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

Eine PCR-Methode zum Nachweis des mit dem Epizootischen Ulzerativen Syndrom (EUS) assoziierten Oomyceten *Aphanomyces invadans* und Empfänglichkeit von drei europäischen Süßwasserfischarten gegenüber der Erkrankung

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

von
Peter Steinbauer
aus Wangen im Allgäu

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Erwin Peter Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. Rudolph Hoffmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2006

Namen der Prüfer: Prof. Dr. Manfred Stangassinger
Prof. Dr. Clemens Knospe
PD Dr. Dr. Petra Kölle

Meiner Familie

I.			**Einleitung**	1
II.			**Literaturübersicht**	3
1.			Einführung	3
2.			Vorkommen und Verbreitung	4
3.			Ätiologie	6
	3.1.		Nomenklatur	6
	3.2.		Taxonomie	7
	3.3.		Morphologie, Physiologie und Entwicklung	9
4.			Empfängliche Fischarten	12
5.			Infektion	12
6.			Epidemiologie	15
	6.1.		Weltweite Verbreitung des EUS	15
	6.2.		Übertragungswege	17
	6.3.		Faktoren, die Ausbreitung, Übertragung, Verlauf und Mortalitätsrate beeinflussen	19
		6.3.1.	Temperatur	19
		6.3.2.	Niederschlag und in Beziehung stehende Wasserparameter	21
		6.3.3.	Bakterielle Infektionen	22
		6.3.4.	Virale Infektionen	22
		6.3.5.	Vorschädigung durch toxinproduzierende Dinoflagellaten	23
7.			Pathogenese	24
8.			Klinik	27
	8.1.		Klinische Symptomatik	27
	8.2.		Klinische Pathologie	28
9.			Histopathologische Befunde	28
10.			Diagnose	31

11.			Differentialdiagnosen	35
12.			Bekämpfung und Prävention	38
13.			Wirtschaftliche Bedeutung	41
III.			**Material und Methoden**	44
1.			Material	44
	1.1.		Versuchstiere	44
	1.2.		Tierversuchsantrag	45
	1.3.		Oomycetenstämme und andere Organismen	46
	1.4.		Infektion mittels Zoosporeninjektion	50
	1.5.		Molekularbiologische Reagenzien und Kits	50
	1.6.		Geräte	51
	1.7.		Rezepturen	52
		1.7.1.	Puffer	52
		1.7.2.	Anzuchtmedien	52
	1.8.		Oligonukleotid-Primer	54
2.			Methoden	55
	2.1.		Gewinnung und Auszählung der Sporen	55
	2.2.		Versuchsaufbau	56
		2.2.1.	Infektion durch Injektion einer Zoosporensuspension	57
		2.2.2.	Probenentnahme	57
	2.3.		DNA-Extraktion von *Aphanomyces invadans* aus Fischgewebe	58
	2.4.		Primer	58
	2.5.		PCR	59

2.6.		Optimierung des PCR-Protokolls	59
	2.6.1.	Annealing-Temperatur	60
	2.6.2.	Primerkonzentration	60
2.7.		Sensitivitätsbestimmung	61
2.8.		Spezifitätsbestimmung	62
2.9.		Agarosegel-Elektrophorese	63
2.10.		Aufreinigung der PCR-Produkte	63
2.11.		Histologische Untersuchungen	64
IV.		**Ergebnisse**	65
1.		Wahl der Primer	65
2.		Optimierung des PCR-Protokolls	70
2.1.		Annealing-Temperatur	70
2.2.		Primerkonzentration	71
2.3.		Optimiertes PCR-Protokoll	72
3.		Spezifität der Primer	73
4.		Sensitivität der Semi-Nested PCR	76
5.		Auswertung der Infektionsversuche	78
5.1.		Blaue Fadenfische	87
5.2.		Europäische Welse	91
5.3.		Regenbogenforellen	94
5.4.		Europäische Aale	97
5.5.		Vergleich von diagnostischer Sensitivität und Spezifität der PCR-Untersuchung und der histopathologischen Untersuchung anhand der Versuchsgruppen der Blauen Fadenfische	98

V.		**Diskussion**	101
1.		Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für *Aphanomyces invadans*	101
	1.1.	Auswahl der Primer	102
	1.2.	Wahl des PCR-Protokolls	104
	1.3.	Bestimmung der Spezifität und der analytischen Sensitivität	104
2.		Infektionsversuche	106
	2.1.	Wahl der Fischarten	106
	2.2.	Wahl der Infektionsmethode	108
	2.3.	Empfänglichkeit der untersuchten Spezies	110
	2.4.	Vergleich von diagnostischer Sensitivität und Spezifität der PCR-Untersuchung und der histopathologischen Untersuchung anhand der Versuchsgruppen der Blauen Fadenfische	116
3.		Abschließende Betrachtung und Ausblick	117
VI.		**Zusammenfassung**	120
VII.		**Summary**	122
VIII.		**Literaturverzeichnis**	124
IX.		**Anhang**	146
	1.	Empfängliche Fischarten	146
	2.	Gelbilder der PCR-Optimierung	151
	3.	Gelbilder zur Spezifität der Primer	154

4. Gelbilder der Infektionsversuche 159

X. **Danksagung** 167

XI. **Lebenslauf** 169

I. Einleitung

Das epizootische ulzerative Syndrom (EUS) ist eine schwerwiegende Erkrankung bei Süß- und Brackwasserfischen, die sich in einer relativ kurzen Zeitspanne über Südostasien und Australien verbreitet hat. Seit Mitte der Achtziger Jahre ist die Erkrankung auch in den Mündungsgebieten der Ostküste der Vereinigten Staaten aufgetreten und dringt von dort weiter ins Landesinnere vor. Der Name der Erkrankung, der offiziell erstmals 1985 in Bangkok bei der Food and Agriculture Organization (FAO) Expert Consultation anerkannt wurde, rührt von ihren charakteristischen Merkmalen: der epizootischen Ausbreitung und dem klinischen Erscheinungsbild. Die Verwendung des Begriffs „Syndrom“ hebt die Komplexität des Krankheitsbildes hervor, das die Interaktion des ursächlichen Infektionserregers *Aphanomyces invadans* mit einer Vielzahl von Umweltfaktoren und sekundären Pathogenen einschließt.

Das EUS dehnt sein Verbreitungsgebiet immer weiter aus und so besteht die berechtigte Sorge, dass die Erkrankung den Sprung nach Afrika und Europa schafft, wobei die große Gefahr in der Verbreitung des Erregers durch den Verkehr von Fischen für die Aquakultur und die Aquaristik liegt, wodurch wohl die meisten Ausbrüche in vorher nicht betroffenen Gebieten herrühren (LILLEY et al., 1997a).

Zwei wesentliche Schritte sind momentan für die Diagnosestellung anerkannt: das histopathologische Bild und die Isolierung und Identifizierung des primär verantwortlichen Erregers *Aphanomyces invadans*, welche zeitaufwendig und schwierig sein kann (WILLOUGHBY & ROBERTS, 1994).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines Routinediagnostikverfahrens in Form einer (Semi)-Nested PCR, welches eine rasche, spezifische und sensitive Diagnose der Erkrankung bietet. Da die

Empfänglichkeit wirtschaftlich wichtiger europäischer Fischarten gegenüber dem EUS überwiegend unklar ist, wurde weiterhin die experimentelle Empfänglichkeit von für die Aquakultur in Deutschland bedeutsamen Fischarten gegenüber der Erkrankung untersucht.

.

II. Literaturübersicht

1. Einführung

In den letzten 30 Jahren traten Ausbrüche einer mit Hautulzerationen einhergehenden Erkrankung, histopathologisch charakterisiert durch eine granulomatöse und nekrotisierende Myositis und Dermatitis, bei Süß- und Brackwasserfischen in weiten Teilen Asiens und Australiens auf. Der Erkrankung wurden unabhängig voneinander unterschiedliche Namen gegeben: mycotic granulomatosis (MG) in Japan, red spot disease (RSD) in Australien und epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Südostasien (LILLEY et al., 1998). Einige Autoren wiesen Gemeinsamkeiten der isolierten *Aphanomyces* spp. bezüglich Morphologie und Kultivierung (WADA et al., 1994; CALLINAN et al., 1995) sowie Ähnlichkeiten im histopathologischen Bild der Erkrankung (FRASER et al., 1992) nach und vermuteten eine einzelne Spezies als ursächlichen Infektionserreger. Neuere Untersuchungen bestätigten, dass bei allen der pathogene Oomycet *Aphanomyces invadans* involviert ist (CALLINAN et al., 1995; LILLEY & ROBERTS, 1997; LILLEY et al., 1997a). Der Zusammenhang eines weiteren, an der Ostküste der Vereinigten Staaten vorkommenden ulzerativen Krankheitsbildes, ulcerative mycosis (UM) genannt, mit dem EUS war lange unklar. Die dort isolierten *Aphanomyces* spp. konnten inzwischen als *Aphanomyces invadans* bestätigt werden (BLAZER et al., 2002).

Das Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI) in Bangkok, das einzige durch das Internationale Tierseuchenamt (Office International des Épizooties, OIE) anerkannte diagnostische Referenzlabor für das EUS, definiert einen EUS-Fall folgendermaßen: ein Fisch mit nekrotisierender granulomatöser Dermatitis und Myositis assoziiert mit Hyphen von *Aphanomyces invadans* (OIE, 2003).

2. Vorkommen und Verbreitung

Mycotic granulomatosis (MG)

Über den ersten Fall eines EUS-ähnlichen Krankheitsbildes wurde laut LILLEY et al. (1998) im Sommer 1971 bei gefarmten Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in der Oita Präfektur, Japan berichtet (EGUSA & MASUDA, 1971). Dabei wurde eine charakteristische granulomatöse Wirtsreaktion auf invasiv eindringende Hyphen beschrieben und der Krankheit der Name mycotic granulomatosis gegeben. Sie breitete sich schnell in andere Präfekturen aus und befiel verschiedene Fischarten (MIYAZAKI & EGUSA, 1972; LILLEY et al., 1998).

Red spot disease (RSD)

Im Jahr 1972 wurde von einer mit Hautulzerationen einhergehenden und red spot disease genannten Erkrankung bei Brackwasserfischen in Queensland, Australien berichtet (MCKENZIE & HALL, 1976). Die Erkrankung verbreitete sich und betraf Süß- und Brackwasserfische in küstennahen Flüssen in New South Wales (RODGERS & BURKE, 1981; CALLINAN et al., 1989) und dem Norden von Neu-Guinea (RODGERS & BURKE, 1981) sowie laut LILLEY et al. (1998) in Northern Territory (PEARCE, 1990) und Westaustralien (CALLINAN, 1994).

Epizootic ulcerative syndrome (EUS)

Den Ausbrüchen von MG und RSD folgend, breitete sich eine Erkrankung westwärts durch Asien aus, die durch Hautulzerationen und hohe Mortalitäten bei zahlreichen Süß- und Brackwasserfischen gekennzeichnet war. In 18 Ländern der asiatisch-pazifischen Region wurde von EUS-Ausbrüchen berichtet, jedoch sind nicht alle sicher dem EUS zuzuordnen, da nicht in allen

Fällen eine histopathologische Untersuchung oder die Isolierung von *Aphanomyces invadans* durchgeführt wurde (LILLEY et al., 1998).
SHAHEEN et al. (1999) isolierten in Ägypten *Aphanomyces* spp. von Meeräschen (*Mugil cephalus* und *Liza ramada*) mit Hautulzerationen. Die Tiere stammten aus einem Erdteich am westlichen Ufer des Suezkanals. Die Isolate zeigten die für *Aphanomyces invadans* typischen Wachstumscharakteristika. Von einer pathohistologischen Untersuchung der erkrankten Fische wurde nicht berichtet.

Ulcerative mycosis (UM)

Die ulcerative mycosis wurde das erste Mal im April 1984 bei Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) im Mündungsgebiet des Pamlico River in North Carolina beobachtet. Die Erkrankung erreichte im November 1984 Ausmaße einer Epizootie (DYKSTRA et al., 1986). Untersuchungen in den darauffolgenden Jahren zeigten, dass die UM eine weitverbreitete Erkrankung bei Menhaden in Florida, North Carolina und Virginia ist (DYKSTRA et al., 1989). Auch andere Fischarten waren von der Erkrankung betroffen (NOGA et al., 1991), jedoch war die Prävalenz bei diesen deutlich niedriger als bei den Menhaden-Heringen (LEVINE et al., 1990a). Die ersten als UM bestätigten Fälle im Süßwasser traten 1997 bei Blauen Sonnenbarschen (*Lepomis macrochirus*) und 2000 bei Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) auf (BLAZER et al., 2002). HAWKE et al. (2003) berichteten vom Auftreten der UM bei Getüpfelten Gabelwelsen, Blauen Sonnenbarschen und Schwarzen Katzenwelsen (*Ameiurus melas*) aus Fischteichen im Südosten von Louisiana.

3. Ätiologie

Der ursächliche Erreger des EUS ist der Oomycet *Aphanomyces invadans* (LILLEY et al., 1997). Eine mannigfaltige Auswahl weiterer Mikroorganismen wurde von EUS-erkrankten Fischen isoliert (BURKE & RODGERS, 1981; CALLINAN & KEEP, 1989; KANCHANAKHAN, 1996; BLAZER et al., 1999; MASTAN & QURESHI, 2001). Da kranke Fische, speziell solche mit Hautulzerationen, empfänglich für Infektionen durch opportunistische Pathogene sind, ist es vor allem bei länger bestehenden Erkrankungen schwierig, die primäre Ursache festzustellen. Zwar können einige dieser Pathogene signifikant zum Verlauf der Erkrankung beitragen, müssen aber vom ursächlichen Infektionserreger *Aphanomyces invadans* unterschieden werden (LILLEY et al., 1998).

3.1. Nomenklatur

Laut LILLEY et al. (1998) isolierten HATAI et al. (1977) einen Oomyceten der Gattung *Aphanomyces* von an MG erkrankten Ayu, diesen benannten sie 1980 *Aphanomyces piscicida*. Für das *Aphanomyces* sp.-Isolat, das aus der Muskulatur eines an EUS erkrankten Fisches in Thailand isoliert wurde (ROBERTS et al., 1993), wurde von WILLOUGHBY et al. (1995) der Name *Aphanomyces invaderis* vorgeschlagen. Laut KHAN et al. (1998) ist der Organismus seit 1997 im Index of Fungi als *Aphanomyces invadans* gelistet (DAVID & KIRK, 1997).

3.2. Taxonomie

Aufgrund morphologischer Merkmale wurden die Oomyceten über viele Jahre den Pilzen zugeordnet. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten jedoch, dass sie mit heterokonten Algen nahe verwandt sind, eine Verwandtschaft mit Pilzen aber nicht besteht (LEIPE et al., 1994; BALDAUF et al., 2000; DICK, 2001)(**Abb. 1 und 2**). Andere Bezeichnungen dieser Gruppe von Organismen sind Peronosporomyceten oder Phycomyceten (Algenpilze) (DICK, 2001).

Eukaryota
Reich: Straminipila
Stamm: Heterokonta
Unterstamm: Peronosporomycotina
Klasse: Peronosporomycetes (Oomycetes, Phycomycetes)
Unterklasse: Saprolegniomycetidae
Ordnung: Saprolegniales
Familie: Leptolegniaceae
Gattung: *Aphanomyces*
Spezies: ***Aphanomyces invadans***

Abb. 1: Klassifizierung von *Aphanomyces invadans* innerhalb der Straminipila nach DICK (2001)

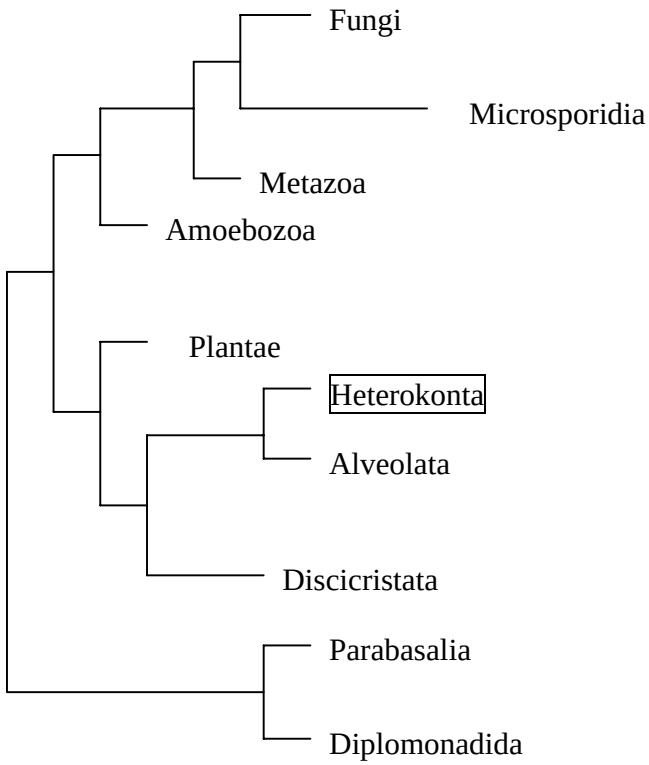

Abb. 2: Vereinfachter phylogenetischer Stammbaum mit Darstellung der Stellung der Heterokonta innerhalb der Eukaryoten (nach BALDAUF et al., 2000)

Aphanomyces invadans-Stämme wurden zusammen mit nahe verwandten Oomyceten mithilfe der folgenden molekularbiologischen Methoden charakterisiert:

- Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (CALLINAN et al., 1995; LILLEY et al., 1997b)
- Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (LILLEY et al., 1997a; LILLEY et al., 2003)
- Western Blot (LILLEY et al., 1997b)
- Pyrolysemassenspektrometrie (PyMS) (LILLEY et al., 2001a)

- Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) (LILLEY et al., 2003)
- Amplifizierung der die ribosomale RNA codierenden DNA-Region, anschließende Sequenzierung und Vergleich der erhaltenen Sequenzen (LILLEY et al., 2003)

Diese Untersuchungen ergaben einen hohen Grad an genetischer Homogenität der *Aphanomyces invadans*-Stämme, welche in einer einzigen klonalen Abstammungslinie zu betrachten sind. *Aphanomyces astaci*, der Erreger der Krebspest, stellte sich als der engste Verwandte heraus (LILLEY et al., 2003).

3.3. Morphologie, Physiologie und Entwicklung

Wie unter II.3.2. bereits erläutert, wurden die Oomyceten aufgrund morphologischer Merkmale in der Vergangenheit den Pilzen zugeordnet und ihre morphologischen Strukturen mit für Pilze geltenden Begriffen beschrieben. Im Folgenden werden daher die hyphenartigen Strukturen des Erregers als Hyphen und das hyphenartige Geflecht als Mycel bezeichnet. Die Hyphen von *Aphanomyces invadans* sind breit, unseptiert mit abgerundeten Enden und haben im Fischgewebe einen Durchmesser von 11,7 bis 16,7 µm, während sie in Laborkultur einen Durchmesser von 8,3 µm bei neugebildeten Hyphen haben (WILLOUGHBY et al., 1995). Diese große Plastizität in der Morphologie des Mycels steht in Bezug zum Substrat, auf dem der Organismus sich befindet (WILLOUGHBY, 1995). Der Organismus zeigt auf Agarplatte ein sehr langsames Wachstum von 4 mm pro Tag bei 24 °C (WILLOUGHBY et al., 1995) und wächst bei Temperaturen von 5 bis 36 °C und einer Salinität bis 1 % NaCl (LILLEY et al., 1998). WILLOUGHBY & CHINABUT (1996) berichteten von der Schwierigkeit, *Aphanomyces invadans* im Labor am Leben zu erhalten, ohne den Organismus in kurzen Zeitabständen zu subkultivieren. Diese Beobachtung scheint nach Meinung der Autoren auf die Freisetzung toxischer oder enzymatischer Substanzen,

die gegen den Wirt gerichtet sind, aber auch zu einer Schädigung von *Aphanomyces invadans* selbst führen, zurückzuführen sein.

LILLEY & ROBERTS (1997) verglichen die von an EUS, RSD und MG erkrankten Fischen isolierten *Aphanomyces invadans*-Stämme mit verschiedenen saprophytischen *Aphanomyces* spp. aus Thailand bezüglich ihrer kulturellen Anforderungen und konnten charakteristische Unterschiede feststellen. Bei den *Aphanomyces invadans*-Stämmen gab es keine signifikanten Unterschiede untereinander. Sie zeigten optimales Wachstum auf Glucose-Pepton-Hefe-Agar bei 26 bis 30°C und starben bei 37 °C ab, wuchsen bei allen Temperaturen sehr langsam und waren unfähig, auf bestimmten Nährmedien wie Sabouraud-Dextrose-Agar, Cornmeal-Agar und Malt-extract-Agar zu wachsen. Die Wachstumscharakteristika der saprophytischen *Aphanomyces* spp. waren innerhalb der Gruppe sehr variabel, sie zeigten aber bei allen Temperaturen einschließlich 37 °C ein schnelleres Wachstum als *Aphanomyces invadans* mit einem Optimum bei 34 bis 38 °C.

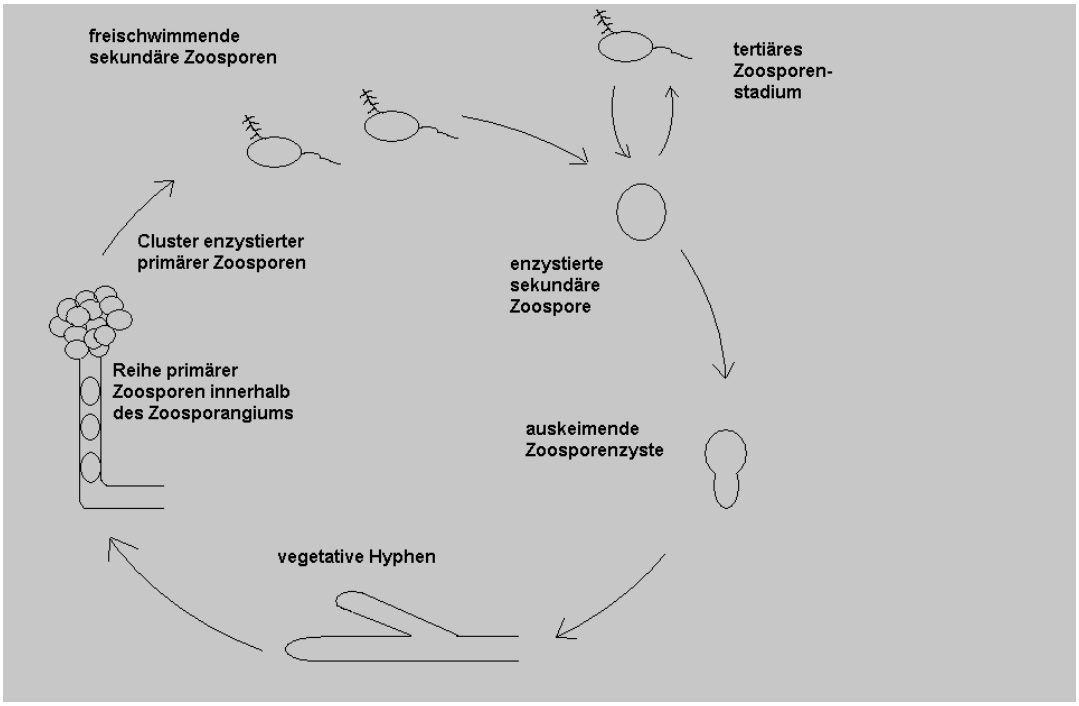

Abb. 3: Asexueller Entwicklungszyklus von *Aphanomyces invadans* (angelehnt an LILLEY et al., 1999)

Die **Abb. 3** skizziert den Entwicklungszyklus von *Aphanomyces invadans.* Innerhalb der Sporangien, die an den terminalen Enden der Hyphen entstehen und mit 10 µm nicht breiter als diese sind (WILLOUGHBY et al., 1995), spaltet sich das Zytoplasma in eine Reihe von länglichen Einheiten, den Primärsporen, die in der für die Gattung *Aphanomyces* typischen achlyoiden Art der Sporenentleerung nach außen entlassen werden (SCOTT, 1961) und sich dort in Haufen enzystieren. Typischerweise werden vier Primärsporenbälle, bestehend aus Primärsporenzysten mit einem Durchmesser von 6,7 bis 10 µm, von jedem Sporangium produziert (ROBERTS et al., 1993).

