e. auf.

Tabelle 7 PKD: Übersicht über Symptome und Sektionsbefunde bei den mit *Tetracapsuloides bryosalmonae* infizierten Fischen

Symptome	Stamm H	Stamm T
Niere geschwollen	15/35 (42,9 %)	16/35 (45,7 %)
Milz geschwollen	14/35 (40 %)	11/35 (31,4 %)
Leber blass	11/35 (31,4 %)	7/35 (20 %)
Kiemen blass	10/35 (28,6 %)	8/35 (22,9 %)
Dunkelverfärbung der Haut	8/35 (22,9 %)	10/35 (28,6 %)
Abdomen ggr. aufgetrieben	7/35 (20 %)	9/35 (25,7 %)
ggr. Exophthalmus	3/35 (8,6 %)	3/35 (8,6 %)

Anzahl der Fische mit dem jeweiligen Symptom / Anzahl der infizierten Fische () Prozentsatz



Abbildung 4 Dunkelfärbung der Haut und geringgradig aufgetriebenes Abdomen bei einem frisch getöteten, mit PKD infizierten Fisch (Stamm T) 9 Wochen p.e.

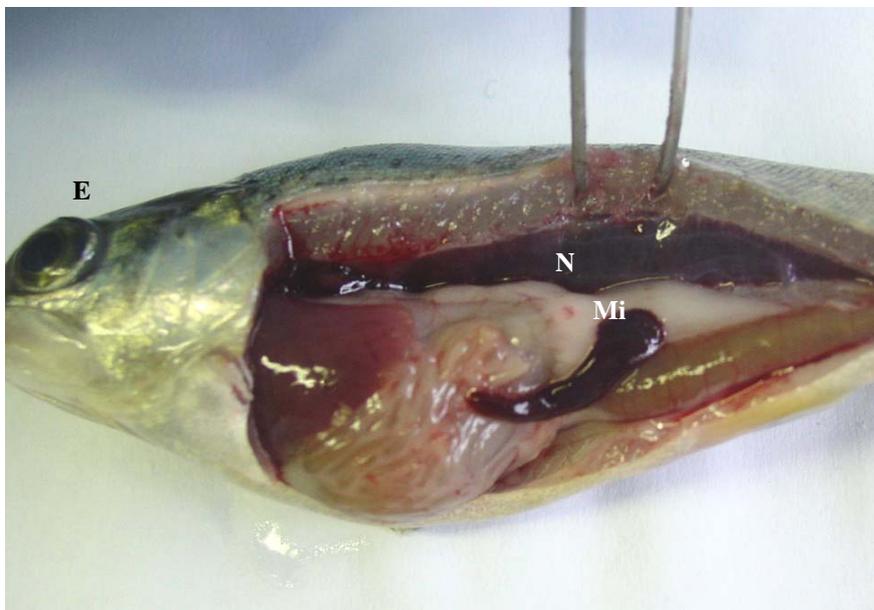


Abbildung 4.1.1 Situs eines frisch getöteten, mit PKD infizierten Fisches (Stamm H) 13 Wochen p.e. Zu sehen sind geringgradiger Exophthalmus (**E**), Milzschwellung (**Mi**) und geringgradige Nierenschwellung (**N**)

Tabelle 8 PKD: Zusammenstellung der Symptome, die bei den Fischen von Stamm H zum Zeitpunkt der Probenentnahme gefunden wurden.

Stamm H Probe Nr.	Probenentnahme (Wochen p.e.)	Nierenschwellung	Milzschwellung	Abdomen aufgetrieben	Leber blass	Kiemeblass	Dunkelverfärbung	Exophthalmus
1	4	+	-	+	-	-	-	-
2		+	-	+	-	-	-	-
3	6	+	+	-	-	-	-	+
4		++	+	+	-	-	-	+
5	8	-	-	-	+	+	-	-
6		+	+	-	+	+	+	-
7	9	+	+	-	-	-	+	-
8		+	+	+	+	+	-	-
9	10	+	+	-	-	-	-	-
10		+	-	-	-	-	+	-
11	11	++	+	-	+	+	-	-
12		-	-	+	+	+	-	-
13	12	-	-	-	-	-	-	-
14		++	++	+	+	-	+	-
15	13	+	++	+	-	+	+	+
16		-	+	-	-	-	-	-
17	14	-	+	-	-	-	-	-
18		+	-	-	+	+	+	-
19	15	-	-	-	-	-	-	-
20		+	-	-	-	-	-	-
21	16	-	-	-	-	-	-	-
22		-	-	-	+	+	-	-
23		-	-	-	-	-	-	-
24		-	-	-	-	-	-	-
25		+	+	-	+	+	+	-
26		-	-	-	-	-	-	-
27		-	-	-	+	+	-	-
28		-	+	-	-	-	-	-
29		-	-	-	+	-	-	-
30		-	-	-	-	-	+	-
31		-	-	-	-	-	-	-
32		-	-	-	-	-	-	-
33		-	-	-	-	-	-	-
34		-	-	-	-	-	-	-
35		-	+	-	-	-	-	-

- = negativ

+ = geringgradig

++ = mittelgradig

Tabelle 9 PKD: Zusammenstellung der Symptome, die bei den Fischen von Stamm T zum Zeitpunkt der Probenentnahme gefunden wurden.

Stamm T Probe Nr.	Probenentnahme (Wochen p.e.)	Nierenschwellung	Milzschwellung	Abdomen aufgetrieben	Leberblass	Kiemerblass	Dunkelverfärbung	Exophthalmus
1	4	+	-	+	+	-	-	-
2		+	-	+	-	-	+	-
3	6	-	-	-	-	-	-	-
4		+	-	-	-	-	-	+
5	8	-	-	+	-	-	-	-
6		+	+	-	+	+	-	-
7	9	++	++	+	+	+	-	+
8		+	-	-	+	+	-	-
9	10	++	+	+	+	+	+	-
10		+	+	+	-	-	-	-
11	11	+	+	+	-	+	-	-
12		-	-	-	-	-	-	-
13	12	-	-	-	-	-	+	-
14		+	+	+	+	+	-	+
15	13	+	-	-	-	-	-	-
16		-	+	-	-	-	+	-
17	14	-	-	-	-	-	-	-
18		+	-	-	-	-	-	-
19	15	-	+	-	-	-	-	-
20		-	+	-	-	-	+	-
21	16	-	-	-	-	-	-	-
22		++	-	+	-	+	+	-
23		-	-	-	-	-	-	-
24		-	-	-	-	+	+	-
25		-	-	-	-	-	-	-
26		+	+	-	-	-	-	+
27		-	-	-	-	-	-	+
28		-	-	-	-	-	-	-
29		-	-	-	-	-	-	-
30		+	+	-	-	-	-	+
31		-	-	-	-	-	-	-
32		-	-	-	-	-	-	-
33		-	-	-	-	-	-	-
34		-	-	-	-	-	-	-
35		+	-	-	-	-	-	+

- = negativ

+ = geringgradig

++ = mittelgradig

Die histologische Auswertung erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten von Niere, Leber und Milz (siehe Abbildung 6). Es wurde die durchschnittliche Anzahl der Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* auf einer Fläche von 11mm² (~15 Gesichtsfeldern in 600-facher Vergrößerung) ermittelt.

Frühe Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* sind rund und haben einen Durchmesser von 5-10 µm. Das Zytoplasma der Parasitenzelle ist in der HE-Färbung eosinophil angefärbt und enthält Granula (siehe Abbildung 6). Spätere Entwicklungsstadien haben einen Durchmesser von bis zu 20 µm und besitzen Sekundär- und Tertiärzellen mit eigener Zellmembran und eigenem Zytoplasma (siehe Abbildung 6 e,f). Als Reaktion auf den Parasitenbefall tritt im Nieren- und Milzgewebe eine hämatopoetische Hyperplasie auf, gefolgt von einer diffusen Entzündungsreaktion um die Parasitenzellen herum. Die Zellen sind oftmals wirbelförmig um die Parasitenstadien angeordnet (siehe Abbildung 6 a) und werden von Kollagenfäden gestützt. Es sind vermehrt Melanomakrophagen und Granulozyten vorhanden.

Wenn die diffuse Entzündungsreaktion sich ausweitet, wird sie makroskopisch als zunehmende Nierenschwellung und graue Flecken im Nierengewebe sichtbar.

In der Milz sind die Veränderungen entsprechend. Das Granulationsgewebe aus Makrophagen, Lymphozyten und Histiocyten befindet sich hauptsächlich in der weißen Milzpulpa und um die Arteriolen herum.

Bei Stamm H wurden die ersten Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* im Niereninterstitium bereits bei der ersten Probenentnahme 4 Wochen p.e. gefunden (siehe Abbildung 6 c). Die Anzahl der Parasitenstadien in der Niere stieg bis zur 11. Woche p.e. an und nahm danach wieder schnell ab. Die ersten negativen Proben wurden 15 Wochen p.e. gefunden. Bei Versuchsende nach 16 Wochen p.e. wurden nur vereinzelt Parasiten gefunden, in 5 Proben waren keine Parasitenstadien auffindbar. Die PCR dieser Proben war allerdings positiv. Die höchsten durchschnittlichen Parasitenzahlen (11 und 15,5) wurden bei Stamm H 9, 10 und 11 Wochen p.e. in der Niere gefunden.

In der Milz wurden Entwicklungsstadien des Parasiten bei Stamm H 9 Wochen p.e. gefunden, danach nur noch in jeweils einer Probe 10 und 12 Wochen p.e (siehe Abbildung 6 d).

Im Lebergewebe wurden keine Parasitenstadien gefunden.

Als Antwort auf den Parasitenbefall wurde bei den infizierten Fischen von Stamm H eine gering- bis mittelgradige Hyperplasie des Niereninterstitiums gesehen. Im Zentrum der Gewebereaktion befanden sich zum Teil Parasitenzellen, die von blastenähnlichen Makrophagen umgeben waren. In der Milz wurden nur vereinzelt Parasitenstadien gefunden, in deren Umgebung eine milde hämatopoetische Hyperplasie zu sehen war (siehe Abbildung 6 d).

Bei Stamm T wurden die ersten Parasitenstadien in der Niere ebenfalls bereits bei der ersten Probenentnahme 4 Wochen p.e. gefunden (siehe Abbildung 6 a,b). Von der 6. bis zur 11. Woche p.e. wurde ein leichter Anstieg beobachtet, danach ging die Anzahl in den Proben zurück. Negative Proben traten in der 14. (2) und in der 15. Woche (1) auf. Zwei dieser Proben waren auch in der PCR negativ. Bei Versuchsende 16 Wochen p.e. konnten in 5 weiteren Proben keine Parasitenzellen gefunden werden, 3 davon waren auch in der PCR negativ. Die höchsten durchschnittlichen Parasitenzahlen (jeweils 4,5) wurden bei Stamm T 8 und 9 Wochen p.e. in der Niere gefunden.

In der Milz kamen die ersten Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* 9 Wochen p.e. vor, danach bei jeweils 10, 12, 15 und 16 Wochen p.e. (siehe Abbildung 6 e,f).

Bei den infizierten Fischen von Stamm T war im hämatopoetische Anteil der Niere eine gering- bis mittelgradig ausgeprägte hyperplastische Gewebereaktion auf die Parasitenstadien zu beobachten, in deren Zentrum sich oft Parasitenzellen befanden. In der Milz wurde in der Umgebung der vereinzelt auftretenden Parasitenstadien eine milde hämatopoetische Hyperplasie gesehen (siehe Abbildung 6 f).

Von den Fischen der Kontrollgruppen wurden ebenfalls histologische Schnitte angefertigt und ausgewertet. Bei keiner der Proben von Stamm H und Stamm T wurden Entwicklungsstadien des Parasiten in den Organen gefunden.

Eine Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Parasitenstadien zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme geben Tabelle 11 und Abbildung 7.

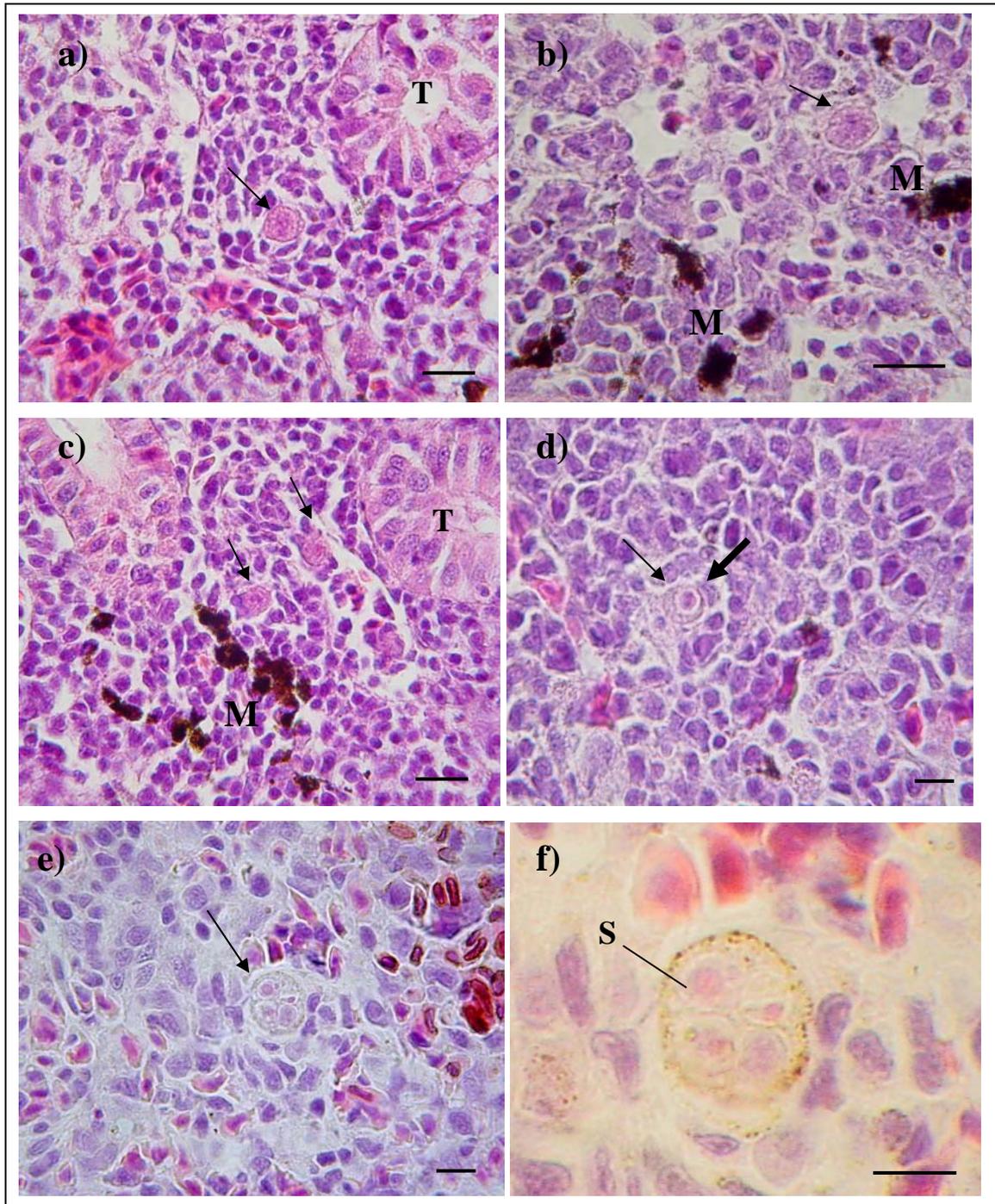


Abbildung 6 Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* in Nieren- und Milzgewebe.

HE-Färbung. Balken = 10 µm → = Parasitenstadien, M = Melanomakrophagen T = Nierentubuli

- a) Niere Stamm T. Entwicklungsstadium von *T. bryosalmonae* (→) im Niereninterstitium, umgeben von Makrophagen und Lymphozyten; wirbelförmige Anordnung der Zellen, gestützt von Kollagenfäden.
- b) Niere Stamm T. Entwicklungsstadium von *T. bryosalmonae* (→) im Niereninterstitium. Vermehrtes Auftreten von Melanomakrophagen (M).
- c) Niere Stamm H. Frühe Entwicklungsstadien (→) des Parasiten im Niereninterstitium. Vermehrtes Auftreten von Melanomakrophagen (M).
- d) Milz Stamm H. Parasitenstadium in Makrophagen im Milzgewebe (dicker Pfeil = Makrophagenkern)
- e) Milz Stamm T spätes Entwicklungsstadium von *T. bryosalmonae* im Milzgewebe, umgeben von Melanomakrophagen.
- f) Ausschnittsvergrößerung des Parasitenstadiums von Bild e). Die Parasitenzelle enthält Sekundärzellen (S).

Tabelle 10 PKD: Ergebnisse der histologischen Untersuchung

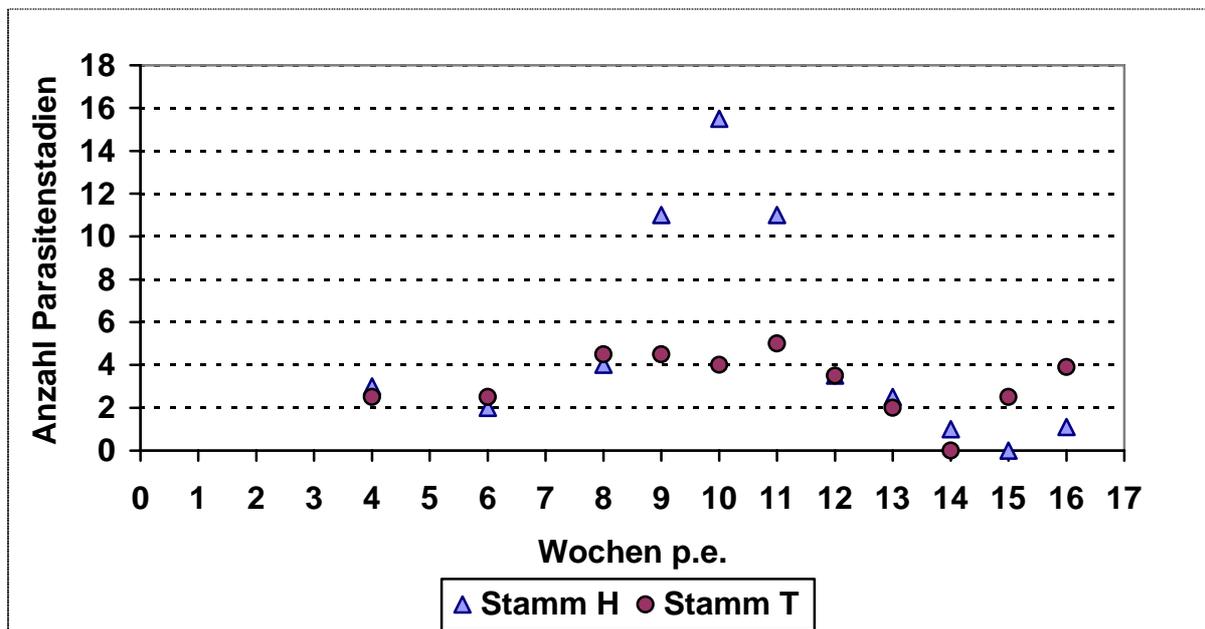
Probe Nr.	Stamm H	Stamm T
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	-
18	+	-
19	-	-
20	-	+
21	+	-
22	+	+
23	+	-
24	+	+
25	-	+
26	-	+
27	+	+
28	+	+
29	+	-
30	+	+
31	-	+
32	-	-
33	-	-
34	+	+
35	+	+
gesamt positiv:	28/35 (80 %)	27/35 (77,14 %)

+ = positiv - = negativ

Tabelle 11 PKD: Ergebnisse der histologischen Untersuchung: Durchschnittliche Anzahl der Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* auf einer Fläche von 11mm² (~15 Gesichtsfeldern in 600-facher Vergrößerung) zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme.

Probenentnahme Wochen p.e.	Stamm H		Stamm T	
	Niere	Milz	Niere	Milz
4	3	–	2,5	–
6	2	–	2,5	–
8	4	–	4,5	–
9	11	2	4,5	1,5
10	15,5	1,5	4	0,5
11	11	–	5	–
12	3,5	2,5	3,5	0,5
13	2,5	–	2	–
14	1	–	–	–
15	–	–	2,5	0,5
16	1,1	–	3,9	0,4

Abbildung 7 PKD: Durchschnittliche Anzahl der Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae*, die zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt in den Gewebeschnitten gefunden wurde



Zur Bestätigung der erfolgten Infektion mit *T. bryosalmonae* wurde von allen Proben eine PCR (Polymerase Chain Reaction) aus Nierengewebe durchgeführt.

Bei 34 der 35 infizierten Fische von Stamm H konnte in der PCR eine Bande mit 435 bp festgestellt werden. Bei dieser Länge ergeben die verwendeten Primer PKD-spezifische Amplifikate (KENT et al. 1998). Dies bedeutet, dass das PCR-Ergebnis der untersuchten Proben positiv für PKD ist (siehe Abbildung 8).

Die Probe des PCR-negativen Fisches wurde 15 Wochen p.e. entnommen.

Bei Stamm T wiesen insgesamt 30 von 35 Fischen in der PCR Banden mit 435 bp auf und waren somit PKD-positiv. Die negativen Proben wurden in der 14. (1), 15. (1) und 16. Woche (3) entnommen (siehe Tabelle 12).

Bei allen Fischen der Kontrollgruppe von Stamm H und Stamm T war das Ergebnis der PCR negativ.

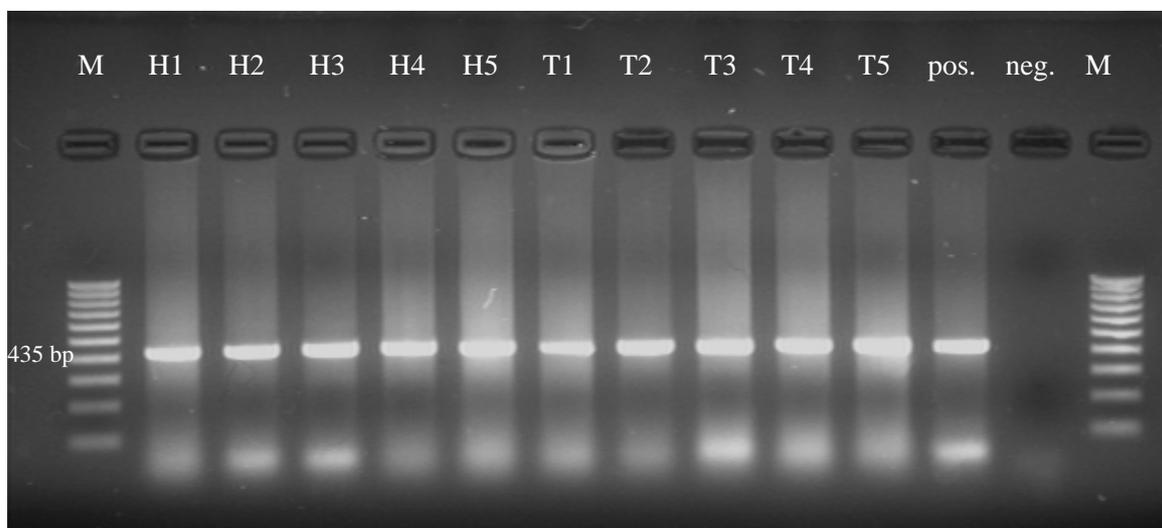


Abbildung 8 Positive PCR-Ergebnisse der ersten 5 entnommenen Proben beider Stämme.

Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel. **M** = Marker, **H1-5** = Proben von Stamm H, **T1-5** = Proben von Stamm T, **pos.** = Positivkontrolle, **neg.** = Negativkontrolle. Zu sehen sind die für den verwendeten Primer spezifischen *T. bryosalmonae*-DNA-Amplifikate als Banden mit einer Länge von 435 bp (Basenpaaren).

Tabelle 12 PKD: PCR-Ergebnisse der PKD-infizierten Fische

Probe Nr.	Stamm H	Stamm T
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	-
19	-	-
20	+	+
21	+	-
22	+	+
23	+	-
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	-
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+
gesamt positiv:	34/35 (97,14%)	30/35 (85,71%)

+ = positiv

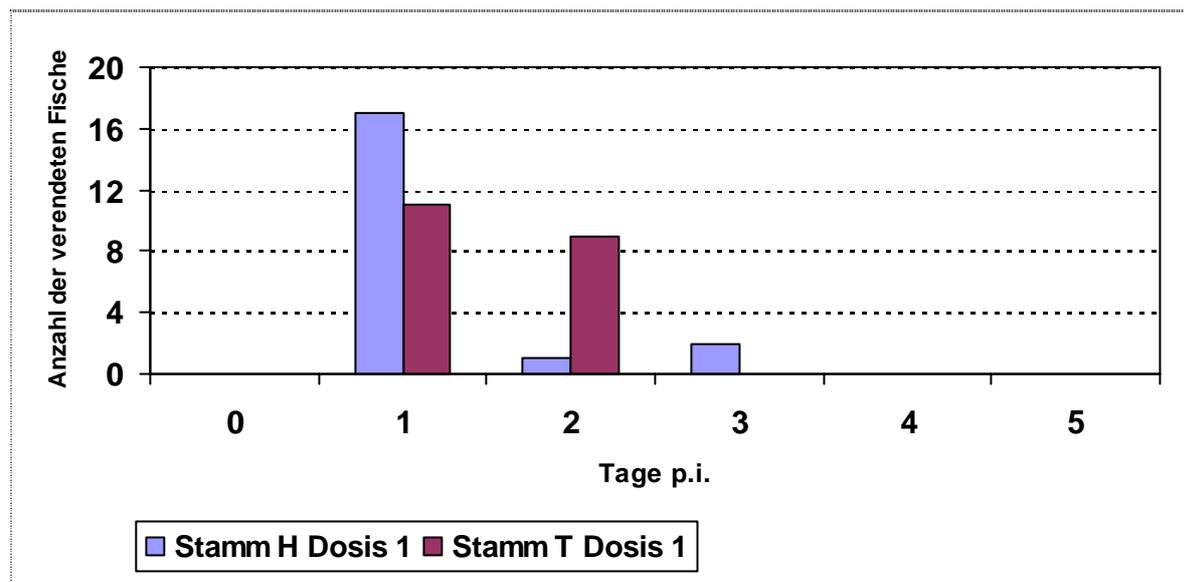
- = negativ

4.2 Rotmaulseuche

Dosis 1 (10^6 kbE/Fisch):

Bereits innerhalb der ersten 24 h p.i. verstarben 17 Fische von Stamm H und 11 Fische von Stamm T perakut. Die übrigen Fische waren lethargisch, nahmen kein Futter auf und starben, zum Teil ohne äußerlich erkennbare Symptome, innerhalb der nächsten beiden Tage. Die Mortalitätsrate betrug somit bei beiden Stämmen 100%. Eine Übersicht über die während des Versuchs aufgetretenen Verluste zeigen Abbildung 9 und Tabelle 13.

Abbildung 9 ERM: Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes gestorben sind - Dosis 1



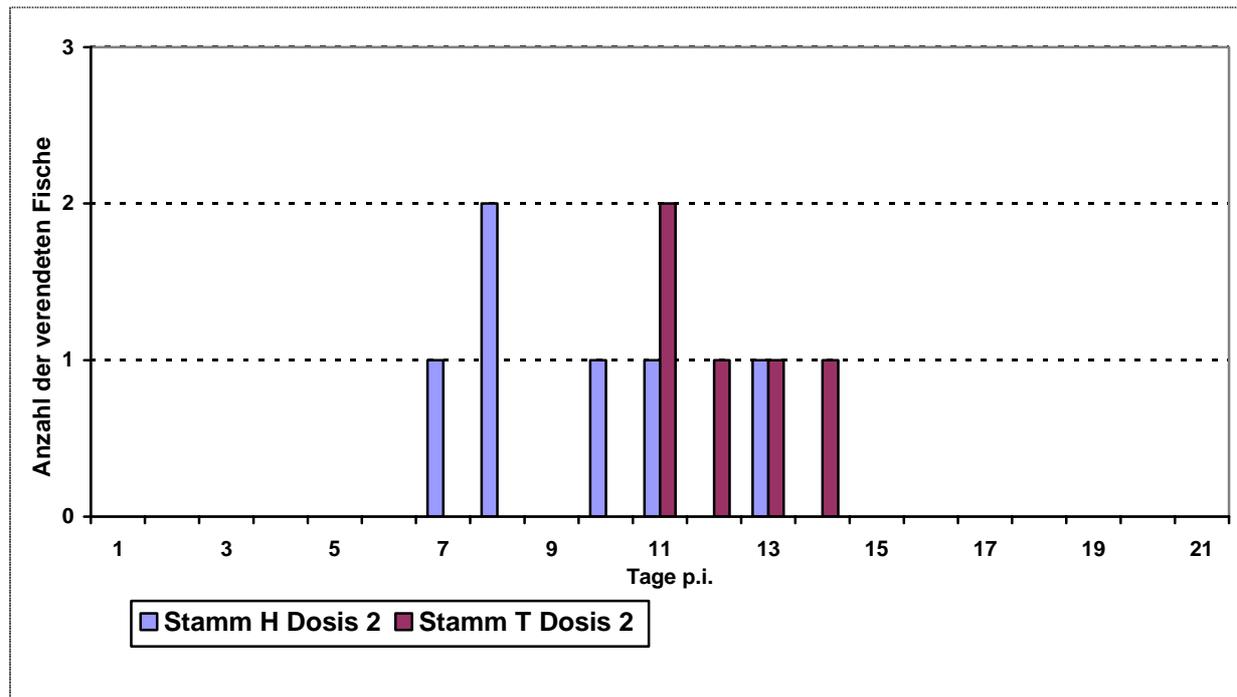
Dosis 2 (10^5 kbE/Fisch):

Bei dieser Dosierung waren die Verluste deutlich niedriger – insgesamt starben bei Stamm H 6 von 20 Fischen und bei Stamm T 5 von 20 Fischen. Dies entspricht einer Mortalität von 30% (Stamm H) bzw. 25% (Stamm T). Die ersten Todesfälle traten bei Stamm H am 7. Tag p.i., bei Stamm T am 11. Tag p.i. auf.

Bei Stamm H starben im weiteren Verlauf an Tag 8 p.i. 2 Fische, an Tag 10, 11 und 13 p.i. jeweils 1 Fisch. Bei Stamm T starb an Tag 12, 13 und 14 p.i. jeweils 1 Fisch.

Eine Übersicht über die während des Versuchs aufgetretenen Verluste zeigen Abbildung 10 und Tabelle 13.

Abbildung 10 ERM : Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes gestorben sind - Dosis 2



Dosis 3 (10^4 kbE/Fisch):

Die geringsten Verluste traten bei dieser Dosierung auf. Nur 1 Fisch von Stamm T starb an Tag 13 p.i.. Von Stamm H starben insgesamt 3 Fische, jeweils einer am 8., 10. und 11. Tag p.i.. Dies entspricht einer Mortalität von 5% (Stamm T) bzw. 15% (Stamm H). Die überlebenden Fische zeigten keine Beeinträchtigungen und gute Futteraufnahme. Sie wurden bei Versuchsende getötet.

Eine Übersicht über die während des Versuchs aufgetretenen Verluste zeigen Abbildung 11 und Tabelle 13.

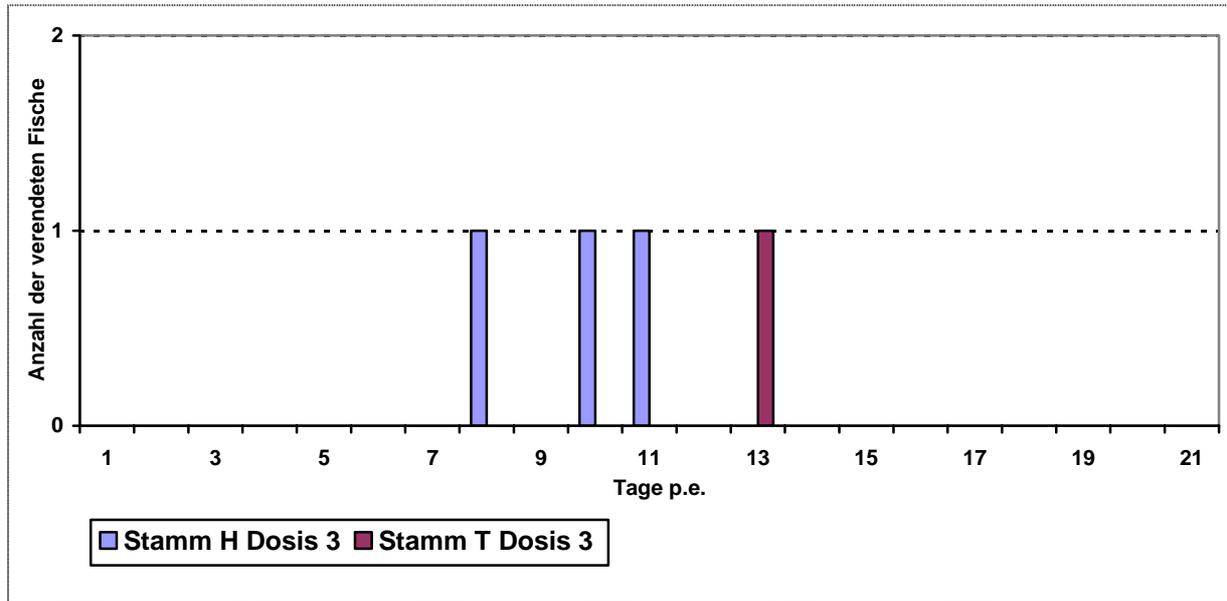
Abbildung 11 ERM: Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes gestorben sind – Dosis 3

Tabelle 13 ERM: Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes von 21 Tagen akut verendet sind oder aufgrund ausgeprägter Symptomatik getötet wurden.

Tag p.e.	Stamm H Dosis 1	Stamm T Dosis 1	Stamm H Dosis 2	Stamm T Dosis 2	Stamm H Dosis 3	Stamm T Dosis 3	Stamm H Kontr.	Stamm T Kontr.
1	17	11	-	-	-	-	-	-
2	1	9	-	-	-	-	-	-
3	2	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	1	-	-	-	-	-
8	-	-	2	-	1	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	1	-	1	-	-	-
11	-	-	1	2	1	-	-	-
12	-	-	-	1	-	-	-	-
13	-	-	1	1	-	1	-	-
14	-	-	-	1	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Symptome, die während des Versuchs bei den infizierten Fischen auftraten, sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Dosis 1: Bei Stamm H waren vor allem Blutungen im Maul (65 %) und im Kopf- und Kieferbereich (50 %) zu sehen (siehe Abbildung 12 b). 45 % der Fische hatten dunkel verfärbte Haut, bei 40 % traten Einblutungen in die Muskulatur auf. Blutungen in der Seitenlinie, in den Flossenbasen und ein flüssigkeitsgefüllter Gastrointestinaltrakt mit ödematisierter Magenwand traten nur in 30 % der Fälle auf, andere Symptome waren noch seltener zu beobachten.

Bei Stamm T waren oft Blutungen im Kopf- und Kieferbereich (55 %) und im Maul (45 %) zu sehen (siehe Abbildung 12 a). Bei 40 % der Fische traten Einblutungen in die Muskulatur auf, 35 % hatten dunkel verfärbte Haut.

Die restlichen Symptome traten weniger oft (Blutungen in der Seitenlinie, anämische Muskulatur zu 25 %) oder nur vereinzelt auf (z.B. Blutungen an den Flossenbasen, Nierenschwellung zu 5 %).

Exophthalmus, aufgetriebenes Abdomen, Blutungen ins Auge und Einblutungen ins Fettgewebe waren bei keinem der Fische von Stamm H und Stamm T zu sehen.

Dosis 2: 70 % der Fische von Stamm H wiesen eine mittel- bis hochgradige Milzschwellung auf (siehe Abbildung 14). In 40 % der Fälle war die Muskulatur der Fische anämisch, ebenso oft wurde eine Dunkelfärbung der Haut beobachtet. Blutungen im Maul und in den Flossenbasen traten in 35 % der Fälle auf, die restlichen Symptome wurden seltener gesehen. Blutungen im Kopf- und Kieferbereich (siehe Abbildung 12 e), in der Seitenlinie, im Auge und im Fettgewebe wurden nur in 5 % der Fälle beobachtet.

Bei Stamm T war das häufigste Symptom die Dunkelfärbung der Haut (60 %), gefolgt von anämischer Muskulatur (40 %) und Milzschwellung (40 %). Bei 25 % der Fische wurde eine mittel- bis hochgradige Milzschwellung beobachtet, bei 20 % Einblutungen in verschiedene Organe (hauptsächlich Leber) (siehe Abbildung 13). Die restlichen beobachteten Symptome traten seltener auf, Blutungen in Maul (siehe Abbildung 12 c), Muskulatur und Flossen (Abb12 d) wurden nur in 5 % der Fälle beobachtet.

Dosis 3: Bei 55 % der Fische von Stamm H war die Haut dunkel verfärbt, die Milz war bei 25 % der Tiere geschwollen. Bei 2 Tieren wurden geringgradige Einblutungen in die Flossenbasen beobachtet. Die anderen Symptome wurden ausschließlich bei den 3 während des Versuchs verendeten Fischen beobachtet, nicht bei den Tieren, die bis zum Versuchsende überlebt hatten.

Bei 4 Fischen von Stamm T war die Haut dunkel verfärbt. Die anderen unten aufgeführten Symptome wie Blutungen in die Muskulatur und Milzschwellung traten alle nur bei dem einzigen Fisch dieser Gruppe auf, der an der Infektion verendet war.

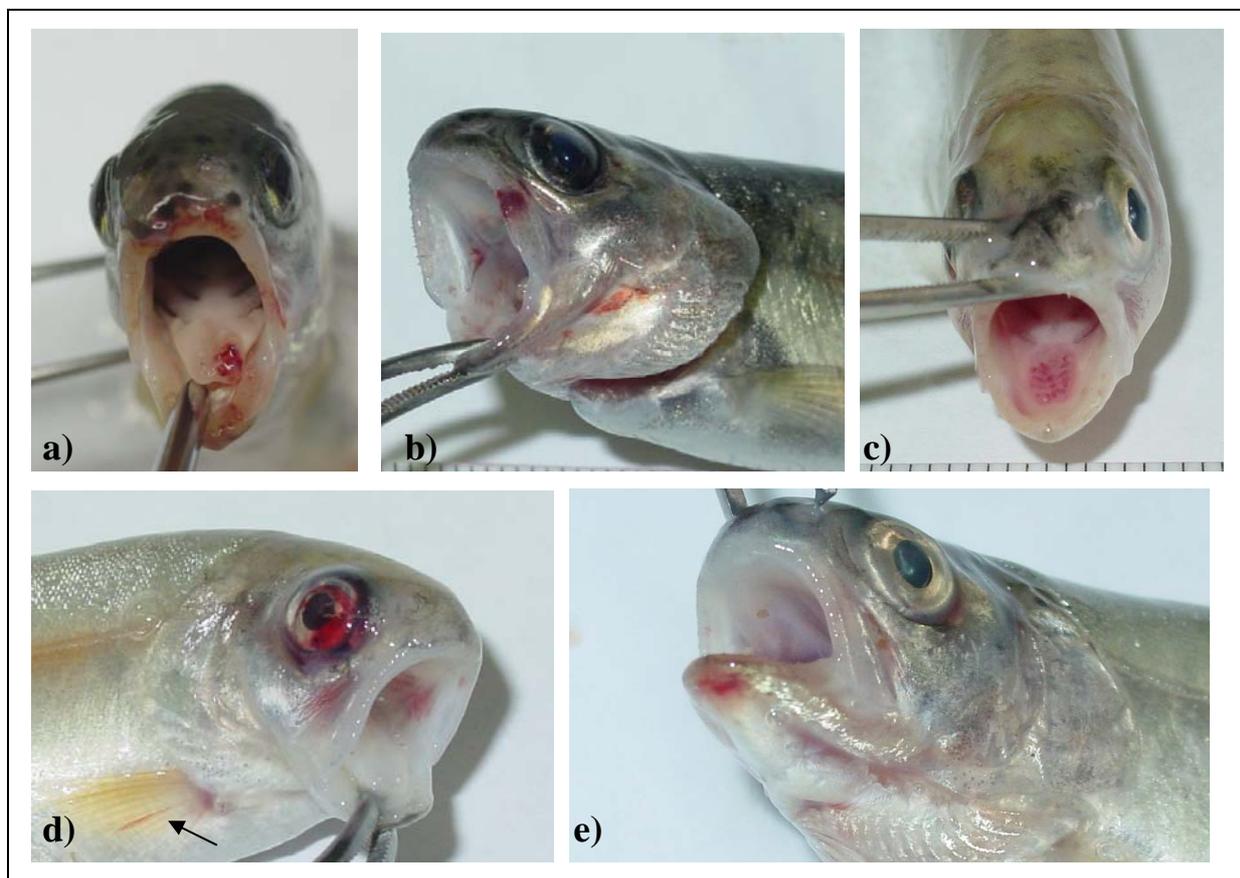


Abbildung 12 Klinische Symptome bei mit *Yersinia ruckeri* infizierten Regenbogenforellen.

- a) Hämorrhagien und Erosionen in Maul und Zunge (Stamm T, Dosis 1)
- b) Hämorrhagien im Maul und Dunkelverfärbung der Haut (Stamm H, Dosis 1)
- c) Hämorrhagien in der Zunge (Stamm T, Dosis 2)
- d) Einblutungen ins Auge und in die Flosse (Stamm T, Dosis 2) (→)
- e) Hämorrhagien im Unterkieferbereich (Stamm H, Dosis 2)

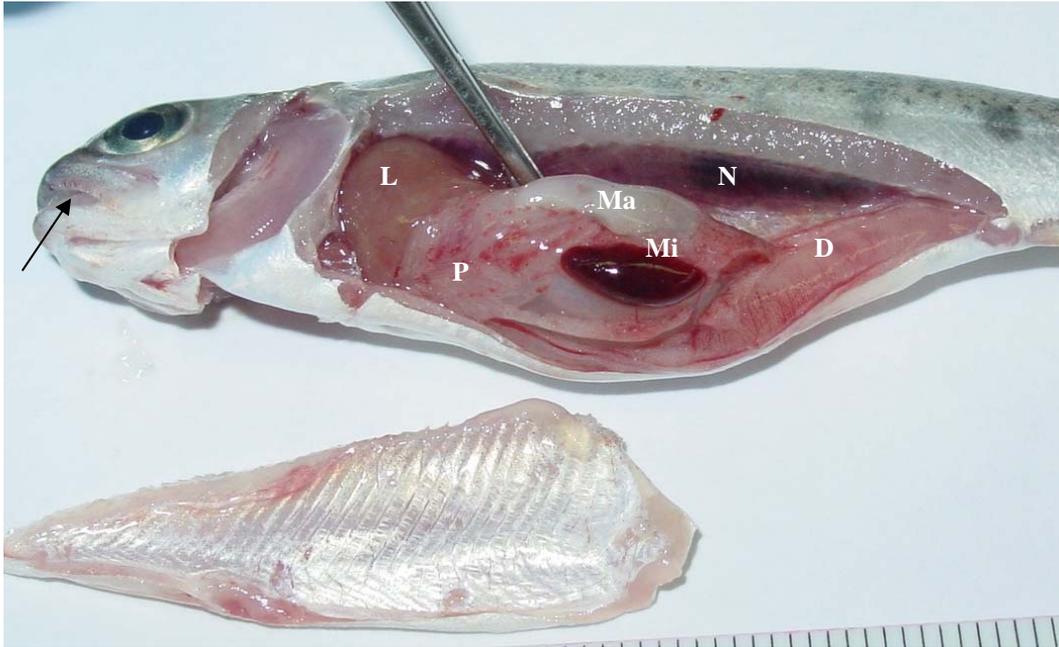


Abbildung 13 Situs eines *Y. ruckeri*-infizierten Fisches (Stamm T, Dosis 2), frisch verendet am 11. Tag p.i.

Muskulatur und Kiemen sind blass, die Milz (**Mi**) ist geschwollen. Der kraniale Anteil der Niere ist blass. Magen (**Ma**) und Darm (**D**) sind futterleer und flüssigkeitsgefüllt. Es sind Hämorrhagien im Fettgewebe um die Pylorusschläuche (**P**) und im Darm und geringgradige Erosionen im Maul (**→**) zu sehen.

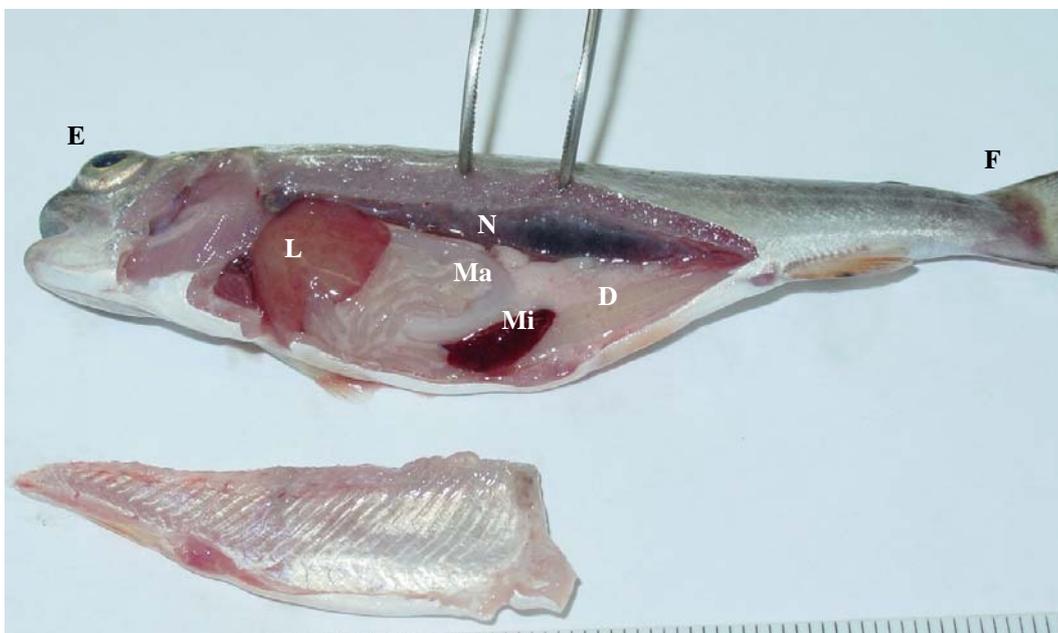


Abbildung 14 Situs eines *Y. ruckeri*-infizierten Fisches (Stamm H, Dosis 2), frisch verendet am 10. Tag p.i.

Muskulatur und Kiemen sind blass, die Milz (**Mi**) ist geschwollen. Magen (**Ma**) und Darm (**D**) sind futterleer und flüssigkeitsgefüllt. Es sind Exophthalmus (**E**) und geringgradige Hämorrhagien in der Leber (**L**), an der Basis der Schwanzflosse (**F**) und in der Muskulatur zu sehen.