Die beweglichen, mit zwei Geißeln ausgestatteten, 6 µm großen nierenförmigen Sekundärsporen werden bei einer Temperatur von 22 °C innerhalb von 12 Stunden nach der Entwicklung der Sporangien aus den Primärsporenzysten freigesetzt. Bei bestimmten Umweltbedingungen bzw. bei der Anwesenheit eines Wirts oder Substrats enzystiert die Sekundärspore und germiniert mittels Keimschlauch, um neue Hyphen zu bilden (LILLEY et al., 1998). In Anwesenheit von nährstoffhaltigen Substanzen können aus Sekundärzysten wiederum neue Zoosporen entstehen (LILLEY et al., 1999). Dieses bei einigen Oomyceten auftretende Phänomen, bei dem mehrere Tertiärgenerationen von Zoosporen von der Sekundärsporenzyste gebildet werden, wird als Polyplanetismus bezeichnet. Es wird als Adaptation zum Parasitismus bei einigen Vertretern der Gattung *Aphanomyces* angesehen (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 1985).

Die Artbestimmung bei den wichtigsten Vetretern von fischpathogenen Oomyceten, den Arten innerhalb der Gattungen *Aphanomyces*, *Achlya* und *Saprolegnia*, erfolgt anhand sexueller Strukturen. Diese fehlen gewöhnlich bei fischparasitischen Arten und sind auch bei *Aphanomyces invadans* unbekannt (LILLEY et al., 1998). ALDERMAN & POLGLASE (1988) betrachten das Fehlen sexueller Strukturen als häufiges Phänomen mehr pathogener Mitglieder der Oomyceten.

4. Empfängliche Fischarten

Die Auflistungen der betroffenen Fischarten bei EUS-Ausbrüchen umfassen weit über 100 Arten (TONGUTHAI, 1985; FRERICHS et al., 1989). Die Haut und Muskulatur von Fischen kann nur in begrenzter Art und Weise auf unterschiedliche Schädigungen und Infektionen reagieren. Das Auftreten von Hautulzera bei einer Fischart während eines EUS-Ausbruchs bedeutet nicht per se, dass die Art am EUS erkrankt und damit empfänglich ist (FRERICHS et al., 1989). Die Tatsache, dass eine Pathologie-basierte Diagnose des EUS bei vielen Untersuchungen vor 1994 nicht erfolgte, macht es wahrscheinlich, dass mindestens einige Berichte irreführend sind (ROBERTS et al., 1994; LILLEY et al., 2002). Jedoch gibt es histopathologisch bestätigte Fälle bei einer großen Anzahl von Fischarten, die aufgrund ihres Umfangs in **Tab. 14** unter IX.1. aufgelistet sind.

Bei obligat marinen Fischarten wurde die Erkrankung nicht festgestellt (ROBERTS et al., 1994; LILLEY et al., 2002). Arten, von denen berichtet wird, dass sie bei EUS-Ausbrüchen nicht betroffen waren, sind der Karpfen (*Cyprinus carpio*), Tilapien (*Oreochromis mossambicus* und *niloticus*) und der Milchfisch (*Chanos chanos*) (COSTA & WIJEYARATNE, 1989; AHMED & RAB, 1995; LILLEY et al., 1998). Bei experimentell infizierten Karpfen (WADA et al., 1996) und Tilapien (KHAN et al., 1998) konnten keine klinischen Symptome hervorgerufen werden.

5. Infektion

Der natürliche Infektionszyklus ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Bei Untersuchungen an EUS-erkrankten oder an der Erkrankung gestorbenen Fischen konnte noch keine Formation von Sporangien beobachtet werden. Bei Untersuchung der Hautulzerationen von erkrankten Fischen war das Mycel des Erregers zwar deutlich zu erkennen, es war jedoch abgesehen von

den terminalen, tief im Fischgewebe liegenden Hyphenspitzen abgestorben (ROBERTS et al., 1993; WILLOUGHBY, 1999). Laut WILLOUGHBY (1999) stellt sich daher die Frage, wie eine direkte horizontale Übertragung von Fisch zu Fisch stattfindet. Er verweist auf die Möglichkeit, dass die Fische durch infektiöse Zoosporen, die im Gewässerlebensraum produziert wurden, infiziert werden.

Das infektiöse Stadium des Erregers ist die freischwimmende Zoospore. In zahlreichen Versuchen konnte das EUS mittels intramuskulärer Zoosporeninjektion (CHINABUT et al., 1995; WADA et al., 1996; LILLEY & ROBERTS, 1997; KHAN et al., 1998; KIRYU et al., 2002) und in wenigen Fällen durch eine Zoosporenexposition in Form eines Sporenbades (LILLEY, 2001; KIRYU et al., 2003) bei empfänglichen Fischarten ausgelöst werden. Die freischwimmenden Zoosporen zeigen gegenüber Fischschleim und Fischhaut empfänglicher und unempfänglicher Fischarten, aber auch gegenüber verschiedenen Zuckerverbindungen und Aminosäuren mit Ausnahme von Arginin eine positive Chemotaxis (SIHALATH, 1999). Bei Untersuchungen von EUS-Läsionen bei Zwergfadenfischen (*Colisa lalia*) waren die durch den Erreger bedingten pathologischen Veränderungen in der Skelettmuskulatur am ausgeprägtesten und nahmen in Richtung der inneren Organe hin ab (WADA et al., 1994). Dies berichteten auch andere Autoren (NOGA et al., 1988; CALLINAN et al., 1989; ROBERTS et al., 1993). Dies ließ ihnen zufolge darauf schließen, dass der Erreger an der äußeren Körperoberfläche in den Wirt eindrang, hier die primäre Läsion etablierte und von dort Hyphen in Richtung Abdominalhöhle vordrangen. LILLEY et al. (1998) betrachteten *Aphanomyces invadans* noch als sekundären Eindringling, der obligat eine Eintrittspforte in Form einer geschädigten oder fehlenden Epidermis benötigt. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Zoosporen sich an eine intakte Epidermis anheften, einen Keimschlauch ausbilden und das Epithel penetrieren konnten (KIRYU et al., 2003). Allerdings führte die Schaffung einer Eintrittspforte in Form einer mechanischen Schädigung der

Schleimschicht und der Epidermis oder die intramuskuläre Injektion von Zoosporen zu einer signifikant höheren Prävalenz und Mortalität (KIRYU et al., 2003). Untersuchungen zur Mindestinfektionsdosis ergaben bei intramuskulär mit Zoosporen infizierten Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*), dass bereits eine einzelne injizierte Zoospore in der Lage war, eine Infektion auszulösen, die zum Tod führt (KIRYU et al., 2003).

6. Epidemiologie

6.1. Weltweite Verbreitung des EUS

Die **Abb. 4** und **5** zeigen die Länder, die vom EUS betroffen waren und geben an, wann die Erkrankung in den betreffenden Staaten das erste Mal auftrat.

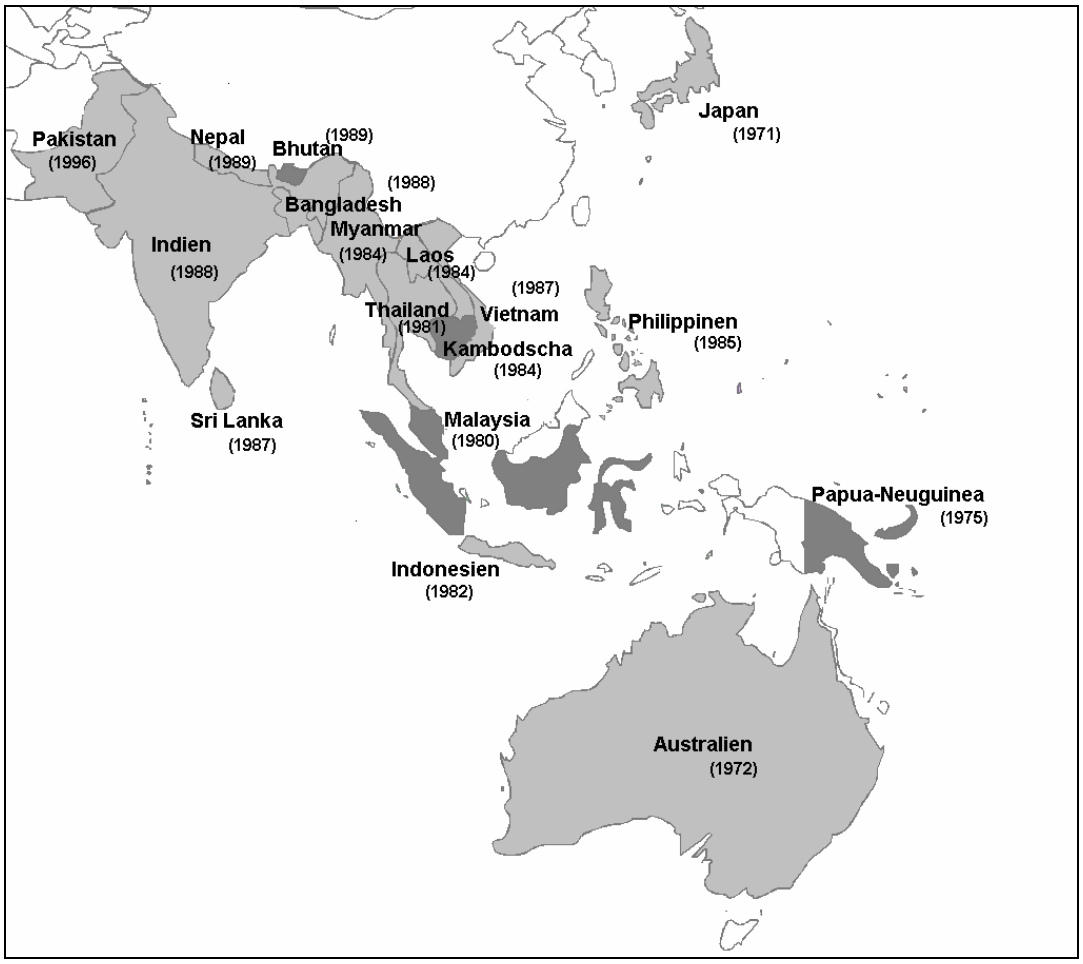

Abb. 4: Vom EUS betroffene Länder im asiatisch-pazifischen Raum (CHINABUT, 1998 ; LILLEY et al., 2001b)

hellgrau unterlegt: Ausbrüche durch histopathologische Untersuchung oder Isolierung von *Aphanomyces invadans* bestätigt; **dunkelgrau unterlegt:** unbestätigte EUS-Ausbrüche; **in Klammern:** Jahr des ersten Auftretens

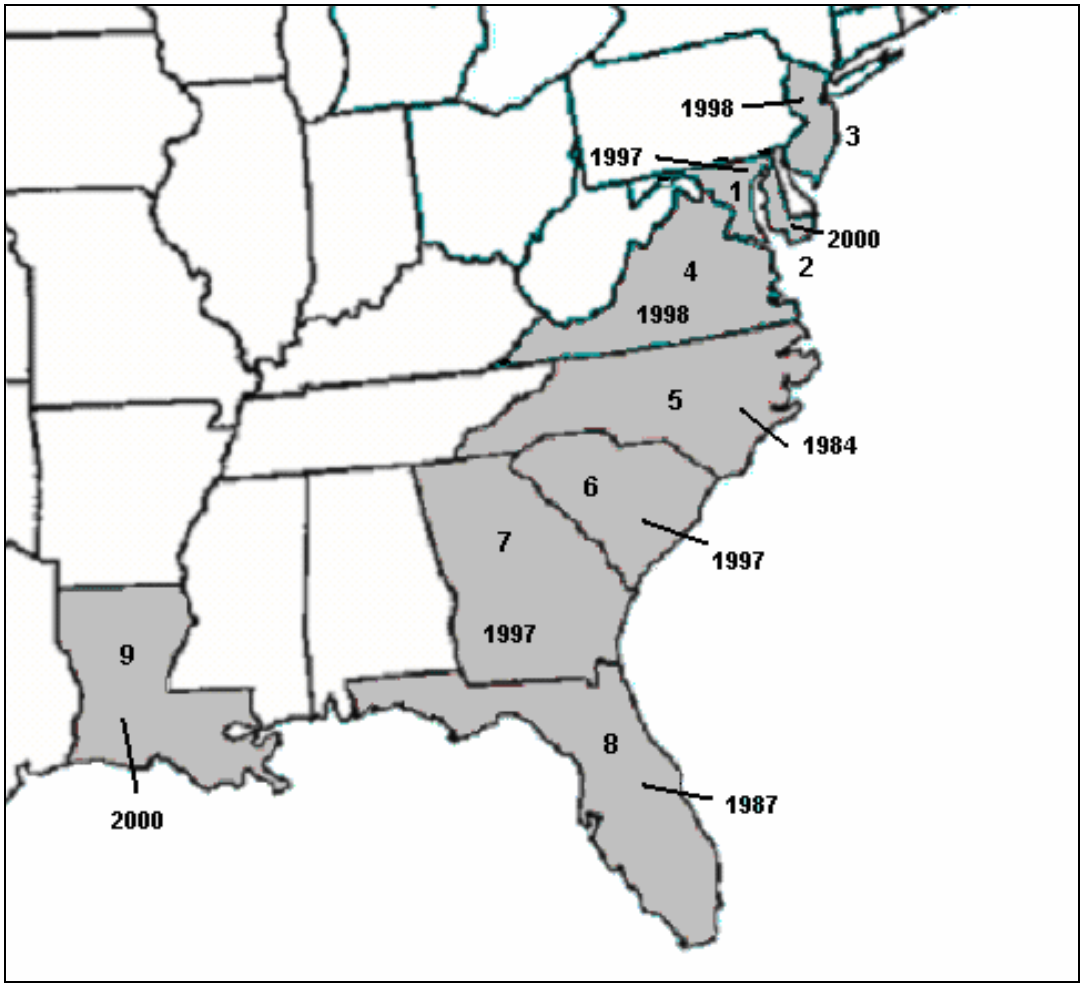

Abb. 5: Vom EUS betroffene Staaten in den USA (durch histopathologische Untersuchung oder Isolierung von *Aphanomyces invadans* bestätigt)

1: Maryland, 1997 (BLAZER et al., 2002)
2: Delaware, 2000 (BLAZER et al., 2002)
3: New Jersey, 1998 (BLAZER et al., 2002)
4: Virginia, 1998 (BLAZER et al., 2002)
5: North Carolina, 1984 (DYKSTRA et al., 1986)
6: South Carolina, 1997 (BLAZER et al., 2002)
7: Georgia, 1997 (BLAZER et al., 2002)
8: Florida, 1987 (NOGA et al., 1988)
9: Louisiana, 2000 (BLAZER et al., 2002)

LILLEY et al. (1997a) untersuchten mittels RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction), einer zur Untersuchung der Epidemiologie von Erkrankungen häufig eingesetzten Methode, verschiedene *Aphanomyces invadans*-Isolate aus dem asiatisch-pazifischen Raum. Die Isolate zeigten eine hohe genetische Homogenität (siehe II.3.2.), so dass eine einzige klonale Abstammungslinie postuliert wurde. Es wurde vermutet, dass die Ausbreitung der Erkrankung im asiatisch-pazifischen Raum erst in jüngster Vergangenheit in einer relativ kurzen Zeitspanne geschah. Die Autoren ziehen einen Vergleich zu *Aphanomyces astaci*-Stämmen in Europa. Bei Untersuchungen zur Stammdifferenzierung verschiedener *Aphanomyces astaci*-Stämme konnten diese vier unterscheidbaren Gruppen zugeordnet werden, was mit der Einschleppung des Erregers nach Euopa über eine mehrmals erfolgte Einfuhr unterschiedlicher Krebsarten erklärt wurde (HUANG et al., 1994; DIEGUEZ-URIBEONDO et al., 1995).

6.2. Übertragungswege

Die länderüberschreitende Verbreitung der Erkrankung in bestimmte Gebiete ist laut LILLEY et al. (1997a) nur durch den Handel von Fischen für die Aquakultur und die Zierfischindustrie erklärbar. In Japan konnte bei drei aus Singapur importierten tropischen Zierfischarten mit EUS-typischen Hautläsionen der Erreger *Aphanomyces invadans* isoliert werden (HATAI et al., 1994; HANJAVANIT et al., 1997). Es kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass neben EUS-empfänglichen Fischarten auch unempfängliche Fischarten als Carrier agieren (LILLEY, 2001). Diese zeigen zwar nur kleine lokal begrenzte entzündliche Läsionen und erliegen der Infektion normalerweise nicht, können den Erreger aber beherbergen (CHINABUT & ROBERTS, 1999). MOHAN & SHANKAR (1994) untersuchten die Ausbreitung des EUS in Südindien. Sie stellten fest, dass eine Verbreitung nicht nur über miteinander in Verbindung stehende Gewässer und durch Überschwemmungen stattfand, sondern dass es auch in

entlegenen und isolierten Gewässern auftrat, möglicherweise begründet in einer aerogenen Verbreitung oder einer Verbreitung durch Wasservögel.

Es ist wenig darüber bekannt, wie der Erreger zwischen den Ausbrüchen überlebt. Vermutet wird, dass er mit niedriger Prävalenz in empfänglichen Fischarten, im Gewässer als enzystierte Spore oder auf Nicht-Fisch-Substrat persistiert (LILLEY et al., 1998). EUS-Ausbrüche in Bangladesch traten in Fischteichen mit empfänglichen Arten auf, die vor dem Besatz unbesetzt waren oder mit Pisciziden behandelt wurden mit dem Ziel, Raubfische und unerwünschte Fischarten zu beseitigen (AHMED & RAB, 1995). Dies ließ laut LILLEY et al. (1998) darauf schließen, dass der Erreger entweder innerhalb überlebender infizierter Fische oder im Gewässer, möglicherweise als enzystierte Spore, persistierte. Enzystierte Zoosporen von *Aphanomyces invadans* konnten *in vitro* bei 20 °C 19 Tage überleben (WILLOUGHBY, 1999). LILLEY et al., (2001) machten bei epidemiologischen Studien in Bangladesh zwei wesentliche Faktoren, die das Risiko eines EUS-Ausbruchs in Fischzuchten erhöhten, aus. Beide hingen mit der Tatsache zusammen, dass das EUS dort bei Wildfischen endemisch ist. Zum einen war dies eine bestehende Verbindung der Fischteiche zu natürlichen Gewässern, zum anderen das Vorhandensein von Wildfischen in den Fischteichen.

JOHNSON et al. (2004) vermuteten, dass die hohe Prävalenz bei Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) durch das spezifische Verhalten zustande kommt. Juvenile Menhaden-Heringe der Altersgruppe der Null- bis Einjährigen schließen sich zu Schulen mit Tausenden Individuen zusammen und durchziehen flache Gewässerabschnitte, in denen eine niedrige Salinität vorherrscht. Da die Motilität von *Aphanomyces invadans*-Zoosporen über einer Salinität von 2 ‰ absinkt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Infektion in diesen Abschnitten mit niedriger Salinität stattfindet. Hierin wird auch die höchste Prävalenz bei Menhaden-Heringen dieser Altersgruppe vermutet (LEVINE et al., 1990b).

Da an EUS-erkrankten oder an der Erkrankung gestorbenen Fischen noch keine Formation von Sporangien oder Sporen festgestellt werden konnte (ROBERTS et al., 1993; WILLOUGHBY, 1999), ist die Möglichkeit der direkten horizontalen Übertragung des Erregers über infektiöse Zoosporen nicht bestätigt (WILLOUGHBY, 1999). SUBASINGHE (1993) setzte mit Ektoparasiten der Gattung *Trichodina* befallene Schlangenkopffische (*Channa striata*) EUS-erkrankten Flugbarben (*Esomus dandricus*) aus. Dies geschah, indem er die Flugbarben an die Schlangenkopffische verfütterte oder in Netzkäfigen zu ihnen setzte. Er konnte EUS-Läsionen bei den Schlangenkopffischen auslösen und deutete dieses Ergebnis als Hinweis darauf, dass das ursächliche Agens zu horizontaler Übertragung fähig ist.

6.3. Faktoren, die Ausbreitung, Übertragung, Verlauf und Mortalitätsrate beeinflussen

Damit es zu einem EUS-Ausbruch kommen kann, müssen empfängliche Fischarten unter geeigneten Umweltbedingungen auf infektiöse Stadien des Erregers treffen. Eine Reihe von biotischen und abiotischen Faktoren spielen eine Rolle bei der Induktion von Läsionen und vermutlich auch der Verfügbarkeit von infektiösen Formen des Erregers. Als Folge dieser Faktoren werden die Abwehrbarrieren der Haut beeinträchtigt, so dass *Aphanomyces invadans* sich an die Haut anheften kann und es ihm erleichtert wird, in die darunterliegenden Gewebe einzudringen (LILLEY et al., 1998).

6.3.1. Temperatur

FRERICHS et al. (1989) berichteten von einem saisonalen Auftreten der Erkrankung im südostasiatischen Raum während der kühleren, trockeneren Monate von Oktober bis März. RODGERS & BURKE (1981) stellten bei

Brackwasserfischen in Australien die höchste Prävalenz fest, wenn diese niedrigen oder schnell wechselnden Wassertemperaturen ausgesetzt waren. Auch andere Autoren zeigten den Einfluß der Temperatur auf die Krankheit auf. Laut HAWKE et al. (2003) traten bei erkrankten Katzenwelsen und Sonnenbarschen aus Fischzuchtbetrieben in Louisiana die meisten Todesfälle in den Monaten November bis Januar bei Wassertemperaturen von 10 bis 15 °C auf. CHINABUT et al. (1995) führten Infektionsversuche mit Schlangenkopffischen (*Channa striata*) bei verschiedenen Temperaturen durch. Obwohl *Aphanomyces invadans* in Laborkultur bei höheren Temperaturen ein schnelleres Wachstum zeigt (ROBERTS et al., 1993), traten bei den niedrigeren Temperaturen höhere Mortalitäten auf. Dies wird dem Einfluss der Temperatur auf die Immunantwort von poikilothermen Tieren wie Fischen zugeschrieben und äußert sich in einem langsameren und weniger ausgeprägten Entzündungsgeschehen (MCQUEEN et al., 1973; ELLIS, 1982; CHINABUT et al., 1995). CATAP & MUNDAY (1998) beschrieben die Auswirkungen einer Absenkung der Temperatur von 26 °C auf 17 °C auf Wundheilungsprozesse und die Immunantwort bei mit *Aphanomyces invadans*-Zoosporen infizierten Wittlingen (*Sillago ciliata*), einer gegenüber dem EUS empfänglichen Fischart. Sowohl bei einer schnellen Absenkung der Temperatur innerhalb von 24 Stunden als auch bei einer schrittweisen Absenkung über sieben Tage traten Wundheilungs-prozesse wie Fibrosierung und Neovaskularisation verzögert auf. Es zeigte sich im Vergleich zu infizierten Wittlingen, die durchgehend bei 26 °C gehalten wurden, eine verzögerte und geringer ausgeprägte granulomatöse Wirtsreaktion und eine verringerte Infiltration mit Entzündungszellen. Die Makrophagenaktivität selbst wird durch niedrige Temperaturen nicht beeinträchtigt, wohl aber die Produktion des von den T-Zellen produzierten Makrophagen-aktivierenden Faktors (LE MORVAN-ROCHER et al., 1995), da T-Zellen durch niedrige Temperaturen gehemmt werden (BLY & CLEM, 1991).

6.3.2. Niederschlag und in Beziehung stehende Wasserparameter

EUS-Ausbrüche bei Brackwasserfischen in Australien wiesen eine signifikante Korrelation mit größeren Niederschlagsmengen und hohen Durchflussmengen der Flüsse und den Mündungsgebieten auf, welche rasche Änderungen verschiedener Wasserparameter wie Salinität, Temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Gehalt an Schwebstoffen verursachten (RODGERS & BURKE, 1981; VIRGONA, 1992). Ein dadurch auf unter 2 ‰ reduzierter Salzgehalt (RODGERS & BURKE, 1981) gab *Aphanomyces invadans* geeignete Bedingungen für Wachstum und Sporulation (FRASER et al., 1992). Daneben kam es zeitweise zu einer Ansäuerung (pH-Wert unter 5) in den Mündungsgebieten Ostaustraliens, bedingt durch die Oxidation sulfathaltiger Sedimente in überschwemmten Flächen und den Transport von Schwefelsäure durch die Flüsse in die Mündungsgebiete (SAMMUT et al., 1996).