Tabelle 14 ERM: Symptome und Sektionsbefunde der mit *Yersinia ruckeri* infizierten Fische (einschließlich der bis zum Versuchsende überlebenden Tiere)

Symptome	Stamm H Dosis 1	Stamm T Dosis 1	Stamm H Dosis 2	Stamm T Dosis 2	Stamm H Dosis 3	Stamm T Dosis 3
Blutungen im Maul	13/20 (65 %)	9/20 (45 %)	7/20 (35 %)	1/20 (5 %)	2/20 (10 %)	-
Blutungen im Kopf- und Kieferbereich	10/20 (50 %)	11/20 (55 %)	1/20 (5 %)	-	1/20 (5 %)	-
Dunkelverfärbung der Haut	9/20 (45 %)	7/20 (35 %)	8/20 (40 %)	12/20 (60 %)	11/20 (55 %)	4/20 (20 %)
Blutungen in der Muskulatur	8/20 (40 %)	8/20 (40 %)	3/20 (15 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)
Blutungen in der Seitenlinie	6/20 (30 %)	5/20 (25 %)	1/20 (5 %)	-	-	-
GIT ödematisiert, flüssigkeitsgefüllt	6/20 (30 %)	3/20 (15 %)	4/20 (20 %)	1/20 (5 %)	3/20 (15 %)	1/20 (5 %)
Blutungen an den Flossenbasen	6/20 (30 %)	1/20 (5 %)	7/20 (35 %)	1/20 (5 %)	2/20 (10 %)	1/20 (5 %)
Muskulatur anämisch	5/20 (25 %)	5/20 (25 %)	8/20 (40 %)	8/20 (40 %)	3/20 (15 %)	1/20 (5 %)
Milz geschwollen	2/20 (10 %)	4/20 (20 %)	14/20 (70 %)	8/20 (40 %)	5/20 (25 %)	1/20 (5 %)
Blutiger Aszites	2/20 (10 %)	2/20 (10 %)	-	3/20 (15 %)	1/20 (5 %)	-
blutige Enteritis	1/20 (5 %)	4/20 (20 %)	2/20 (10 %)	2/20 (10 %)	-	-
Niere geschwollen	-	1/20 (5 %)	5/20 (25 %)	5/20 (25 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)
Einblutungen in Organe	-	1/20 (5 %)	4/20 (20 %)	4/20 (20 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)
aufgetriebenes Abdomen	-	-	3/20 (15 %)	3/20 (15 %)	-	-
Exophthalmus	-	-	2/20 (10 %)	3/20 (15 %)	-	-
Blutungen ins Auge	-	-	1/20 (5 %)	2/20 (10 %)	1/20 (5 %)	-
Einblutungen ins Fettgewebe	-	-	1/20 (5 %)	2/20 (10 %)	1/20 (5 %)	-

Anzahl der Fische mit dem jeweiligen Symptom / Anzahl der infizierten Fische () Prozentsatz

Von den Organen (Leber, Niere, Milz) der zu untersuchenden Fische wurden Ausstriche auf Caso-Agar angefertigt. Bei sämtlichen Fischen, die während des Versuches gestorben waren, konnte der Erreger aus den Organen isoliert werden. Bereits nach 24 h war ein deutliches Bakterienwachstum auf den Nährböden zu erkennen. Die Beurteilung erfolgte nach 48h anhand des Wachstums und Aussehens der Kolonien. Zusätzlich wurden die gewachsenen Keime mit dem API20E-System getestet. Die Proben aller verendeten Fische wiesen ein einheitliches API20E-Profil auf (5104100) (siehe Abbildung 15). Der Ausschluss von *Hafnia alvei* erfolgte durch die PCR.

Die bakteriologische Untersuchung der Fische, die bis zum Ende des Versuchs überlebt hatten, verlief negativ, ebenso die Untersuchung der Kontrollgruppe. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung zusammengefasst.



Abbildung 15 API 20E „Bunte Reihe“ zur Identifizierung von Bakterien anhand ihrer biochemischen Eigenschaften. Profil von *Yersinia ruckeri*.

Tabelle 15 ERM: Ergebnisse der **Bakteriologischen Untersuchung**

Probe Nr.	Stamm H Dosis 1	Stamm T Dosis 1	Stamm H Dosis 2	Stamm T Dosis 2	Stamm H Dosis 3	Stamm T Dosis 3
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-
16	+	+	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-

+ = positiv - = negativ

Von den aufgrund ausgeprägter Symptomatik getöteten Fischen beider Stämme wurden histologische Schnitte von Niere, Leber, Milz, Herz, Kiemen und Darm angefertigt und HE- (Hämatoxilin-Eosin) gefärbt.

Es wurden zum Teil massive Ansammlungen von Melanomakrophagen in Niere und Milz gefunden (siehe Abbildung 16). Es wurden außerdem Nekrosen und Hyperämie in den meisten Organen beobachtet.

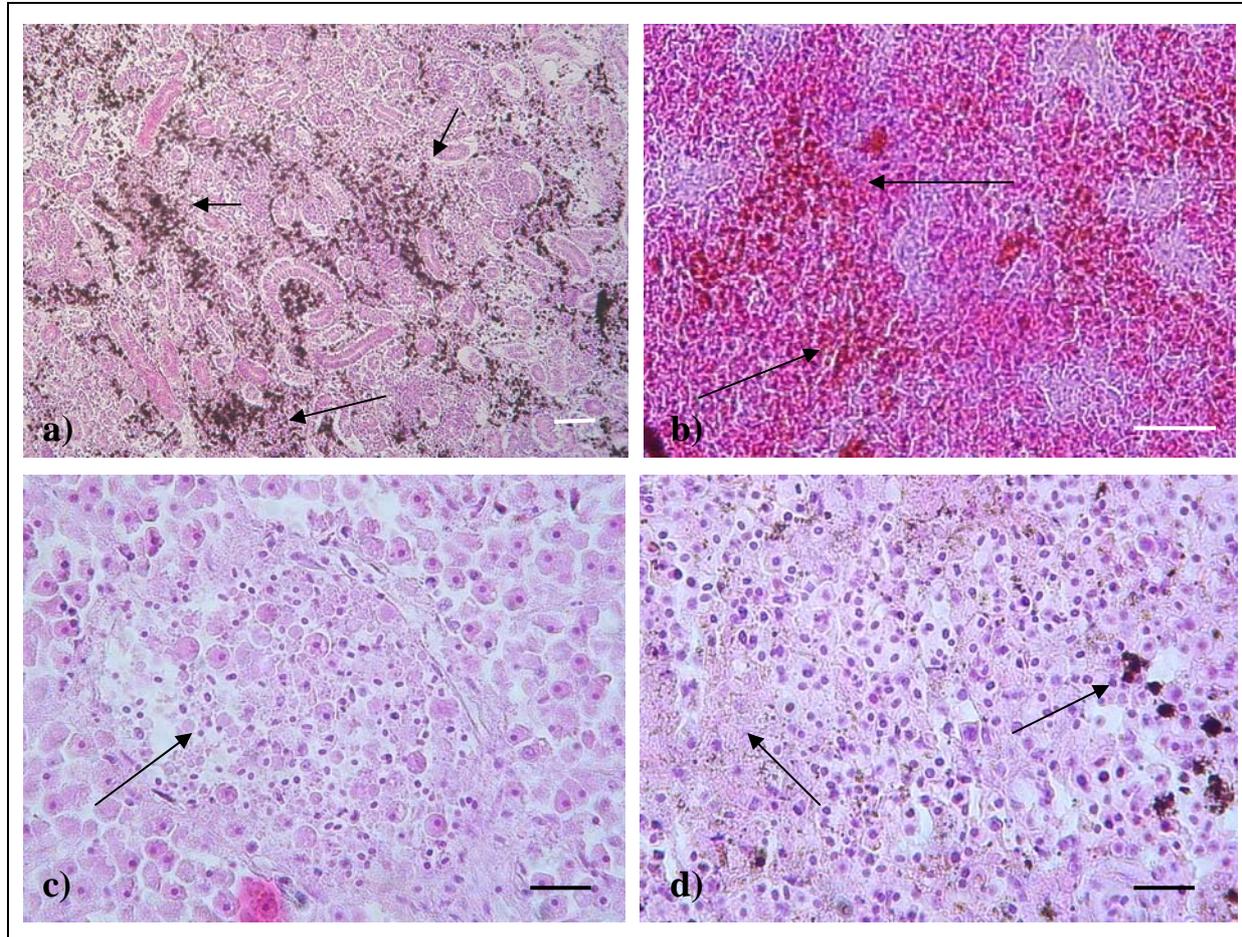


Abbildung 16 Histologische Veränderungen bei mit *Yersinia ruckeri* infizierten Fischen. HE-Färbung
a) Übersicht Nierengewebe. Infiltration von Melanomakrophagen im Niereninterstitium (→).
b) Übersicht Milzgewebe mit Hyperämie (→).
c) Lebergewebe. Fokale Nekrose und pyknotische Zellkerne (→).
d) Milzgewebe. Fokale Nekrosen und Makrophagenansammlungen (→).
 schwarzer Balken = 10 µm, weißer Balken = 100 µm

Die aus Nieren-, Milz- und Lebergewebe durchgeführte PCR ergab bei allen während des Versuchs verendeten Fischen eine Bande mit 550 bp (siehe Abbildung 17). Das von den verwendeten Primern nachgewiesene Amplifikat dieser Länge ist spezifisch für *Y. ruckeri*. Die Ergebnisse der PCR waren also bei den verendeten Fischen ERM-positiv. Bei den überlebenden Fischen, die keine äußerlichen Krankheitssymptome zeigten und bei

Versuchsende getötet wurden, war die PCR negativ, ebenso bei den Fischen der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse der PCR entsprechen denen der bakteriologischen Untersuchung (siehe unten). In Tabelle 16 sind die PCR-Ergebnisse der verschiedenen Stämme und Dosierungen zusammengefasst.

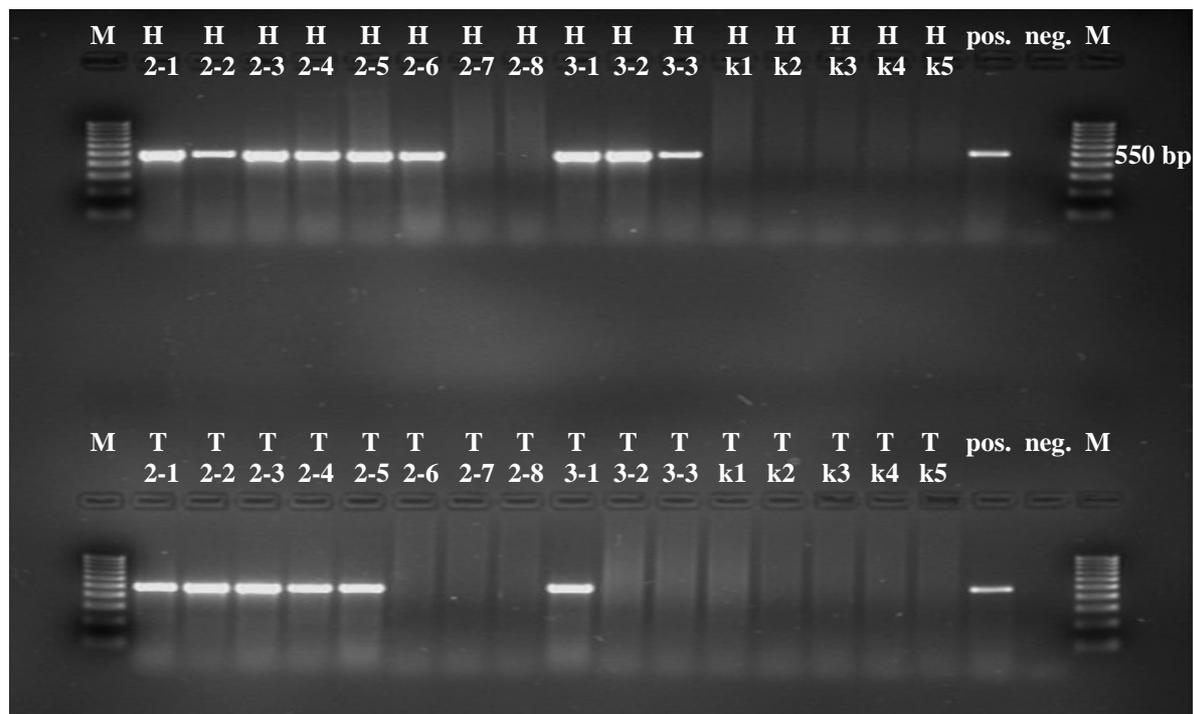


Abbildung 17 PCR-Ergebnisse beider Stämme der ersten 8 entnommenen Proben von Dosis 2 und der ersten 3 Proben von Dosis 3. Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel. **M** = Marker, **H2-1-H2-8** = Proben von Stamm H Dosis 2, **H3-1-H3-3** = Proben von Stamm H Dosis 3, **Hk1-Hk5** = Proben der Kontrollfische von Stamm H, **T2-1-T2-8** = Proben von Stamm T Dosis 2, **T3-1-T3-3** = Proben von Stamm T Dosis 3, **Tk1-Tk5** = Kontrollfische von Stamm T, **pos.** = Positivkontrolle, **neg.** = Negativkontrolle. Zu sehen sind die für den verwendeten Primer spezifischen *Y. ruckeri*-DNA-Amplifikate als Banden mit einer Länge von 550 bp (Basenpaaren).

Tabelle 16 ERM: Ergebnisse der PCR

Probe Nr.	Stamm H Dosis 1	Stamm T Dosis 1	Stamm H Dosis 2	Stamm T Dosis 2	Stamm H Dosis 3	Stamm T Dosis 3
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-
16	+	+	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-
19	+	+	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-
positive Proben insgesamt:	20/20 (100%)	20/20 (100%)	6/20 (30%)	5/20 (25%)	3/20 (15%)	1/20 (5%)

+ = positiv - = negativ

4.3 VHS

Die ersten Todesfälle bei den infizierten Fischen traten bei Stamm H am 4. Tag p.e., bei Stamm T am 5. Tag p.e. auf. Die Fische verstarben akut und wiesen bei der Untersuchung für die Erkrankung typische Symptome auf, wie Anämie, Blutungen in Muskulatur, Haut und Auge, Exophthalmus und ödematisierten, flüssigkeitsgefüllten Gastrointestinaltrakt (siehe Tabelle 18). Die erkrankten Fische zeigten größtenteils schon reduzierte Futteraufnahme, bevor die ersten Krankheitssymptome zu sehen waren. Sobald Symptome wie Exophthalmus und Hämorrhagien in Auge und Haut auftraten, verendeten die betroffenen Fische meist innerhalb weniger Stunden, aber spätestens nach einem Tag. Diejenigen Tiere, die sehr stark ausgeprägte Symptome zeigten, Bewegungsstörungen aufwiesen oder aufgrund extremer Einblutungen ins Auge erblindet waren, wurden getötet.

Die Verluste waren bei beiden Stämmen zwischen dem 5. und dem 8. Tag p.e. am höchsten und gingen dann bis auf einen zweiten, niedrigeren Peak um den 12. Tag p.e. relativ schnell zurück. Der letzte Fisch von Stamm H starb an Tag 14 p.e., von Stamm T an Tag 17 p.e.. Die bis zum Versuchsende nach 21 Tagen überlebenden Fische waren geringgradig lethargisch, zeigten aber keine weiteren äußerlich erkennbaren Symptome.

Insgesamt starben bei Stamm H 26 von 30 Fischen, bei Stamm T 28 von 30 Fischen. Dies entspricht einer Mortalität von 86,7 % (Stamm H) bzw. 93,3 % (Stamm T).

Eine Übersicht über die während des Versuchs aufgetretenen Verluste zeigen Abbildung 18 und Tabelle 17.

Abbildung 18 VHS: Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes gestorben sind

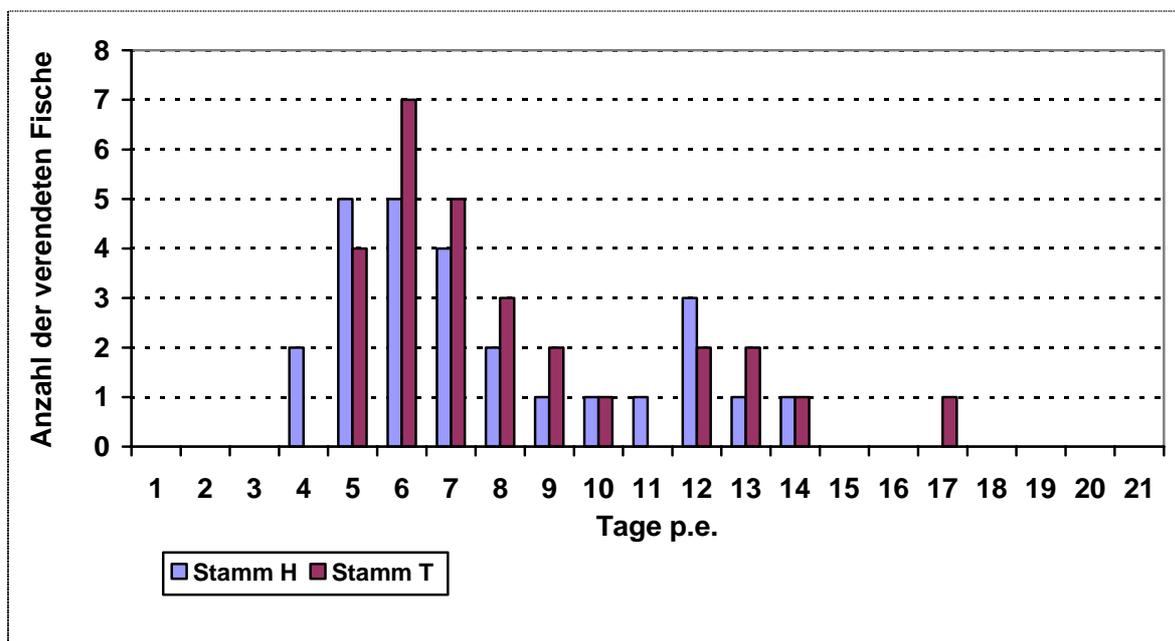


Tabelle 17 VHS Anzahl der Fische, die innerhalb des Versuchszeitraumes von 21 Tagen akut verendet sind oder aufgrund ausgeprägter Symptomatik getötet wurden

Tag p.e.	Stamm H	Stamm T	Stamm H Kontrolle	Stamm T Kontrolle
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	2	-	-	-
5	5	4	-	-
6	5	7	-	-
7	4	5	-	-
8	2	3	-	-
9	1	2	-	-
10	1	1	-	-
11	1	-	-	-
12	3	2	-	-
13	1	2	-	-
14	1	1	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	1	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
gesamt:	26/30 (86,7 %)	28/30 (93,3 %)	-	-

Die Symptome, die bei den infizierten Fischen auftraten, sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Alle Fische, die an der Infektion verstarben, zeigten mindestens ein, meist aber mehrere der aufgeführten Symptome.

Bei Stamm H waren besonders häufig eine Anämie mit blasser Muskulatur (86,7 %), Milzschwellung (83,3 %) und ein futterleerer, flüssigkeitsgefüllter Gastrointestinaltrakt mit ödematisierter Magenwand (76,7 %) zu beobachten (siehe Abbildung 21). Ebenfalls häufig fielen porzellanweiße Kiemen (60 %) und ein aufgetriebenes Abdomen (60 %) auf, 50 % der Tiere hatten dunkel verfärbte Haut (siehe Abbildung 19 d). Die restlichen aufgelisteten Symptome waren bei weniger als der Hälfte der Tiere zu finden und traten zum Teil weniger häufig (z.B. Exophthalmus zu 43,3 %) (siehe Abbildung 19 b), zum Teil nur vereinzelt auf (z.B. Einblutungen ins Fettgewebe oder blutige Enteritis zu 6,7 %) (siehe Abbildung 21).

Bei Stamm T waren gehäuft ein futterleerer, flüssigkeitsgefüllter Gastrointestinaltrakt mit ödematisierter Magenwand (86,7 %), aufgetriebenes Abdomen (80 %), Anämie mit blasser

Muskulatur (80 %) und Milzschwellung (76,7 %) zu beobachten (siehe Abbildung 20). Die Haut der Tiere war häufig dunkel verfärbt (56,7 %), die Kiemen porzellanweiß (53,3 %) (siehe Abbildung 19 c). Bei 50 % der Tiere traten Blutungen ins Auge auf (siehe Abbildung 19 a). Die restlichen aufgelisteten Symptome waren bei weniger als der Hälfte der Tiere zu finden und traten zum Teil weniger häufig (z.B. Exophthalmus zu 43,3 %), zum Teil nur vereinzelt auf (z.B. Blutungen in die Haut zu 6,6 %, Blutungen in die Flossenbasen zu 3,3 %)

Tabelle 18 VHS: Symptome und Sektionsbefunde der mit VHS infizierten Fische (einschließlich der bis zum Versuchsende überlebenden Tiere)

Symptome	Stamm H	Stamm T
Muskulatur anämisch	26/30 (86,7 %)	24/30 (80 %)
Milz geschwollen	25/30 (83,3 %)	23/30 (76,7 %)
GIT ödematisiert, flüssigkeitsgefüllt	23/30 (76,7 %)	26/30 (86,7 %)
Kiemen porzellanweiß	18/30 (60 %)	16/30 (53,3 %)
aufgetriebenes Abdomen	18/30 (60%)	24/30 (80 %)
Dunkelverfärbung der Haut	15/30 (50%)	17/30 (56,7 %)
Exophthalmus	13/30 (43,3%)	13/30 (43,3 %)
blutiger Aszites	9/30 (30 %)	11/30 (36,7 %)
Blutungen in der Muskulatur	7/30 (23,3 %)	10/30 (33,3 %)
Streifenförmige Blutungen in den Kiemen	7/30 (23,3 %)	7/30 (23,3 %)
Blutungen ins Auge	6/30 (20 %)	15/30 (50 %)
Blutungen in der Haut	6/30 (20 %)	2/30 (6,7 %)
Einblutungen in Organe	5/30 (16,7 %)	4/30 (13,3 %)
Aszites	5/30 (16,7 %)	6/30 (20 %)
Blutungen an den Flossenbasen	4/30 (13,3 %)	1/30 (3,3 %)
Blutungen im Kopf- und Kieferbereich	3/30 (10 %)	8/30 (26,7 %)
Niere geschwollen	3/30 (10 %)	3/30 (10 %)
Einblutungen ins Fettgewebe	2/30 (6,7 %)	7/30 (23,3 %)
blutige Enteritis	2/30 (6,7 %)	3/30 (10 %)

Anzahl der Fische mit diesem Symptom / Anzahl der infizierten Fische () Prozentsatz

Bei den Fischen, die bis zum Versuchsende überlebten, waren äußerlich keine Symptome zu erkennen, sie waren allerdings geringgradig lethargisch und die Futtermittelaufnahme war geringgradig reduziert. Bei der Sektion zeigten die Fische von Stamm H anämische Muskulatur (4/4) und Milzschwellung (4/4). Einer der Fische hatte außerdem dunkel verfärbte Haut und geringgradigen Exophthalmus. Die beiden überlebenden Fische von Stamm T hatten eine geschwollene Milz und anämische Muskulatur. Einer der beiden Fische war außerdem dunkel verfärbt und hatte geringgradigen Exophthalmus.

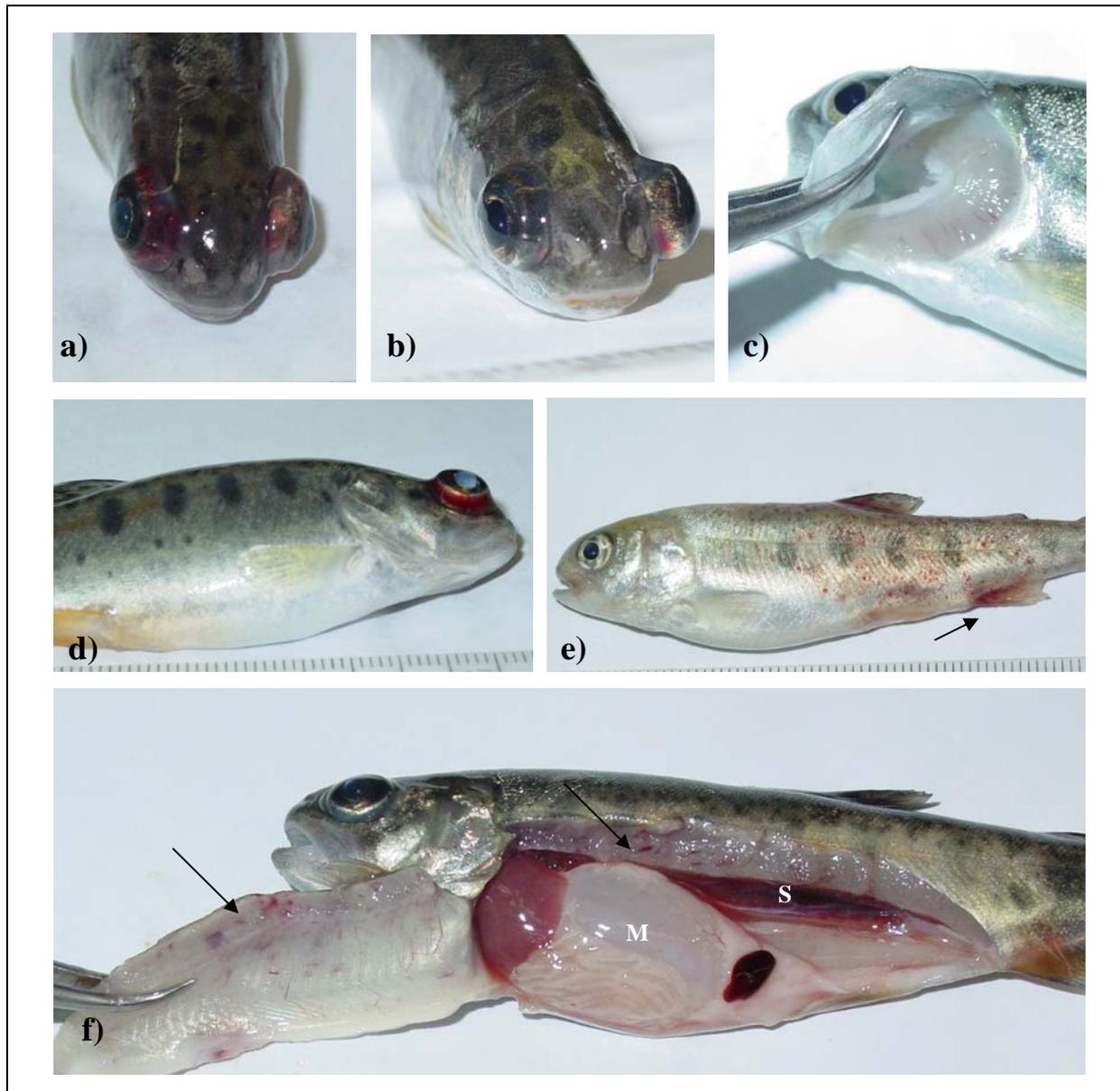


Abbildung 19 Klinische Symptome bei frisch verendeten bzw. getöteten VHS-infizierten Regenbogenforellen.

- a) hochgradiger Exophthalmus und periokuläre Blutungen (Stamm T)
- b) hochgradiger Exophthalmus und periokuläre Blutungen (Stamm H)
- c) porzellanweiße Kiemen mit streifigen Einblutungen bei frisch getötetem Fisch (Stamm T)
- d) Dunkelverfärbung der Haut, aufgetriebenes Abdomen und Exophthalmus mit periokulären Blutungen (Stamm H)
- e) petechiale Blutungen in der Haut, Einblutungen in die Afterflosse (→) (Stamm H)
- f) Einblutungen in die Muskulatur (→) und in die Schwimmblase (S), Magen (M) flüssigkeitsgefüllt (Stamm T)

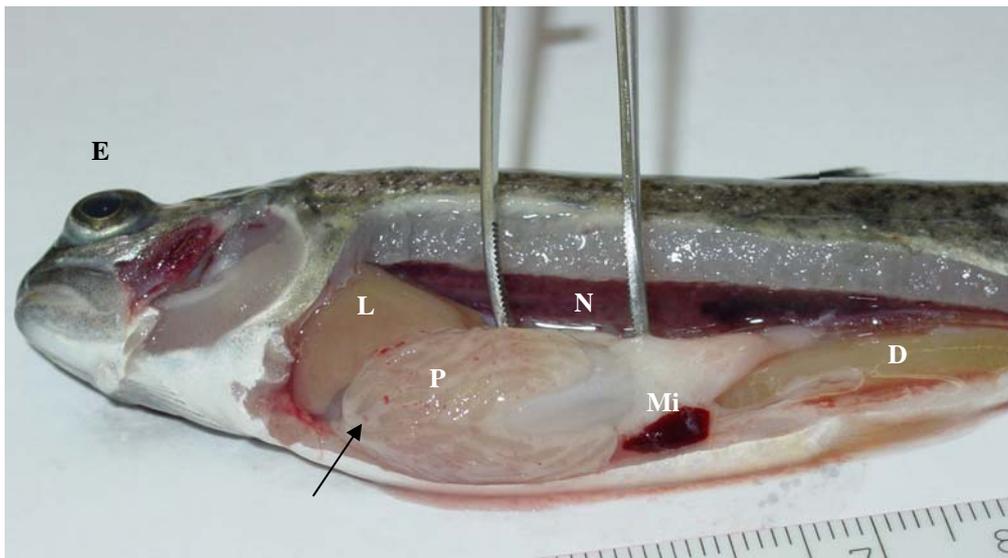


Abbildung 20 Situs eines frisch gestorbenen, mit VHS infizierten Fisches (Stamm T)
Kiemen und Muskulatur sind anämisch, im Kopfbereich sind Einblutungen in die Muskulatur und Exophthalmus (E) vorhanden. Leber (L) und kranialer Anteil der Niere (N) sind blass, im Fettgewebe um die Pylorusschläuche (P) sind vereinzelt petechiale Blutungen zu sehen (→). Magen und Darm sind futterleer, der Darm (D) ist mit gelblicher Flüssigkeit gefüllt.

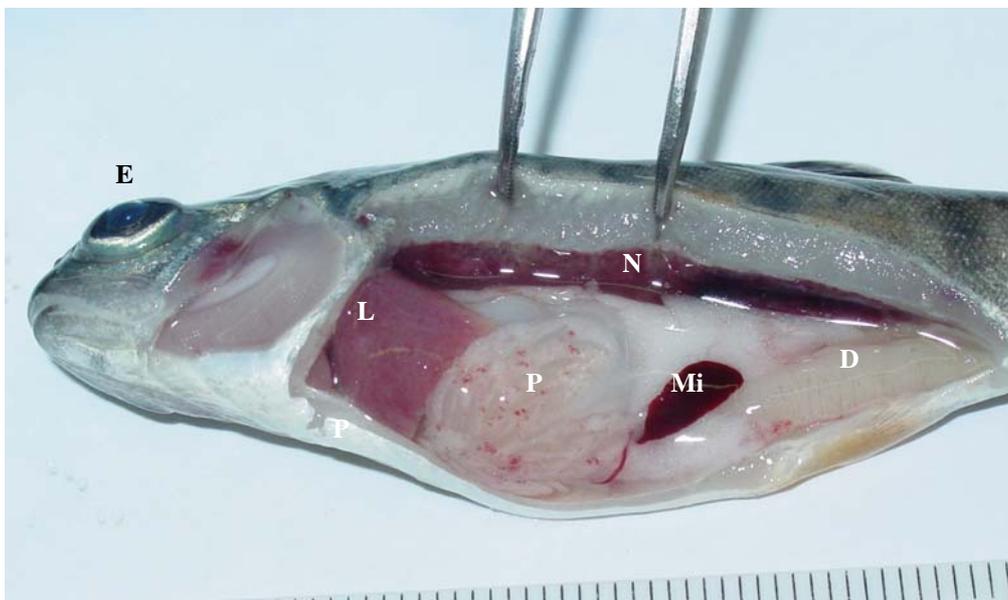


Abbildung 21 Situs eines frisch gestorbenen, mit VHS infizierten Fisches (Stamm H)
Kiemen und Muskulatur sind anämisch, im Kopfbereich sind geringgradige Hämorrhagien und geringgradiger Exophthalmus (E) vorhanden. Die Milz (Mi) ist vergrößert. Im Fettgewebe um die Pylorusschläuche (P) sind petechiale Blutungen zu sehen. Magen und Darm (D) sind futterleer und flüssigkeitsgefüllt.

Für die Zellkultur wurden Zellkulturröhrchen (RTG2-Zellen) mit Organsuspensionen der infizierten Fische beimpft und eine Woche lang täglich auf das Auftreten eines CPE (Cytopathischer Effekt) untersucht.

In allen mit Organmaterial der infizierten Fische beimpften Zellkulturröhrchen, auch in denen der überlebenden Fische, trat ein CPE auf, der Zellrasen wurde durch die Vermehrung des Virus meist komplett zerstört.

In den Zellkulturröhrchen der Kontrollgruppe wurde kein CPE beobachtet (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21 VHS: Ergebnisse der Zellkultur

Zellkultur-Ergebnis	Stamm H	Stamm T	Stamm H Kontrolle	Stamm T Kontrolle
CPE	30/30 (100%)	30/30 (100%)	-	-
kein CPE	-	-	5/5 (100%)	5/5 (100%)

Von den aufgrund ausgeprägter Symptomatik getöteten Fischen beider Stämme wurden histologische Schnitte angefertigt und HE-(Hämatoxilin-Eosin) gefärbt. Es waren fokale Nekroseherde in Leber, Niere und Milz zu sehen (siehe Abbildung 22).

Das hämatopoetische Gewebe war vor allem in der Milz aufgelockert (siehe Abbildung 22 c,d). In den Kiemen waren einzelne Epithelzellen angeschwollen oder bereits abgestoßen. Im Myokard des Herzens waren erste Anzeichen einer nicht-eitrigen Myokarditis zu finden. Vor allem in Niereninterstitium und Milz wurden vermehrt Pigmentmakrophagen gefunden (siehe Abbildung 22 a,b). In der Leber waren nekrotische Hepatozyten und Vakuolenbildung zu beobachten (siehe Abbildung 22 e,f).

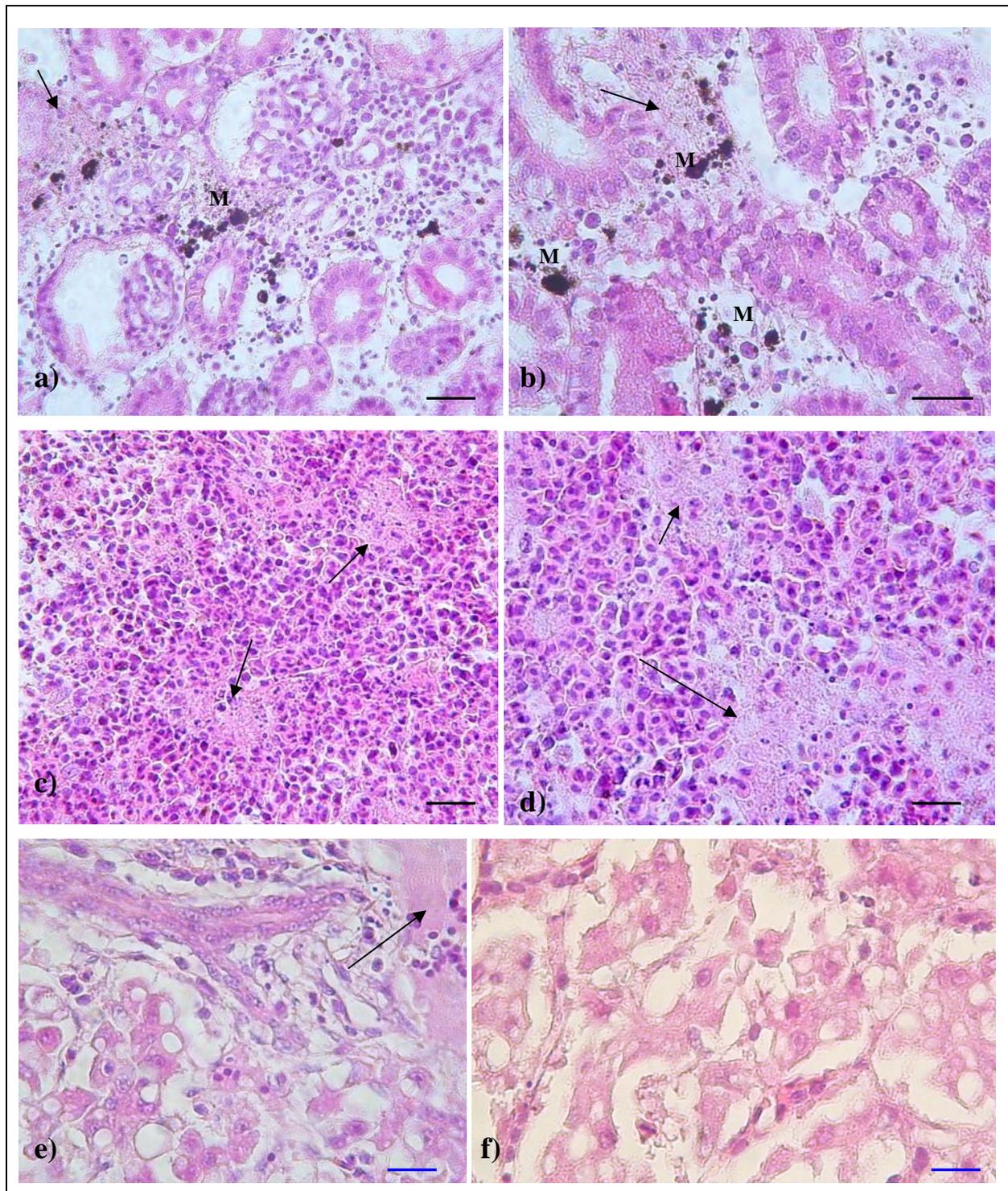


Abbildung 22 Histologische Veränderungen bei VHS-infizierten Fischen. HE-Färbung
 a), b) Nierengewebe. Infiltration von Pigmentmakrophagen (M), Nekroseherde (→)
 c), d) Nekroseherde im Milzgewebe (→). Gewebestruktur aufgelockert.
 e), f) Lebergewebe mit Nekrosen (→), Vakuolenbildung und beginnendem Strukturverlust.
 schwarzer Balken = 10 µm, blauer Balken = 50µm

Die durchgeführte PCR ergab bei allen infizierten Fischen eine Bande bei 440 bp. Das von den verwendeten Primern nachgewiesene Amplifikat dieser Länge ist VHS-spezifisch. Somit war die PCR also bei allen Proben positiv, auch bei denjenigen Fischen, die bis zum Versuchsende überlebt hatten. Nur bei den Fischen der Kontrollgruppe traten bei der PCR keine Banden auf, sie waren VHS-negativ (siehe Tabelle 22 und Abbildung 23).

Die Ergebnisse der PCR entsprechen denen der Zellkultur (siehe oben).

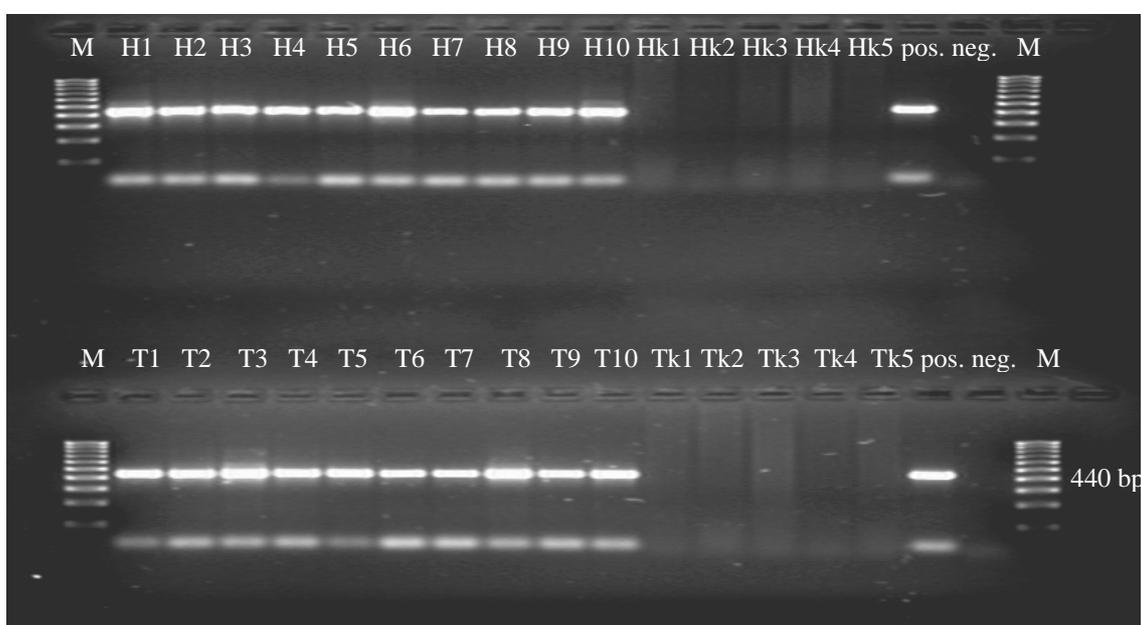


Abbildung 23 Positive PCR-Ergebnisse der ersten 10 entnommenen Proben beider Stämme.

Ethidiumbromid-gefärbtes 1,5 %iges Agarosegel. **M** = Marker, **H1-10** = Proben von Stamm H, **Hk1-Hk5** = Proben der Kontrollfische von Stamm H, **T1-10** = Proben von Stamm T, **Tk1-Tk5** = Kontrollfische von Stamm T, **pos.** = Positivkontrolle, **neg.** = Negativkontrolle. Zu sehen sind die für den verwendeten Primer spezifischen VHS-RNA-Amplifikate als Banden mit einer Länge von 440 bp (Basenpaaren).

Tabelle 22 VHS: Ergebnisse der PCR

PCR-Ergebnis	Stamm H	Stamm T	Stamm H Kontrolle	Stamm T Kontrolle
positiv	30/30 (100%)	30/30 (100%)	-	-
negativ	-	-	5/5 (100%)	5/5 (100%)

5 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die verheerenden Auswirkungen der Drehkrankheit auf die Regenbogenforellenbestände in Nordamerika führten zu verstärkten Forschungen auf diesem Gebiet, und es wurde versucht, eine Lösung für das Problem zu finden. Der erste Schritt hierzu war getan, als von der Arbeitsgruppe in Deutschland ein deutscher Regenbogenforellenstamm (H) gefunden wurde, der relativ unempfindlich gegenüber der Drehkrankheit ist (EL-MATBOULI et al. 2002, HEDRICK et al. 2003b).

Der Einsatz eines solchen Stammes könnte eine große Rolle bei der Sanierung der Fischbestände in den betroffenen Gebieten Amerikas spielen. Trotzdem muss bedacht werden, dass der Transfer von Tieren von einem komplexen Ökosystem in ein anderes, noch dazu über verschiedene Kontinente hinweg, immer ein Risiko darstellt. Durch das Einbringen einer fremden Spezies oder eines fremden Stammes in ein Ökosystem kann es nicht nur zur Verdrängung dort beheimateter Arten kommen, sondern auch zur Einschleppung bzw. Verbreitung von bisher unbekanntem Krankheiten (GEBHARD et al. 1996, MAZZONI 2003). Dies lässt sich am Beispiel der Forelle verdeutlichen: Die ursprünglich in Nordamerika beheimatete Regenbogenforelle wurde Ende des 19. Jahrhunderts nach Europa eingeführt und gelangte so auch nach Deutschland. Die Ansprüche an den Lebensraum und das Nahrungsangebot der Regenbogenforelle entsprechen in etwa denen der in Deutschland heimischen Bachforelle. Regenbogenforellen sind jedoch frohwüchsiger und weniger empfindlich gegenüber niedrigem Sauerstoffgehalt, schlechter Wasserqualität und höheren Temperaturen, weswegen es durch das Aussetzen von Regenbogenforellen in deutschen Gewässern zur Verdrängung bzw. zu einem Rückgang der Bachforellenpopulation kam (BROWN et al. 1994, RUANE et al. 1999, GOLDSTEIN et al. 2001).

Außerdem wurde durch den Import von Regenbogenforellen, Brut und Eiern aus den USA die Rotmaulseuche nach Europa eingeschleppt. Diese Krankheit war dort zuvor nicht bekannt und breitete sich innerhalb kurzer Zeit in vielen Ländern Europas aus (FUHRMANN et al. 1983, HORNE & BARNES 1999).

Deswegen bedarf es weiterführender Untersuchungen, um eventuelle Gefahren für das dortige Öko-System erkennen zu können, bevor an das Einsetzen des deutschen Regenbogenforellenstammes (H) in amerikanische Gewässer gedacht werden kann. Mechanismus und Basis der beobachteten Resistenz und deren Vererbung auf Nachkommen bei Kreuzungen mit

anderen Stämmen müssen erforscht werden, ebenso die Empfänglichkeit des Stammes gegenüber anderen Krankheitserregern, mit denen er im neuen Habitat in Kontakt kommen könnte. Zu diesem Zweck wurden in Kalifornien, USA und in München, Deutschland parallel Versuche mit bedeutenden Krankheitserregern durchgeführt. Die kalifornische Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit IHNV (Infektiöse Hämato-poetische Nekrose-Virus), SaHV1 (Salmonid herpes-like Virus Typ 1), dem amerikanischen Stamm des VHS-Virus (Virale Hämorrhagische Septikämie) und mit *Ceratomyxa shasta*. Bei den Infektionsversuchen wurden keine Unterschiede in der Empfänglichkeit der beiden Stämme gegenüber den untersuchten Krankheiten gefunden (BARTHOLOMEW et al. 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Empfänglichkeit des Drehkrankheit-resistenten Regenbogenforellenstammes (H) gegenüber der PKD (Proliferative Kidney Disease, Proliferative Nierenschwellung), der Rotmaulseuche (Enteric Redmouth Disease, ERM) und dem europäischen Stamm der VHS (Virale Hämorrhagische Septikämie) zu untersuchen. Zum Vergleich wurde ein Drehkrankheit-empfindlicher amerikanischer Regenbogenforellenstamm (T) mituntersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der deutsche Regenbogenforellenstamm im Vergleich zum mituntersuchten amerikanischen Stamm weder eine verminderte noch eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber den getesteten Krankheitserregern besitzt:

5.1 PKD

Obwohl bekannt ist, dass schon durch eine sehr kurze Expositions-dauer eine PKD-Infektion hervorgerufen werden kann (LONGSHAW et al. 2002), wurden die Fische in diesem Versuch für 6 Tage in dem für PKD endemischen Bestand belassen, um einen ausreichenden Erregerkontakt sicherzustellen. Die Erregerexposition erfolgte im Sommer (Juli) bei hohen Außentemperaturen, weil die Krankheit aufgrund der Abhängigkeit von der Wassertemperatur saisonal auftritt und die Mortalität zwischen Juli und Mitte September am höchsten ist (FERGUSON & ADAIR 1977, FERGUSON & BALL 1979, ELLIS et al. 1985, GAY et al. 2001).