EUS-Ausbrüchen im Jahr 1997 in Sri Lanka waren starke Regenfälle vorangegangen, gefolgt von einer Periode mit geringen Niederschlagsmengen während der Ausbrüche, mit der Folge einer Verschlechterung der Wasserqualität, insbesondere einem Absinken der Sauerstoffkonzentration (PATHIRATNE & JAYASINGHE, 2001). Bereits PLUMB et al. (1976) berichteten von Hautläsionen bei Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) in einer Phase mit stark gesunkenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Läsionen waren durch Hämorrhagien, Nekrose und nachfolgende bakterielle Infektion mit *Aeromonas hydrophila* gekennzeichnet.

Auch HAWKE et al. (2003) berichteten über das Auftreten des EUS in Fischgewässern in Louisiana, die sich durch einen leicht sauren pH-Wert und eine geringe Karbonat- und Gesamthärte auszeichneten. EUS-Ausbrüche in Sri Lanka waren laut COSTA & WIJEYARATNE (1989) auf Gewässer mit einer Wasserhärte von unter 30 mg $CaCO_3$/l beschränkt.

6.3.3. Bakterielle Infektionen

Bakterien spielen in der Pathogenese des EUS auf zwei Ebenen eine Rolle. Bakterielle Hautinfektionen können Fische für das EUS prädisponieren, indem sie die Hautbarriere schädigen und somit eine Eintrittspforte für den Erreger schaffen. Auf der anderen Seite besiedeln Bakterien bestehende Ulzerationen, dringen in den Blutstrom ein und führen zu tödlich verlaufenden Septikämien (LILLEY et al., 1998). Besonders bei Fischen mit fortgeschrittenen Läsionen wurden Bakteriämien festgestellt (NOGA et al., 1988). Zahlreiche Bakterienarten wurden von den Hautläsionen und in manchen Fällen von den inneren Organen, insbesondere Leber und Rumpfniere, isoliert. Keine Spezies konnte jedoch durchweg oder wenigstens bei einem größeren Anteil der erkrankten Fische nachgewiesen werden (NOGA & DYKSTRA, 1986; LLOBRERA & GACUTAN, 1987; BOONYARATPALIN, 1989; CALLINAN & KEEP, 1989; COSTA & WIJEYARATNE, 1989; PAL & PRADHAN, 1990). Histologisch sind in der Tiefe der EUS-Läsionen nur in wenigen Fällen Bakterien zu sehen (LILLEY et al., 1998).

6.3.4. Virale Infektionen

Von an EUS erkrankten Fischen aus dem südostasiatischen Raum konnten in der Vergangenheit Birnaviren (HEDRICK et al., 1986), Rhabdoviren (FRERICHS et al., 1989; FRERICHS, 1995; KANCHANAKHAN, 1996; LIO-PO et al., 2000) und ein Reovirus (FRERICHS, 1995; JOHN et al., 2001) isoliert werden. Diese Heterogenität bei den erhaltenen Viren und der geringe und unregelmäßige Prozentsatz der erfolgreichen Virusisolierung von erkrankten Individuen ließ darauf schließen, dass diese Viren nur Zufallsbefunde ohne Bezug zum EUS darstellen (FRERICHS, 1995), zumal bei Infektionsversuchen mit Schlangenkopffischen (*Ophicephalus striatus*) einige der Rhabdoviren auf ihre Pathogenität untersucht wurden und keine

sichtbaren Läsionen hervorriefen (FRERICHS et al., 1993). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Rhabdoviren einen Einfluß auf das EUS haben könnten. KANCHANAKHAN (1996) isolierte während EUS-Epizootien in Thailand in den Jahren 1993 und 1994 vor allem in der frühen Periode der Ausbrüche neun Viren aus der Familie der Rhabdoviridae. Eines davon erwies sich im Tierversuch mit Schlangenkpoffischen (*Ophicephalus striatus*) als fischpathogen und führte bei Brütlingen zum Tod sowie bei Jungfischen zu Hautschäden (KANCHANAKHAN, 1997). Schlangenkopf-fische, die mit diesem Rhabdovirus infiziert wurden, zeigten sich gegenüber *Aphanomyces invadans* empfänglicher (KANCHANAKHAN, 1996). Ein von EUS-erkrankten Schlangenkopffischen (*Ophicephalus striatus)* auf den Philippinen isoliertes Rhabdovirus führte im Tierversuch bei 20 - 22,5 °C nach drei bis fünf Tagen zu fortschreitenden Hautläsionen, die jedoch nicht mit den tiefen Ulzerationen der natürlich erkrankten Tiere vergleichbar waren (LIO-PO et al., 2001).

6.3.5. Vorschädigung durch toxinproduzierende Dinoflagellaten

Ein neuentdeckter toxischer Dinoflagellat wurde Anfang der Neunziger Jahre als Ursache für ulzerative Hautläsionen und Fischsterben in den nährstoffreichen Mündungsgebieten der Atlantikküste der USA verantwortlich gemacht (BURKHOLDER et al., 1992; NOGA et al., 1996; DYKSTRA & KANE, 2000). NOGA et al. (1993) setzten Tilapien (*Oreochromis aureus*) Laborkulturen der Dinoflagellaten aus. Sie beobachteten eine positive Relation zwischen der Konzentration der Dinoflagellaten, der die Fische ausgesetzt waren, und der Mortalität und vermuteten ein Ichthyotoxin als Ursache dafür. In weiteren Versuchen konnten Epithelerosionen und -verluste induziert werden (NOGA et al., 1996). Als Auslöser für die in Tierversuchen auftretenden pathologischen Veränderungen vermutete man Exotoxine oder räuberisches Verhalten der Dinoflagellaten in Form aktiven Fressens der Epidermis. Der Zusammenhang zwischen toxinproduzierenden

Dinoflagellaten mit Massensterben und Hautulzerationen bei Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) wird kontrovers diskutiert. Zumindest eine Rolle als prädisponierenden Faktor für eine Infektion mit *Aphanomyces invadans* schlossen VOGELBEIN et al. (2001) nicht aus.

7. Pathogenese

Klinische Symptome in Form von rötlichen hämorrhagischen Hautläsionen traten bei Infektionsversuchen mit Schlangenkopffischen (*Channa striata*) bei 26 °C bereits drei bis fünf Tage post infectionem (p. i.) auf (CHINABUT et al., 1995), makroskopisch sichtbare Veränderungen können jedoch bei niedrigeren Temperaturen erst 10 Tage p. i. auftreten, wie Infektionsversuche mit Ayu (*Plecoglossus altivelis*) bei 16 °C (WADA et al., 1996) und mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bei 18 °C (KHAN et al., 1998) zeigten. Die ersten Todesfälle traten bei Infektionsversuchen mit den Schlangenkopffischen bei Temperaturen von 19, 26 und 31 °C (CHINABUT et al., 1995) und bei Blauen Fadenfischen (*Trichogaster trichopterus*) bei 26 °C (CATAP & MUNDAY, 2002) an Tag 7 p. i. auf. Die Mortalität kann bei intramuskulär mit Zoosporen infizierten Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) 100 % betragen (KIRYU et al., 2002) und steigt mit zunehmender Infektionsdosis (KIRYU et al., 2003). Bei Infektionsversuchen mit Schlangenkopffischen nahm die Mortalität mit sinkender Wassertemperatur zu (CHINABUT et al., 1995). Erkrankte Schlangenkopffische mit mäßig fortgeschrittenen Hautläsionen gesunden oft, wenn ihnen eine verbesserte Wasserqualität geboten wird, ähnlich heilen Hautläsionen bei Meeräschen (*Mugil cephalus*) schnell, sobald sie in Meerwasser wandern (LILLEY et al., 1998). EUS-Ausbrüche gehen meist in den ersten zwei bis drei Jahren mit hohen Mortalitäten einher, in den darauffolgenden Jahren ist die Inzidenz gewöhnlich geringer (ROBERTS et al., 1994; KANCHANAKHAN, 1996). ROBERTS et al. (1994) vermuteten dahinter die Entwicklung einer Resistenz oder die Tatsache, dass empfängliche Fischarten in den betroffenen

Gewässern nach Ausbrüchen so stark dezimiert sind, dass sie weitgehend fehlen.

Der Verlauf der Infektion kann perakut, akut oder chronisch sein. Bei Ausbrüchen in Aquakulturen von Jungfischen empfänglicher Fischarten wie Barben (*Puntius spp.*) und in Indien in der Aquakultur gezüchteten Karpfenfischen (*Labeo rohita*, *Cirrhina mrigala* und *Catla catla)* kam es innerhalb 48 Stunden zu Massenmortalitäten. Die klinischen Symptome waren begrenzt auf Luftschnappen an der Wasseroberfläche und abgegrenzte dunkelrote bis bräunliche Hautläsionen (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Bei Untersuchungen von Ausbrüchen in Südindien forderte das EUS bei betroffenen Fischarten innerhalb kurzer Zeit einen hohen Tribut und löschte die empfänglichen Arten innerhalb eines Monats aus, um dann allmählich zu verschwinden (MOHAN & SHANKAR, 1994). HAWKE et al. (2003) berichteten dagegen von einem chronischen Verlauf der Erkrankung bei Katzenwelsen und Sonnenbarschen. In den betroffenen Fischzuchten traten während des Winterhalbjahres über einen Zeitraum von mehreren Monaten Todesfälle auf, die sich laut Aussagen der Besitzer auf Mortalitäten von 10 - 20 % kumulierten.

Während schulenbildende Fischarten wie Silberbarben (*Puntius gonionotus*) relativ schnell bereits mit minimalen Läsionen verenden, können Schlangenkopffische (*Channa striata*) und Stachelaale (*Mastacembalus spp.*) eine erstaunliche Gewebezerstörung über einen Zeitraum von Wochen erdulden und weisen dann so ausgedehnte und oft massive Läsionen auf, dass knöcherne Strukturen oder innere Organe zum Vorschein kommen. Im Allgemeinen führen diese Läsionen zum Tode, assoziiert mit schwerem generalisierten Ödem und sekundärer bakterieller Septikämie (ROBERTS et al., 1994). Die großflächigen Ulzerationen verursachen osmotischen Streß und hochgradige Imbalanzen im Flüssigkeithaushalt der Fische (NOGA et al., 1988).

VISHWANATH et al. (1998) untersuchten das invasive Wachstum von *Aphanomyces invadans* an ungefähr 300 zu unterschiedlichen Fischspezies gehörenden EUS-erkrankten Fischen aus dem Süß- und Brackwasser in Indien. Sie stellten dabei fest, dass das Eindringen des Erregers und die damit verbundenen pathologischen Veränderungen nicht auf den Bereich der Ulzeration beschränkt blieben. Der Erreger wuchs in Stellen weit entfernt davon bis in die kontralaterale Seite und konnte in allen viszeralen Organen sowie im Rückenmark, den Zwischenmuskelgräten und der Niere nachgewiesen werden. Die Hyphen breiteten sich in den intermyotomalen Zwischenräumen aus und wählten so den Weg des geringsten Widerstandes. Die Studie dokumentierte deutlich, dass der Erreger bei empfänglichen Spezies hochgradig invasiv und fähig ist, von der Ulzeration schnell in alle Richtungen zu wachsen, noch bevor er von Makrophagen eingeschlossen werden kann. Auch in einiger Entfernung zu den Hyphen wurden beträchtliche Gewebezerstörungen festgestellt (WADA et al., 1996), was darauf hindeutet, dass extrazellulär sezernierte Produkte bei der Pathogenese eine Rolle spielen (MILES et al., 2003). Ein mit Hilfe von Immunfluoreszenz entdecktes extrazelluläres Proteinantigen des Erregers konnte im nekrotischen und entzündeten Gewebe, das die Hyphen umgibt, nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Gewebeschädigung, die in frühen Stadien auftritt, durch extrazelluläre Produkte, die von den Hyphen sezerniert werden, bedingt ist (MILES et al., 2003). Viele pathogene Oomyceten inklusive *Aphanomyces astaci* produzieren extrazelluläre Enzyme, um in den Wirt einzudringen (SÖDERHÄLL & UNESTAM, 1975). Von pflanzenpathogenen Pilzen ist bekannt, dass sie lytische Enzyme oder Toxine freisetzen (LUTTRELL, 1974).

KURATA et al. (2000) demonstrierten, dass der Überstand homogenisierter Hyphen von *Aphanomyces invadans* hämagglutinierende und hämolytische Eigenschaften besitzt, was von Bedeutung für die Entwicklung einer Anämie bei erkrankten Fischen (HATAI et al., 1984) sein kann. Die

hämagglutinierende Eigenschaft ist durch ein Galaktose-bindendes Protein von *Aphanomyces invadans* bedingt (KURATA et al., 2002).

8. Klinik

8.1. Klinische Symptomatik

Nach einer Inkubationszeit, die abhängig von der Temperatur und der betroffenen Fischart ist (siehe II.7.) und drei bis zehn Tage beträgt, treten die ersten makroskopisch sichtbaren Hautveränderungen auf. Die Hautläsionen treten meist seitlich an der Körperoberfläche, seltener an anderen Körperstellen auf. So sind sie beispielsweise bei räuberisch lebenden Fischarten häufig im Maulbereich lokalisiert (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Bemerkenswert ist eine oft signifikante Übereinstimmung der Lokalisation bei einer bestimmten Fischspezies (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Auch andere Autoren können dies bestätigen. So waren bei erkrankten Meeräschen (*Mugil cephalus*) in Australien meist einzelne und auf den dorsalen und kaudalen Körperbereichen lokalisierte Läsionen zu beobachten (CALLINAN et al., 1989), während die Hautveränderungen bei Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) mehrheitlich solitär und perianal gelegen waren (LEVINE et al., 1990b; BLAZER et al., 1999). Im Gegensatz dazu wiesen Katzenwelse (*Ictalurus punctatus, Ameiurus melas*) und Blaue Sonnenbarsche (*Lepomis macrochirus*) in Louisiana zufällig verteilte, multifokale, sich teilweise vereinigende Hautläsionen auf (HAWKE et al., 2003).

Die weiteren klinischen Symptome der Erkrankung sind bei allen Fischarten sehr ähnlich. Die Tiere verhalten sich meistens lethargisch, verharren träge am Boden (CATAP & MUNDAY, 2002) und zeigen eine reduzierte Futteraufnahme (LILLEY et al., 1998). Gelegentlich schwimmen die Tiere mit dem Kopf aus dem Wasser gestreckt (TONGUTHAI, 1985) oder sind

hyperaktiv und schwimmen mit ruckartigen Bewegungen (ROBERTS et al., 1994). Während der Ausbrüche treibt ein großer Anteil der Fische meist tot im Randbereich eines Flussabschnitts oder Teichs (ROBERTS et al., 1994). NOGA & DYKSTRA (1986) stellten bei einigen der untersuchten Menhaden-Heringe extrem blasse Kiemen fest, was auf eine hochgradige Anämie hindeutet. HATAI et al. (1994) berichteten bei erkrankten Zwergfadenfischen (*Colisa lalia*) von einer Schwellung des Abdomens, bedingt durch geschwollene innere Organe ohne eine Ansammlung von Aszites.

8.2. Klinische Pathologie

In einem sehr frühen Stadium der Erkrankung beschränken sich die makroskopisch sichtbaren Veränderungen auf stecknadelkopfgroße rote Flecken ohne eine wahrnehmbare Hämorrhagie oder Ulzeration (VISHWANATH et al., 1997). Bei weiter fortgeschrittenen Erkrankungen zeigen sich zum einen proliferative, blasse, verfärbte und weiche Läsionen, die vor allem in der Peripherie noch von intakter Haut bedeckt sind (CALLINAN et al., 1989; BLAZER et al., 1999; HAWKE et al., 2003), zum anderen offene Hautulzera, die sich in die tiefergelegene Skelettmuskulatur bis an knöcherne Strukturen und bis in die Bauchhöhle ausdehnen können (CALLINAN et al., 1989; VISHWANATH et al., 1997; BLAZER et al., 1999). Oft entspricht der Grad der Hautläsion nicht der Schwere der pathologischen Veränderungen in der Dermis und der Muskulatur, die sich im histopathologischen Bild darstellt (HAWKE et al., 2003).

9. Histopathologische Befunde

Charakteristisch für das EUS ist eine sehr spezifische hochgradige nekrotisierende myofibrilläre Degeneration, verbunden mit einer granulomatösen Entzündungsreaktion auf die eindringenden Hyphen von

Aphanomyces invadans in Form mykotischer Granulome. Laut CHINABUT & ROBERTS (1999) fehlen diesen Strukuren die fibrösen und lymphoiden Elemente von Granulomen, vielmehr umgeben Makrophagen die eindringenden Hyphen auf ihrem Weg folgend in Form linearer Strukturen, die komplett aus Epitheloid-Makrophagen bestehen.

Die frühen Stadien der EUS-Läsionen sind durch Bezirke mit Nekrose des Hautepithels und umgebender Ödematisierung (LILLEY et al., 1998) sowie einer Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen gekennzeichnet (CALLINAN et al., 1989). In der darunterliegenden hyperämischen Dermis (CALLINAN et al., 1989) zeigen sich Hämorrhagien (LILLEY et al., 1998). In diesem Stadium konnten nur in wenigen Fällen einzelne Hyphen nachgewiesen werden (VISHWANATH et al., 1997). Bei weiter fortgeschrittenen Läsionen liegt eine deutliche nekrotisierende Dermatitis und Myositis in Epidermis, Dermis und Skelettmuskulatur mit zahlreichen Hyphen und einer granulomatösen Reaktion rund um die Hyphen vor (VISHWANATH et al., 1997). Die bereits längerbestehenden, offenen und hämorrhagischen Hautulzerationen zeichnen sich durch eine hochgradige nekrotische und granulomatöse Myositis mit zahlreichen wenig verzweigten, unseptierten Hyphen, die von mehrschichtigen Epitheloidzellagen eingeschlossen sind, aus (LILLEY et al., 1998). Die Muskulatur ist in den betroffenen Bereichen oft vollständig durch Granulationsgewebe durchsetzt (CHINABUT et al., 1995) mit vereinzelten, isoliert liegenden Muskelfasern (HAWKE et al., 2003). Die Oberfläche der Läsionen kann aus einem abgegrenzten Bezirk mit massiver Nekrose und Überresten der chronischen granulomatösen Wirtsreaktion bestehen (BLAZER et al., 1999). In diesen Bereichen treten auch Bakterien und Hyphen, vermutlich von wundparasitischen Oomyceten, die keine granulomatöse Reaktion auslösen, auf (BLAZER et al., 1999).

ROBERTS et al. (1994) wiesen auf eine deutliche Übereinstimmung der Morphologie des Erregers und der charakteristischen Wirtsreaktion bei einer großen Zahl von Fischarten hin. Abweichend davon fehlte bei EUS-

erkrankten Schwarzen Katzenwelsen (*Ameiurus melas*) und Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) die für das EUS typische Entzündung, bei der mehrere Epitheloidzellagen die Hyphen umschließen. Anstelle dessen trat eine eher diffuse Entzündung mit Beteiligung von Makrophagen, wenigen Lymphozyten sowie Riesenzellen, die versuchten, die Hyphen zu phagozytieren, auf (HAWKE et al., 2003). Das Auftreten von Riesenzellen vom Langhans-Typ wurde im Zusammenhang mit dem EUS nur bei wenigen Fischarten nachgewiesen. Diese beinhalten Ayu (*Plecoglossus altivelis*) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) (WADA et al., 1996), Brassenbarbe (*Puntius schwanenfeldi*), Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und Nilbuntbarsch (*Oreochromis niloticus*) (KHAN et al., 1998), Schwarzen Katzenwels (*Ameiurus melas*) und Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) (HAWKE et al., 2003), sowie Gestreiften Killifisch (*Fundulus majalis*) (JOHNSON et al., 2004). Da sich darunter sowohl gegenüber dem EUS empfängliche als auch unempfängliche Arten befinden, ist die Bedeutung der Riesenzellen für den Ausgang der Infektion unklar. So stellten zum Beispiel WADA et al. (1996) bei Infektionsversuchen mit gegenüber dem EUS empfänglichen Ayu (*Plecoglossus altivelis*) und unempfänglichen Karpfen (*Cyprinus carpio*) bei beiden Fischarten eine Beteiligung vielkerniger Riesenzellen fest. Die Riesenzellen umschlossen dabei die Hyphen, wobei sie bei den Ayu das Hyphenwachstum nicht unterdrücken konnten, zugrunde gingen und von Epitheloidzellen eingeschlossen wurden. Dies konnte auch bei den Karpfen vereinzelt festgestellt werden, mehrheitlich konnten aber beim Karpfen die Riesenzellen die Hyphen erfolgreich bekämpfen. Die Autoren vermuteten daher, dass Riesenzellen beim Karpfen eine wichtige Rolle in der zellulären Immunabwehr spielen, auch wenn sie die eindringenden Hyphen nicht vollständig unter Kontrolle bringen können.

Bei gegenüber dem EUS unempfänglichen Fischarten wie Tilapien (*Oreochromis* spp.) und Karpfen (*Cyprinus carpio*) beschränkt sich die Infektion auf nahe der Körperoberfläche gelegene Bereiche der Skelettmuskulatur. Die Wirtsreaktion ist lokal beschränkt, weniger ausgeprägt

als bei empfänglichen Arten und mehr zellulärer Natur, welche den Erreger erfolgreich davon abhalten kann, sich weiter auszubreiten (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Auch WADA et al. (1996) berichteten von schwächer ausgeprägten pathologischen Veränderungen bei experimentell infizierten Karpfen im Vergleich zu empfänglichen Ayu und führten dies auf eine schnellere und intensivere Wirtsreaktion zurück.

In vielen Fällen dringen die Hyphen bis in die inneren Organe vor. So konnten von Granulomen eingeschlossene Hyphen in sämtlichen Abdominalorganen, Herz, Zentralnervensystem, Ösophagus, Rückenmark und Zwischenmuskelgräten gefunden werden (NOGA et al., 1988; WADA et al., 1994; VISHWANATH et al., 1998). Das Eindringen des Erregers in die Abdominalhöhle war verbunden mit einer exsudativen, hämorrhagischen und fibrinösen Peritonitis. Ein Merkmal bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und bei Befall der inneren Organe war die generalisierte Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Von eindringenden Hyphen unbefallene innere Organe zeigen nur geringgradige pathologische Veränderungen, die nicht regelmäßig bei EUS-erkrankten Fischen vorkommen. Es schien kein Zusammenhang mit der Erkrankung zu bestehen (NOGA et al., 1988).

Bei einem geringen Prozentsatz von Fischen mit geringgradigen Läsionen konnten NOGA et al. (1988) Anzeichen einer Abheilung feststellen. Diese war gekennzeichnet durch eine vermehrte Pigmentierung, verursacht durch eine vermehrte Anzahl an Melanomakrophagen (LILLEY et al., 1998), bedeckt von intakter und teilweise hyperplastischer Epidermis (NOGA et al., 1988).

10. Diagnose

Hautulzerationen treten bei verschiedensten Erkrankungen bei Fischen auf und sind daher nicht als pathognomisch einzustufen. Im Handbuch des

Internationalen Tierseuchenamts (OIE) zur Diagnose von Krankheiten bei aquatischen Lebewesen wird die vom OIE empfohlene Methode zur Diagnose von EUS angegeben. Diese basiert auf den klinischen Symptomen und wird durch die histopathologische Untersuchung bestätigt (OIE, 2003). Die Isolierung und Identifizierung des Erregers ist wünschenswert und wesentlich für eine definitive Diagnose (CHINABUT & ROBERTS, 1999).

Histopathologische Untersuchung

Das Auftreten einer granulomatösen und nekrotisierenden Entzündungsreaktion in der Muskulatur und den inneren Organen ist ein Schlüsselmerkmal bei der Identifizierung und der Bestätigung von EUS-Ausbrüchen (CHINABUT, 1998). Frühe Stadien dieser granulomatösen Reaktion wurden bei Infektionsversuchen mit Schlangenkoffischen (*Channa striata*) und einer Wassertemperatur von 26 °C ab Tag 4 post infectionem (CHINABUT et al., 1995), bei Infektionsversuchen mit Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) bei 23,5 °C ab Tag 5 post infectionem (KIRYU et al., 2002) nachgewiesen und traten bei Infektionsversuchen mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bei 18 °C ab Tag 14 (KHAN et al., 1998), bei Infektionsversuchen mit Wittlingen (*Sillago ciliata)* bei 15 bis 16 °C ab Tag 15 (WADA et al., 1996) auf.