Im Verlauf des Versuches verstarb keiner der Fische an der Infektion mit *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Dies ist erklärbar mit der relativ niedrigen Wassertemperatur, bei der die

Fische im Labor gehältert wurden, und dem Fehlen von krankheitsbegünstigenden Stressfaktoren. Auch FEIST et al. (2002) sahen im Fehlen von Stressfaktoren die Ursache für die gering ausgeprägte klinische Symptomatik bei den von ihnen untersuchten PKD-infizierten Fischen. Die Höhe der Wassertemperatur spielt eine entscheidende Rolle für die Schwere des Krankheitsverlaufes (FERGUSON 1981, CLIFTON-HADLEY et al. 1984b, FOOT & HEDRICK 1987, GAY et al. 2001). Die Fische wurden im Labor bei einer Temperatur von 13°C gehältert, was bereits der unteren Schwelle für das Angehen einer klinischen Infektion entspricht. Außerdem waren die Fische durch die guten Haltungsbedingungen im Labor nicht den gleichen Stressfaktoren ausgesetzt wie in Fischzuchtbetrieben, wo Krankheitsausbrüche durch Faktoren wie zu hohe Besatzdichte, schlechte Wasserqualität und übermäßige Fütterung begünstigt werden (SEAGRAVE & BUCKE 1979, BUCKE et al. 1981, EL-MATBOULI & HOFFMANN 2002).

Den Beweis für die erfolgte Infektion mit *T. bryosalmonae* lieferten die klinischen und pathologischen Befunde, der histologische Nachweis von Parasitenstadien und die positiven Ergebnisse der PCR.

Bei allen Fischen beider Stämme mit negativem PCR-Ergebnis wurden auch histologisch keine Entwicklungsstadien von *T. bryosalmonae* gefunden. Umgekehrt wurden aber in einigen Fällen (6-mal bei Stamm H, 3-mal bei Stamm T) in der Niere keine Parasiten gefunden, obwohl die PCR positiv war. Es ist wahrscheinlich, dass bei diesen Fischen keine Parasitenstadien gefunden wurden, weil diese zum Zeitpunkt der Probenentnahme (14-16 Wochen p.e.) durch die zelluläre Immunreaktion der Fische bereits degeneriert und zum größten Teil zerstört waren (KENT & HEDRICK 1986, CLIFTON-HADLEY et al. 1987a, MACCONNELL et al. 1989).

In der Leber infizierter Fische wurden während der gesamten Versuchsdauer keine Parasitenstadien gefunden, in der Milz nur vereinzelt. Dies lässt sich auf den milden Verlauf der Erkrankung zurückführen. In der Leber und in anderen Organen treten meist erst bei stärkerem Befall Parasitenstadien auf (CLIFTON-HADLEY et al. 1987a).

Bei der Sektion wurden bei beiden zu untersuchenden Regenbogenforellenstämmen Krankheitsanzeichen wie Dunkelverfärbung, Nieren- und Milzschwellung und Blässe der Organe gefundenen, welche typischerweise bei der PKD beobachtet werden können (HEDRICK et al. 1984). Häufigkeit und Ausprägung der Symptome waren bei beiden Stämmen vergleichbar, ebenso der Zeitpunkt ihres Auftretens im Verlauf des Versuches.

Aufgrund des milden Krankheitsverlaufes waren die beobachteten Symptome bei beiden Stämmen in den meisten Fällen nur geringgradig ausgebildet. Nur in jeweils 3 Fällen war die Niere der erkrankten Fische mittelgradig geschwollen, in 2 Fällen (H) bzw. in nur einem Fall (T) war auch eine mittelgradige Milzschwellung zu sehen.

Insgesamt waren der Krankheitsverlauf und die klinische Symptomatik bei den beiden Stämmen vergleichbar, und statistisch war kein signifikanter Unterschied zwischen Stamm H und Stamm T erkennbar.

Die histologische Auswertung erfolgte anhand von Gewebeschnitten. Es wurde die Anzahl der Parasitenstadien in Niere, Milz und Leber auf einer Fläche von 11 mm² ermittelt. Dies entspricht 15 Gesichtsfeldern bei 600-facher Vergrößerung (40er Objektiv). Zu jedem Entnahmezeitpunkt (4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und 15 Wochen p.e.) wurden jeweils zwei der infizierten Fische beider Stämme entnommen und untersucht, bei Versuchsende nach 16 Wochen die restlichen 15 Fische beider Stämme. So wurde die durchschnittliche Anzahl der Parasitenstadien in 11 mm² zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt ermittelt.

Bei beiden Stämmen wurde ein gering- bis mittelgradiger Befall mit Parasitenstadien in der Niere festgestellt.

Die Anzahl der Parasitenstadien war in den ersten 8 Wochen des Versuches bei beiden Stämmen gering. Während bei Stamm T in den darauffolgenden Wochen die durchschnittliche Anzahl der Parasitenstadien in der Niere nur geringfügig zunahm, war bei Stamm H um die 10. Woche p.e. ein deutlicherer Anstieg zu beobachten. Dagegen wurden in den letzten Wochen des Versuches mehr Parasiten bei Stamm T gefunden als bei Stamm H, bei dem nur noch vereinzelt Parasitenstadien zu sehen waren.

Die im Vergleich zu Stamm T deutlich höheren durchschnittlichen Parasitenzahlen bei Stamm H in der 9. bis 11. Woche p.e. stellen eine Auffälligkeit dar. In diesem Zeitraum wurden in der 9. Woche durchschnittlich 11 (H) bzw. 4,5 (T) Parasiten, in der 10. Woche 15,5 (H) bzw. 4 (T) und in der 11. Woche 11 (H) bzw. 5 (T) Parasitenstadien gefunden. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant. Sie kamen dadurch zustande, dass bei den Probenentnahmen in diesem Zeitraum jeweils in einem der beiden untersuchten Fische von Stamm H auffallend viele Parasitenstadien gefunden wurden (17 in der 9. Woche, 23 in der 10. und 18 in der 11. Woche). Die Parasitenanzahl der anderen in diesem Zeitraum untersuchten Fische von Stamm H entsprach der durchschnittlichen Anzahl bei Stamm T in der 9. bis 11. Woche.

Bei Versuchsende nach 16 Wochen p.e. wurden bei 2 Fischen von Stamm T ebenfalls auffällig hohe Parasitenzahlen (16 und 17 Parasitenstadien) gefunden. Da aber zu diesem

Zeitpunkt der Versuch beendet wurde, wurden nicht nur 2 Fische, sondern die restlichen 15 untersucht. Deswegen wurde der Durchschnittswert durch diese beiden Proben nicht so stark erhöht wie durch die 3 auffälligen Proben bei Stamm H.

Abgesehen von diesen Ausnahmen waren die durchschnittliche Parasitenanzahl bei beiden Stämmen und auch die zumeist milde Gewebereaktion in der Niere im Versuchsverlauf sehr ähnlich. Deswegen sind trotz der signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Parasitenanzahl von Stamm H und Stamm T in den Wochen 9-11 die histologischen Ergebnisse der beiden Stämme insgesamt vergleichbar.

Bisher liegen noch keine Arbeiten über unterschiedliche Empfänglichkeit verschiedener Regenbogenforellenstämme gegenüber der PKD vor (BARTHOLOMEW et al. 2003). Der durchgeführte Versuch und dessen Auswertung haben gezeigt, dass die beiden untersuchten Stämme H und T vergleichbare Reaktionen auf die Infektion mit *T. bryosalmonae* zeigen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Empfänglichkeit von Stamm H und Stamm T gegenüber der PKD gefunden.

5.2 Rotmaulseuche

Für die Infektionsversuche mit *Yersinia ruckeri* wurde nicht der Referenzstamm ATCC 29473 verwendet, sondern ein Feldisolat aus Bayern. Die beiden Bakterienstämme wurden mit Hilfe eines Selektivmediums (FURONES et al. 1993) auf das Vorhandensein des virulenzgebundenen „Heat-Sensitive-Factor“ (HSF) untersucht, und nur das Feldisolat war HSF-positiv. Es ist wahrscheinlich, dass die vorliegende Probe des Referenzstammes durch häufige Passagen auf Nährböden seine Virulenz verloren hat. Aus diesem Grund wurde das HSF-positive Feldisolat für den Versuch verwendet.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass bei einer Erregerexposition mittels Wasserbad auch bei sehr hohen Keimkonzentrationen kein Krankheitsausbruch ausgelöst werden konnte. Daher wurde als Expositionsmethode die intraperitoneale Injektion einer *Y. ruckeri* - Suspension gewählt (BUSCH & LINGG 1975, AFONSO et al. 1998).

Die Bestätigung für die stattgefundene Infektion mit *Y. ruckeri* erfolgte zusätzlich zur klinischen Symptomatik und pathologischen Veränderungen mittels bakteriologischer Untersuchung (BU) und PCR. Bei sämtlichen verendeten Fischen waren sowohl PCR als auch BU positiv. Diejenigen Fische, die bis zum Versuchsende nach 3 Wochen überlebten, waren

dagegen sowohl in der PCR als auch in der BU negativ. Bei der Sektion wurden bei diesen Fischen zum Teil noch Symptome wie Dunkelverfärbung der Haut und Milzschwellung (RÜBSAMEN & WEIS 1985, FRERICHS et al. 1985) gefunden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Fische trotz der überstandenen Infektion zu symptomlosen Trägern des Bakteriums geworden sind (BUSCH & LINGG 1975). Versuche von HUNTER et al. (1980) zeigten, dass *Y. ruckeri* in Carrierfischen nicht immer nachgewiesen werden kann. In ihrer Studie wurde das Bakterium in inneren Organen der Carrierfische nicht gefunden. Der Nachweis gelang nur aus den hinteren Darmabschnitten der Fische und auch dort nur zu bestimmten Zeiten, aufgrund des zyklischen Auftretens des Bakteriums im Carrier. Dieselben Beobachtungen machten BUSCH & LINGG (1975).

Bei der höchsten Dosierung (Dosis 1: 1×10^6 Keime/Fisch) verstarben sämtliche Fische beider Stämme perakut innerhalb der ersten 3 Tage p.i.. Sowohl BU als auch PCR der Fische waren positiv und die für die Rotmaulseuche typischen Symptome wie Hämorrhagien in verschiedenen Organen und Dunkelverfärbung der Haut (WOBESER 1973, FUHRMANN et al. 1983, RÜBSAMEN & WEIS 1985, SCHLOTFELDT et al. 1985) traten bei beiden Stämmen in vergleichbarem Umfang auf. Bei dieser Dosierung waren also keine signifikanten Unterschiede zwischen Stamm H und Stamm T zu beobachten.

Auch bei Infektionsversuchen von ANDERSON (1988) und KAWULA (1996) wurden nach Infektionsversuchen mit vergleichbar hohen Dosen von *Y. ruckeri* perakute Verluste und Mortalitätsraten von 100 % beobachtet.

Bei der niedrigeren Dosis 2 mit 1×10^5 Keimen/Fisch betrug die Mortalitätsrate nur noch 30 % (H) bzw. 25 % (T). Die ersten Verluste traten zeitlich etwas versetzt auf, bei Stamm H am 7. Tag p.e., bei Stamm T erst 11 Tage p.e.. Insgesamt aber waren die Verluste mit 6 Fischen bei Stamm H und 5 Fischen bei Stamm T annähernd gleich. Bei der Sektion wurden für die Rotmaulseuche charakteristische Symptome wie Blutungen im Maul- und Kopfbereich beobachtet (BUSCH & LINGG 1975, RÜBSAMEN & WEIS 1985). Die meisten beobachteten Symptome traten bei beiden Stämmen im gleichen Maße auf. Auffällige Unterschiede waren nur bei Hämorrhagien im Maul und in den Flossenbasen, Milzschwellung und Dunkelverfärbung der Haut zu sehen. Die drei erstgenannten Symptome kamen bei Stamm H signifikant häufiger vor als bei Stamm T. Eine Dunkelfärbung der Haut trat dagegen häufiger bei Stamm T auf.

Bei ANDERSON (1988), BUSCH & LINGG (1975), KNITTEL (1981) und EWALDSON (1990) wurden nach Infektion von Regenbogenforellen mit einer vergleichbaren Dosis von *Y. ruckeri* ähnliche Mortalitätsraten beobachtet.

Von der Gruppe, die mit der niedrigsten Keimzahl infiziert wurde (Dosis 3: 1×10^4 Keime/Fisch), verstarben nur wenige Tiere – 3 Fische von Stamm H und ein Fisch von Stamm T. Die Mortalitätsrate betrug 15 % (H) bzw. 5 % (T).

Auch bei dieser Gruppe traten die Symptome bei beiden Stämmen größtenteils in gleichem Umfang auf. Die einzige Auffälligkeit bestand darin, dass deutlich mehr Fische von Stamm H als von Stamm T eine Dunkelverfärbung der Haut aufwiesen.

Die bei den beiden Stämmen etwas voneinander abweichenden Schwerpunkte in der klinischen Symptomatik bei der mittleren Dosierung und die im Vergleich zu Stamm H geringfügige zeitliche Verzögerung, mit der Verluste bei Stamm T auftraten, weisen auf eine geringgradig unterschiedliche Form der Manifestation der Erkrankung bei den beiden Stämmen hin. Trotzdem waren bei jeder Dosierung die auftretenden Verluste bei Stamm H und Stamm T annähernd gleich, und deswegen kann abschließend gesagt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in der Empfänglichkeit von Stamm H und Stamm T gegenüber der Infektion mit *Y. ruckeri* gefunden werden konnten.

5.3 VHS

Bei diesem Versuch erfolgte die Erregerexposition über ein infektiöses Wasserbad. Dieses Infektionsmodell wurde gewählt, weil es sich zuvor schon in verschiedenen Arbeiten bewährt hatte (SNOW & CUNNINGHAM 2000, KING et al. 2001b, QUILLET et al. 2001, SLIERENDRECHT 2001). Außerdem wurde diese Methode vom Nationalen Referenzlaboratorium für Viruskrankheiten der Fische, Insel Riems (BFAV) empfohlen, von welchem das Virus zur Verfügung gestellt worden war (BERGMANN, pers. Mitteilung).

Der Versuch wurde bei einer Wassertemperatur von 12 °C durchgeführt, weil Temperaturen von 9-12°C für die Virusvermehrung im Fisch am günstigsten sind. Bei Temperaturen über 15°C wird das Wachstum des Virus gehemmt und es treten in der Regel keine Krankheitsausbrüche mehr auf (VESTERGARD JØRGENSEN 1982).

Den Beweis für die erfolgte Infektion mit dem VHS-Virus erbrachten zusätzlich zum klinischem Erscheinungsbild und den pathologischen Veränderungen der Nachweis eines

CPE in der Zellkultur und die positiven Ergebnisse der PCR. Bei sämtlichen infizierten Fischen beider Stämme, auch bei denjenigen, die bis zum Versuchsende überlebt hatten, war die PCR positiv und in der Zellkultur trat ein CPE auf. Dies weist darauf hin, dass auch bei den überlebenden Fischen der Erreger bis zum Ende des Versuches nach 21 Tagen nicht vollständig eliminiert werden konnte. Auch PFEIL & WIEDEMANN (1977) konnten mittels Immunofluoreszenz und Zellkultur das Virus über einen Zeitraum von 23 Tagen p.i. nachweisen.

Der Krankheitsverlauf bei den beiden Stämmen war insgesamt sehr ähnlich. Die Mortalität war sowohl bei Stamm H (86,7%) als auch bei Stamm T (93,3 %) hoch, und bei beiden Stämmen traten die größten Verluste zwischen dem fünften und dem siebten Tag p.e. auf.

Sowohl bei Stamm H als auch bei Stamm T wurden bei der Sektion die für die Krankheit charakteristischen Symptome wie anämische Muskulatur, Dunkelverfärbung, Exophthalmus und Einblutungen in Muskulatur, Haut und Auge gefunden (GHITTINO 1965, SMAIL 1999). Eine Auffälligkeit bestand darin, dass bei Stamm T deutlich häufiger Blutungen ins Auge auftraten als bei Stamm H, aber abgesehen davon kamen die beobachteten Symptome bei beiden Stämmen vergleichbar häufig vor.

Insgesamt waren bei der Infektion mit VHS keine signifikanten Unterschiede in der Empfänglichkeit der beiden Stämme gegenüber dem Virus zu erkennen.

Die Empfänglichkeit verschiedener Regenbogenforellenstämme und ihrer Kreuzungsprodukte wurde sowohl in Frankreich als auch in Dänemark im Rahmen von Studien eingehend untersucht. Die Mortalitätsraten der verschiedenen Stämme lagen zwischen 30 und 95% (DORSON et al. 1995) bzw. zwischen 58-75% (SLIERENDRECHT et al. 2001). Die Autoren konnten mit Kreuzungsversuchen einen genetischen Hintergrund für die vorhandenen Resistenzen verschiedener Regenbogenforellenstämme gegenüber der VHS nachweisen.

Mit Mortalitätsraten von 86,7% (H) und 93,3 % (T) weisen beide untersuchten Stämme keine erhöhte Resistenz gegenüber der VHS auf. Vielmehr sind beide Stämme empfänglich für eine Infektion mit dem Virus.

Bei keinem der durchgeführten Infektionsversuche mit PKD, ERM und VHS wurden gravierende, statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Krankheitsverlaufes, der Symptomatik und der Mortalitätsraten zwischen den beiden Stämmen gefunden. Die

Empfänglichkeit des deutschen (H) und des amerikanischen Regenbogenforellenstammes (T) gegenüber diesen Krankheiten ist vergleichbar.

Zusammen mit den Ergebnissen der kalifornischen Arbeitsgruppe deutet dies darauf hin, dass die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Drehkrankheit bei Stamm H nicht zu Lasten einer höheren Empfänglichkeit gegenüber anderen Fischpathogenen erfolgte.

Der nächste Schritt wird sein, die Art und die Vererbung des Resistenzmechanismus zu erforschen, den der deutsche Regenbogenforellenstamm gegenüber der Drehkrankheit besitzt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Drehkrankheit ist eine wichtige parasitäre Erkrankung der Salmoniden, die in vielen europäischen Ländern sowie in den USA zunehmend an Bedeutung gewinnt. In vorangegangenen Untersuchungen wurde ein deutscher Regenbogenforellenstamm gefunden, der gegenüber der Drehkrankheit relativ unempfindlich ist.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war, diesen Regenbogenforellenstamm (H) auf seine Empfänglichkeit gegenüber folgenden, sowohl in Europa als auch in den USA bedeutenden Krankheitserregern zu untersuchen: Der Parasit *Tetracapsuloides bryosalmonae* verursacht die Proliferative Nierenerkrankung (PKD), das Bakterium *Yersinia ruckeri* ist der Erreger der Rotmaulseuche (ERM), und das VHS-Virus ist das verursachende Agens der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS). Ein Drehkrankheit-empfindlicher amerikanischer Stamm (T) wurde zum Vergleich mituntersucht.

Beim Infektionsversuch mit PKD erfolgte die Erregerexposition für 6 Tage unter Feldbedingungen in einem Fischzuchtbetrieb, in dem die Krankheit seit Jahren endemisch auftritt. Danach wurden die Fische ins Labor verbracht und bis zum Versuchsende 16 Wochen p.e. dort unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Die Infektionsversuche mit *Y. ruckeri* und dem VHS-Virus wurden unter Laborbedingungen durchgeführt.

Die erfolgte Infektion mit den Krankheitserregern wurde anhand von klinischer Symptomatik, Histologie und PCR bestätigt. Bei der Rotmaulseuche wurden außerdem bakteriologische Untersuchungen durchgeführt, und bei der VHS erfolgte der Virusnachweis zusätzlich mittels Zellkultur. Bei allen Fischen, die im Verlauf der Versuche verstarben, konnte der jeweilige Krankheitserreger mit den genannten Diagnosemethoden nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auf, dass der deutsche Stamm H und der amerikanische Stamm T für alle drei untersuchten Krankheiten eine vergleichbare Empfänglichkeit besitzen. Weder bei Krankheitsverlauf und Symptomatik noch bei der Mortalitätsrate wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen gefunden.

Damit sind die Voraussetzungen für den Beginn der dritten Phase des Projekts „Resistant Trout“, welche für einen Zeitraum von 7 Jahren geplant ist, erfüllt. Es werden nun weiterführende Untersuchungen durchgeführt, welche unter anderem Art und Vererbung der Resistenzmechanismen des deutschen Regenbogenforellenstammes gegenüber der Drehkrankheit klären sollen.

7 SUMMARY

Investigation into the Susceptibility of Two Strains of Rainbow Trout to *Tetracapsuloides bryosalmonae*, *Yersinia ruckeri* and Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus.

Whirling disease is an important parasitic disease of salmonids that attains increasing importance in Europe and in the USA. Earlier studies have shown that a strain of rainbow trout from Germany (H) is relatively resistant to Whirling Disease compared with 3 other German strains and one North American strain.

The focus of this work was to examine the susceptibility of this rainbow trout strain to other important pathogens, along with a North American strain (T), which is highly susceptible to whirling disease.

The parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* causes **Proliferative Kidney Disease (PKD)**, the bacterium *Yersinia ruckeri* generates **Enteric Red Mouth Disease (ERM)** and the VHS-virus is the causative agent of **Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS)**.

The exposure to *Tetracapsuloides bryosalmonae* was conducted under field conditions for 6 days in a hatchery long known as endemic for the parasite. Fish were then transferred to the wet laboratory and held under controlled conditions until the end of the experiment after 16 weeks. The infection trials with *Yersinia ruckeri* and viral haemorrhagic septicaemia virus were taken place under controlled laboratory conditions until the end of the experiments on day 21 p.e..

The infection was confirmed by means of clinical signs, histology and PCR for all the pathogens investigated. For ERM an additional bacteriological examination was carried out and for VHS the virus verification was also conducted via cell culture. Within all fish that died following challenge with the pathogens the causative agent could be identified with at least one of the above mentioned diagnostic methods.

The results of this work demonstrate that the susceptibility of the German strain H is comparable with that of the American strain T to all three pathogens investigated.

There were no significant differences in course of the disease, clinical signs and mortality caused by the diseases.

Thus the conditions for the start of phase three of the project “Resistant Trout” are fulfilled. Further investigations concerning the mechanisms of resistance of the German strain to Whirling Disease are in progress.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS A., RICHARDS R.H., MARIN DE MATEO M. (1992) Development of monoclonal antibodies to PKX, the causative agent of proliferative kidney disease. *Journal of Fish Diseases* 15: 515-521
- AFONSO A., LOUSADA S., SILVA J., ELLIS A.E., SILVA M.T. (1998) Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:27-37
- AHNE W. (1980a) Occurrence of infectious pancreatic necrosis virus (IPN) in different fish species. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 93(1): 14-16
- AHNE W. (1980b) Experimentelle Egtved Virus Infektion beim Hecht (*Esox lucius*). *Tierärztliche Umschau* 35: 225-229
- ALDERMANN D.J. & CLIFTON-HADLEY R.S. (1988) Malachite green therapy of proliferative kidney disease in rainbow trout: Field trials. *The Veterinary Record* 122: 103-106
- ALDERMANN D.J. & RODGERS C.J. (1984) The effects of precision mesh filtration on proliferative kidney disease infectivity. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 4: 38-39
- ALEXANDER J.B., INGRAM G.A., SHAMSHOOM S.M., BOWERS A. (1983) Antigen clearance in trout. *Developmental and Comparative Immunology* 7: 707-708
- ALTINOK I., GRIZZLE J.M., ZHANJIANG L. (2001). Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 44: 29-34
- AMEND D.F., ESHENOUR R.W. (1980) Development and use of commercial fish vaccines. *Salmonid* 3(6): 8-12
- AMLACHER E. (1986) Taschenbuch der Fischkrankheiten. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena
- AMLACHER E. (1992). Taschenbuch der Fischkrankheiten. Grundlagen der Fischpathologie, 6. überarbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 149-177
- AMLACHER E., UDE J., RUDOLPH C., ERNST G. (1980) Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of VHS in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and additional histopathological and hematological observations. *Journal of Fish Diseases* 3: 55-62

-
- ANDERSON C.L., CANNING E.U., OKAMURA B. (1998) A triploblast origin for Myxozoa. *Nature* 392: 346
- ANDERSON C.L., CANNING E.U., OKAMURA B. (1999a) 18S rDNA sequences indicate that PKX organism parasitizes Bryozoa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19: 94-97
- ANDERSON C.L., CANNING E.U., OKAMURA B. (1999b) Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology* 119: 555-561
- ANDERSON W. (1988) Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Yersinia ruckeri* in Süddeutschland. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians- Universität, München
- ANDREE K.B., MACCONNELL E., HEDRICK R.P. (1998) A polymerase chain reaction test for detection of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in fish, and a comparison to existing detection techniques. *Diseases of Aquatic Organisms* 34 (2): 145-154
- ANGELIDIS P., BAUDIN-LARUENCIN F., QUENTEL C., YOUINOU P. (1987) Lower immune response induced by PKD. *Journal of Fish Biology* 31 (Suppl. A): 247-250
- ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MCDOWELL T.S., HEDRICK R.P. (1998) Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete tissues by using a nonradioactive *In situ* hybridization (ISH) protocol. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 338-347
- ARGENTON F., DE MAS S., MALOCCO C., DALLA VALLE L., GIORGETTI G., COLOMBO L. (1996) Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24: 121-127
- ARKUSH K.D. & HEDRICK R.P. (1990) Experimental transmission of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease, to three species of Pacific salmon. *Journal of Applied Ichthyology* 6: 237-243
- AUSTIN B. & AUSTIN D.A. (1987) Enterobacteriaceae representatives. In: Austin B. and Austin D.A., *Bacterial fish pathogens, Disease in farmed and wild fish*, Ellis Horwood Ltd., Halsted Press, Chichester. Pp 196-224
- AUSTIN B. & AUSTIN D.A. (1989) *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Chichester, Ellis Horwood 1989
- AUSTIN B. & AUSTIN D.A. (1993) *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, 2nd ed. Ellis Horwood, UK, pp.208-226
- AUSTIN D.A., ROBERTSON P.A.W., AUSTIN B. (2003) Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology* 26: 127-131

- BANGERT R.L., WARD A.S., STAUBER E.H., CHO B.R., WIDDERS P.R. (1988) A survey of the aerobic bacteria in the faeces of captive raptors. *Avian Diseases* 32: 53-62
- BARTHOLOMEW J.L., MCDOWELL T.S., MATTES M., EL-MATBOULI M, HEDRICK R.P. (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
- BENMANSOUR A., BASURCO B., MONNIER A.F., VENDE P., WINTON J., DE KINKELIN P. (1997) Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of VHS virus, a fish rhabdovirus. *The Journal of General Virology* 78: 2837-2846
- BERCOVIER H. & MOLLARET H.H. (1984) Genus XIV. *Yersinia*. In: Krieg, N.R. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 Williams and Wilkins, Baltimore pp 498-506
- BESSE P. (1956) L'anémie pernicieuse des truites. *Annales de la Station Centrale d'hydrobiologie Appliqués* 6: 441-467
- BLAZER V.S. & WOLKE R.E. (1984) Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 1244-1247
- BOUDINOT P., BLANCO M., DE KINKELIN P., BENMANSOUR A. (1998) Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and non specific response in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306
- BRAGG R.R. & HENTON M.M. (1986) Isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 6: 5-6
- BROWN J.A., THONNEY J.-P., HOLWELL D., WILSON W.R. (1991) A comparison of the susceptibility of *Salvelinus alpinus* and *Salmo salar* ouananiche to proliferative kidney disease. *Aquaculture* 96: 1-6
- 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
- BRUCHHOF B., MARQUARDT O., ENZMANN P.J. (1995) Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 55: 111-119
- BRUDERSETH B.E. & EVENSEN Ø. (2002) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 52(1): 21-28

- BRUDERSETH B.E., CASTRIC J., EVENSEN Ø. (2002) Studies on pathogenesis following single and double infection with viral hemorrhagic septicaemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology* 39: 180-189
- BRUNO, D.W. & MUNRO A.L.S. (1989) Immunity in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., fry following vaccination against *Yersinia ruckeri* and the influence of body weight and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on the detection of carriers. *Aquaculture* 81: 205-211
- BRUNSON R., TRUE K., YANCEY J. (1989) VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter* 17: 3-4
- BUCKE D., MCGREGOR D., HUDSON E.B., SCOTT P. (1981) Control measures fail to stop the threat of PKD. *Fish Farmer* 4: 25
- BUCKE D., FEIST S.W., CLIFTON-HADLEY R.S. (1985) The occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in wild fish stocks. Second International Conference of the EAFP. "Diseases of Fish and Shellfish", September 2-5, 1985, Montpellier, France (Abstract)
- BUCKE D., FEIST S.W., CLIFTON-HADLEY R.S. (1991) The occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in cultured and wild fish: further investigations. *Journal of Fish Diseases* 14: 583-588
- BULLOCK G.L. & ANDERSON D.B. (1984) Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric redmouth disease. In: P. de Kinkelin, (ed) Symposium on fish vaccination. Office International des Epizooties, Paris, France. 2022 February 1984, 151-166
- BULLOCK G.L. & SNIEZKO S.F. (1975) Hagerman Redmouth, a Disease of Salmonids Caused by a Member of the Enterobacteriaceae. *Fish Disease Leaflet* 42, United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, S.1-5
- BULLOCK G.L., STUCKEY H.M., HERMAN R.L. (1976) Comparative susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the enteric redmouth bacterium and *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Wildlife Diseases* 12: 376-379
- BULLOCK G.L., STUCKEY H.M., SHOTTS E.B. (1978) Enteric Redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *Journal of Fish Diseases* 1: 351-356
- BULLOCK G.L., MAESTRONE G., STARLIPER C., SCHILL B. (1983). Potentiated sulfonamide therapy of enteric redmouth disease. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 101-102
- BUSCH R.A. (1978) Protective vaccines for mass immunisation of trout. *Salmonid* 1: 10-22
- BUSCH R.A. (1981) The current status of diagnostic serology for the major bacterial diseases of fish. *Developments in biological standardization* 49: 85-96

- BUSCH R.A. (1982) Enteric Redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Anderson D.P., Dorson M. and Dubourget P. (eds.) Antigenes of Fish Pathogens. Marcel Merieux, Lyons, pp 201-223
- BUSCH R.A. (1985) PKD in Idaho. Fish Health Section of the American Fisheries Society Newsletter 13: 6
- BUSCH R.A. & LINGG A.J. (1975) Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada 32: 2429-2433
- BÜTSCHLI O. (1881) Zoologisches Jahrbuch 1880 I, 162
- CANNING E.U., OKAMURA B., CURRY A. (1996) Development of a myxozoan parasite *Tetracapsula bryozoides* gen. n. et sp. n. in *Cristatella mucedo* (Bryozoa: Phylactolaemata). Folia Parasitologica 43: 249–261.
- CANNING E.U., CURRY A., FEIST S.W., LONGSHAW M., OKAMURA B. (1999) *Tetracapsula bryosalmonae* n.sp. for PKX organism, the cause of PKD in salmonid fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 19: 203-206
- CANNING E.U., CURRY A., FEIST S.W., LONGSHAW M., OKAMURA B. (2000) A New Class and Order of Myxozoans to Accommodate Parasites of Bryozoans with Ultrastructural Observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX Organism). The Journal of Eukaryotic Microbiology 47(5): 456-468
- CANNING E.U., TOPS S.A., CURRY A., WOOD T.S., OKAMURA B. (2002) Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. The Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 280-295
- CASTAGNARO M., MARIN M., GHITTINO C., HEDRICK R.P. (1991) Lectin histochemistry and ultrastructure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* kidneys affected by proliferative kidney disease. Diseases of Aquatic Organisms 10: 173-183
- CASTILLO J.A. & PERIBANEZ M.A. (1992) First description of PKD in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. NATO Advanced Research Workshops Programme. International Workshop of Myxosporea, October 6-8, 1992, České Budejovice, Czechoslovakia (Abstract).
- CASTILLO J.A., PERIBANEZ M.A., GARCIA L., DE LUCO D. (1995) Efficacy of Fumagillin therapy against proliferative kidney disease (PKD) in naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Seventh International Conference of the EAFP. "Diseases of Fish and Shellfish", September 10-15, 1995, Palma de Mallorca, Spain (Poster)
- CASTRIC J. & DE KINKELIN P. (1980) Occurrence of VHS in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson reared in sea-water. Journal of Fish Diseases 3: 21-27

- CASTRIC J. & DE KINKELIN P. (1984) Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, seabass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to VHS. *Aquaculture* 41: 203-212
- CASTRIC J., JEFFROY J., BEARZOTTI M., DE KINKELIN, P. (1992) Isolation of VHSV from wild elvers (*Anguilla anguilla*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 21-23
- CESCHIA G., GIORGETTI G., BERTOLDINI G., FONTEBASSO S. (1987) The in vitro sensitivity of *Yersinia ruckeri* to specific antibiotics. *Journal of Fish Diseases* 10: 65-67
- CHILMONCZYK S., THOMAS P., DE KINKELIN P. (1989) Occurrence of proliferative kidney disease in an indoor recirculating unit and indirect experimental contamination of the rainbow trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 9: 38-41
- CHILMONCZYK S., MONGE D., DE KINKELIN P. (2002) Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *Journal of Fish Diseases* 25: 217-226
- CIPRIANO R.C., SCHILL W.B., PYLE S.W., HORNER R. (1986) An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitolpositive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Wildlife Diseases* 22: 488-492
- CIPRIANO R.C., RUPPENTHAL T., SCHILL W.B., PYLE S.W., SHOTTS E.B. Jr. (1987) Susceptibility of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental infections with different serotypes of *Yersinia ruckeri*. *FEMS Microbiology Letters* 35: 27-31
- CLIFTON-HADLEY R.S. (1986) Studies on proliferative kidney disease. Institute of Aquaculture. University of Stirling, PhD thesis
- CLIFTON-HADLEY R.S. & ALDERMAN D.J. (1987) The effects of malachite green upon proliferative kidney disease. *Journal of Fish Diseases* 10: 101-107
- CLIFTON-HADLEY R.S. & FEIST S.W. (1989) Proliferative kidney disease in brown trout *Salmo trutta*: further evidence of a myxosporean aetiology. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 99-103
- CLIFTON-HADLEY R.S., RICHARDS R.H., BUCKE D. (1983) Method for the rapid diagnosis of proliferative kidney disease in salmonids. *The Veterinary Record* 112: 609
- CLIFTON-HADLEY R.S., RICHARDS R.H., BUCKE D. (1984a) Experimental transmission of proliferative kidney disease: Preliminary report. *The Veterinary Record* 114: 90
- CLIFTON-HADLEY R.S., BUCKE D., RICHARDS R.H. (1984b) Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 7: 363-377

- CLIFTON-HADLEY R.S., RICHARDS R.H., BUCKE D. (1985) The Sequential Pathological Changes in Proliferative Kidney Disease. Fish and Shellfish Pathology, Academic Press 1985, Ellis A.E. (ed.), N.Y., 359-367
- CLIFTON-HADLEY R.S., RICHARDS R.H., BUCKE D. (1986a) Proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Salmo gairdneri*: Further observations on the effects of water temperature. Aquaculture 55: 165-171
- CLIFTON-HADLEY R.S., BUCKE D., RICHARDS R.H. (1986b) Economic importance of proliferative kidney disease in salmonid fish in England and Wales. The Veterinary Record 119: 305-306
- CLIFTON-HADLEY R.S., BUCKE D., RICHARDS R.H. (1987a) A study of the sequential clinical and pathological changes during proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases 10: 335-352
- CLIFTON-HADLEY R.S., RICHARDS R.H., BUCKE D. (1987b) Further consideration of the haematology of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases 10: 435-444
- COONS A.H., CREECH H.J., JONES R.N. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 47: 200
- COQUET L., COSETTE P., QUILLET L., PETIT F., JUNTER G.-A., JOUENNE T. (2002) Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. Applied and Environmental Microbiology 68: 470-475
- COSSARINI-DUNIER M. (1986) Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin. Journal of Fish Diseases 9:27-33
- DALSGAARD J., FROM J., HORLYCK V. (1984) First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 4: 10
- DALY J.G. & STEVENSON R.M.W. (1985) The importance of culturing several tissues to detect *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish. Transactions of the American Fisheries Society 114: 909-910
- DALY J.G., LINDVIK B., STEVENSON R.M.W. (1986) Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. Diseases of Aquatic Organisms 1: 151-153
- DAVIES R.L. & FRERICHS G.N. (1989) Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. Journal of Fish Diseases 12: 357-365
- DE GRANDIS S.A., KRELL P.J., FLETT D.E., STEVENSON R.M.W. (1988) Deoxyribonucleic acid relatedness of serovars of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 38: 49-55

- DALTON J.P. (1980) Protozoan threat to fish industry. *The Veterinary Record* 107: 316
- DE KINKELIN P. (1988) Vaccination against haemorrhagic septicaemia. In: Ellis AE (ed.) *Fish vaccination*. Academic Press, London, p 172–192
- DE KINKELIN P. & GERARD J.-P. (1976) L'hepato-néphrite des salmonidés. *La Pisciculture Francaise* 49: 42-47
- DE KINKELIN P. & GERARD J.-P. (1977) L'hepato-néphrite parasitaire de la truite arc-en-ciel. *Bulletin de l'office International des Epizooties* 87: 489-490
- DE KINKELIN P. & LE BERRE M. (1977) Isolement d'un rhabdovirus pathogene de la truite fario (*Salmo trutta* L.1766) C.R. Académie des Sciences, Paris 284 D: 101-104
- DE KINKELIN P., GAY M., FORMAN S. (2002) The persistence of infectivity of *Tetracapsula bryosalmonae*-infected water for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25 : 477-482
- DE KINKELIN P., CHILMONCZYK S., DORSON M., LE BERRE M., BAUDOY A.M. (1979) Some pathogenic facets of rhabdoviral infection of salmonid fish. In: *Symposium on Microbiology: Mechanisms of Viral Pathogenesis and Virulence*, ed. Bachmann P.A., 357-375. WHO Collaborating Centre for Collection and Education of Data on Comparative Virology, Munich, Germany
- DE LA CRUZ J.A., RODRIGUEZ A., TEJEDOR C., DE LUCAS E., OROZCO L.R. (1986) Isolation and identification of *Yersinia ruckeri*, causal agent of enteric Redmouth disease, for the first time in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 6: 43-44
- DEL CERRO A., MARQUEZ I., GUIJARRO J.A. (2002) Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10): 5177-5180
- DIEROLF B. (1995) Untersuchungen zur Proliferativen Kidney Disease (PKD) der Salmoniden. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- DIXON P.F., FEIST S., KEHOE E., PARRY L., STONE D.M., WAY K. (1997) Isolation of VHSV from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 81-89
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C., CHEVASSUS B. (1995) Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Veterinary Research* 26:361-368
- DUDLEY D.J., GUENTZEL M.N., IBARRA M.J., MOORE B.E., SAGIK B.P. (1980) Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 118-126
- DULIN M.P., HUDDLESTON T., LARSON R.E., KLONTZ G.W. (1976) Enteric redmouth disease. Idaho Forest, Wildlife and Range Experiment Station, Contributions 16: 15 pp

- DWILOW A.G., SOUTER B.W., KNIGHT K. (1987) Isolation of *Yersinia ruckeri* from burbot *Lota lota* from the Mackenzie River, Canada. *Journal of Fish Diseases* 10: 315-317
- EINER-JENSEN K., OLESEN N.J., LORENZEN N., JØRGENSEN P.E.V. (1995) Use of polymerase chain reaction (PCR) to differentiate serologically similar VHS virus isolates from Europe and America. *Veterinary Research* 26: 464-469
- ELLIS A.E., MCVICAR A.H., MUNRO A.L.S (1982) A preliminary report on the epidemiology of proliferative kidney disease in brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon parr (*S. salar*) in Scotland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 2: 13-15
- ELLIS A.E., MCVICAR A.H., MUNRO A.L.S (1985) Proliferative kidney disease in brown trout, *Salmo trutta* L., and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr.: histopathological and epidemiological observations. *Journal of Fish Diseases* 8: 197-208
- EL-MATBOULI M. & HOFFMANN R.W. (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitology Research* 75(6): 461-464
- EL-MATBOULI M. & HOFFMANN R.W. (1991) Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Fumagilin. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 109-113
- EL-MATBOULI M. & HOFFMANN R.W. (1998) Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporous stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology* 28: 195-217
- EL-MATBOULI M. & HOFFMANN R.W. (2002) Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease – field studies and exposure experiments. *Journal of Fish Diseases* 25: 1-9
- EL-MATBOULI M., FISCHER-SCHERL T., HOFFMANN R.W. (1992) Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some *Myxosporidia* spp. important for freshwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 367-402
- EL-MATBOULI M., HOFFMANN R.W., MANDOK C. (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. *Journal of Fish Biology* 46: 919-935
- EL-MATBOULI M., HOLSTEIN T.W., HOFFMANN R.W. (1998) Determination of nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease. *Parasitology Research* 84: 694-699

- EL-MATBOULI M., KÜPPERS M.P., MCDOWELL T.S., 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).
- ENZMANN P.-J. (1981) Rapid identification of VHSV from trout by immunofluorescence.
In: Hennessen W. (ed.) Fish Biologics, Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardization. Vol. 49, S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 57-62
- ERDAL J.L. (1989) Vaksinasjon mot aktuelle infeksjoner hos fisk. Norsk Veterinaertidsskrift 101: 489-495
- EVENSEN Ø. & OLESEN N.J. (1997) Immunohistochemical detection of VHS virus in paraffin-embedded specimens of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the influence of primary antibody, fixative and antigen unmasking on method sensitivity. Veterinary Pathology 43: 253-261
- EWALDSSON L. (1990) ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Yersinia ruckeri* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
- EWING W.H., ROSS A.J., BRENNER D.J., FANNING G.R. (1978) *Yersinia ruckeri* sp.nov., the Redmouth (RM) bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 28: 37-44
- EWING W.H. (1986) Edward's and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York, 473 pp
- FEIST S.W. & BUCKE D. (1987) Ultrastructural aspects of PKD, the causative agent of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases 10: 323-327
- FEIST S.W. & BUCKE D. (1993) Proliferative kidney disease in wild salmonids. Fisheries Research 17: 51-58
- FEIST S.W., PEELER E.J., GARDINER R., SMITH E., LONGSHAW M. (2002) Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. Journal of Fish Diseases 25: 451-458
- FERGUSON H.W. (1981) Effects of temperature on the development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases 4: 175-177
- FERGUSON H.W. (1989) Systemic pathology of fishes. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, Ames, Iowa: 78-86
- FERGUSON H.W. & ADAIR B. MC.C. (1977) Protozoa associated with proliferative kidney disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Veterinary Record 100: 158-159

- FERGUSON H.W. & BALL H.J. (1979) Epidemiological aspects of proliferative kidney disease amongst rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in Northern Ireland. *Journal of Fish Diseases* 2: 219-225
- FERGUSON H.W. & NEEDHAM E.A. (1978) Proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 1: 91-108
- FERNANDEZ-ALONSO M., ROCHA A., COLL J.M. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral hemorrhagic septicemia virus. *Vaccine* 19: 3067-75
- FERNÁNDEZ DE LUCO D., PERIBÁÑEZ M.A., GARCÍA L., CASTILLO J.A. (1997) Granulomatous myositis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* affected by proliferative kidney disease (PKD). *Diseases of Aquatic Organisms* 31:49-54
- 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
- FOOTT J.S. & HEDRICK R.P. (1987) Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *Journal of Fish Biology* 30: 477-483
- FOOTT J.S. & HEDRICK R.P. (1990) Blood parameters and immune status of rainbow trout with proliferative kidney disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 2: 141-148
- FRERICHS G.N., STEWART J.A., COLLINS R.O. (1985) Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 8: 383-387
- FUHRMANN H., BOHM K.H., SCHLOTTFELDT H.-J. (1983) An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases* 6: 309-311
- FUHRMANN H., BÖHM K.H., SCHLOTTFELDT H.-J. (1984) On the importance of enteric bacteria in the bacteriology of freshwater fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 4: 42-46
- FURONES M.D., GILPIN M.J., MUNN C.B. (1993) Culture medium for the differentiation of isolates of *Yersinia ruckeri* based on detection of a virulence factor. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 360-366
- GAY M., OKAMURA B., DE KINKELIN P. (2001) Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 31-40
- GEBHARD H., KINZELBACH R., SCHMIDT-FISCHER S. (Hrsg.) (1996) Gebietsfremde Tierarten; Auswirkungen auf einheimische Arten, Lebensgemeinschaften und Biotope. *Situationsannale*, Landsberg: ecomed Verlagsgesellschaft
- GHITTINO P. (1965). Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 126: 468-478

- GHITTINO P., ANDRUETTO S., VIGLIANI E. (1977) L'amebiasi della trota iridea d'Allevamento. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia* 12: 74-89
- GIBELLO A., BLANCO M.M., MORENO M.A., CUTULI M.T., DOMENECH A., DOMÍNGUEZ L., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL J.F. (1999). Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 346-350
- GIORGETTI G., GESCHIA G., BOVO G. (1985) First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow trout in Italy. In: Ellis AE (ed.) *Fish and Shellfish Pathology*, Academic Press, New York
- GOLDSTEIN J.N., HUBERT W.A., WOODWARD D.F., FARAG A.M., MEYER J.S (2001) Naturalized salmonid populations occur in the presence of elevated trace element concentrations and temperatures in the Firehole River, Yellowstone National Park, Wyoming, USA. *Environmental toxicology and chemistry* 20(10): 2342-2352
- GREEN M. & AUSTIN B. (1982) The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae. *Aquaculture* 34: 185-192
- GUILLOU J.P., MERLE G., HENAULT S., HATTENBERGER A.M. (1999) Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by reverse transcription followed by polymerase chain reaction. *Diagnostic validation. Veterinary Research* 30: 49-60
- HALLIDAY M.M. (1973) Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids I. The diagnosis of infection. *Nordisk Veterinaermedicin* 25: 345-348
- HALLIDAY M.M. (1973b) Studies of *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures. *Nordisk Veterinaermedicin* 25: 349-358
- HALLIDAY M.M. (1976) The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease in salmonids. *Journal of Fish Biology* 9: 339-357
- HANSEN C.B. & LINGG A.J. (1976) Inert Particle Agglutination Tests for Detection of Antibody to Enteric Redmouth Bacterium. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33: 2857-2860
- HASTINGS T.S. & BRUNO D.W. (1985) Enteric redmouth disease: survey in Scotland and evaluation of a new medium, Shotts-Waltman, for differentiating *Yersinia ruckeri*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 5: 32-36
- HEDRICK R.P. & ARONSTIEN D. (1987) Effects of saltwater on the progress of proliferative kidney disease (PKD) in chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 7: 93-95
- HEDRICK R.P., KENT M.L., ROSEMARK R., MANZER D. (1984) Occurrence of proliferative kidney disease (PKD) among pacific salmon and steelhead trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 4: 34-37