Die am häufigsten angewendete Reaktion zur Sichtbarmachung der Hyphen von *Aphanomyces invadans* ist Grocotts (GROCOTT, 1955) Methenamin-Silber-Färbung (GMS) für Mucopolysaccharide (WADA et al., 1996; VISHWANATH et al., 1997), mit der die Hyphen scharf abgegrenzt schwarz und das Hypheninnere rosafarben angefärbt werden (GROCOTT, 1955). Hiermit ist jedoch keine Unterscheidung von opportunistischen Pilzen oder anderen Oomyceten möglich (MILES et al., 2003). MILES et al. (2003) entwickelten einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein extrazellulär sezerniertes Proteinantigen von *Aphanomyces invadans* gerichtet ist und verwendeten diesen für Immunfluoreszenzfärbungen an paraffinierten

Schnitten von EUS-erkrankten Fischen. Im Vergleich zu konventionellen Färbetechniken war diese Methode sensitiver und ermöglichte in einigen Fällen die Entdeckung früher Stadien der Infektion in der Dermis sowie die Unterscheidung von Saprophyten. Es traten keine Kreuzreaktionen mit anderen Oomyceten oder fischpathogenen Pilzen auf, die in dieser Studie getestet wurden, mit Ausnahme von *Aphanomyces astaci*, dem Erreger der Krebspest. Dieser steht *Aphanomyces invadans* taxonomisch sehr nahe (LILLEY et al., 2001a; LILLEY et al., 2003), befällt aber keine Fische (LILLEY & ROBERTS, 1997; OIDTMANN et al., 1999). Im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern zeigten von LILLEY et al. (1997b) entwickelte polyklonale Antikörper Kreuzreaktionen.

Anzucht des Erregers

Aphanomyces invadans ist in Laborkultur ein sehr langsam wachsender (WILLOUGHBY & ROBERTS, 1994) sowie empfindlicher und kulturell anspruchsvoller Organismus (ROBERTS et al., 1993), der leicht von Kontaminanten wie anderen Oomyceten, Pilzen und Bakterien überwuchert wird (WILLOUGHBY & ROBERTS, 1994; CALLINAN et al., 1995). Zahlreiche Autoren (DYKSTRA et al., 1989; ROBERTS et al., 1993; HATAI et al., 1994; HAWKE et al., 2003) berichten von der Schwierigkeit, den Erreger zu isolieren. Dies scheint auch daran zu liegen, dass nur die terminalen, weiter vordringenden Hyphenenden intakt sind, während das übrige Mycel bereits von Makrophagen umgeben ist und abgestorben zu sein scheint (CHINABUT & ROBERTS, 1999). Auch andere Autoren (ROBERTS et al., 1993; HATAI et al., 1994) beschreiben in Nativpräparaten der Muskulatur und der inneren Organe weitgehend abgestorbenes Mycel. HAWKE et al. (2003) empfehlen, die Oberfläche der Läsion mit 95 % Ethanol zu desinfizieren, eine Inzision in die Muskulatur am Rand der Läsion zu setzen und Material von Stellen in der Tiefe der Muskulatur zu entnehmen. Am geeignetsten erweisen sich blasse, erhabene Läsionen, die noch nicht komplett ulzeriert sind, während sich

gelbliche bis rötliche Läsionen oder abheilende Ulzerationen nicht eignen (LILLEY et al., 1998). Für die initiale Isolierung vom Fisch werden Agarplatten auf der Basis eines Glukose-Pepton-Mediums empfohlen, dem Antibiotika zugesetzt werden, um bakterienfreie Kulturen zu erhalten (WILLOUGHBY & ROBERTS, 1994; HAWKE et al., 2003).

Eine Artbestimmung anhand morphologischer Kriterien alleine ist nicht möglich (OIE, 2003). Durch Induzieren der Sporogenese kann anhand typischer asexueller Merkmale der Gattung *Aphanomyces* diese bestimmt werden (OIE, 2003). *Aphanomyces invadans* produziert keine sexuellen Strukturen wie Oogonien oder Antheridien (PHADEE et al., 2004), anhand derer eine Artbestimmung bei der Gattung *Aphanomyces* erfolgt (SCOTT, 1961). *Aphanomyces invadans* kann von saprophytischen *Aphanomyces* spp. wie unter II.3.3. beschrieben anhand des Temperatur-Wachstumsprofils, anhand der Unfähigkeit des Erregers, auf bestimmten Nährmedien zu wachsen oder mittels Tierversuch und Erfüllung der Kochschen Postulate unterschieden werden (WILLOUGHBY et al., 1995; LILLEY & ROBERTS, 1997; HAWKE et al., 2003).

Molekularbiologische Methoden

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ist es möglich, durch Anzucht gewonnene *Aphanomyces* sp.-Isolate weiter zu charakterisieren (siehe II.3.2.). Zur Speziesidentifizierung wurde die Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte angewendet. HAWKE et al. (2003) konnten *Aphanomyces* spp. von EUS-erkrankten Fischen isolieren und amplifizierten mithilfe gruppenspezifischer Primer die internal transcribed spacer der für die ribosomalen RNA-Gene codierenden DNA. Das erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert und anschließend mit bekannten ITS-Sequenzen von fünf *Aphanomyces invadans*-Isolaten verglichen mit dem Ergebnis einer vollständigen Homologie.

LILLEY et al. (2003) konnten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) *Aphanomyces invadans* aus axenischen Laborkulturen verschiedener Stämme nachweisen. Die Primer wurden auf Kreuzreaktionen mit Reinkulturen von neun saprophytischen *Aphanomyces* spp., einer *Achlya* sp., *Saprolegnia diclina* und *Phytophthora cinnamomi* getestet, die alle negativ ausfielen. Angaben über die Sensitivität der Reaktion und über die Tauglichkeit für die Routinediagnostik wurden nicht gemacht. Mit Hilfe der von LILLEY et al. (2003) konstruierten Primer konnte *Aphanomyces invadans* aus mehreren Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben EUS-erkrankter Menhaden-Heringe, Sonnenbarsche und Gabelwelse nachgewiesen werden (BLAZER et al., 2002). Mit einer von PHADEE et al. (2004) entwickelten PCR-Methode konnte der Erreger bei klinisch erkrankten Goldfischen, die experimentell mit *Aphanomyces invadans* infiziert wurden, nachgewiesen werden. Die Methode wurde bezüglich ihrer Spezifität auf zahlreiche *Aphanomyces invadans*-Isolate und nahe verwandte Oomyceten getestet. Die Autoren räumten eine vermutlich zu geringe Sensitivität ihrer Methode zum Nachweis des Erregers bei geringgradigem Befall oder zu Krankheitsbeginn ein.

11. Differentialdiagnosen

Aphanomyces spp. und andere Oomyceten

Zahlreiche Autoren berichten von saprophytischen *Aphanomyces* spp. als Wundparasiten bei Fischen (SHANOR & SASLOW, 1944; SRIVASTAVA, 1979; OGBONNA & ALABI, 1991), bei Weichschildkröten (VALAIRATANA & WILLOUGHBY, 1994) und Süßwasserdelphinen (FOWLES, 1976). Häufig sind saprophytische *Aphanomyces* spp. auch beim EUS beteiligt und wachsen auf der Oberfläche der Läsionen (ROBERTS et al., 1993; BLAZER et al., 1999; CHINABUT & ROBERTS, 1999). Bei keiner der oben aufgeführten *Aphanomyces* spp. erfolgte eine Speziesbestimmung. Wenn

keine sexuellen Vermehrungsstrukturen, die fundamental für die Identifizierung von Peronosporomyceten sind (DICK, 1995), von einer isolierten *Aphanomyces* sp. induziert werden können, erfolgt bei Verdacht auf *Aphanomyces invadans* die Unterscheidung anhand des Temperatur-Wachstumsprofils, anhand der Unfähigkeit von *Aphanomyces invadans*, auf bestimmten Nährmedien zu wachsen oder mittels Tierversuch und der Erfüllung der Kochschen Postulate (WILLOUGHBY et al., 1995; LILLEY & ROBERTS, 1997; HAWKE et al., 2003). Dass neben *Aphanomyces invadans* auch andere Vertreter der Gattung *Aphanomyces* bei Fischen zu Erkrankungen führen können, zeigt ein Bericht von MONDAL & DE (2001) über eine Infektion bei Gemeinen Hechtlingen (*Aplocheilus panchax*) mit *Aphanomyces laevis*. Die Infektion führte bei allen befallenen Fischen zum Tod. Der Erreger zeigte ein baumwollartiges Aussehen auf der Haut und auf den Flossen. Die Hyphen drangen tief ins Gewebe ein und breiteten sich in der Muskulatur aus. Von einer für das EUS charakteristischen granulomatösen Entzündung wurde dabei nicht berichtet.

Weitere Vertreter der Oomyceten sind dafür bekannt, durch mechanische Traumata oder durch pathogene Organismen verursachte Hautwunden zu besiedeln (PICKERING & WILLOUGHBY, 1982) und überwachsen auch regelmäßig EUS-Läsionen, was in der Vergangenheit zu Verwirrung bezüglich der Bestimmung des ursächlichen Infektionserregers führte (BLAZER et al., 1999; CHINABUT & ROBERTS, 1999). Es handelt sich hierbei vor allem um Vertreter der Gattungen *Achlya*, *Dictyuchus*, *Saprolegnia* und *Pythium* (CALLINAN et al., 1989; OGBONNA & ALABI, 1991; BLAZER et al., 1999; CHINABUT & ROBERTS, 1999). Im Gegensatz zu *Aphanomyces invadans* sind diese durch watteartige Beläge, die makroskopisch deutlich auf der Oberfläche von befallenen Fischen zu sehen sind, gekennzeichnet (NOGA & DYKSTRA, 1986). Sie führen zu oberflächlichen Infektionen, bei denen die Hyphen selten durch die Dermis in die darunterliegende Muskulatur vordringen (PICKERING & WILLOUGHBY, 1982) und sich nicht über die oberflächlichen Schichten der Muskulatur hinaus ausbreiten (NOGA

et al., 1996). LILLEY & ROBERTS (1997) konnten im Rahmen von Infektionsversuchen mit gegenüber dem EUS hochgradig empfänglichen Schlangenkopffischen (*Channa striata*) ausschließen, dass diese opportunistischen Oomyceten zu einer EUS-typischen granulomatösen und nekrotisierenden Myositis führen.

Laut ROBERTS et al. (1993) zeigt *Aphanomyces invadans* in Laborkultur für gewöhnlich schmale und näher beieinander liegende Hyphen. Bei der Untersuchung von Nativpräparaten von aus EUS-Ulzera gewonnenem Mycel sind sehr breite, unseptierte Hyphen von *Aphanomyces invadans* zu sehen, die zunächst auf *Saprolegnia* spp. oder *Achlya* spp. hindeuten und nicht von diesen zu unterscheiden sind.

Bakterielle, virale, pilzbedingte und parasitäre Infektionskrankheiten

Ulzerative Hautläsionen sind ein Charakteristikum des EUS, aber auch bei zahlreichen bakteriellen, pilzbedingten und viralen Infektionen (DYKSTRA & KANE, 2000). Weiterhin ist von einer Vielzahl protozoischer, metazoischer und sogar vertebrater Parasiten bekannt, dass sie Hautulzerationen bei Fischen verursachen (NOGA et al., 1988; ROBERTS & SCHLOTFELD, 1989).

Im Allgemeinen verlaufen durch gram-positive Bakterien bedingte Infektionen chronisch, induzieren Granulome und haben einen Tropismus für Phagozyten (MUNRO, 1982). Besonders sind säurefeste Stäbchen, vor allem Mykobakterien, hervorzuheben, die zur Bildung von Epitheloid-zellgranulomen führen (TIMUR & ROBERTS, 1977; NOGA et al., 1989). Bei der Mykobakteriose können kleine hämorrhagische Hautläsionen auftreten, die den frühen Stadien des EUS ähneln. Histopathologisch lassen sich im Zentrum der Granulome säurefeste Stäbchen nachweisen, im Gegensatz zu den granulomatösen Strukturen des EUS (CHINABUT & ROBERTS, 1999).

Ichthyophonus hoferi ist ein Erreger, der hauptsächlich bei marinen Fischen vorkommt, jedoch auch bei Süßwasserfischen, die mit Seewasserfisch enthaltendem Futter gefüttert wurden, auftritt. Er findet sich im gesamten Körper einschließlich der Muskulatur, die stark befallen sein kann. Eine akute Infektion führt zu Degeneration und Nekrose der Skelettmuskulatur. Histopathologisch zeigt sich eine granulomatöse Reaktion, vor allem gegen die Sporen, anhand derer eine Diagnose erfolgen kann. Diese keimen nach dem Tod des Wirts aus und bilden sich verzweigende hyphenartige Strukturen (MCVICAR, 1982). Für *Ichthyophonus hoferi* charakteristisch ist ein dicht gepackter Sporeninhalt und ein klarer kapsulärer Zwischenraum zum Wirtsgewebe, wodurch der Erreger sich von *Aphanomyces invadans* unterscheiden lässt (CHINABUT & ROBERTS, 1999).
Myxosporidien- und Microsporidienzysten zahlreicher Spezies können in der Skelettmuskulatur auftreten und von einer granulomatösen Wirtsreaktion umgeben sein. Diese granulomatöse Reaktion kann zwar dem histopathologischen Bild des EUS ähneln, jedoch von diesem durch die unterschiedlich großen Zysten und die darin eingeschlossenen charakteristischen sporenhaltigen Plasmodien unterschieden werden (CHINABUT & ROBERTS, 1999).

12. Bekämpfung und Prävention

Da sich der Erreger bei erkrankten Tieren geschützt in der Muskulatur des Wirtes befindet, entzieht er sich der Wirkung von im Wasser befindlichen Therapeutika (LILLEY & INGLIS, 1997). Ein systemisch wirksames Medikament steht derzeit nicht zur Verfügung, somit liegt die einzige Möglichkeit in der Verhinderung einer Infektion.

Zur Bekämpfung der infektiösen Stadien wurden zahlreiche Substanzen in ihrer Wirksamkeit untersucht. LILLEY & INGLIS (1997) verglichen *in vitro*

verschiedene Fungizide und Desinfektionsmittel in ihrer Wirkung auf die Hyphen von *Aphanomyces invadans* und anderen Oomyceten. *Aphanomyces invadans* und *Aphanomyces astaci*, der Erreger der Krebspest, zeigten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Substanzen als die übrigen Oomyceten. Wasserstoffperoxid und das Desinfektionsmittel Proxitan 0510, eine Lösung von Peressigsäure und Wasserstoffperoxid, (Solvays Interox Ltd, Widnes, UK) zeigten dabei Potential, für Desinfektionsmaßnahmen und eine Bekämpfung des Erregers in der Aquakultur Verwendung zu finden. Wasserstoffperoxid führte bei einer Konzentration von 500 ppm (parts per million) in einer einstündigen Anwendung zu einer Abtötung von *Aphanomyces invadans*. Proxitan 0510 zeigte nach einer zwanzigminütigen Anwendung bei einer Konzentration von 100 ppm Peressigsäure diese Wirkung. Ob die Dosierungen der Substanzen fischverträglichen Konzentrationen entsprechen, wurde nicht erwähnt. Malachitgrün schnitt in den Untersuchungen am besten ab und war bei einer fischverträglichen Dosierung von 0,08 ppm nach mindestens einstündiger Anwendung bei 20 °C gegen Zoosporenzysten wirksam. Die Substanz hat jedoch karzinogene und teratogene Wirkungen (MEYER & JORGENSON, 1983) und ist laut der Verordnung 2377/90 (EWG) in der EU und Deutschland zur Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren nicht erlaubt. Bei Untersuchungen über die Wirkung von Cycloheximid zeigte sich, dass *in vitro* mit einer Konzentration von 0,4 ppm eine Hemmung des Wachstums und mit 10 ppm eine Abtötung des Mycels erzielt werden konnte (HATAI & EGUSA, 1978).

CAMPBELL et al. (2001) testeten ebenfalls *in vitro* zahlreiche Substanzen auf ihre fungizide Wirkung gegen Hyphen sowie auf die Hemmung von Zoosporenproduktion und -motilität von *Aphanomyces invadans*. Darunter befanden sich Stoffe mit erwiesener Wirkung gegen Oomyceten, Stoffe, von denen bekannt ist, dass sie bei EUS-Ausbrüchen angewendet werden, kommerzielle Fungizide, natürliche Substanzen mit potentieller antimikrobieller Wirkung sowie oberflächenaktive Substanzen. Am effektivsten erwies sich wiederum Malachitgrün, welches in einer

fischverträglichen Dosierung von 0,05 ppm gegen Zoosporen wirksam war. Ähnlich verhielt es sich mit Formalin, das zwar auf die Hyphen erst bei für Fische toxischen Konzentrationen wirkte, gegen Zoosporen waren aber bereits Dosierungen wirksam, die im Rahmen dessen liegen, was in der Therapie bei Fischen angewendet wird. Folgende der oberflächenaktiven Substanzen waren, teilweise in Kombination mit natürlichen Stoffen, wirksam gegen Zoosporen und zogen bei Toxizitätstests an Silberbarben (*Puntius gonionotus*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) bei den unten angegebenen Konzentrationen weder Mortalitäten noch Verhaltensänderungen nach sich: coconut diethanolamid in einer Konzentration von 2,5 ppm (Ellis & Everard, Middlesbrough, UK), 0,5 ppm 13/6.5 (ein Alkohol-Ethoxylat; Ellis & Everard) in Kombination mit 1,25 ppm Propolis und 0,01 ppm OP10 (ein Alkyl-Phenol-Ethoxylat; Ellis & Everard) in Kombination mit 5 ppm neem-seed-Extrakt (Samen von *Azadirachta siamensis*).

Die Verwendung der aufgelisteten Substanzen in fischbesetzten Gewässern muss jedoch insgesamt als problematisch betrachtet werden, da einerseits ihre Toxizität gegenüber dem Wirt und anderen Lebewesen und andererseits ihre Wirksamkeit durch verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Wasserhärte und dem Gehalt an organischen Stoffen beeinflusst werden kann (ALDERMAN & POLGLASE, 1984; LILLEY & INGLIS, 1997).

MILES et al. (2001) testeten eine Reihe von Immunstimulantien in ihrer Wirkung auf EUS-erkrankte Schlangenkopffische (*Channa striata*). Salar-bec, ein Vitaminkomplex, führte zu einer Verbesserung der Hemmung von Auskeimung und Wachstum von *Aphanomyces invadans*-Zysten durch Serum und Makrophagen. Salar-bec enthaltendes Futter wurde an mit *Aphanomyces invadans* infizierte Schlangenkopffische verabreicht. Die Inzidenz war gleich hoch wie bei der Kontrollgruppe, die normales Futter erhielt, es zeigte sich aber eine um 59,2 % höhere Überlebensrate.

Histologisch konnten Hyphen später, granulomatöse Strukturen früher als bei der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Betriebsmanagment

Es ist wenig darüber bekannt, wie der Erreger zwischen den Ausbrüchen überlebt. Vermutet wird, dass er mit niedriger Prävalenz in empfänglichen Fischarten, im Gewässer als enzystierte Spore oder auf Nicht-Fisch-Substrat persistiert. Daher wird bei einem Ausbruch empfohlen, sämtliche Fische aus dem Teich, den Wasserreservoirs und den Zulauf-Kanälen zu entfernen, die Gewässer trockenzulegen und Branntkalk (CaO) einzubringen sowie alle Gerätschaften zu desinfizieren (LILLEY et al., 1998). Die Zucht- oder Besatzfische bei einem Neubesatz müssen EUS-frei sein, die Teiche müssen vor dem Besatz fischfrei sein und Wildfischen als potentieller Ansteckungsquelle muß der Zugang verwehrt werden. Um ein Einschleppen des Erregers über den Wasserzulauf zu verhindern, muss das zulaufende Wasser EUS-freien Ursprungs sein. Der Gesundheitsstatus der Fische und die Wasserparameter müssen in regelmäßigen Abständen überwacht werden (LILLEY, 2001b). Eine weitere Möglichkeit ist die Entscheidung für gegenüber dem EUS unempfängliche Fischarten wie Tilapien, Karpfen oder Milchfische (AHMED & RAB, 1995; LILLEY et al., 1998).

13. Wirtschaftliche Bedeutung

Damit eine Erkrankung bei der OIE gelistet wird, muss sie bestimmte Kriterien erfüllen. Dazu gehören vor allem durch Krankheitsausbrüche bedingte Produktionsausfälle in der Aquakultur oder Ausfälle bei Wildfischen mit einer nationalen oder multinationalen Bedeutung (OIE, 2005). Dies trifft beim EUS zu, welches in der Vergangenheit zu Verlusten in der Aquakultur und bei Wildfischpopulationen im pazifisch asiatischen Raum (ACIAR, 1998, LILLEY

et al., 2001b) und im Osten der Vereinigten Staaten (DYKSTRA et al., 1989; HAWKE et al., 2003) führte.

In manchen Fällen können die Auswirkungen des EUS nicht anhand von Mortalitäten gemessen werden. Es tritt nicht immer saisonal und mit hohen Mortalitäten verbunden auf, sondern auch ganzjährig prävalent auf niedrigem Niveau. Im Allgemeinen wirkt es sich mehr auf extensive Bewirtschaftungssysteme und Wildfische als auf kontrollierte, intensive Fischzuchten aus und trifft damit vor allem Familien, die vom Fischfang und der Fischzucht abhängig sind. Das EUS scheint in den meisten betroffenen Gebieten nicht die Mortalitäten in der Ausprägung vorangegangener Ausbrüche zu verursachen. Es ist eher der Fall, dass der wirtschaftliche Verlust, der durch eine niedrigere Produktivität bedingt ist, von größerer Signifikanz ist als der durch direkte Fischsterben verursachte Verlust (LILLEY et al., 2002).

Die Ausbrüche in den Jahren 1982 und 1983 in Thailand verursachten Verluste in Höhe von 8,7 Millionen US$. Die Nachfrage nach Fisch sank drastisch wegen der Furcht der Bevölkerung vor einer Ansteckung (TONGUTHAI, 1985). Eine Erhebung von Daten bei Fischzüchtern in Bangladesh im Jahr 2002 ergab, dass das EUS, welches dort erstmals 1988 auftrat (KHAN & LILLEY, 2002) immer noch die den höchsten Schaden verursachende Erkrankung bei Süßwasserfischen war. Der Schaden, den der Ausbruch von 1998 und 1999 anrichtete, betrug geschätzte 3,97 Millionen US$. 86 % der Bauern und 89 % der Fischer betrachteten das EUS als großes Problem, es lagen jedoch keine Daten zu Mortalitäten vor (KHAN & LILLEY, 2002). Menhaden-Heringe (*Brevoortia tyrannus*), die am häufigsten vom EUS betroffene Fischart an der Ostküste der USA (DYKSTRA & KANE, 2000), sind von großer Bedeutung für die 27 Millionen US$-Fischereiindustrie von North Carolina (DYKSTRA et al., 1986; DYKSTRA et al., 1989). Beim Ausbruch der Erkrankung im Jahr 1984 waren 80 % der Menhaden-Heringe, die im Pamlico River Estuary von North Carolina gefangen worden waren,

befallen (DYKSTRA et al., 1986). Die Ausbrüche in den Achtziger Jahren hatten eine signifikante Auswirkung auf die Produktivität der Fischerei in den Mündungsgebieten an der Atlantikküste der USA (NOGA et al., 1988).

Das EUS hat in Australien immer noch eine große Bedeutung bei Wildfischen aus den Ästuarien und bei gefarmten Australischen Silberbarschen (*Bidyanus bidyanus*) in New South Wales, Queensland und dem Northern Territory. Bei den gefarmten Silberbarschen trat die Erkrankung beinahe jährlich auf bei einer Prävalenz von 20 bis 90 % (CALLINAN, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al. (2002)). Konservative Schätzungen der durch das EUS verursachten erwarteten finanziellen Verluste in Australien, den Philippinen und Indonesien bis zum Jahr 2027 liegen bei 63 Millionen US$ (ACIAR, 1998)

III. Material und Methoden

1. Material

1.1. Versuchstiere

Blauer Fadenfisch (*Trichogaster trichopterus*)

Die 48 gesunden Blauen Fadenfische stammten von einem Großhändler für Zierfische. Es handelte sich um noch nicht ausgewachsene ca. 6 Monate alte Tiere unbekannten Geschlechts mit einer Körperlänge von 5,7 bis 7,3 cm und einem Gewicht von 2,8 bis 6,7 g. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn in einem 200 Liter-Aquarium mit Kunststoffpflanzen, Filterung und einer Beheizung bei ca. 26 °C im Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten gehältert. Die Tiere wurden vor und während dem Versuch täglich mit handelsüblichen Zierfischflocken gefüttert, das Wasser wurde alle 2 - 3 Tage zu 50 % gewechselt. Die Tiere wurden vor dem Einsetzen in die Versuchsbecken klinisch untersucht, insbesondere auf Ektoparasitenbefall. In der Zeit bis Versuchsbeginn waren die Tiere klinisch gesund und zeigten keine Auffälligkeiten.

Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Die 48 gesunden Regenbogenforellen stammten aus der institutseigenen spezifisch pathogenfreien (SPF) Zucht. Die Tiere waren ca. 4 Monate alt, unbekannten Geschlechts, mit einer Körperlänge von 7,6 bis 12,2 cm und einem Gewicht von 5,1 bis 17,8 g. Die Tiere wurden vor und während dem Versuch täglich mit Forellenpellets gefüttert. In der Zeit bis Versuchsbeginn zeigten die Tiere keine Auffälligkeiten.

Europäischer Wels (*Silurus glanis*)

Die 48 gesunden Welse stammten aus einer Fischzucht in Süddeutschland. Die Tiere waren ca. 6 Monate alt, unbekannten Geschlechts, mit einer Körperlänge von 7,7 bis 14 cm und einem Gewicht von 5,2 bis 18,7 g. Die Tiere wurden bis Versuchsbeginn in zwei 200 Liter-Aquarien mit Versteckmöglichkeiten, Sauerstoffversorgung, Filterung und Beheizung bei 24 °C gehalten. Die Tiere wurden bis Versuchsende alle 2 Tage mit zerstückelten Futterfischen und nach Angewöhnung mit Forellenpellets gefüttert, das Wasser wurde alle 2 - 3 Tage zu 50 % gewechselt. In der Zeit bis Versuchsbeginn zeigten die Tiere keine Auffälligkeiten.

Europäischer Aal (*Anguilla anguilla*)

Die 48 gesunden Satzaale stammten aus derselben Fischzucht wie die Welse. Die Tiere waren unbekannten Geschlechts, mit einer Körperlänge von 9,5 bis 16 cm und einem Gewicht von 1,8 bis 8,3 g. Die Tiere wurden bis Versuchsbeginn in einem 200 Liter-Aquarium mit Versteckmöglichkeiten, Sauerstoffversorgung, Filterung und Beheizung bei 24 °C gehalten. Die Tiere wurden bis Versuchsende alle 2 Tage mit zerstückelten Futterfischen und gefrosteten Mückenlarven gefüttert, das Wasser wurde alle 2 - 3 Tage zu 50 % gewechselt.

1.2. Tierversuchsantrag

Die durchgeführten Versuche dieses Versuchsvorhabens wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 209.1/211-2531-96/02 nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

1.3. Oomycetenstämme und andere Organismen

Für die Untersuchungen zur Spezifität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurde die DNA von sieben verschiedenen *Aphanomyces invadans*-Stämmen eingesetzt. Das Isolat NJM 9701 diente weiterhin als Referenzstamm für die PCRs und wurde für die Infektionsversuche verwendet.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der verwendeten Primer wurde die DNA von nahe verwandten Oomyceten und verschiedenen Organismen aus der Umwelt des Wirtes, insbesondere der Oberfläche von Hautulzerationen, benötigt. Diese sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung und Beschreibung der *Aphanomyces invadans*-Stämme und der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung untersuchten Organismen

Spezies	**Identif.-Nr./ -Kürzel**	**Herkunft**	**Natürliches Vorkommen**
Aphanomyces invadans			
Aphanomyces invadans	NJM 9701	Shiga Präfektur, Japan (1997)	Parasit bei Fischen
Aphanomyces invadans	PA7	Thailand (1995)	Parasit bei Fischen
Aphanomyces invadans	PA8	Thailand (1995)	Parasit bei Fischen
Aphanomyces invadans	WIC	West Virginia (1999)	Parasit bei Fischen
Aphanomyces invadans	UM3	Maryland	Parasit bei Fischen
Aphanomyces invadans	B99C	Bangladesh	Parasit bei Fischen

Aphanomyces invadans	T99G2	Thailand	Parasit bei Fischen
Andere *Aphanomyces* spp.			
Aphanomyces astaci	S_v	Schweden (1970) Edelkrebs	Parasit bei Flußkrebsen
Aphanomyces astaci	D_1	Deutschland (1996) Edelkrebs	Parasit bei Flußkrebsen
Aphanomyces astaci	K_v	Schweden (1978) Edelkrebs	Parasit bei Flußkrebsen
Aphanomyces astaci	P_c	Spanien (1992)	Parasit bei Flußkrebsen
Aphanomyces brassicae	CBS 121.80	keine Angabe	aus *Brassica* sp.
Aphanomyces cladogamus	CBS 108.29	keine Angabe	pflanzenpathogen
Aphanomyces cochlioides	CBS 477.71	keine Angabe	Aus *Beta vulgaris*
Aphanomyces euteiches	keine Angabe	keine Angabe	pflanzenpathogen
Aphanomyces helicoides	CBS 210.82	keine Angabe	Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
Aphanomyces iridis	CBS 524.87	keine Angabe	aus der Blatt-scheide von *Iris hollandica*
Aphanomyces irregulare	CBS 278.81	keine Angabe	Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
Aphanomyces laevis	CBS 107.52	keine Angabe	Saprophyt, Wundparasit aquatischer Tiere
Andere Oomycoten			

Achlya racemosa	CBS 578.67	keine Angabe	Saprophyt, in Wasser und Erde vorkommend, Wundparasit
Pythium flevoense, weiblich	CBS 232.72	aus *Daphnia* sp., Niederlande	Saprophyt in Wasser und Erde, pflanzenpathogen
Saprolegnia diclina	keine Angabe	Schweden	Saprophyt, in Erde und Schlamm
Saprolegnia ferax	ATCC 26116	keine Angabe	Saprophyt, in Erde und Schlamm
Saprolegnia furcata	keine Angabe	keine Angabe	Saprophyt, in Erde und Schlamm
Saprolegnia litoralis	keine Angabe	Schweden	Saprophyt in Wasser und Schlamm
Saprolegnia parasitica	CBS 540.67	England	Saprophyt, Parasit bei Fischen
Saprolegnia terrestris	UK 2102	keine Angabe	Saprophyt, in Erde und Schlamm
Andere Pilze (nicht-Oomyceten)			
Aspergillus sp.	keine Angabe	Deutschland (1998)	Saprophyt
Fusarium solani	keine Angabe	unbekannt	Parasit bei Fischen, in der Erde vorkommend
Candida albicans	keine Angabe	Deutschland (1998)	sekundär, v. a. in Geschwüren bei Säugern vorkommend
Ektoparasiten			

Chilodonella sp.	keine Angabe	Hautabstriche von Koikarpfen, Deutschland (2004)	Ektoparasit bei Fischen
Ichthyobodo necator	keine Angabe	Hautabstriche von Koikarpfen, Deutschland (2004)	Ektoparasit bei Fischen
Ichthyophthirius multifiliis	keine Angabe	Hautabstriche von Koikarpfen, Deutschland (2004)	Ektoparasit bei Fischen
Trichodina sp.	keine Angabe	Hautabstriche von Koikarpfen, Deutschland (2004)	Ektoparasit bei Fischen
Bakterien			
Aeromonas hydrophila	04045	England	fakultativ pathogener Erreger, ubiqitär im Süßwasser
Aeromonas salmonicida salmonicida	04107	England	pathogener Erreger bei Fischen
Citrobacter freundii	keine Angabe	Deutschland (2004)	Fische, ubiqitär im Süßwasser
Edwardsiella tarda	keine Angabe	Staatliches Untersu-chungsamt Aulendorf	pathogener Erreger, v.a. bei Welsen
Escherichia coli	DSM 1103	keine Angabe	Fäkalkeim, sekundär bei Fischen
Flavobacterium psychrophilum	keine Angabe	Staatliches Untersu-chungsamt Aulendorf	pathogener Erreger, v.a. Salmoniden

Listonella anguillarum	97007	England	pathogener Erreger in Süß- und Meerwasser
Mycobacterium fortuitum	keine Angabe	Nationales vet.med. Referenzlabor für Tuberkulose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena	pathogener Erreger, v.a. Süßwasserfische
Mycobacterium marinum	keine Angabe	Nationales vet.med. Referenzlabor für Tuberkulose, Friedrich-Löffler-Institut, Jena	pathogener Erreger, v.a. marine Fische
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1117	keine Angabe	pathogener Erreger, von Fischen bis zu Säugetieren
Staphylococcus aureus	DSM 2569	keine Angabe	fakultativ pathogener Erreger

1.4. Infektion der Fische mittels Zoosporensuspension

Betäubungsmittel:
MS-222 (Tricain-Methan-Sulfonat,Thomson & Joseph Limited, Norwich, UK)

Injektion:
1 ml Tuberkulinspritzen (Braun, Melsungen)
Kanülen, 26G (Henke, Sasse, Wolf GmbH, Tuttlingen)

1.5. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

DNA-Extraktion:
QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
Ethanol ≥ 99,9% (Rotisol®, Roth, Karlsruhe)

PCR:
ReddyMix PCR Mastermix (Conc: 2x) (ABgene, Surrey, UK)
Primer (Metabion, Martinsried)
Aqua injectabile (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg)

Gelelektrophorese:
Agarose (StandardLow-MR 100, NEEO Ultra Qualität)(Roth, Karlsruhe)
100 bp DNA ladder (Biozym, Hess. Oldendorf)
6x Gel loading buffer (Roth, Karlsruhe)
50x TAE Elektrophorese-Puffer:
- Trisma® Base Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- EDTA Molecular Biology Reagent (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Acetic Acid Glacial (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ethidiumbromid (10 mg/ml) (BioRad, Hercules, CA)

Sequenzierung:
QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Automatische Sequenzierung (GENterprise, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie GmbH, Mainz)

1.6. Geräte

BioPhotometer 6131 (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg)
Elektrophorese-Kammern, 3 verschiedene Größen (Sub-cell GT) (BioRad, Hercules, CA)

Hochgeschwindigkeitszentrifuge, Typ Biofuge Stratos (Heraeus Instruments GmbH, Osterode)

Mikroskop Olympus BH2-RFCA (Olympus Optical Co. Ltd, Japan)

Photosystem, Bioprint DS Fotodokumentations-System zur Bildspeicherung (Ltf-Labortechnik GmbH & Co. KG, 8176) mit Software (Bio-Capt, Version 1997)

Präzisionswaage, Sartorius Basic^{plus} (Sartorius AG, BP 410s-OCE, Göttingen)

Software zur DNA-Analyse (Lasergene for Windows, DNASTAR, Inc., Version)

Variable Mikroliter-Pipetten: 0,5-10, 2-20, 10-100, 100-1000 µl (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg)

1.7. Rezepturen

1.7.1. Puffer

TAE-(Tris-Acetat-EDTA-)-Puffer

TAE-Puffer 50x:

Tris Base	242 g
Essigsäure 100%	57,1 ml
EDTA	37,2 g
Aqua dest. autoklaviert	ad 1 l

TAE-Gebrauchslösung 1x:

TAE 50x	20 ml
Aqua dest.	980 ml

1.7.2. Anzuchtmedien

GP(Glucose-Pepton)-Medium (OIE, 2003)

3 g/l	D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
1 g/l	Pepton (Oxoid, Hampshire, England)
0,128 g/l	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Darmstadt)
0,014 g/l	KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
0,029 g/l	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck, Darmstadt)
2,4 mg/l	$FeCl_3 \cdot 2H_2O$ (Merck, Darmstadt)
1,8 mg/l	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Merck, Darmstadt)
3,9 mg/l	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Merck, Darmstadt)
0,4 mg/l	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Darmstadt)

Bei 121°C für 15 Minuten autoklavieren.

GP-Agar:

Vor dem Autoklavieren werden zu 1 Liter GP-Medium 12 g/l Agar bacteriological (Oxoid, Hampshire, England) zugegeben.

Autoklavierte Hanfsamen (Davert GmbH, Senden):

Die Hanfsamen wurden von ihrer Schale befreit und in Aqua dest. bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

V8-Medium:

5 % V8® 100% Vegetable Juice (Campbell Grocery Products Ltd., Norfolk, England)

0,2 % Calciumcarbonat (AppliChem, Darmstadt)

Autoklaviertes Flußwasser:

Für 1 Liter wurden 1 Teil Flusswasser* aus dem Eisbach, Englischer Garten in München mit 2 Teilen Aqua dest. gemischt und 0,05 g Calciumcarbonat

(AppliChem, Darmstadt) zugegeben. Anschließend wurde es bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

*: pH: 8,6; LF: 238 µS/cm; NH_4: < 0,022 mg/l; NO_3: <0,50 mg/l; PO_4: 0,019 mg/l; Ca: 40,3 mg/l; Mg: 10,8 mg/l.

1.8. Oligonukleotid-Primer

Tabelle 2: Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer zum Nachweis von *Aphanomyces invadans*

Name		**DNA-Sequenz (5' – 3')**	**Referenz**
BO 73	F	CTTGTGCTGAGCTCACACTC	OIDTMANN, unveröffentlicht
BO 487	F	TGTGTTGATATTACACGACT	OIDTMANN, unveröffentlicht
BO 639	R	ACACCAGATTACACTATCTC	OIDTMANN, unveröffentlicht

Tabelle 3: Darstellung der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung als Positivkontrolle dienenden Primer

Name		**DNA-Sequenz (5' – 3')**	**Referenz**
Primer zum Nachweis von *Aphanomyces astaci*			
BO 525	F	AAGAAGGCTAAATTGCGGTA	OIDTMANN et al., 2004
BO 640	R	CTATCCGACTCCGCATTCTG	OIDTMANN et al., 2004
Primer zum Nachweis von anderen Oomyceten und Pilzen			
ITS1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	WHITE et al.,

			1990
ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	WHITE et al., 1990
Primer zum Nachweis von Bakterien			
EUB f933	F	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	JI et al., 2004
EUB r1387	R	GCCCGGGAACGTATTCACCG	JI et al., 2004
Primer zum Nachweis von Ektoparasiten			
NS 1	F	GTAGTCATATGCTTGTCTC	DAMS et al., 1988
NS 2	R	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	DAMS et al., 1988
Primer zum Nachweis von Wirts-DNA			
ChordVf	F	ACAYACCGCCCGTCAC	JARMAN et al., 2004
ChordVr	R	CATRATGCAAAAGGTA	JARMAN et al., 2004

2. Methoden

2.1. Gewinnung und Auszählung der Sporen

Zur Ermittlung der Sensitivität der PCR sowie zur Infektion der Versuchstiere wurden Zoosporen benötigt, die vom *Aphanomyces invadans*-Referenzstamm NJM 9701 gewonnen wurden. Die Reinkultur wurde auf GP-Agarplatten bei 20 °C subkultiviert. Die Gewinnung von Zoosporen erfolgte nach der Methode von MARSHALL (1998), mit der sich hohe Sporenkonzentrationen pro ml Sporensuspension ergeben. Dabei wurden auf eine mit *Aphanomyces invadans* bewachsene GP-Agarplatte autoklavierte Hanfsamen aufgelegt. Sobald diese mit Mycel überwachsen waren, wurden sie in V8-Medium verbracht und wuchsen dort dreidimensional auf den

Hanfsamen an. Nach 3 Tagen wurden die bewachsenen Hanfsamen nach gründlichem Auswaschen des V8-Mediums in 2 ml-Eppendorf-Gefäße mit autoklaviertem Flusswasser überführt und dort für 24 Stunden bei 20 °C belassen. Anschließend wurden die mycelbewachsenen Hanfsamen entfernt und es erfolgte die Ermittlung der Sporendichte pro ml Filtrat mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurden 3 Stichproben der Sporensuspension in den 18 Quadraten der Kammer ausgezählt und die Sporendichte pro ml Filtrat durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{\text{ausgezählte Sporen} \times 10 \times 1000}{18}$$

Das Volumen eines der ausgezählten Quadrate beträgt 1mm (Kantenlänge) x 1 mm (Kantenlänge) x 0,1 mm (Tiefe) = 0,1 mm³. Die Faktoren x 10 und x 1000 dienen dabei der Umrechnung von 0,1 mm³ auf 1 mm³ (= 1 µl) und von diesem auf 1 cm³ (= 1 ml). Anschließend wurde die Sporendichte durch Zufügen von autoklaviertem Flusswasser auf die gewünschte Konzentration pro ml eingestellt.

2.2. Versuchsaufbau

Jede der 4 Fischarten wurde in 3 Versuchsgruppen und 1 Kontrollguppe aufgeteilt. Jede dieser Gruppen bestand aus 12 Tieren. Die Forellen wurden wegen des großen Temperaturunterschiedes vor (12 - 14 °C) und während dem Versuch (18 °C) 14 Tage, die anderen Fischarten 7 Tage vor der Zoosporeninjektion in die Versuchs- sowie die Kontrollgruppen aufgeteilt und in die vorbereiteten Aquarien eingesetzt. In dieser Zeitspanne wurde die Temperatur schrittweise auf die während des Infektionsversuchs festgelegte Temperatur angepasst. Die Versuchsgruppen wurden in 54 Liter-Becken eingesetzt, die mit Luftausströmern und handelsüblichen Stabheizern sowie mit Versteckmöglichkeiten bestückt worden waren. Die Forellen erhielten einen konstanten Frischwassertropfzulauf, der so eingestellt wurde, dass ca.

50 Liter Münchner Leitungswasser pro Tag zugeführt wurden, bei den übrigen Fischarten wurde 30 % des Aquarienwassers täglich durch temperiertes Münchner Leitungswasser ersetzt. Das gewechselte Wasser wurde durch Zugabe einer jodophoren Desinfektionslösung desinfiziert. Die Fütterung erfolgte in denselben Intervallen wie in der Phase vor dem Versuch. Die Wassertemperaturen betrugen 18 °C bei den Forellen und 23 °C bei den übrigen Fischarten.

2.2.1. Infektion durch Injektion einer Zoosporensuspension

Für die Injektion der Sporen wurden die Fische, die 24 Stunden vor der Injektion nicht mehr gefüttert wurden, in ein Narkosebad mit MS-222 überführt. Die Konzentration des Anästhetikums wurde, den einzelnen Fischspezies angepasst, unterschiedlich gewählt. Das Injektionsvolumen betrug bei den Welsen und Forellen 0,2 ml, bei den Fadenfischen und Aalen, bedingt durch die geringere Größe, nur 0,1 ml. Die *Aphanomyces invadans*-Sporensuspension wurde im linken Flankenbereich dorsal der Seitenlinie ventral des kranialen Beginns der Rückenflosse intramuskulär injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten die gleiche Menge an autoklaviertem Flusswasser injiziert. Zu definierten Intervallen nach Injektion (nach 24 Stunden, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21, 28, 35 Tagen) wurde je Versuchs- und Kontrollgruppe ein Fisch entnommen und in einem Narkosebad, das eine Überdosis MS-222 enthielt, eingeschläfert. Die Aale wurden nach Verweilen im Narkosebad dekapitiert. Dabei wurden bevorzugt Fische ausgesucht, die makroskopisch sichtbare Veränderungen zeigten. Während des Versuchs wurden die Tiere täglich auf EUS-typische Läsionen untersucht. Wurden dabei Fische beobachtet, welche so deutliche Läsionen aufwiesen, dass eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden diese auch außerhalb des Entnahmeplanes eingeschläfert und untersucht.

2.2.2. Probenentnahme

Die getöteten/verendeten Tiere wurden auf einer Digitalwaage gewogen und mit dem Lineal gemessen (Gewicht in g, Gesamtkörperlänge in cm). Die Tiere wurden auf makroskopische Veränderungen auf der Körperoberfläche, insbesondere EUS-typische Läsionen, untersucht und die Befunde protokolliert. Im Anschluß wurden mit einem sterilen Skalpell aus den veränderten Bereichen oder bei symptomlosen Tieren aus dem Injektionsbereich zuerst 2 - 4 mm große Blöcke für die molekularbiologische Untersuchung und darauffolgend Blöcke für die histologische Untersuchung entnommen.

2.3. DNA-Extraktion von *Aphanomyces invadans* aus Fischgewebe

Von den für die molekularbiologische Untersuchung entnommenen Gewebeblöcken wurden mit einem sterilen Skalpell 25 mg entnommen, grob zerkleinert und nach Anleitung des Herstellers in dem kommerziellen QIAamp® DNA Tissue Kit (Qiagen) weiter aufbereitet. Dabei wurde nach dem Gewebe-Protokoll nach Anweisung des Herstellers vorgegangen. Die DNA wurde in jeweils 100 µl Elutions-Puffer gelöst. Damit ist zwar die absolute Ausbeute an DNA, die man mit Hilfe der Extraktion gewinnen kann, geringer als bei einer Eluierung in 200 µl Elutionspuffer, die Konzentration pro µl Eluat aber höher.

2.4. Primer

Die für *Aphanomyces invadans* spezifischen Primer waren bereits vor Beginn der Arbeit festgelegt worden (OIDTMANN, unveröffentlicht). Diese wurden für die Entwicklung einer (Semi)-Nested PCR verwendet, dabei dienten die Primer BO 73 (forward primer) und BO 639 (reverse primer) als äußere

Primer für die 1. PCR, die Primer BO 487 (forward primer) und BO 639 (reverse primer) als innere Primer für die nachgeschaltete PCR. Für das Designen von Primern für die Amplifikation von *Aphanomyces invadans*-DNA wurden verschiedene Sequenzen, die von der NCBI Genbank bezogen wurden, und unveröffentlichte Sequenzen der ITS-Region der Oomycota aligned. Dazu wurde eine spezielle Software zur DNA-Analyse verwendet (Lasergene for Windows, DNASTAR, Inc., Version 1997) und nach manueller Überprüfung die oben aufgeführten Primer konstruiert.

2.5. PCR

Um eine möglichst hohe Spezifität und Sensitivität zu erreichen, kann die Nested PCR angewendet werden. Hierbei werden in einer zweiten PCR geschachtelte Primer (innere Primer), die innerhalb des zuerst mit den äußeren Primern amplifizierten PCR-Produkts liegen, eingesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PCR erfolgt als Semi-Nested PCR (halb-verschachtelte PCR), bei der ein Primer sowohl bei der äußeren als auch bei der inneren PCR verwendet wird. In die erste PCR mit den Primern BO 73 und BO 639 wurden 2,5 µl der vom Probenmaterial extrahierten DNA-Lösung eingesetzt, in die zweite (Semi)-Nested PCR mit den Primern BO 487 und BO 639 wurde 1 µl des PCR-Produktes der vorangegangenen PCR eingesetzt.

Um Kontaminationen weitgehend auszuschließen, waren die Arbeitsschritte DNA-Extraktion, PCR-Ansatz und Analyse der PCR-Produkte räumlich getrennt. Für jeden Arbeitsschritt wurden eigene Pipettensets verwendet. Zur Kontrolle von potentiellen Kontaminationen wurde sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten PCR eine Negativkontrolle, die alle Reagentien außer die zu untersuchende DNA-Probe enthält, mitgeführt. Die PCR erfolgte im Thermocycler unter standardisierten Bedingungen.

2.6. Optimierung des PCR-Protokolls

Zur Optimierung der Zusammensetzung der PCR-Ansätze und der Bedingungen im Thermocycler wurden unterschiedliche Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen verglichen und das beste Ergebnis mit der höchsten Effizienz ermittelt. Es wurde jeweils nur ein Parameter variiert. Die beiden Primerkombinationen wurden zeitlich parallel optimiert. Den PCR-Ansätzen wurden 2,5 µl einer definierten Stammlösung an *Aphanomyces invadans*-DNA (5 ng/µl) des Referenzstammes NJM9701 zugegeben.

2.6.1. Annealing-Temperatur

Bei der Austestung der optimalen Annealing-Temperatur orientiert man sich an den berechneten Schmelztemperaturen der Primer. Diese betrugen:

Primer:	BO 73	BO 487	BO 639
berechnete Schmelztemperatur T_m:	59,4 °C	51,1 °C	53,2 °C

Als Mittelwert wurde für die Kombination BO 73/BO 639 56 °C, für die Kombination BO 487/BO639 52 °C gewählt. Unter Verwendung des Gradientencyclers konnten unterschiedliche Temperaturen gleichzeitig im Thermocycler getestet werden. Zunächst wurden Temperaturen in Abständen von etwa 2-2,5 °C getestet (Groboptimierung), anschließend wurde die optimale Hybridisierungstemperatur enger eingegrenzt durch Abstände von etwa 1 °C (Feinoptimierung).

2.6.2. Primer-Konzentration

In einem Gesamt-PCR-Volumen von 50 µl wurden Primerendkonzentrationen von 0,05 bis 2 pmol/µl ausgetestet. Das Austesten verschiedener Primerkonzentrationen erfolgte sowohl mit reiner *Aphanomyces invadans*-DNA als auch mit sogenannten gespikten Proben, bei denen eine definierte Menge an Fisch-DNA (2,5 µl einer 5 ng/µl Lösung), die aus der Haut und Muskulatur von gesunden Blauen Fadenfischen (*Trichogaster trichopterus*) extrahiert wurde, dem PCR-Ansatz zugesetzt wurde.

2.7. Sensitivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der PCR zum Nachweis von *Aphanomyces invadans* wurde sowohl die DNA von Mycel von *Aphanomyces invadans*-Reinkulturen als auch von Zoosporen extrahiert und davon Verdünnungsreihen angelegt. Anschließend wurden daraus Aliquote (2,5 µl) in die (Semi)-Nested-PCR nach dem unter IV.2.3. aufgeführten optimierten Protokoll eingesetzt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit DNA aus Mycel von *Aphanomyces invadans*

Hierzu wurde DNA aus einer Reinkultur des *Aphanomyces invadans*-Referenzstammes NJM 9701 gewonnen. Unter photometrischer Messung wurde eine Stammlösung von 10 ng/µl hergestellt und diese im Anschluß in Zehnerschritten verdünnt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit DNA aus Zoosporen

Die von Oomyceten freigesetzten Zoosporen stellen einzellige Fortpflanzungsformen dar. Eine Spore entspricht somit einer genomischen Einheit. Die benötigten Zoosporen wurden wie unter III.2.1. beschrieben gewonnen, ausgezählt und 10.000 Zoosporen in die DNA-Extraktion eingesetzt. Das gewonnene Eluat wurde im Anschluß in Zehnerschritten verdünnt.

Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR mit gespikten Proben

Nach Herstellen einer Stammlösung mit 10.000 Zoosporen wurde diese in Zehnerschritten bis auf theoretisch 1 Spore verdünnt. Für die sogenannten gespikten Proben wurden zu jeweils 25 mg Muskulatur von nicht infizierten Fadenfischen die durch die Verdünnungsreihe gewonnenen Zoosporenmengen von 10.000, 1.000, 100, 10 und 1 Spore hinzugegeben und die Probe in die DNA-Extraktion eingesetzt.

2.8. Spezifitätsbestimmung

Die DNA der in **Tabelle 1** angegebenen Organismen wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit nach dem Gewebe-Protokoll extrahiert. Dabei wurden bei den Pilz- und Bakterienstämmen Reinkulturen verwendet, bei den ektoparasitischen Protozoen wurde die Erreger-DNA aus Schleimhautabstrichen der Haut und Kiemen von erkrankten Koikarpfen extrahiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Mischinfektionen verschiedener Ektoparasiten vorlagen. Hierbei wurden technisch bedingt auch immer Wirtszellen mit eingesetzt. Weiterhin wurde die Spezifität der Primer gegenüber Fisch-DNA getestet. Dabei wurden Haut und Muskulatur verschiedener Fischarten in die DNA-Extraktion und anschließend in die Semi-Nested PCR mit den Primern BO 73/BO 639 und BO 487/BO 639 eingesetzt.

2.9. Agarosegelelektrophorese

Im Anschluß an die PCR erfolgte die Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese, mit Hilfe derer sich DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel auftrennen lassen. Die Analyse der entstandenen PCR-Amplifikate erfolgte in einem 1,3 %igen Agarosegel, das in die Elektrophorese-Kammer eingelegt wurde. Es wurde jeweils 7,5 µl der PCR-Ansätze in die Gelkavitäten pipettiert. Als Größenstandard dienten 15µl einer 100 bp-DNA-Leiter, die alle 100 bp eine Markierung von ca. 20 ng ergab. Eine Spannung von 5 V/cm Gellänge wurde für 30 - 60 Minuten angelegt. Danach wurden die PCR-Produkte mit UV-Durchlicht (312 nm) in einer UV-Kammer sichtbar gemacht, mit einer digitalen Fotoeinrichtung fotografiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert.

2.10. Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die automatische Sequenzierung (GENterprise) der ITS-Region des *Aphanomyces invadans*-Stammes NJM 9701 musste das PCR-Produkt, welches durch die Amplifikation der ITS-Region mit den Primern ITS1 und ITS4 generiert wurde, aufgereinigt werden. Dazu wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die zu sequenzierende Probe wurde in beide Richtungen, jeweils mit dem Primer ITS1 und mit dem Primer ITS4, ausgewertet.

2.11. Histologische Untersuchungen

Anfertigen der Schnitte

Die aus dem Injektionsbereich entnommenen Haut- und Muskelproben wurden für mindestens 24 Stunden in 5%-igem Formalin fixiert. Dann wurden

sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin (Paraplast®) eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom in einer Dicke von 3 µm geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin-Eosin sowie nach Grocott gefärbt und anschließend mit Eukitt® eingedeckelt.

Auswertung

Die Schnitte wurden auf das Auftreten von Hyphen und der EUS-charakteristischen Wirtsreaktion in Form mykotischer Granulome untersucht.

IV. Ergebnisse

1. Wahl der Primer

Aufgrund von Sequenzdaten von *Aphanomyces invadans* und verschiedenen nahe verwandten Oomyceten wurden in der ITS-Region (internal transcribed spacer) der für die ribosomale RNA codierenden Gene Bereiche gefunden, in denen sich die Sequenz von *Aphanomyces invadans* von diesen gut unterschied. Die Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden in die Nukleotid-Datenbank der NCBI-Genbank unter Verwendung des Suchprogramms BLAST eingegeben und auf ihre Spezifität hin überprüft. Die Recherche ergab keinen Treffer aller verwendeten Primer auf eine DNA-Sequenz mit Ausnahme der Sequenzen von *Aphanomyces invadans*-Stämmen. Die als Zielsequenz für die Primer ausgewählte internal transcribed spacer-Region (ITS1, 5,8S, ITS2) befindet sich in dem für die ribosomale RNA kodierenden Bereich. Die internal transcribed spacer ITS1 und ITS 2 liegen zwischen den für die 18S (SSU)- 5,8S- und 28S (LSU)-ribosomale RNA kodierenden DNA-Regionen. Der Primer BO 73 hybridisiert innerhalb der ITS1-Region von *Aphanomyces invadans*, die Primer BO 487 und BO 639 hybridisieren innerhalb der ITS2-Region. Die Position der Primer ist in **Abb. 6** schematisch und in **Abb. 7** detailliert dargestellt.

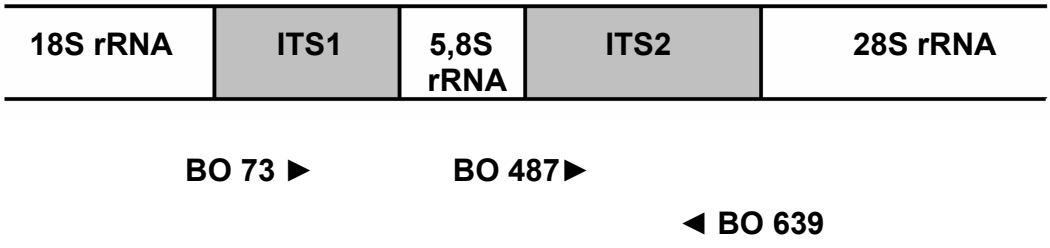

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lage der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer am rRNA-Gen

1

1. *Aphanomyces invadans* NJM9701 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAA---TATCCACGTGAATGTATTCTT-TATAAGGCTT
2. *Aphanomyces invadans* NJM9801 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAA---TATCCACGTGAATGTATTCTT-TATAAGGCTT
3. *Aphanomyces invadans* RF6 TCCGTAG-TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAA---TATCCACGTGAATGTATTCTT-TATAAGGCTT
4. *Aphanomyces* sp. 84-1240 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACAATATCCACGTGAATGTATTCTT-AATGAGGCCT
5. *Aphanomyces astaci* M 96/1 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAC---TATCCACGTGAATGTATTCTT-TATAAGGCTT
6. *Aphanomyces laevis* CBS 107.52 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAA---TATCCACGTGAACGTACTCTT-TATGAAGCC-
7. *Saprolegnia parasitica* CBS 540.67 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAATAAAC---TATCCACGTGAACGTATACTTATATTGGGTTT
8. *Saprolegnia diclina* CBS 455775 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAAC---ACCCCACGTGAATGTACTCTT-TATGAGGCTC
9. *Achlya bisexualis* NJM 9905 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAA---AATATCCACGTGAATGTATACTTGTATTAGGCTT

76 **B0 73**

1 GTGCTGAG----CTC------AC-ACTCGGCTAGCCGAAGGTT---TCGCAAGA---AACCGATGTACTTTTAATCCCTT--TAA--ACTACATAC-TGA-A—ACCT
2 GTGCTGAG----CTC------AC-ACTCGGCTAGCCGAAGGTT---TCGCAAGA---AACCGATGTACTTTTAATCCCTT--TAA--ACTACATAC-TGA-A—ACCT
3 GTGCTGAG----CTC------AC-ACTCGGCTAGCCGAAG-TT---TCGCAAGA---AAC-GATGTACTTTTAATCCCTT--TAA--ACTACATAC-TGA-A—ACCT
4 GGGC-GAA-----CTACGAAAGTAGATTGCTGGCAGAAGGTT---CTGTAAGG---AACTGATGTA-----AATCCTGTTTAAATAATAAACGAC-TGATA—AAGA
5 GTGCTGAGGATGTTCTTCGGGACGACCCGGCTAGCAGAAGGTT---TCGCAAGA---AGCCGATGTACTTTTAATCCCTTCTTAA--ATAACATAC-TGATA—AACT
6 ------AAG------TCAGGCGCAAGCTTGTAGGCAGAAGGTT---TCGCAAGA---AGCCGATGTGATTTCA-TCCCTTTTTAA--ATAAACGAC-TGATA—GAGA
7 GTGTTG--------CTCCCCCGGGAG---CGACTAACCGAAGGTT---TCGAAAGG---AACCGATGAACTTTTAATCCCTTTTACTTAATGTCTGA----ACC—AATT
8 GCGCTG--------CCCTC---GTGG---CAGCTAGCCGAAGGTT---TCGCAAGA---AGCCGATGTCAATTTGAATCCTTTTAAACAACGACTGA----TCA—AAAC
9 GTGCTGC-------CTCGTTG--------CGGCTAGCCGAAGGTTCTTTCGTAAGAGAGAACTGATGTTTAATTGAATCCCTTTTA-TATTAAATAACCTGACATCAAT

159

1 TAGCCATCAGAAATGATAGCTTGTAATCAA-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
2 TAGCCATCAGAAATGATAGCTTGTAATCAA-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
3 TAGCCATCAGAAATGATAGCTTGTAATCAA-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
4 GAGTCATCAGAAATGATAGCTTGTAATTCT-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTCGGCTCGCACATCGATGAAGAGCGCCGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
5 TAGCCGTCAGAAATGATAGCTTGTAATAAA-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
6 TAGCCATCAGAAATGATAGCTTGTAATAAA-ATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTCGGCTCGCACATCGATGAAGAGCGCGGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
7 TGGCATACAGAAATGTGTGCTTACAATTGACATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
8 TG-CAGATAGAAATGTCTGCATGCAATTGAAATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACACCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT*
9 TTGCAGATAGAAATATTTGCATGTAATTGAAATA*CAACTTTCAACAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATC*

266

1 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*TAATACAAAATTGTTTTGTCT-TT
2 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*TAATACAAAATTGTTTTGTCT-TT
3 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*TAATACAAAATTGTTTTGTCT-TT
4 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATCTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTTGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*TGACACAAACTTGTTTGATCC-TC
5 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*TAATACAAAATTGTTTTGTCT-TT
6 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATCTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGT*CGACACCAAATTGTTTTATCA-TT
7 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCAAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCTTGTATCAGTGTCCGT*TAATACTAAATTGTTTCATGTATT
8 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCAAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGTTTGTATCAGTGTCCGT*GAACACAAACTTGTTTCATTTCTT
9 *GCAGAATTCAGTGAGTCATCAAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGTTTGTATCAGTGTCCGT*TTCAAACCAATTGTTTCATGTATT

373

1 G---GA-TAAAACAGAATGTGAAG-GTCTTG---TTTCGG-CAAGTCCTTTTAAATGA-CGGTCCCTGTATA-GCTGT-TCAAGTACATTA-TACAAAGGGCTACATG
2 G---GA-TAAAACAGAATGTGAAG-GTCTTG---TTTCGG-CAAGTCCTTTTAAATGA-CGGTCCCTGTATA-GCTGT-TCAAGTACATTA-TACAAAGGGCTACATG
3 G---GA-TAAAACAGAATGTGAAG-GTCTTG---TTTCGG-CAAGTCCTTTTAAATGA-CGGTCCCTGTATA-GCTGT-TCAAGTACATTA-TACAAAGGGCTACATG
4 GA--GA-TGAAACAGA-TATGAAG-GTCTTG---TTACGA-CAAGTCCTTTTAAATGA-ATATCCCTCACTG-GATGT-CAGAGTGCATTA-TATAAAGGGCGTCATG
5 G---GA-CGAAGCAGAATGTGAAG-GTCTTG---TTTCGA-CAAGTCCTTTTAAATGA-CGGTCCCTGTATA-GCTGT-TCAAGTACATTA-TACAAAGGTCTATATG
6 GATTGA-TAGAGCAGACTGTGAAG-GTCTTG---TTTCGG-CAAGTCCTTTGAAATGA-AGGTCCCTCGGTT-GATGT-CAGAGTACATTA-CATAGAGGACTATTTG
7 -------TGAAGCAGAATGTGAAGTGTCTTG---CTTCGG-CAAGTCCTTTTAAATGAGTATTACCTGTGCA-CCCTTGTGGTTTGTACAA-TATAAAGGTATTG-CA
8 GATGGAATGAAGCAGACTGTGAAG-GTCTTG---TGAATA-CAAGTCCTTCTAAACGA-TGGTACCTATGCG-TCCTCGTGAGATGTATTA-TTTAAAGGTATGC-CT
9 -------TGAAGCAGAATGTGAAGTGTCTTGCTCTTTTGATCAAGTCCTTTTAAGTGGAACGTACCTATATACAACGTAAGAAGCATACCAATATAAAGGTGTGTATC

468 **B0 487**

1 ATTCTGATTTCG--AATGTTTTGTGTTGATATTACACGACTTTTGAAGGAAGAATAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTCTCGGCACAGGTAAACAACAT-ATTGCTT
2 ATTCTGATTTCG--AATGTTTTGTGTTGATATTACACGACTTTTGAAGGAAGAATAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTCTCGGCACAGGTAAACAACAT-ATTGCTT
3 ATTCTGATTTCG--AATGTTTTGTGTTGATATTACACGACTTTTGAAGGAAGAATAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTCTCGGCACAGGTAAACAACAT-ATTGCTT
4 GATCTTGTT-CGGTATTGTTTTGTGTTGCGATTGCACACCAAGT-ACTGGCGATTCAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCATGAGTGAACATGTT-ATTGCAT
5 ATTCTGATTTCG--AATGTTTTGTGTTGAAATTGCACAACTTTTGAAAGAAGGCTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGAACAACAT-ATTGCTT
6 GATCTTGTTTCGGCATTATTTTGTGTTGCGACTGCACACTGGCTGAAGGGAGATTAAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTGTTTCGGCACGGGTGAACA-TGT-ATTGCAT
7 ATTTCGACTTTGGCC--GTCCGGAGTAAAGAT-GCCCGGCT-TGGAAGGAGGAATGGATCGCGGTAGTTTTGCTTGTGCTTCGGTGCAGGTGAATCGTGTTATTGCTT
8 GCGCTCCTTTCGAGA--GTCTTGTGTGGCGAC-ACACAGGT-TCAAAGAGAGAGCAAATCGCGGTAGTTTTGCTTGTACTTCGGTATGAGTGGG-CATAT-ATTGCTT
9 ATTTGAATTTCAATATTGTTTTGTATGAATA-TACATGAC-GTTGAAAGTAAAATGAATTGCGGTAGTTTTGCTTGTACTT--GTACAAGTGAACAATAT-ATTGCTT

574 **BO 639**

```
1 TTTATTTCGTC-TGGAAGAGGTTTGTAGTAGAAGGCAAAATGCGGAGT--GAGATAGTGTAATCTGGTGTGCTTGTGT---CT---ATACGGAAGCAAATTGGGAAAC
2 TTTATTTCGTC-TGGAAGAGGTTTGTAGTAGAAGGCAAAATGCGGAGT--GAGATAGTGTAATCTGGTGTGCTTGTGT---CT---ATACGGAAGCAAATTGGGAAAC
3 TTTATTTCGTC-TGGAAGAGGTTTGTAGTAGAAGGCAAAATGCGGAGT--GAGATAGTGTAATCTGGTGTGCTTGTGT---CT---ATACGGAAGCAAATTGGGAAAC
4 TTGTGTTGACCGTGGAAAGTGTATGTAGTTAAAGGCAGAGCATGGAGA— AGAGAAATGATGTCTGATGTACTTCTATGCATTGTAGTAGAGAAGGAAATGGGAAATA
5 TTTATGTCGTC-TGGAAGAGGTTTGTAGTTGAAGGCAGAATGCGGAGT--CGGATAGTATGGTCTGGTGTGCTTGTGT---CT---ATATGGAAGCAAATTGGGAAAC
6 TTTAATTCGAC-TGGAGGACTTGGGTGGTCAAAGATGAAATACGAGCA--AGAGCCTTGTAGTCTGGTGTACTCCTAG---CTCAAGTCGAGAAGCAAAT-GGGAATA
7 TTTG--TTCTTTTGGAAGGGCCCCGTGTTTGATCGCTGGATTCAATTT--CGAGTTGTACGTACTGGTGCATTCCTTGGT------GTATGGAGGCAAATTGGGAAA-
8 TTTG--TGATTTCAGC-GAGTCTGTTGTTTAAGCACAGGGCGCGTAAG--GGGAGTAGGTATGCTGGTGCATTTCTTGGC------GTGTGGAGGCAAATTGGGAAT-
9 TTTGTTTTACTGT---AGATGTGTGTATTGAAATATAAGATAAGAAGTTTATAATGGTATATACTGGGTTGTTTCT--GTAGT---ATATAGAAGCAAAT-GGGAA--
```

673

```
1 A---ACATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCA-TAAGCCGGAGGA
2 A---ACATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAACTTAAGC-------TA
3 A---ACATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAACTTAAGC-------TA
4 ATATAAATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAACTTAAGC-TA
5 A---ACATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAGCC
6 A---ACATCCAATTTGGACCTGATATCAGACAAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
7 ---CAAATCCAATTTGGACCTGATATCAAGCAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
8 ---TCAATCCAATTTGGACCTGATATCAAACAAGACTACCCGCTGAACTTAAGC-TA
9 --ATATATCCAATTTGGACCTGATATCAAACAAGATTACCCGCTGAACTTAAGC-TA
```

Abb. 7:
Alignment zum Sequenzvergleich der ITS-Region. Die für die ribosomale RNA kodierenden Bereiche sind kursiv dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich auf den Referenzstamm NJM 9701. Mit der Primersequenz nicht übereinstimmende Nukleotide sind grau unterlegt.

Die Primer BO 73/BO 639 ergeben ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Länge von 566 bp, die Primer BO 487/BO 639 ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Länge von 152 bp.

2. Optimierung des PCR-Protokolls

Um die optimalen Bedingungen für eine PCR zu ermitteln, werden wesentliche Faktoren, die Einfluß auf die Effizienz der Reaktion haben, variiert. Im Folgenden werden die Austestung einer optimalen Annealing-Temperatur und einer optimalen Primerkonzentration dargestellt.

2.1. Annealing-Temperatur

Unter Verwendung eines Gradientencyclers (Mastercycler gradient©, Eppendorf), der um einen eingegebenen Mittelwert die angrenzenden Temperaturwerte berechnet, wurden zeitgleich verschiedene Temperaturschritte getestet. Die Dezimalstellen bei den Temperaturangaben sind technisch bedingt. Nach dem Austesten eines breiten Temperaturbereichs (Groboptimierung) wurde die optimale Hybridisierungs-temperatur in kleineren Abständen (Feinoptimierung) eingegrenzt.

Für das Primerpaar BO 73/BO 639 zeigte sich bei der Feinoptimierung bis 58,1 °C eine kräftige Bande. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurde die höchste Temperatur gewählt, bei der sich noch eine kräftige Bande zeigte. Die Annealing-Temperatur dieses Primerpaares wurde für die weiteren PCRs auf 58 °C festgelegt. Für das Primerpaar BO 487/BO 639 zeigte sich bei der Feinoptimierung bis 56 °C eine kräftige Bande, diese Temperatur wurde für die folgenden PCRs für dieses Primerpaar festgelegt. Exemplarisch zeigt die **Abb. 8** die Groboptimierung der Annealing-

Temperatur für das Primerpaar BO 487/BO 639. Die weiteren Gelbilder sind im Anhang unter IX.2. dargestellt.

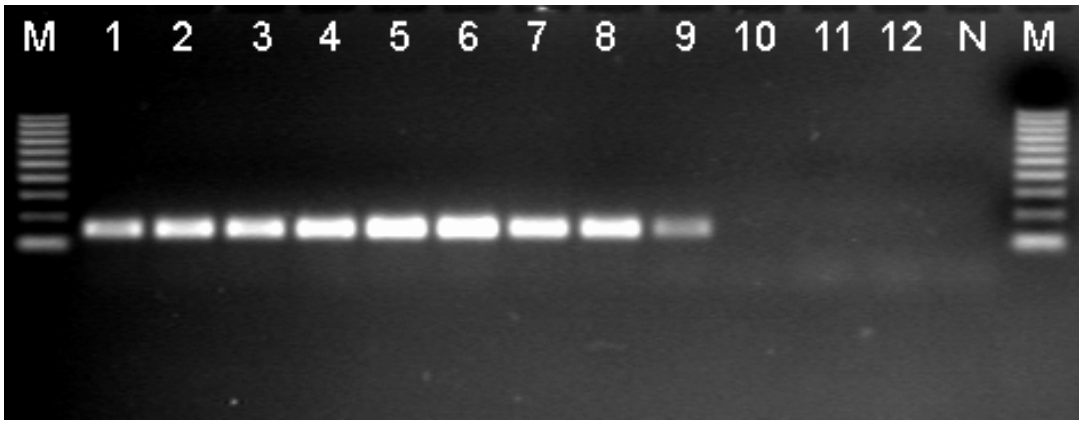

Abb. 8: Groboptimierung der Annealing-Temperatur in °C für das Primerpaar BO 487/BO 63, 30 Zyklen

M: DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 42 °C; **2:** 42,2 °C; **3:** 43,3 °C; **4:** 45,1 °C; **5:** 47,4 °C; **6:** 50 °C; **7:** 52,8 °C; **8:** 55,5 °C; **9:** 58 °C; **10:** 60,1 °C; **11:** 61,7 °C; **12:** 62,6 °C

2.2. Primerkonzentrationen

Für die Bestimmung einer optimalen Primerkonzentration wurden Endkonzentrationen im PCR-Ansatz zwischen 0,05 und 2,0 pmol/µl ausgetestet. Ab einer Primerkonzentration von 0,6 pmol/µl zeigten sich bei beiden Primerpaaren sowohl bei den ungespikten als auch bei den gespikten Proben kräftige und deutlich abgegrenzte Banden. Mit dem Ziel einer hohen Spezifität wurde die Primerkonzentration möglichst niedrig gewählt. In den folgenden PCRs wurde die Konzentration von 0,6 pmol/µl für beide Primerpaare festgelegt. Die zugehörigen Gelbilder sind im Anhang unter IX.2. aufgeführt.