- HEDRICK R.P., KENT M.L., FOOTT J.S., ROSEMARK R., MANZER D. (1985) Proliferative kidney disease (PKD) among salmonid fish in California, USA: a second look. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 5: 36-38
- HEDRICK R.P., KENT M.L., SMITH C.E. (1986) Proliferative kidney disease in salmonid fishes. *Fish Disease Leaflet* 74, US Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington D.C.
- HEDRICK R.P., GROFF J.M., FOLEY P., MCDOWELL T. (1988b) Oral administration of Fumagillin DCH protects chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* from experimentally-induced proliferative kidney disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 165-168
- HEDRICK R.P., MARIN DE MATEO M., ADAMS A., DE KINKELIN P. (1992) The myxosporean nature of proliferative kidney disease of salmonid fish. NATO Advanced Research Workshop Programm. International Workshop of Myxosporea, October 6-8, 1992, České Budejovice, Czechoslovakia.
- HEDRICK R.P., MACCONNELL E., DE KINKELIN P. (1993) Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases* 14: 277-290
- HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., GAY M., MARTY G.D., GEORGIADIS M.P., MACCONNELL E. (1999) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 37: 173-183
- HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., MARTY G.D. MUKKATIRA K., ANTONIO D. B., ANDREE K.B., BUKHARIS 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(1): 53-59
- HEDRICK R.P., BATTS W.N., YUN S., TRAXLER G.S., KAUFMAN J., WINTON J.R. (2003a) Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicaemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 211-220
- HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., MARTY G.D., FOSGATE G.T., MUKKATIRA K., MYKLEBUST K., EL-MATBOULI M. (2003b) 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.
- HEUSCHMANN-BRUNNER G. (1966) Eine seltene Nierenerkrankung bei Forellen. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 16: 511
- HEUSCHMANN O. (1952) Bauchwassersucht bei Regenbogenforellen? *Allgemeine Fischerei-Zeitung* 77: 214-215
- HICKS B.D. & FERGUSON H.W. (1986) Proliferative kidney disease (PKD) in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from Newfoundland. *American Society of Fish Health Sec. Newsletter* 14: 6

-
- HNATH J.G. (1988) Whirling Disease in Michigan: A historical Perspective. For: Whirling Disease Management in North America, an Emergency Conference. Denver CO. April: 12-14
- HOFER B. (1903) Über die Drehkrankheit der RBF. Allgemeine Fischereizeitung 28: 7-8
- HOFFMAN G.L. (1990) *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. Journal of aquatic animal health 2: 30-37
- HOFFMAN G.L. (1970) Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). In: Symposium on Diseases of Fisheries and Shellfish. Sniezko S. F. (ed) American Fisheries Society 69-81
- HOFFMAN G.L. (1974) Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*), and its effect on fish. Transactions of the American Fisheries Society 103: 541-550
- HOFFMAN G.L. Sr. & HOFFMAN G.L. Jr. (1972) Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). I. The effects of chemicals on spores in vitro, and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds. Journal of Wildlife Diseases 8: 49-53.
- HOFFMAN G.L. & PUTZ R.E. (1969) Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. The Progressive Fish Culturist 31: 35-37
- HOFFMAN G. L., DUNBAR C.E., BRADFORD A. (1962) Whirling disease of trout caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report-Fisheries 427: 1 -14
- HOFFMAN G.L., SNEZKO S.F., WOLF K.E. (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 R., PFEIL-PUTZIEN C., DANGSCHAT H., VOGT M. (1979) Untersuchungen zur Pathogenese der VHS bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*). II. Hämatologische und histologische Untersuchungen. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 92: 180-185
- HOFFMANN R.W. & DANGSCHAT H. (1981) A note on the occurrence of proliferative kidney disease in Germany. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 1: 33
- HOFFMANN R.W. & LOMMEL R. (1984) Haematological studies in proliferative kidney disease of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases 7: 323-326
- HOFFMANN R.W. & EL-MATBOULI M. (1994) Proliferative kidney disease (PKD) as an important myxosporean infection in salmonid fish. Pike A.W., Lewis J.W. (ed.): Parasitic Diseases of Fish, Samara Publishing Limited, Tresaith, GB, 3-15

- HOFFMANN R.W., VAN DE GRAAFF S., BRAUN F., KÖRTING W., DANGSCHAT H., MANZ D. (1984) Proliferative kidney disease (PKD) bei Salmoniden. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 97: 288-291
- HOPPER K. (1989) The isolation of VHSV from chinook salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter 17: 1-2
- HORLYCK V., MELLERGARD S., DALSGAARD I., JØRGENSEN P.E.V. (1984) Occurrence of VHS in Danish maricultured rainbow trout. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 4: 11-13
- HORLYCK V., DALSGAARD J., FROM J., OLESEN N.J., VESTERGARD JØRGENSEN P.E. (1985) Observations on enteric redmouth in Denmark. 2. International Conference of EAAP, Montpellier, France, Sept. 2-5
- HORNE M.T. & BARNES A.C. (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
- HOSKINS G.E. (1985) in Brief Notes. Fish Health Section of the American Fisheries Society Newsletter 13: 8
- HOSKINS G.E. & KIESER D. (1986) The occurrence of Proliferative Kidney Disease in British Columbia. In: Hedrick R.P. (ed.) Proceedings of a Workshop on Proliferative Kidney Disease (PKD) in North America. University of California, Davis, April 25-26 1985
- HUNTER V.A., KNITTEL M.D., FRYER J.L. (1980) Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Journal of Fish Diseases 3: 467-472
- IBARRA A.M., GAYLL G.A.E., HEDRICK R.P. (1990) Trials with fumagillin DCH and malachite green to control ceratomyxosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology 25: 217-223
- IBRAHIM A., GOEBEL B.M., LIESACK W., GRIFFITHS M., STACKEBRANDT E. (1993) The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16s rDNA sequences. FEMS Microbiology Letters 114: 173-178
- ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T., MIYAZAKI T. (2001) An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. Diseases of Aquatic Organisms 47(2): 87-99
- JENSEN M.H. (1965) Research on the virus of Egtved disease. Annals of the New York Academy of Sciences 126: 422-426
- JENSEN N.J., BLOCH B., LARSEN J.L. (1979) The ulcer syndrome in cod (*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. Nordisk Veterinaermedicin 31: 436-442

- JØRGENSEN P.E.V. (1969) Serological identification of Egtved virus. Bulletin - Office International des Epizooties 69: 985
- JØRGENSEN P.E.V. (1972) Egtved virus: Antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization tests and by means of the fluorescent antibody technique. In: Mawdesley-Thomas, L.E. (ed.) Diseases of Fish. Academic Press, London, 333
- JØRGENSEN P.E.V. & OLESEN N.J. (1987) Cod ulcer syndrome rhabdovirus is indistinguishable from the Egtved (VHS) virus. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 7: 73-74
- KAERBER G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162: 480
- KAWULA T.H., LELIVELT M.J., ORNDORFF P.E. (1996) Using a new inbred fish model and cultured fish tissue-cells to study *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri* pathogenesis. Microbial Pathogenesis 20: 119-125
- KENT M.L. (1992) The pathogenicity of the PKX myxosporean, the cause of proliferative kidney disease. NATO Advanced Research Workshops Programme. International Workshop of Myxosporea, October 6-8, 1992, České Budejovice, Czechoslovakia (Abstract).
- KENT M.L. & HEDRICK R.P. (1985a) PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific Salmonid Fishes, and its Affinities with the Myxozoa. Journal of Protozoology 32: 254-260
- KENT M.L. & HEDRICK R.P. (1985b) Transmission of the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) with the blood and spleen of infected fish: further evidence that the PKX parasite belongs to the phylum Myxozoa. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 5: 39-42
- KENT M.L. & HEDRICK R.P. (1986) Development of the PKX myxosporean in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Diseases of Aquatic Organisms 1: 169-182
- KENT M.L., KUMI C., WHITAKER D.J., MARGOLIS L. (1993a) *Sphaerospora* sp. in Sockeye Salmon *Oncorhynchus nerka* and its Association with the PKX Myxosporean. Fish Health Section of the American Fisheries Society Newsletter 21: 12-13
- KENT M.L., WHITAKER D.J., MARGOLIS L. (1993b) *Sphaerospora oncorhynchi* n. sp. (Myxosporea: Sphaerosporidae) from the kidney of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in British Columbia and its possible relationship to the myxosporean causing proliferative kidney disease in salmonid fishes. Canadian Journal of Zoology 71: 2425-2430.
- KENT M.L., MARGOLIS L., CORLISS J.O. (1994a) 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 M.L., MARGOLIS L., WHITAKER D.J., HOSKINS G.E., MCDONALD T.E. (1994b) Review of Myxosporidia of importance to salmonid fisheries and aquaculture in British Columbia. *Folia Parasitologica* 41: 27–37.
- KENT M.L., HIGGINS M., WHITAKER D.J., YOKOYAMA H. (1995) Proliferative kidney disease and *Sphaerospora oncorhynchi* in wild-caught salmonids from the Puntledge River system. Vancouver Island, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52 (Suppl.1):13-17
- KENT M.L., KHATTRA J., HERVIO D.M.L., DEVLIN R.H. (1998). Ribosomal DNA Sequence Analysis of Isolates of the PKX Myxosporidian and Their Relationship to Members of the Genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health* 10-1: 12-21
- KENT M.L., KHATTRA J., HEDRICK R.P., DEVLIN R.H. (2000) *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa: Saccosporidae); the PKX myxozoan –the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *The Journal of Parasitology* 86: 103–111.
- KING J.A., SNOW M., SMAIL D.A., RAYNARD R.S. (2001a) Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, north east Atlantic Ocean and Irish Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 47(2): 81-86
- KING J.A., SNOW M., SKALL H.F., RAYNARD R.S. (2001b) Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47(1): 25-31
- KLONTZ G.W. & HUDDLESTON T.R. (1976) Control of Enteric Redmouth Disease: a Twelve Month Activity Report on Contract 10690004 DEMO-1014 Moscow, Idaho
- KLONTZ G.W. & CHACKO A.J. (1983) Methods to detect the organism causing proliferative kidney disease in salmonids. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 3: 33-36
- KLONTZ G.W., ROURKE A.W., ECKBLAD W. (1986) The immune response during proliferative kidney disease in rainbow trout: A case history. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12: 387-393
- KNITTEL M.D. (1981) Susceptibility of steelhead trout, *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection (*Yersinia ruckeri*) following exposure to copper. *Journal of Fish Diseases* 4: 33-40
- KÖRTING W., LEHMANN J., STÜRENBERG F.-J., MOCK D. (1989) Zur proliferativen Nierenerkrankung (Proliferative kidney disease, PKD) der Salmoniden. *Tierärztliche Praxis* 17: 217-220
- KOCAN R., BRADLEY M., ELDER N., MEYERS T., BATTS B., WINTON J. (1997) North American strain of VHSV is highly pathogenic for laboratory-reared Pacific herring. *Journal of Aquatic Animal Health* 9: 278-290

- KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2001) Entscheidung (2001/183/EG) der Kommission vom 22. Februar 2001 zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 67/65-76
- KONRAD M. & ENZMANN P.-J. (1987) Infektionsversuche zur Übertragung des VHS-V von der Bachforelle (*Salmo trutta fario* L.) und vom Hecht (*Esox lucius* L.) auf die Regenbogenforelle (*S. gairdneri* Richardson) In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Hrsg.) Tagung der Fachgruppe Fischkrankheiten der DVG, Gießen, S. 23-29
- LE GOUVELLO R. & POBEL T. (1995a) The use of fumaqua (5% fumagillin premix) against proliferative kidney disease - further achievements. Seventh International Conference of EAFP. "Diseases of Fish and Shellfish", September 10-15, 1995, Palma de Mallorca, Spain (Poster)
- LE GOUVELLO R. & POBEL T. (1995b) Metaprophylactic use of fumagillin against proliferative kidney disease on rainbow trout. Fourth International Symposium of Fish Parasitology, October 3-7, 1995, Munich (Abstract)
- LE GOUVELLO R., BLANC G., DE KINKELIN P. (1993a) Assessment of the efficacy of fumagillin on the course of PKD in rainbow trout maintained under permanent infectious conditions of PKX. Sixth International Conference of the EAFP. "Diseases of Fish and Shellfish", September 5-10, 1993, Brest, France, 117 (Abstract)
- LE GOUVELLO R., WARDLE R., POBEL T. (1993b) Efficacy of a ten day oral treatment of fumagillin at 3mg/kg/day against PKD on trout farms. Sixth International Conference of the EAFP. "Diseases of Fish and Shellfish", September 5-10, 1993, Brest, France, 118 (Abstract)
- LEHMANN J., STUERENBERG F.J., MOCK D. (1987) The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. Journal of Applied Ichthyology 3: 174-183
- LEJEUNE J.T. & RURANGIRWA F.R. (2000). Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 12: 558-561
- LENOIR G. & DE KINKELIN P. (1975) Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. Journal of Virology 16: 259-262
- LESEL R., LESEL M., GAVINI F., VUILHAUME A. (1983) Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France. Journal of Fish Diseases 6: 385-387
- LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.E., LOM J., LYNN D., MERINGFELD E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F.G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. Journal of Protozoology 27: 37-58

-
- LEWIS D.H. (1981) Immunoenzyme microscopy for differentiating among systemic bacterial pathogens of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 463-466
- LEWIS K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 999-1007
- LIEBMANN H. (1956) Ernährungsstörung und Degeneration als primäre Ursache der Bauchwassersucht bei Fischen. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 69: 21-25
- LILTVED H., HEKTOEN H., EFRAIMSEN H. (1995) Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV. *Aquacultural Engineering* 14: 107-122
- LILTVED H. & LUNDVALD B. (1996) Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria. *Water Research* 30: 1109-1114
- LIVERSIDGE J., MUNRO A.L.S., SCHLOTTFELDT H.J., EVELYN T.P.T. (1985) Fischpathogene Viren. In: Roberts R.J., Schlotfeldt, H.-J. (Hrsg.) *Grundlagen der Fischpathologie*. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S.112-173
- LLEWELLYN L. (1980) A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *Journal of Fish Diseases* 3: 29-39
- LOM J. & DYKOVÁ I. (1992) *Protozoan Parasites of Fish* 26, Elsevier, Amsterdam
- LOM J. & NOBLE E.R. (1984) Revised classification of the myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Parasitologica*, Prague 31: 193-205
- LONGSHAW M. & FEIST S.W. (2000) The agent of proliferative kidney disease (PKD) requires a bryozoan in its lifecycle - studies at CEFAS Weymouth on PKD and other myxozoans. *Trout News* 29: 24-27
- LONGSHAW M., FEIST S.W., CANNING E.U., OKAMURA B. (1999) First identification of PKX in bryozoans from the United Kingdom. Molecular evidence. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19 (4): 146-148
- LONGSHAW M., LE DEUFF R.-M., HARRIS A.F., FEIST S.W. (2002) Development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *Journal of Fish Diseases* 25: 443-449
- LORENZEN N., OLESEN N.J., KOCH C. (1999) Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture* 172: 41-61
- LUTZ U. (1992) Bekämpfung der Drehkrankheit der Salmoniden mit dem Antibiotikum Fumagilin (DCH). Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München

- MACCONNELL E., SMITH C., HEDRICK R.P., SPEER C.A. (1989) Cellular Inflammatory Response of Rainbow Trout to the Protozoan Parasite that Causes Proliferative Kidney Disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 1: 108-118
- MACCONNELL E. & PETERSON J.E. (1992) Proliferative kidney disease in feral cutthroat trout from a remote Montana reservoir: a first case. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 182-187
- MANDOK C. (1993) Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Inaugural- Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München
- MARGOLIS M.L., KENT M.L., BUSTOS P. (1996) Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 33-37
- MARIN DE MATEO M. & SANZ F. (1993) Detection of PKX, the cause of proliferative kidney disease (PKD) in Spain by lectin histochemistry. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 13: 83-85
- MARIN DE MATEO M., ADAMS A., RICHARDS R.H., CASTAGNARO M., HEDRICK R.P. (1993) Monoclonal antibody and lectin probes recognize developmental and sporogonic stages of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease in European and North American salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 15: 23-29
- MARIN DE MATEO M., MCGEORGE J., MORRIS D., KENT M.L. (1996) Comparative studies of PKX and *Sphaerospora* spp. from salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques. *Journal of Fish Diseases* 19: 55-63
- MARKIW M.E. (1992) Salmonid Whirling Disease U. S. Fish and Wildlife Service. National Fisheries Research Center, Leetown, National Fish Health Research Laboratory. Fish and Wildlife Leaflet 17
- MARKIW M.E. & WOLF K. (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
- MAYR A., BACHMANN P.A., BIBRACK B., WITTMANN G. (1977) Virologische Arbeitsmethoden (Band II) G.Fischer Verlag, Stuttgart, N.J.
- MAZZONI R. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging infectious diseases* 9(8):995-998
- MC ALLISTER P.E. (1993) Salmonid fish viruses. In: Stoskopf, M.K. (ed.) *Fish Medicine*. W. B. Saunders Company, Philadelphia etc., 391-396
- MC ALLISTER P.E. & WAGNER R.R. (1975) Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. *Journal of Virology* 15: 733

- MC CARTHY D.H., JOHNSON K.A. (1982) A serotypic survey and cross-protection test of North American field isolates of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 5: 323-328
- MC DANIEL D.W. (1971) Hagerman Redmouth. *American Fisheries US Trout News* 15: 14-28
- MC DANIEL D.W. (1972) Hatchery Biologists, Quarterly Report, First Quarter 1972.
- MEIER W. (1986): Enteric redmouth disease: Outbreak in rainbow trout in Switzerland. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 81-82
- MEIER W. & JØRGENSEN P.E.V. (1980) Isolation of VHS-virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. In: Ahne, W. (ed.) *Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences*. Springer Verlag, Berlin, S. 8-17
- MEIER W. & PFISTER K. (1981) VHS virus in pike (*Esox lucius*). Clinical, macroscopic, histological and electron-microscopical findings; direct visualisation of Egtved virus. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 123: 37-49
- MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995) VHS-Virus in North America. In: Faisal M., Hetrick F.M. (eds.) *Annual Review of Fish Diseases, Vol.5*, Pergamon Elsevier Sciences, Oxford, 3-24
- MEYERS T.R., SULLIVAN J., EMMENEGGER E., FOLLETT J., SHORT S., BATTS W.N., WINTON J.R. (1992) Identification of viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 167-175
- MEYERS T.R., SHORT S., LIPSON K. (1999) Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 38(2): 81-6
- MICHEL C., FAIVRE B., DE KINKELIN P. (1986) A clinical case of enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as baitfish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 6: 97-99
- MILLER T. (1983) Blood coagulation in ERM infected trout: role of bacterial endotoxin. In: *Proceedings of the 8th Annual FHS/AFS Workshop, Kearneysville, West Virginia, USA*, p.48
- MILLER T.A., RAPP J., WASTLHUBER U., HOFFMANN R.W., ENZMANN P.-J. (1998) Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based on detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Diseases of Aquatic Organisms* 34: 13-20
- MODIN J. (1998) Whirling Disease in California: A Review of its History, Distribution and Impacts, 1965-1997. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 132-142
- MOLNÁR K. (1979) *Myxobolus pavlovskii* (myxosporidia) infection in the silver carp and bighead. *Acta Veterinaria Hungarica* 27: 207-216

-
- MOLNÁR K. (1993) Recent achievements in the chemotherapy of Myxosporean infections of fish. *Acta Veterinaria Hungarica* 41: 51-58
- MORRIS D.J. & ADAMS A. (2002) PCR and In Situ Hybridisation of *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX), the causative agent of Proliferative kidney disease. In: Cunningham C.O. (ed.) *Molecular diagnosis of salmonid diseases*. Kluwer Academic Publishers 299-313
- MORRIS D.J., ADAMS A., RICHARDS R.H. (1997) Studies of the PKX parasite in rainbow trout via immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *Journal of Aquatic Animal Health* 9: 265-273
- MORRIS D.J., ADAMS A., RICHARDS R.H. (1999) In situ hybridisation of DNA-probes to PKX, the causative organism of proliferative kidney disease (PKD). *Journal of Fish Diseases* 22: 161-163
- MORRIS D.J., ADAMS A., FEIST S.W., MCGEORGE J., RICHARDS R.H. (2000a) PCR and immunohistochemistry of wild fish for *Tetracapsula bryosalmonae*, the causative organism of Proliferative kidney disease. *Journal of Fish Diseases* 23: 129-135
- MORRIS D.J., ADAMS A., RICHARDS R.H. (2000b) In situ hybridisation identifies the gill as a portal of entry for PKX (Phylum Myxozoa), the causative agent of proliferative kidney disease in salmonids. *Parasitology Research* 86: 950-956
- MORRIS D.C., MORRIS D.J., ADAMS A. (2002) Development of improved PCR to prevent false positives and false negatives in the detection of *Tetracapsula bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease. *Journal of Fish Diseases* 25: 477-482
- MORTENSEN H.F., HEUER O.E., LORENZEN N., OTTE L., OLESEN N.J. (1999) Isolation of VHSV from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Research* 63: 95-106
- MUNRO A.L.S. (1982) The Pathogenesis of Bacterial Diseases of Fishes. In: Roberts, R.J., *Microbial Diseases of Fish*, Academic Press, London pp 131-149
- NEWMAN S.G. & MAJRNARICH J.J. (1982) Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Journal of Fish Diseases* 5: 339-341
- NEUKIRCH M. (1984) Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*). Einfluß von Wassertemperatur und Körpergewicht auf die Mortalität nach experimenteller Infektion über das Wasser. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 97: 329-333
- NEUKIRCH M. (1985) Uptake, multiplication and excretion of VHSV in rainbow trout. In: Ellis, A.E. (ed.) *Fish and shellfish pathology*, Academic Press, London, 295-300
- NEUKIRCH M. (1986) Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. *Journal of Veterinary Medicine* 33: 471-476

- NOGA E.J., LEVINE J.F., TOWNSEND K., BULLIS R.A., CARLSON C.P., CORBETT W.T. (1988) Kidney biopsy a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection enteric redmouth disease in rainbow trout *Salmo gairdneri*. American Journal of Veterinary Research 49: 363-365
- O'BRIEN D., MCARDLE J., DOYLE J. (1977) A renal disease of possible protozoan aetiology resembling nephrocalcinosis in rainbow trout. Irish Veterinary Journal 31: 46-48
- O'FLYNN J.A. (1998) Studies of the biology and life cycle of PKX, the causative agent of proliferative kidney disease. National University of Cork, Ireland, PhD thesis.
- O'FLYNN J. & MULCAHY M. (1995) Prevalence of proliferative kidney disease in farmed salmonids in Ireland. Aquaculture Ireland.
- O'HARA T. (1985) The use of saltwater as a treatment for proliferative kidney disease in 0+ Atlantic salmon (*S. Salar*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 5: 79-80
- OKAMURA B., ANDERSON C.L., LONGSHAW M., FEIST S.W., CANNING E.U. (2001) Patterns of occurrence and 18S rDNA sequence variation of PKX (*Tetracapsula bryosalmonae*), the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. Journal of Parasitology 87: 379-385
- OKAMURA B., CURRY A., WOOD T.S., CANNING E.U. (2002) Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. Parasitology 124(Pt 2): 215-23
- O'LEARY P.J. (1977) Enteric redmouth bacterium of salmonids: a biochemical and serological comparison of selected isolates. M.S. thesis. Oregon State University, Corvallis. 93 pp.
- O'LEARY P.J., ROHOVEC J.S., FRYER J.L. (1979) A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 14: 71-78.
- O'LEARY P.J., ROHOVEC J.S., SANDERS J.E., FRYER J.L. (1982) Serotypes of *Yersinia ruckeri* and their immunogenic properties. Sea Grant College Program Publication No. ORESU-T-82-001, Oregon State Univ., Corvallis, Oregon, 1-15
- OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1986) Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. Diseases of Aquatic Organisms 1: 183-189
- OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1991) Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. Journal of Applied Ichthyology 7: 183-186
- OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V., MELLERGARD S., KEHLET N.P. (1983) Occurrence of proliferative kidney disease in Denmark. European Association of Fish Pathologists. First International Conference; 1983 September 20-23; Plymouth, England, 14