2.3. Optimiertes PCR-Protokoll

Die **Tabelle 4** stellt die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die Bedingungen im Thermocycler zusammengefasst dar.

Tabelle 4: Zusammenfassung des optimierten PCR-Protokolls

PCR mit Primer	**BO 73/ BO 639**		**BO 487/ BO639**	
Mastermix				
Bestandteile	**Volumen je Einzelreaktion**	**Endkonzentration**	**Volumen je Einzelreaktion**	**Endkonzentration**
2x ReddyMix™*	25 µl		25 µl	
enthält :				
DNA-Polymerase		1,25 U		1,25 U
dNTPs		0,2 mM je dNTP		0,2 mM
$MgCl_2$		1,5 mM		1,5 mM
Tris-HCl		75 mM		75 mM
$(NH_4)_2SO_4$		20 mM		20 mM
Tween 20®		0,1 % (v/v)		0,1 % (v/v)
Primer 1 (12µM)	2,5 µl	0,6 µM	2,5 µl	0,6 µM
Primer 2 (12µM)	2,5 µl	0,6 µM	2,5 µl	0,6 µM
Aqua inject.	17,5 µl		19 µl	
	47,5 µl		49 µl	
Template DNA	+2,5 µl		+1 µl	
Endvolumen	50 µl		50 µl	
Thermocycler				
Initiale Denaturierung	96°C, 5 min		96°C, 5 min	
Anzahl der Zyklen	20		30	
Denaturierung	96°C, 1 min		96°C, 1 min	
Primer-Annealing	**58°C**, 1 min		**56°C**, 1 min	
Extension	72°C, 1 min		72°C, 1 min	
Finale Extension	72°C, 5 min		72°C, 5 min	

3. Spezifität der Primer

Zur Abklärung der Spezifität der verwendeten Primer für *Aphanomyces invadans* wurde die DNA verschiedener *Aphanomyces invadans*-Stämme, DNA von nahe und entfernt verwandten Oomyceten, von Pilzen, Bakterien und protozoischen Ektoparasiten, die zu Hautläsionen bei Fischen führen können oder diese sekundär besiedeln, sowie Wirts-DNA in die Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll (**Tabelle 4**) eingesetzt. Alle sieben getesteten *Aphanomyces invadans*-Isolate ergaben in der Semi-Nested PCR deutliche Banden im erwarteten Größenbereich (**Abb. 9**).

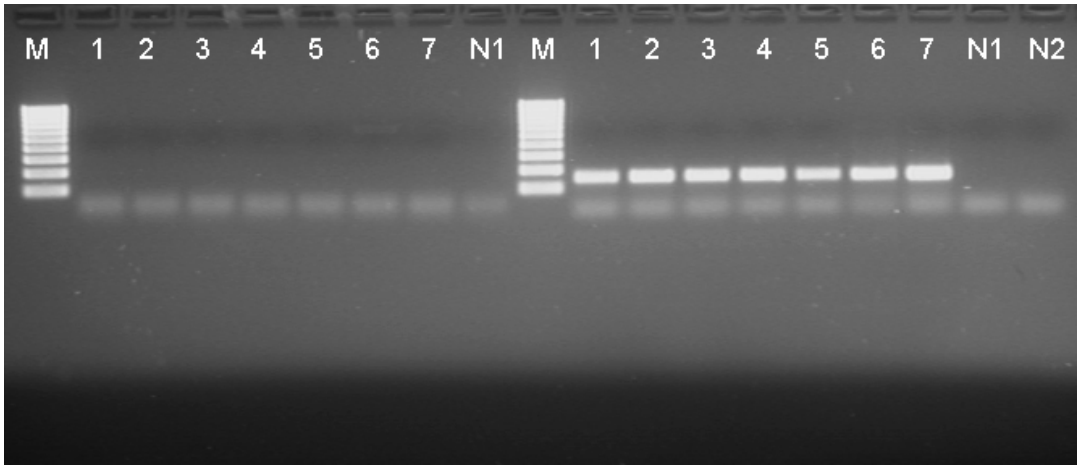

Abb. 9: PCR-Ergebnisse verschiedener *Aphanomyces invadans*-Isolate, links mit den Primern BO 73/ BO 639, rechts Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/ BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** *Aphanomyces invadans* NJM 9701;
2: *Aphanomyces invadans* WIC; **3:** *Aphanomyces invadans* PA7;
4: *Aphanomyces invadans* PA8; **5:** *Aphanomyces invadans* UM3;
6: *Aphanomyces invadans* B99C; **7:** *Aphanomyces invadans* T99G2

Bei keiner weiteren untersuchten DNA-Probe konnte eine unerwünschte Amplifikation nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigt die **Abb. 10** die

untersuchte DNA der *Aphanomyces spp.* Um sicherzustellen, dass die Proben der negativ getesteten Organismen genug DNA enthalten, wurden diese einer Positivkontrolle mit den unter III.1.8. aufgeführten gruppenspezifischen Primern unterzogen. Es traten bei allen verwendeten DNA-Proben Banden im erwarteten Größenbereich auf. Die **Abbildung 11** stellt die Positivkontrollen für die DNA-Proben der getesteten *Aphanomyces spp.* dar. Die weiteren Gelbilder sind im Anhang unter IX.3. aufgeführt.

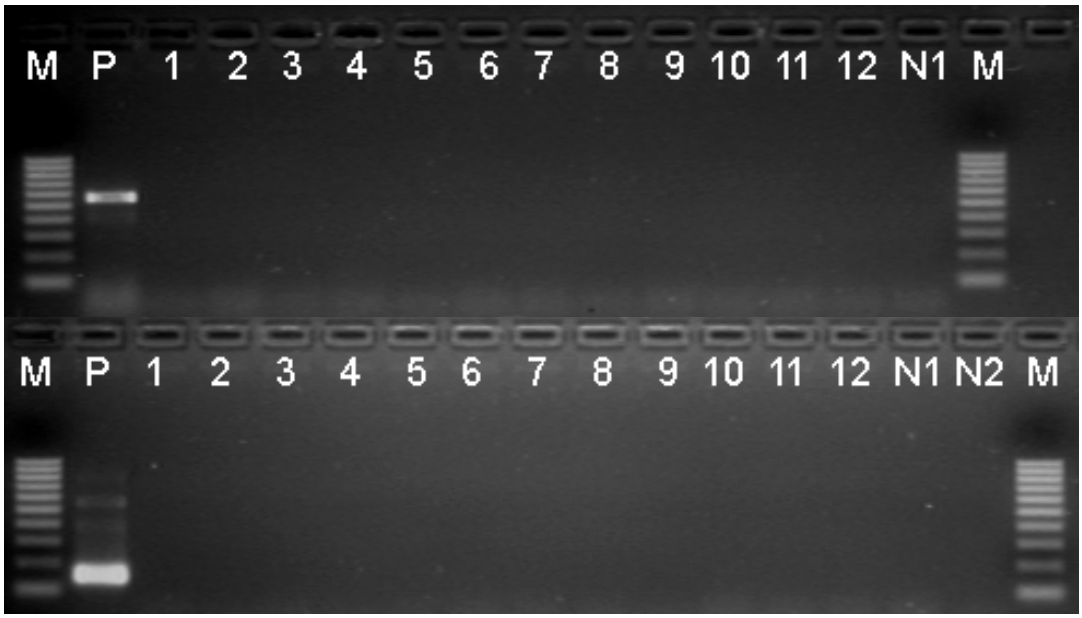

Abb. 10: Austestung der Spezifität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll mit DNA verschiedener *Aphanomyces spp.*, oben PCR mit Primern den BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **P:** Positivkontrolle; **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** *Aphanomyces astaci* S_v; **2:** *Aphanomyces astaci* D_1; **3:** *Aphanomyces astaci* K_v; **4:** *Aphanomyces astaci* P_c; **5:** *Aphanomyces brassicae*; **6:** *Aphanomyces cladogamus*; **7:** *Aphanomyces cochlioides*; **8:** *Aphanomyces euteiches*; **9:** *Aphanomyces helicoides*; **10:** *Aphanomyces iridis*; **11:** *Aphanomyces irregulare*; **12:** *Aphanomyces laevis*

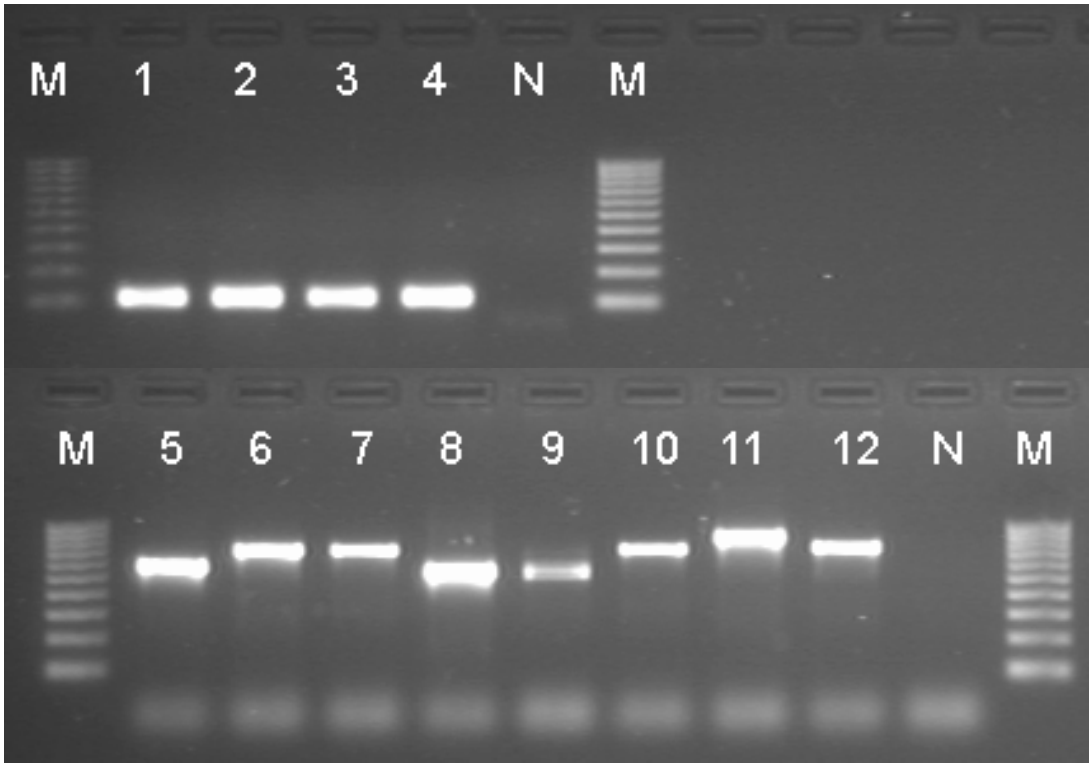

Abb. 11: Darstellung der Positivkontrollen der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung getesteten *Aphanomyces spp.* mit den Primern BO 525/BO 640 (**1-4**) und den Primern ITS 1/ITS 4 (**5-12**)

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N:** Negativkontrolle; **1:** *Aphanomyces astaci* Sv; **2:** *Aphanomyces astaci* D_1; **3:** *Aphanomyces astaci* K_v; **4:** *Aphanomyces astaci* P_c; **5:** *Aphanomyces brassicae*; **6:** *Aphanomyces cladogamus*; **7:** *Aphanomyces cochlioides*; **8:** *Aphanomyces euteiches*; **9:** *Aphanomyces helicoides*; **10:** *Aphanomyces iridis*; **11:** *Aphanomyces irregulare*; **12:** *Aphanomyces laevis*

4. Sensitivität der Semi-Nested PCR

Unter Verwendung des optimierten und für *Aphanomyces invadans* spezifischen PCR-Protokolls wurde die untere Nachweisgrenze der entwickelten Semi-Nested PCR bestimmt. Wie unter III.2.7. beschrieben wurde DNA aus Mycel und aus Zoosporen des *Aphanomyces invadans*-Isolats NJM 9701 gewonnen, Verdünnungsreihen angelegt und diese DNA-Proben in die PCR eingesetzt. Weiterhin wurde von einer Zoosporensuspension eine Verdünnungsreihe angelegt, diese Proben zusammen mit Wirtsgewebe („gespikte“ Proben) in die DNA-Extraktion und anschließend in die PCR eingesetzt. Die **Abbildungen 12** und **13** illustrieren die Ergebnisse und die **Tabelle 5** fasst diese zusammen.

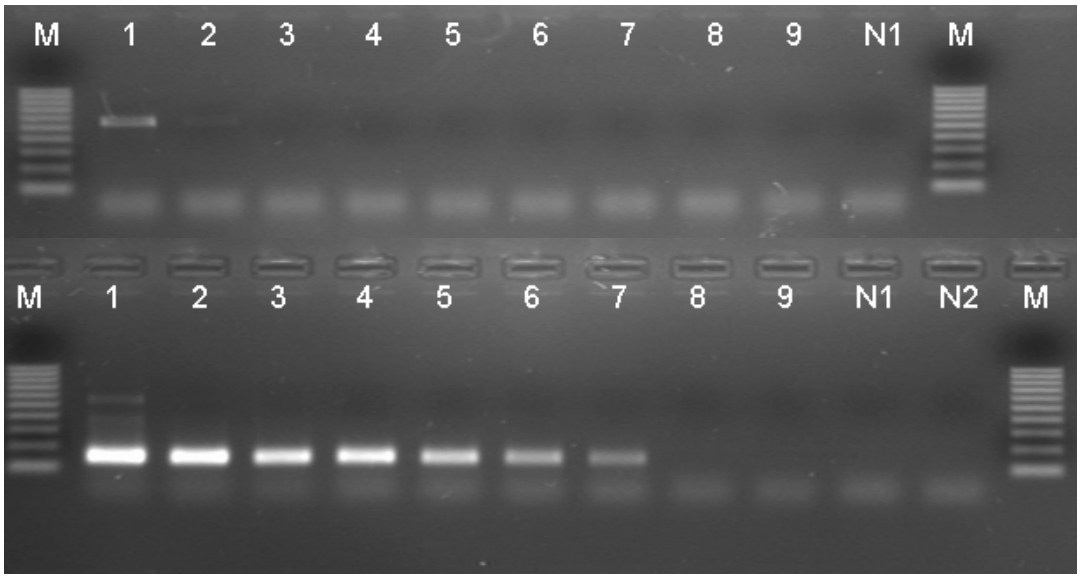

Abb. 12: Sensitivität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll unter Verwendung von DNA aus Pilzmycel, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativ-kontrolle der Semi-Nested PCR; **1:**10 ng/µl; **2:** 1 ng/µl; **3:** 100 pg/µl; **4:**10 pg/µl; **5:** 1 pg/µl; **6:** 100 fg/µl; **7:** 10 fg/µl; **8:** 1 fg/µl; **9:** 100 ag/µl

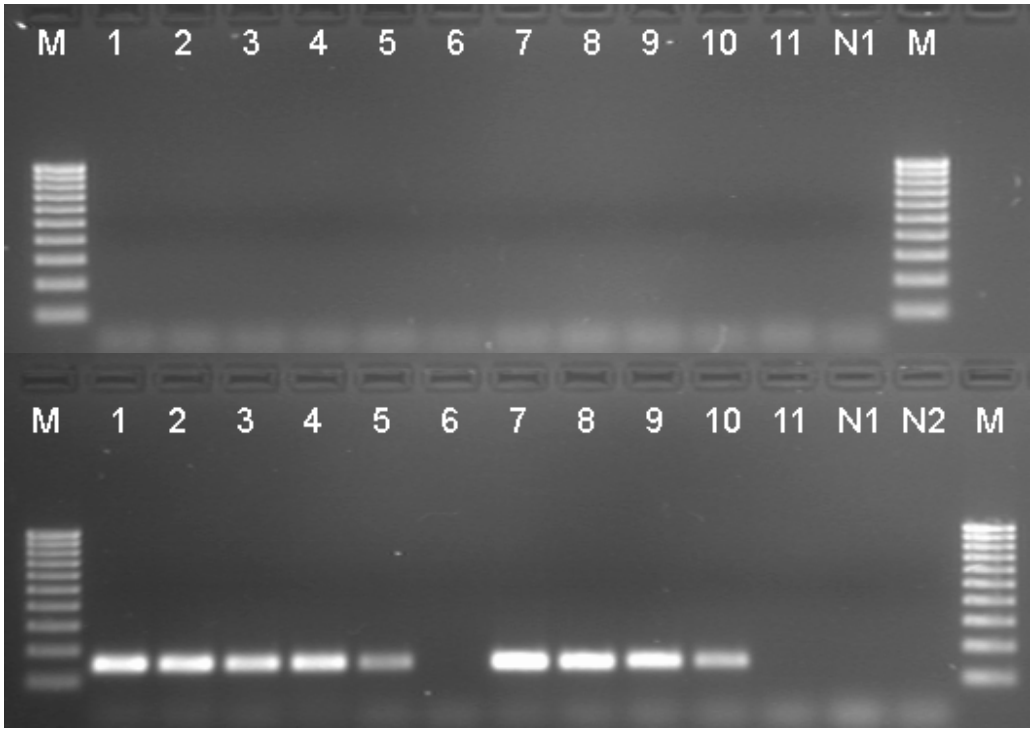

Abb. 13: Sensitivität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll unter Verwendung von Zoosporen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** 10.000 Sporen; **2:** 1.000 Sporen; **3:** 100 Sporen; **4:** 10 Sporen; **5:** 1 Spore; **6:** 0,1 Spore; **7:** 10.000 Sporen in 30 mg; **8:** 1.000 Sporen in 30 mg; **9:** 100 Sporen in 30 mg; **10:** 10 Sporen in 30 mg; **11:** 1 Spore in 30 mg

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Semi-Nested PCR

Eingesetztes Material	**Untere Nachweisgrenze**
Aus Pilzmycel gewonnene Dann	10 fg/µl
Aus Zoosporen gewonnene Dann	0,025 Sporen
Aus mit Wirtsgewebe versetzten Zoosporen gewonnene DNA	10 Sporen, versetzt mit 30 mg Fischgewebe

5. Auswertung der Infektionsversuche

Die Anästhesie der Versuchstiere und die Injektion der Zoosporen verliefen ohne Komplikationen, allerdings konnten einige Aale durch das Narkosebad nicht komplett immobilisiert werden, so dass die Injektion eine vorsichtige manuelle Fixation erforderte. Eine Dosiserhöhung des Anästhetikums wurde wegen der Gefahr einer Überdosierung unterlassen. Im Versuchsverlauf war die Futteraufnahme bei allen vier Fischarten gut, abgesehen von Fischen mit stark beeinträchtigtem Allgemeinbefinden.

Wie bereits unter III.2.2.1. aufgeführt, erfolgte die Entnahme der Fische für die Untersuchung anhand vorher festgelegter Entnahmezeitpunkte, die die **Tabelle 6** nochmals verdeutlicht. Es wurden bevorzugt klinisch auffällige Tiere mit makroskopisch sichtbaren Veränderungen oder verendete Tiere entnommen. Die Fische wurden täglich auf ihr Allgemeinbefinden und EUS-typische Läsionen kontrolliert. Wurden dabei Tiere mit beeinträchtigtem Gesundheitszustand beobachtet, wurden diese auch außerhalb des Entnahmeplans euthanasiert und ebenso wie verendete Tiere umgehend der Untersuchung zugeführt.
Das führte dazu, dass klinisch unauffällige Fische aufgrund dieser Auslese eher zum Ende des Versuchszeitraumes der Untersuchung zugeführt wurden. Den aus den Versuchsgruppen entnommenen Fischen wurden fortlaufende Entnahmenummern von 1 bis 12 gegeben.

Tabelle 6: Vorgesehene Entnahmezeitpunkte im Rahmen der Infektionsversuche

Entnahmezeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tag nach Infektion	1	2	4	6	8	10	12	14	17	21	28	35

Tabelle 7: Daten zu den Infektionsversuchen der Blauen Fadenfische

Gruppe und Nummer	Tag p. i.	Größe in cm	Gewicht in g	Getötet/ gestorben	Klinik	PCR	Gro-cott	Mykotische Granulome
A1	1	6,5	3,1	getötet	Injektionsstelle gerötet, Schuppenverlust	+	-	-
B1	1	6,8	3,3	getötet	Injektionsstelle gerötet, Schuppenverlust	+	-	-
C1	1	6,7	3,2	getötet	Injektionsstelle gerötet, Schuppenverlust	+	-	-
K1	1	6,2	2,8	getötet	Injektionsstelle gerötet, Schuppenverlust	-	-	-
A2	2	6,1	5,3	getötet	-	+	-	-
B2	2	5,7	4,5	getötet	-	+	-	-
C2	2	6,4	5,1	getötet	Lethargie	+	-	-
K2	2	6,8	3,8	getötet	-	-	-	-
A3	4	6,2	5	getötet	geringgradige Dunkelfärbung im Injektionsbereich	+	-	-
B3	4	5,8	3,1	getötet	Deutliche Dunkelfärbung im Injektionsbereich	+	-	-
C3	4	7,3	6,7	getötet	Deutliche Dunkelfärbung im Injektionsbereich	+	-	-
K3	4	6,8	3,8	getötet	geringgradige Dunkelfärbung im Injektionsbereich	-	-	-
A4	6	6,5	5,2	getötet	geringgradige Dunkelfärbung im Injektionsbereich	+	+	+
B4	6	6,9	6,5	getötet	Deutliche Dunkelfärbung im Injektionsbereich	+	-	-
C4	6	6,6	6,8	getötet	Schaukelbewegungen, Dunkelfärbung, Schwellung, Schuppensträube im Injektionsbereich	+	+	+
K4	6	6,8	5,6	getötet	geringgradige Dunkelfärbung im Injektionsbereich	-	-	-
A5	8	6,7	5,3	getötet	Schwellung	+	+	+
B5	8	6,5	6,1	getötet	Schaukelbewegungen, 6 x 3 mm große Ulzeration	+	+	+
C5	8	6,2	5,5	getötet	6 x 6 mm große Ulzeration	+	+	+
K5	8	6,8	5,6	getötet	-	-	-	-
A6	10	6,5	5,1	getötet	Rötung, Schuppenverlust, Schwellung	+	+	+
B6	10	6,4	5,1	getötet	Rötung, Schuppenverlust, Schwellung	+	+	+
C6	10	6	3,3	gestorben	4 x 4 mm große Ulzeration	+	+	-

K6	10	6,2	3,1	getötet	-	-	-	-
A7	12	6,9	6,8	gestorben	Rückenpartie gerötet, Schuppenverlust	+	+	+
B7	12	6	4,4	getötet	Schuppenverlust, Injektionsstelle gerötet	+	+	+
C7	10	6,3	4,1	getötet	Lethargie, Absonderung, Schaukelbewegungen, tiefreichende 10 x 7 mm große Ulzeration	+	+	+
K7	12	6,2	3,1	getötet	-	-	-	-
A8	12	6,2	6	getötet	in Seitenlage, Rücken gerötet, Schuppenverlust	+	+	+
B8	14	6,8	5,7	getötet	Schwellung der Rückenpartie	+	+	+
C8	10	6,2	4,1	getötet	Lethargie, Absonderung, Schaukelbewegungen, 6 x 3 mm große Ulzeration, Umgebung gerötet	+	+	+
K8	14	5,5	3,3	getötet	-	-	-	-
A9	13	6,3	3,2	gestorben	Rückenpartie ulzeriert, Schuppenverluste	+	+	+
B9	17	6,5	5,3	getötet	Injektionsstelle aufgehellt	-	-	-
C9	12	6,8	6,5		10 x 7 mm große, tiefreichende Ulzeration	+	+	+
K9	17	5,5	3,3	getötet	-	-	-	-
A10	13	6,8	4,8	gestorben	Ulzeration im gesamten Rückenbereich	+	+	+
B10	21	6,2	5,7	getötet	Pigmentierung der Injektionsstelle	-	-	-
C10	14	6,9	6,6	getötet	3 x 3 mm große Ulzeration	+	+	+
K10	21	6,3	5,8	getötet	-	-	-	-
A11	14	6,5	4	getötet	4 x 4 mm große Ulzeration	+	+	+
B11	28	6,6	3,6	getötet	-	-	-	-
C11	17	6,2	4,3	getötet	Pigmentierung der Injektionsstelle	-	-	-
K11	21	6,9	5,6	getötet	-	-	-	-
A12	17	6,9	5,2	getötet	Pigmentierung der Injektionsstelle	-	-	-
B12	35	6,7	3,7	getötet	-	-	-	-
C12	21	6,4	5,3	getötet	Pigmentierung der Injektionsstelle	-	-	-
K12	35	6,2	2,9	getötet	-	-	-	-