- ØYE A.K. & RIMSTAD E. (2001) Inactivation of infectious salmon anaemia virus, VHS-virus and IPN-virus in water using UVC irradiation. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 1-5
- PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986) Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron (*Ardea cinerea*). *Journal of Fish Diseases* 9: 539-544
- PFEIL C. & WIEDEMANN H. (1977) Virusnachweis durch indirekte Immunofluoreszenz und Virusanzüchtung bei experimentell erzeugter viraler hämorrhagischer Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 84. Jahrgang, 4: 152-154
- PHILLIPS M.J., BEVERIDGE M.C.M, ROSS L.G. (1985) The environmental impact of salmonid cage culture on inland fisheries: present status and future trends. *Journal of Fish Biology* 27: 123-137
- PICKERING A.D., POTTINGER T.G., CHRISTIE P. (1982) Recovery of brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology* 20: 229 - 244
- PLEHN M. (1904) Über die Drehkrankheit der Salmoniden [*Lentospora cerebralis*, (Hofer) Plehn] *Archiv für Protistenkunde* 5:145-166
- PLEHN M. (1924) Parasiten der Niere, Amöbeninfektion. *Praktikum der Fischkrankheiten*. In: *Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas Band I*; Demoll R. & Maier H.N. (ed.). Schweitzerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 421-424
- PRITCHARD T.J., BELIVEAU C.M., FLANDERS K.J., DONNELLY C.W. (1995) Environmental surveillance of dairy processing plants for the presence of *Yersinia* species. *Journal of Food Protection* 58, 395-397
- PUTZ R.E. & HOFFMAN G.L. (1970) Transmission of *Myxosoma cerebralis* (whirling disease). *Progressive Sport Fisheries Research* 1970: 93-99
- PYLE S.W., RUPPENTHAL T., CIPRIANO R.C., SHOTTS E.B. Jr. (1987) Further characterization of biochemical and serological characteristics of *Yersinia ruckeri* from different geographic areas. *FEMS Microbiology Letters* 35: 87-93.
- QUENTEL C. & ALDRIN J.F. (1986) Blood changes in catheterised rainbow trout (*Salmo gairdneri*) intraperitoneally inoculated with *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture* 53: 169-185
- QUILLET E., DORSON M., AUBARD G., TORHY C. (2001) In vitro viral haemorrhagic septicaemia virus replication in excised fins of rainbow trout: correlation with resistance to waterborne challenge and genetic variation. *Diseases of Aquatic Organisms* 45(3): 171-182
- RAFFERTY M.D. (1986) A study of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Ph. D. Thesis, University College, Cork, 154pp
- RASMUSSEN G.J. (1965) A biological study of the Egtved disease. *The New York Academy Of Science* 126: 427-460

-
- RIGGS I.L. & BROWN G.C. (1961) Direct and indirect immunofluorescence of enteroviruses. *Bacteriological Proceedings* 23: 145
- RINTAMÄKI P., VALTONEN E.T., FRERICHS G.N. (1986) Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish *Coregonus peled* and *Coregonus muksun*, and Atlantic salmon *Salmo salar*, in northern Finland. *Journal of Fish Diseases* 9: 137-140
- ROBERTS M.S. (1983) A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 6: 551-552
- ROBERTS R.J. (1978a) Miscellaneous non-infectious diseases. Roberts R.J. (ed.). *Fish Pathology*. London: Bailliere-Tindall, 227-234
- ROBERTS R.J. (1978b) The Bacteriology of Teleosts. In: Roberts R.J., *Fish Pathology*, Bailliere Tindall, London
- ROBERTS R.J. (1985) Bakterielle Erkrankungen der Knochenfische. In: Roberts R.J., Schlotfeldt H.-J., *Grundlagen der Fischpathologie*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, pp 174-207
- ROBERTS R.J. & SCHLOTTFELDT H.-J. (1985) Proliferative Nieren-Krankheit (PKD). *Grundlagen der Fischpathologie*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 295-297
- ROBERTS R.J. & SHEPHERD C.J. (1974) Proliferative kidney disease (PKD). *Handbook of Trout and Salmon Diseases*. London: Fishing News (Books) Ltd., London, 94-117 & 128
- RODGERS C.J. (1991) The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 14: 291-301
- RODGERS C.J. (1992) Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *Journal of Fish Diseases* 15: 243-254
- RODGERS C.J. & HUDSON E.B. (1985) A comparison of two methods for the isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 5: 92-93
- ROMALDE J.L., MAGARINOS B., BARJA J.L., TORANZO A.E. (1993) Antigenic and molecular characterisation of *Yersinia ruckeri*. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 411-419
- ROMALDE J.L., BARJA J.L., MAGARINOS B., TORANZO A.E. (1994) Starvation-survival processes of the bacterial fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Systematic and Applied Microbiology* 17: 161-618
- ROSE J.D., MARRS G.S., LEWIS C., SCHISLER G. (2000) Whirling Disease Behavior and its Relation to Pathology of Brain Stem and Spinal Cord in Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 107-118

-
- ROSS A.J. & SMITH C.A. (1972) Effect of two iodophors on bacterial and fungal fish pathogens. *J. Fish. Res. Board Can.* 29:1359-1361.
- ROSS A.J., RUCKER R.R., EWING W.H. (1966) Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology* 12: 763-770
- ROSS K., MCCARTHY U., HUNTLY P.J., WOOD B.P., STUART D., ROUGH E.I., SMAIL D.A., BRUNO D.W. (1994) An outbreak of VHS in turbot *Scophthalmus maximus* in Scotland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14: 213-214
- RUANE N.M., WENDELAAR BONGA S.E., BALM P.H. (1999) Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and comparative endocrinology*. 115(2): 210-219
- RÜBSAMEN S. & WEIS J. (1985) Nachweis von Enteric Redmouth Disease bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri* Richardson, in Südbaden. *Tierärztliche Umschau* 40: 995-998
- RUCKER R.R. (1966) Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin – Office International des Epizooties* 65: 825-830
- 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
- SANTOS Y., ROMALDE J.L., BANDIN I., MAGARINOS B., NUNEZ S., BARJA J.L., TORANZO A.E. (1993) Usefulness of the API 20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116: 111-120
- SAULNIER D. & DE KINKELIN P. (1996) Antigenic and biochemical study of PKX, the myxosporean causative agent of proliferative kidney disease of salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 103-114
- SAULNIER D. & DE KINKELIN P. (1997) Polymerase chain reaction primers for investigations on the causative agent of proliferative kidney disease of salmonids. *Journal of Fish Diseases* 20: 467-470
- SAULNIER D., BRÉMONT M., DE KINKELIN P. (1996) Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding an antigen from the Myxosporea parasite causing the proliferative kidney disease of salmonid fish. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83: 153-161
- SCHÄPERCLAUS W. (1931) Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung. *Zeitschrift für Fischerei* 29: 521-567

- SCHÄPERCLAUS W. (1938) Die Schädigungen der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. Allgemeine Fischerei-Zeitung 41: 256-259, 267-270
- SCHÄPERCLAUS W. (1954) Fischkrankheiten, 3. Aufl., Berlin: Akademie-Verlag, 1954 537-543
- SCHÄPERCLAUS W. (1979) Fischkrankheiten. 4. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin
- SCHÄPERCLAUS W. (1990) Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin
- SCHAUNER M. (1985) Untersuchungen zum serologischen Nachweis der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Fakultät, München
- SCHILL W.B., PHELPS S.R., PYLE S.W. (1984) Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. Applied and Environmental Microbiology 48: 975-979
- SCHISLER G.J. & BERGERSEN E.P. (1998) The effect of electrofishing injury and *Myxobolus cerebralis* infection on fingerling rainbow trout. Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit. Aus: Whirling Disease Symposium: Research in Progress 1998: 93-98
- SCHLEGEL M., LOM J., STECHMANN A., BERNHARD D., LEIPE D., DYKOVÁ I., SOGIN M. (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. Archiv für Protistenkunde 147: 1-9
- SCHLOTTFELDT H.J. (1985) Field observations on PKD. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 5 (4): 32-33
- SCHLOTTFELDT H.-J., BÖHM K.H., PFORTMÜLLER F., PFORTMÜLLER K. (1985) Rotmaulseuche/ERM (Enteric Redmouth Disease) der Forelle und anderer Nutzfische in Nordwestdeutschland – Vorkommen, Therapie und Vakzinierungsergebnisse. Tierärztliche Umschau 40: 985-995
- SCHLOTTFELDT H.J., BÖHM K.H., PFORTMÜLLER F., PFORTMÜLLER K. (1986) Rotmaulseuche/ERM der Forelle und anderer Nutzfische in Nordwestdeutschland – Vorkommen, Behandlung und erste Schutzimpfungs-(Vakzinierungs-)Ergebnisse. Fischer und Teichwirt 37: 18-21
- SCHRÖDER O. (1910) *Buddenbrockia plumatellae*, eine neue Mesozoenart aus *Plumatella repens* L. und *Pl. fungosa*. Pall. Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie, 1056: 525–537.
- SCHÜTZE H., MUNDT E., METTENLEITER T.C. (1999) Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. Virus Genes 19: 59-65
- SCOTT P.W. (1979) The occurrence of proliferative kidney disease on a chalk stream. The Veterinary Record 105: 330-331

- SCOTT P.W. (1984) Changes in serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) through an outbreak of proliferative kidney disease. The Veterinary Record 115: 63-64
- SEAGRAVE C.P. & BUCKE D. (1979) Water threat to fingerlings. Fish Farmer 2: 28-29
- SEAGRAVE C.P., BUCKE D., ALDERMAN D.J. (1980a) The causative agent of proliferative kidney disease may be a member of the Haplosporidia. Ahne W. (ed.) Fish Diseases, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 174-181
- SEAGRAVE C.P., BUCKE D., ALDERMAN D.J. (1980b) Ultrastructure of a Haplosporean-like organism: the possible causative agent of proliferative kidney disease in rainbow trout. Journal of Fish Biology 16 : 453-459
- SEAGRAVE C.P., BUCKE D., HUDSON E.B., MCGREGOR D. (1981) A survey of the prevalence and distribution of proliferative kidney disease (PKD) in England and Wales. Journal of Fish Diseases 4: 437-439
- SEELIGER H.P.R. (1978) Serologische Untersuchung. In: Seeliger, H.P.R., Taschenbuch der medizinischen Bakteriologie, Würzburg
- SIDDALL M.E., MARTIN D.S., BRIDGE D., DESSER S.S., CONE D.K. (1995) The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. Journal of Parasitology 8: 961-967
- SLIERENDRECHT W.J., OLESEN N.J., JUUL-MADSEN H.R., LORENZEN N., HENRYON M., BERG P., SØNDERGAARD J., KOCH C. (2001) Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. Fish & Shellfish Immunology 11: 155-167
- SMAIL D.A. (1999) Viral Haemorrhagic Septicemia. In: Woo, P.T.K., Bruno D.W. (eds) Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, New York, p 123-147
- SMAIL D.A. (2000) Isolation and identification of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) viruses from cod *Gadus morhua* with the ulcer syndrome and from haddock *Melanogrammus aeglefinus* having skin haemorrhages in the North Sea. Diseases of Aquatic Organisms 41 (3): 231-235
- SMITH C., MORRISON J., RAMSEY H. (1982) Proliferative kidney disease (PKD): First outbreak in North America. Fish Health News 10: 3-5
- SMITH C.E., MORRISON J.K., RAMSEY H.W., FERGUSON H.W. (1984) Proliferative kidney disease: First reported outbreak in North America. Journal of Fish Diseases 7: 207-216
- SMOTHERS J.F., VON DOHLEN C.D., SMITH Jr. L.H., SPALL R.D. (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. Science 265: 1719-1721

- SNOW M. & CUNNINGHAM C.O. (2000) Virulence and nucleotide sequence analysis of marine viral haemorrhagic septicaemia virus following in vivo passage in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 17-26
- SPARBOE O., KOREN C., HÅSTEIN T., POPPE T., STENWIG H. (1986) The first isolation of *Yersinia ruckeri* from farmed Norwegian salmon. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 6: 41-42
- STEIGERWALD A.G., FANNING G.R., FIFE-ASBURY M.A., BRENNER D.J. (1976) DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Canadian Journal of Microbiology* 22: 121-137
- STEVENSON R.M.W. & DALY J.D. (1982) Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 870-876
- STEVENSON R.M.W. & AIRDRIE D.W. (1984) Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *Journal of Fish Diseases* 7:247-254.
- STEVENSON R., FLETT D., RAYMON B.T. (1993) Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections. In: Inglis, V., Roberts R.J. and Bromage N.R. (eds.) *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, Edinburgh pp 80-106
- STONE D.M., WAY K., DIXON P.F. (1997) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of VHS viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus Morhua* L.). *Journal of General Virology* 78: 1319-1326
- STROMMEN H.K. & STONE D.M. (1998) Detection of VHS virus in fish tissues by semi-nested polymerase chain reaction (PCR). In: Barnes A.C., Davidson, G.A., Hiney, M.P. and McIntosh, D. (eds.) *Methodology in Fish Disease Research*. Fisheries Research Services, Aberdeen.
- TACK E. (1957) Beiträge zur Erforschung der Forellenseuche. *Der Fischwirt* 12: 307-314
- TAKANO R., NISHIZAWA T., ARIMOTO M., MUROGA K. (2000) Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 20 : 186-193
- TEMPRANO A., YUGUEROS J., HERNANZ C., SÁNCHEZ M., BERZAL B., LUENGO J.M., NAHARRO G. (2001) Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yrul-yrur* quorum sensing. *Journal of Fish Diseases* 24: 253-261
- THIÉRY R., DE BOISSÉSON C., JEFFROY J., CASTRIC J., DE KINKELIN P., BENMANSOUR A. (2002) Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999). *Diseases of Aquatic Organisms* 52 (1): 29-37
- THORSEN B.K., ENGER O., NORLAND S., HOFF K.A. (1992) Long term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1624-1628

- TRAXLER G.S., KIESER D., RICHARD J. (1999) Mass mortality of pilchard and herring associated with viral haemorrhagic septicaemia virus in British Columbia, Canada. American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter 27: 3–4
- VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARSTENS E.B. and 7 others (eds.) (2000). Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego
- VESTERGARD JØRGENSEN P.E. (1970) The survival of VHS virus associated with trout eggs. Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia 5: 13-14
- VESTERGARD JØRGENSEN P.E. (1973) Artificial transmission of VHS of rainbow trout. Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia 8: 101-102
- VESTERGARD JØRGENSEN P.E. (1982) Egtved-virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. Journal of Fish Diseases 5: 47-55
- VESTERGARD JØRGENSEN P.E. (1982b) Egtved-virus: Occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. Journal of Fish Diseases 5: 251-255
- VINCENT D. (1996) Whirling Disease, the Montana Experience, Madison River. In: Whirling Disease Workshop Proceedings: Where do we go from here? Bergersen, E.P and Knopf, B.A. (ed.) Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit. 159
- WALKER P.G. & NEHRING R.B. (1995) An investigation to determine the cause(s) of the disappearance of young wild rainbow trout in the upper Colorado River in Middle Park, Colorado. Colorado Division of Wildlife Report, Denver
- WALTMAN W.D. & SHOTTS E.B. Jr. (1984) A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 41: 804-806
- WARREN J.W. (1983) Enteric redmouth disease. In: Meyer FP, Warren JW and Carey TG: A guide to integrated fish health management in the great lakes basin, Great Lakes Fishery Commission, Ann Arbor, Michigan Spec. Pub. 83-2
- WILLIAMS K., BLAKE S., SWEENEY A., SINGER J.T., NICHOLSON B.L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. Journal of Clinical Microbiology 37: 4139-4141
- WILLUMSEN B. (1989) Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish Diseases 12: 275-277
- WILSON T. & CARSON J. (2003) Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridisation assay to detect selected bacterial fish pathogens. Diseases of Aquatic Organisms 54: 127-134

- WINTON J.R. & EINER-JENSEN K. (2002) Molecular Diagnosis of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus. In: Carey O.Cunningham (ed) Reviews: Methods and technologies in fish biology and fisheries Volume 3: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases, Kluwer Academic Publishers: 49-79
- WINTON J.R., BATTS W.N., NISHIZAWA T., STEHR C.M. (1989) Characterization of the first North American isolates of VHSV. American Fisheries Society, Fish Health Section Newsletter 17: 2-3
- WISHKOVSKY A., GROFF J.M., LAUREN D.J., TOTH R.J., HEDRICK R.P. (1990) Efficacy of fumagillin against proliferative kidney disease and its toxic side effects in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Pathology 25: 141-146
- WIZIGMANN G. & HOFFMANN R. (1982) Vergleichende lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle Zentralblatt für Veterinärmedizin B 29: 782-788
- WIZIGMANN G., BAATH C., HOFFMANN R. (1980) Isolierung des Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) aus Regenbogenforellen-, Hecht- und Äschenbrut. Zentralblatt für Veterinärmedizin B 27: 79-81
- WOBESER G. (1973) An outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 30: 571-575
- WOLF K. (1988) Viral hemorrhagic septicemia. In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases, Wolf K., Cornell University Press, New York, S.217-249
- WOLF K. & MARKIW M.E. (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225: 1449-1452
- WOLF K., MARKIW M.E., MACHADO J., CRUZ M., GALHANO H., EIRAS J., HERMAN, R. L. (1981) Non-myxosporidan black tail of salmonids. Journal of Fish Diseases 4: 355-357
- WOLF K., MARKIW M.E., HILTUNEN J.K. (1986) Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle Journal of Fish Diseases 9: 83-85
- WOOTTEN R. & MCVICAR A.H. (1982) Some preliminary observations on proliferative kidney disease in wild brown trout, *Salmo trutta* L., in a scottish stream. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 2: 60-62
- XU B.H., CHEN Y.S., WU Y.S. (1991) An outbreak of a new epizootic in silver carp and bighead carp – *Yersinia ruckeri*, a new pathogen of silver carp and bighead. Chinese Science Bulletin 36: 1825-1828

YAMAMOTO T., HU K., BATTS W.N., WINTON J.R. (1990) Infection of fish skin and the transmission of salmonid virus diseases. In: Habermehl KO, Zeichhardt H (eds) VIIIth Congress of Virology. Institute for Clinical and Experimental Virology, Berlin, p 488 (abstract)

YASUTAKE W.T. (1975) Fish viral diseases: clinical, histopathological and comparative aspects. In: Ribelin W.H. & Nigaki G.: The Pathology of Fishes. University of Wisconsin Press.

ZWILLENBERG L.O., JENSEN M.H., ZWILLENBERG H.H.L. (1965). Electron microscopy of the virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (Egtved virus). Archiv für die gesamte Virusforschung 17: 1-19

9 DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Mansour El-Matbouli für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die gute Betreuung und die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Osterkorn möchte ich herzlich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danken.

Herrn Dr. Widemann, Frau Franke, Frau Meschenmoser, Dana Wenzel, Claudia Memel und den anderen Mitarbeitern vom Zentralinstitut, Abteilung Virologie, des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. danke ich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und für die freundliche Einarbeitung in virologische Arbeitsmethoden. Frau Dr. Pfeil-Putzien möchte ich für die guten Ratschläge für die Versuchsdurchführung danken und Herrn Dr. Gangl für die Zurverfügungstellung des *Y. ruckeri*-Stammes.

Bei Herrn Dr. Neubauer vom Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe, die vielen guten Ratschläge bei der Versuchsplanung und für die Durchsicht meiner Ergebnisse bedanken.

Auch bei den anderen Mitarbeitern der Sanitätsakademie möchte ich mich bedanken: Herrn Robert Schneider danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung in bakteriologische Arbeitsmethoden und die geduldige Beantwortung auch der dümmsten Fragen über Mikrobiologie im Allgemeinen und *Yersinia ruckeri* im Besonderen. Frau Lodri danke ich für die freundliche Hilfe bei PCR und DNA-Sequenzierung.

Herrn Dr. Fichtner und Herrn Dr. Bergmann von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems, danke ich für ihre freundliche und schnelle Hilfe, die Ratschläge zur Versuchsdurchführung und das zur Verfügung gestellte VHS-Virus.

Herrn Dr. Wolf danke ich für die Hilfe bei der Planung der Versuche.

Herrn Dr. Popp und den anderen Mitarbeitern vom Amt für Wasserwirtschaft danke ich für die freundliche Hilfe und die Zurverfügungstellung der Zentrifuge und des Photometers.

Frau Dr. Elisabeth Nardy und Herrn Düll möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit beim Feldversuch herzlich danken.

Hatem Soliman möchte ich ganz herzlich für die große Hilfe bei der Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitsmethoden und die vielen guten Tipps bei PCR und Gelelektrophorese danken.

Den Institutsmitarbeitern, die mir bei der Durchführung dieser Doktorarbeit geholfen haben, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen – insbesondere Herrn Josef Feiling für die Hilfe bei den bakteriologischen Arbeiten und die gute Zusammenarbeit, Christine Kühnhauser-Vogt für die Einarbeitung in die histologischen Arbeitsmethoden, André Hohenegger für die Betreuung der Fische und Tatjana Kovaleva und Gabi Stelea für ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Mit-Doktoranden Michael Meixner, Christoph Dörfler, M'hamed Oumouna, Martin Knaus und Amine Oucible möchte ich herzlichst für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen und die schöne Zeit in München danken.

Meinen Freundinnen Nicole Braun und Pamela Frank danke ich für die moralische Unterstützung und die Aufmunterung wenn's mal nicht so gut lief (und für die guten Tipps und sowieso für alles!).

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern Maria Mattes und Hans-Günther Mattes und meiner Schwester Daniela Mattes für alles, was sie für mich getan haben, ganz herzlich Danke sagen!

10 LEBENS LAUF

Name: Marianne Mattes
Geburtsdatum: 04.02.1975
Geburtsort: Villingen – Schwenningen
Vater: Hans-Günther Mattes, Notar
Mutter: Maria Mattes geb. Schumacher, Damenschneiderin
Geschwister: Daniela Mattes, Diplom-Verwaltungswirtin (FH)

Schulausbildung:

1981 – 1985: Grundschule: Schillerschule in Spaichingen
1985 – 1994: Gymnasium Spaichingen
Juni 1994: Abitur

Berufsausbildung:

Aug. 1994 – Feb. 1997: Ausbildung zur Bankkauffrau, Kreissparkasse Tuttlingen
(beurlaubt zum Semesterbeginn (Nov. 1996) bis zum Ende der
Ausbildung)

Studium:

1996 – 2002: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München, abgeschlossen mit Staatsexamen
Juni 2002: Approbation
Seit Juni 2002: Promotionsstudium