Tabelle 8: Daten zu den Infektionsversuchen der Europäischen Welse

Gruppe und Nummer	Tag p. i.	Größe in cm	Gewicht in g	Getötet/ gestorben	Klinik	PCR	Grocott	Mykotische Granulome
A1	1	11,4	8,5	getötet	-	+	-	-
B1	1	12,5	12,6	getötet	-	+	-	-
C1	1	12	13,4	getötet	-	+	-	-
K1	1	13	16,8	getötet	-	-	-	-
A2	2	14	18,7	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	-	-
B2	2	10,1	8,8	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	-	-
C2	2	12,8	18,4	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	-	-
K2	2	11,4	14,3	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	-	-	-
A3	4	10,2	7,9	getötet	-	+	+	-
B3	4	10,9	11,4	getötet	-	-	-	-
C3	4	10,5	10	getötet	-	+	-	-
K3	4	10,2	7,2	getötet	-	-	-	-
A4	6	11,3	12,2	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	-	-
B4	6	12	15,8	getötet	Injektionsstelle deutlich aufgetrieben	+	-	-
C4	6	12,7	16,3	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	-	-
K4	6	9	8,6	getötet	-	-	-	-
A5	8	10,2	8,5	getötet	petechiale Blutungen auf der Epidermis	+	+	-
B5	8	11,5	13,1	getötet	beulenartige Auftreibung	+	-	-
C5	8	9,5	9,7	getötet	beulenartige Auftreibung	+	-	-
K5	8	11,2	15,7	getötet	-	-	-	-
A6	10	12,2	13,3	getötet	3 x 3 mm große Ulzeration	+	+	-
B6	10	10	9,6	getötet	Skoliose, Absonderung, 5 x 5 mm große, zentral weißliche Ulzeration, Umgebung gerötet	+	+	-
C6	10	7,7	5,2	getötet	beulenartige, weißlich schimmernde Auftreibung	+	-	-
K6	10	9,8	10,6	getötet	-	-	-	-
A7	12	9	7,5	getötet	Injektionsstelle gerötet, stellenweise ulzeriert	+	+	-
B7	11	9,1	7,1	getötet	Lethargie, 13 x 13 mm große Ulzeration	+	+	-
C7	12	11,8	12,5	getötet	5 x 5 mm große Ulzeration	+	+	-

Gruppe und Nummer	Tag p. i.	Größe in cm	Gewicht in g	Getötet/ gestorben	Klinik	PCR	Grocott	Mykotische Granulome
K7	12	11,9	16,6	getötet	-	-	-	-
A8	14	10,6	10,9	getötet	5 x 5 mm große Ulzeration	+	+	-
B8	12	11,	11,5	getötet	5 x 5 mm große Ulzeration	+	+	-
C8	14	11,8	13	getötet	5 x 5 mm große Ulzeration	+	+	-
K8	14	9,2	8,3	getötet	geringradig aufgetriebene Injektionsstelle	-	-	-
A9	17	9,8	8,7	getötet	Injektionsstelle geschwollen, hämorrhagisch, zentral ulzeriert	+	+	-
B9	14	11,3	12,8	getötet	4 x 4 mm große Ulzeration	+	+	-
C9	17	12,4	17,8	gestorben	13 x 13 mm große, bis an die Wirbelsäule reichen-de Ulzeration, Umgebung deutlich aufgetrieben	+	+	-
K9	17	10,8	11,2	getötet	-	-	-	-
A10	17	10,8	12,1	getötet	gesamter kranialer Rückenbereich geschwollen, Hämorrhagien	+	+	-
B10	17	11,7	12,6	getötet	5 x 5 mm große Auftreibung	+	+	-
C10	21	10,4	10,9	getötet	geringgradig aufgetrieben	-	-	-
K10	21	11,8	11,4	getötet	geringgradig aufgetrieben	-	-	-
A11	19	13,4	17,6	getötet	Lethargie, Schwimmstörungen,Rückenpartie aufgetrieben, hämorrhagisch, zentral ulzeriert	+	+	-
B11	21	10,7	12,6	getötet	-	-	-	-
C11	28	11,5	10,8	getötet	-	-	-	-
K11	28	11,8	9,8	getötet	-	-	-	-
A12	21	12,5	13,9	getötet	-	-	-	-
B12	28	12,2	13,6	getötet	-	-	-	-
C12	35	12,3	13,1	getötet	-	-	-	-
K12	35	13	15,5	getötet	-	-	-	-

Tabelle 9: Daten zu den Infektionsversuchen der Regenbogenforellen

Gruppe und Nummer	Tag p. i.	Größe in cm	Gewicht in g	Getötet/ gestorben	Klinik	PCR	Grocott	Mykotische Granulome
A1	1	9,6	9,4	getötet	-	-	-	-
B1	1	8	5,5	getötet	-	-	-	-
C1	1	8,2	5,1	getötet	-	+	-	-
K1	1	10	11,4	getötet	-	-	-	-
A2	2	10,2	11,9	getötet	-	-	-	-
B2	2	10,7	12,2	getötet	-	+	-	-
C2	2	10	10,3	getötet	-	-	-	-
K2	2	8	5,7	getötet	-	-	-	-
A3	4	11,3	15,8	getötet	-	-	-	-
B3	4	12	17,8	getötet	Injektionsstelle geringgradig geschwollen und aufgehellt	-	-	-
C3	4	9,5	9,2	getötet	-	-	-	-
K3	4	9,1	9,8	getötet	-	-	-	-
A4	6	10,7	13,4	getötet	-	+	+	-
B4	6	8,9	9,3	getötet	-	-	-	-
C4	6	7,6	7,2	getötet	Hämorrhagien an der Injektionsstelle	-	-	-
K4	6	8,3	6,7	getötet	-	-	-	-
A5	8	11,5	14,5	getötet	Schuppenverluste an der Injektionsstelle	+	+	-
B5	8	10,2	12,2	getötet	-	-	-	-
C5	8	8,3	8,4	getötet	-	-	-	-
K5	8	8,8	6,9	getötet	-	-	-	-
A6	10	9,2	9,9	getötet	Injektionsstelle geringgradig aufgetrieben	+	+	-
B6	10	11	13,2	getötet	-	-	-	-
C6	10	11,3	14,3	getötet	Injektionsstelle geringgradig aufgetrieben	+	-	-

K6	10	7,7	5,6	getötet	-	-	-	-
A7	12	9,5	10,7	getötet	Injektionsstelle aufgetrieben	+	+	+
B7	12	8,8	9,3	getötet	-	-	-	-
C7	12	10,3	13,7	getötet	-	-	-	-
K7	12	10,2	12,1	getötet	-	-	-	-
A8	14	9,1	8,7	getötet	deutliche Auftreibung	+	+	+
B8	14	9,4	9,6	getötet	mittelgradige Auftreibung	+	+	-
C8	14	7,6	8,1	getötet	-	-	-	-
K8	14	11,2	13	getötet	-	-	-	-
A9	17	9,3	8,3	getötet	3 x 3 mm große, aufgehellte Vorwölbung	+	+	-
B9	17	12,2	16,4	getötet	Injektionsstelle geringgradig aufgetrieben und hämorrhagisch	+	-	-
C9	17	9,8	12,4	getötet	Injektionsstelle geringgradig aufgetrieben	-	-	-
K9	17	8,9	7,7	getötet	-	-	-	-
A10	21	9,4	9,3	getötet	Injektionsbereich aufgetrieben, hämorragisch	+	+	+
B10	21	8,5	6,7	getötet	abnorme Schwimmbewegungen, Skoliose, Injektionsbereich aufgetrieben, hervorragende Hyphen	+	+	-
C10	21	9,6	8,9	getötet	-	-	-	-
K10	21	9,1	7	getötet	-	-	-	-
A11	28	11,7	17,3	getötet	-	-	-	-
B11	28	10,6	13,1	getötet	Injektionsstelle hämorrhagisch, kontralateral gelegener 3 x 3 mm große Vorwölbung	+	+	+
C11	28	9,7	10,9	getötet	-	-	+	-
K11	28	10,2	11,1	getötet	-	-	-	-
A12	35	9,8	9,6	getötet	-	-	-	-
B12	35	10	10,1	getötet	-	-	-	-
C12	35	11,5	14,4	getötet	-	-	-	-
K12	35	9,3	7,7	getötet	-	-	-	-

Tabelle 10: Daten zu den Infektionsversuchen der Europäischen Aale

Gruppe und Nummer	Tag p. i.	Größe in cm	Gewicht in g	Getötet/ gestorben	Klinik	PCR	Gro-cott	Mykotische Granulome
A1	1	14,4	5,3	getötet	-	+	-	-
B1	1	16,3	5,6	getötet	-	-	-	-
C1	1	12,8	3,3	getötet	-	+	-	-
K1	1	12	2,5	getötet	-	-	-	-
A2	2	16,8	7,4	getötet	Injektionstelle gerötet	+	+	-
B2	2	12	8,5	getötet	-	+	-	-
C2	2	11,8	8,2	getötet	-	-	-	-
K2	2	11,6	2,5	getötet	-	-	-	-
A3	4	14,1	5,5	getötet	-	-	-	-
B3	4	12,3	3,8	getötet	-	-	-	-
C3	4	11,8	3	getötet	-	-	-	-
K3	4	10,7	2,9	getötet	-	-	-	-
A4	6	17,5	9,2	getötet	-	+	-	-
B4	6	16,5	5,3	getötet	-	+	-	-
C4	6	14,2	7,2	getötet	-	-	-	-
K4	6	13,5	3,4	getötet	-	-	-	-
A5	8	15,1	4,5	getötet	-	-	-	-
B5	8	14,2	6,6	gestorben	-	-	-	-
C5	8	15,5	6,1	getötet	-	-	-	-
K5	8	12,8	3,1	getötet	-	-	-	-
A6	10	14,5	6,2	getötet	-	-	-	-
B6	10	12,8	3,4	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
C6	10	16,6	7,9	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
K6	10	13,7	3,6	getötet	-	-	-	-

A7	12	13,7	5,3	getötet	-	-	-	-
B7	12	15,5	4,9	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
C7	12	15,7	5,6	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
K7	12	13,3	3,5	getötet	-	-	-	-
A8	14	15,5	7,1	getötet	-	-	-	-
B8	14	14,8	5,6	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
C8	14	13	7	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
K8	14	13	4,3	getötet	-	-	-	-
A9	17	17,3	8,6	getötet	-	-	-	-
B9	17	14,8	4,7	getötet	-	-	-	-
C9	17	17,1	7,4	getötet	-	-	-	-
K9	17	12	2,8	getötet	-	-	-	-
A10	21	18,4	7,1	getötet	-	-	-	-
B10	21	12,2	2,1	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
C10	21	14,4	4,2	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
K10	21	13	2,6	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
A11	28	17,1	5,5	getötet	-	-	-	-
B11	28	14	4,2	gestorben	-	-	-	-
C11	28	15,4	3,7	getötet	-	-	-	-
K11	28	13,3	3	getötet	Pigmentierungen im Injektionsbereich	-	-	-
A12	35	15,6	4,5	getötet	-	-	-	-
B12	35	19,2	7,9	getötet	-	-	-	-
C12	35	15,7	4,5	getötet	-	-	-	-
K12	35	12	2,1	getötet	-	-	-	-

Molekularbiologischer Nachweis von *Aphanomyces invadans*

Für die PCR-Untersuchung wurde aus dem entnommenen Probenmaterial DNA extrahiert. 2,5 µl des erhaltenen Eluats wurden in die Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll (**Tabelle 4**) eingesetzt. Die PCR-Ergebnisse der Versuchsgruppen sind in den **Tabellen 7** – **10** dargestellt.
Die Gelbilder, in denen die Ergebnisse visualisiert wurden, sind im Anhang unter IX.4. aufgeführt. Beispielhaft zeigt **Abb. 17** die PCR-Ergebnisse der Gruppe A der Blauen Fadenfische.

Auswertung der histologischen Schnitte

Die nach Grocott und HE-gefärbten histologischen Schnitte wurden auf das Vorhandensein des für das EUS charakteristischen pathohistologischen Bildes, welches im Nachweis von Hyphen und den typischen mykotischen Granulomen besteht, untersucht. Die Zellwände des Erregers stellen sich bei der Grocott-Reaktion schwarz dar.

5.1. Blaue Fadenfische

Sowohl bei den Versuchsgruppen als auch bei der Kontrollgruppe waren von Tag 1 – 3 p. i. Rötungen und Schuppenverluste und ab Tag 4 p. i. bei einzelnen Fadenfischen eine Dunkelfärbung im Bereich der Injektionsstellen zu sehen. An Tag 6 p. i. zeigte der erste Fadenfisch (Versuchsgruppe C) Verhaltensauffälligkeiten, die sich als Schaukelbewegungen in Form kontinuierlichen Vorwärts- und Rückwärtswippens ausdrückten. Dieses Symptom konnte ab Tag 7 p. i. auch bei anderen Fadenfischen der Versuchsgruppen beobachtet werden. Deutliche Rötungen im Injektionsbereich traten ab Tag 7 p. i. bei den Versuchsgruppen auf,

ulzerative Hautläsionen (**Abb. 14**) konnten erstmals an Tag 8 p. i. beobachtet werden.

Abb. 14: Ulzerative Hautläsion im Injektionsbereich

An Tag 6 p. i. konnte erstmals das EUS-charakteristische histopathologische Bild (**Abb. 15 und 16**) in Form mykotischer Granulome bei einem Fadenfisch nachgewiesen werden.

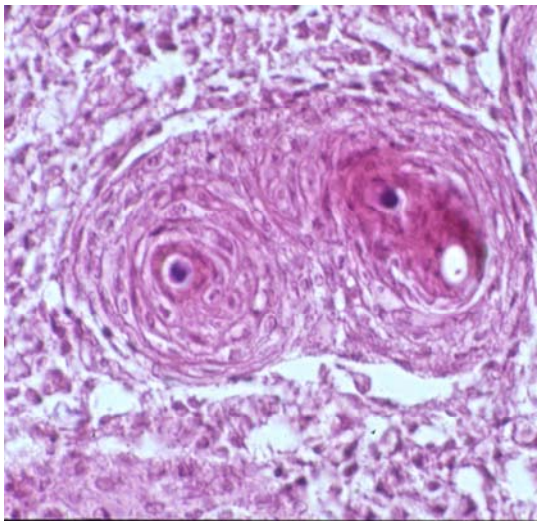

Abb. 15:
EUS-typisches mykotisches Granulom , bestehend aus mehreren Lagen Epitheloidzellen, umgeben von einem angedeuteten Ring Fibroblasten. Blauer Fadenfisch, Tag 12 p. i., HE-Färbung, 400x

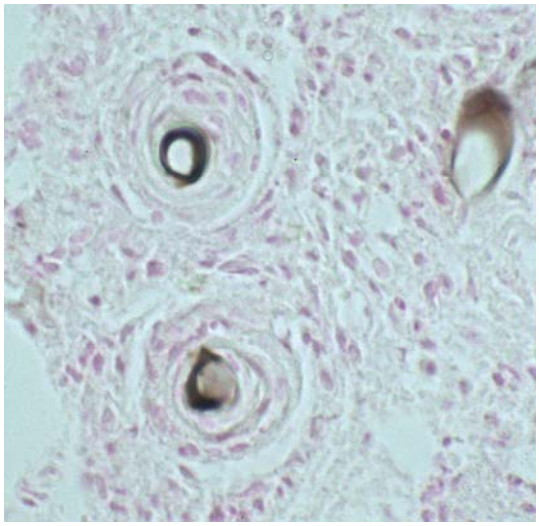

Abb. 16:
Angefärbte Hyphen von *Aphanomyces invadans* im Zentrum der mykotischen Granulome. Blauer Fadenfisch, Tag 12 p. i., Grocott-Färbung, 400x

Dieses trat in der Folge bei allen Tieren mit makroskopisch sichtbaren Hautläsionen mit Ausnahme eines Fadenfisches und insgesamt bei 18 der 36 infizierten Fadenfische auf. Bei dieser Ausnahme handelte es sich um einen Fadenfisch, der an Tag 8 der Versuchsgruppe C entnommen wurde. Das Tier war verendet und wies eine 4 x 4 mm große Hautulzeration auf. Mithilfe der Grocott-Reaktion konnten bei diesem Tier Hyphen in der Muskulatur nachgewiesen werden. Bei allen 18 Fadenfischen, bei denen mykotische Granulome auftraten, waren bei Grocott-gefärbten histologischen Schnitten auch Hyphen zu sehen.

Bei allen drei Versuchsgruppen konnten ab dem ersten Entnahmezeitpunkt an Tag 1 p. i. mit der PCR-Untersuchung positive Ergebnisse erzielt werden. Bei insgesamt 29 von 36 Tieren gelang der Erregernachweis und es zeigten sich in der (Semi)-Nested PCR Banden im erwarteten Größenbereich. **Abb. 17** zeigt exemplarisch das Gelbild der Versuchsgruppe A der Blauen Fadenfische.

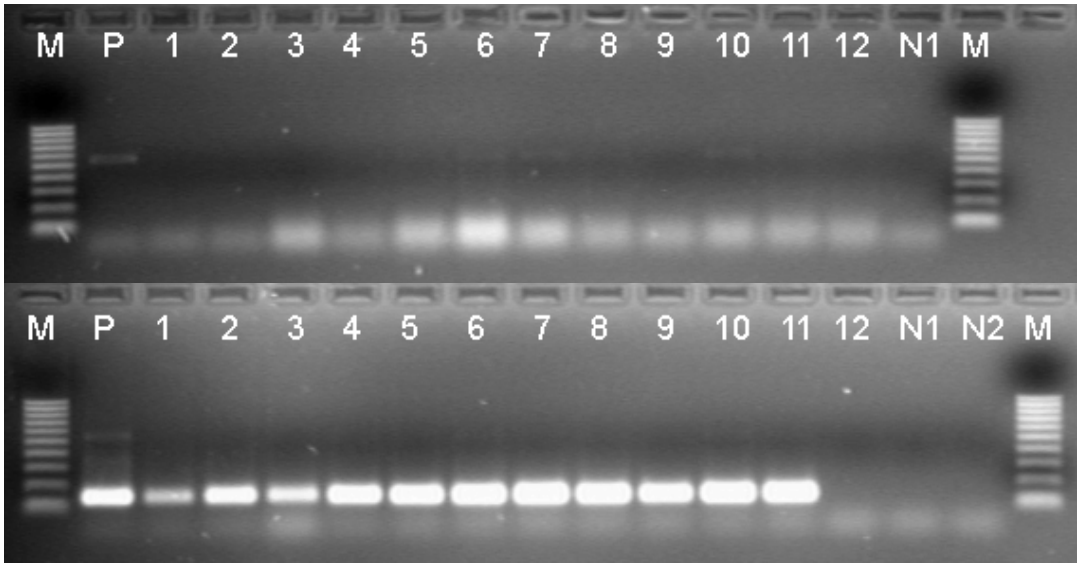

Abb. 17: PCR-Ergebnisse der Versuchsgruppe **A** der Blauen Fadenfische, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

M: DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter); **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **P:** Positivkontrolle; **1 - 12:** Entnahmenummer

Bei der Kontrollgruppe konnten abgesehen von Rötungen an den ersten vier Tagen p. i. und einer Dunkelfärbung im Bereich der Injektionsstelle ab Tag 4 bei einzelnen Tieren keine weiteren klinisch auffälligen Befunde erhoben werden. Bei der histopathologischen Untersuchung der Kontrollgruppe konnten weder Hyphen noch eine granulomatöse zelluläre Entzündungsreaktion nachgewiesen werden. Bei der PCR-Untersuchung traten keinerlei Banden auf.

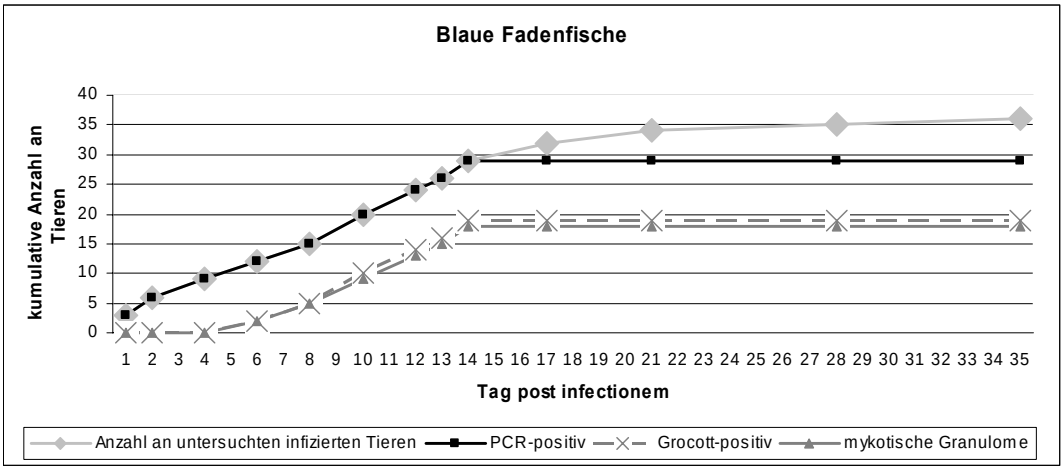

Abb. 18: Positive Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Versuchsverlauf bei den Blauen Fadenfischen

5.2. Europäische Welse

Ab Tag 2 p. i. stellte sich die Körperoberfläche der Welse der Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe im Bereich der Injektionsstellen geringgradig aufgetrieben dar, was sich bei den Tieren der Versuchsgruppen ab Tag 6 p. i. deutlich stärker ausgeprägt zeigte. An Tag 8 p. i. konnte erstmals eine ulzerative Hautläsion bei einem Wels beobachtet werden. Ein deutlich beeinträchtigtes Allgemeinbefinden konnte erstmals an Tag 10 p. i. bei dem Wels mit der Entnahmenummer 6 der Versuchsgruppe B festgestellt werden. Dieses Tier sonderte sich von den anderen Tieren ab und wies im Bereich der Injektionsstelle eine 6 x 5 mm große, zentral weißliche Ulzeration mit geröteter Umgebung sowie eine Skoliose auf (**Abb. 19**).

Abb. 19: Ulzerative Hautläsion und eine Skoliose der Wirbelsäule bei einem Wels, der an Tag 10 p. i. der Versuchsgruppe B entnommen wurde

Bei der histopathologischen Untersuchung konnte bei keinem der infizierten Welse das für das EUS charakteristische histopathologische Bild in Form mykotischer Granulome nachgewiesen werden. Stattdessen trat eine diffuse granulomatöse Entzündungsreaktion auf, die aus einer losen Anordnung von Makrophagen, wenigen Lymphozyten und Riesenzellen vom Langhanstyp, die sich ab Tag 10 p. i. am Entzündungsgeschehen beteiligten, bestand (**Abb. 20** und **21**).

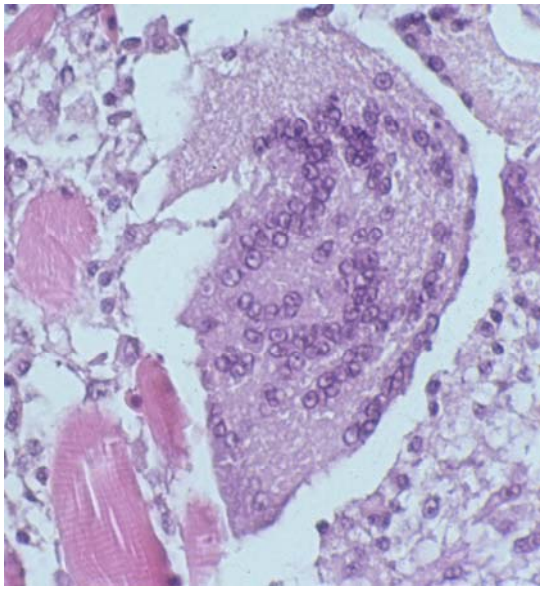

Abb. 20:
Weitgehender Ersatz der Muskelfasern durch eine lose Anordnung von Entzündungszellen, vornehmlich Makrophagen mit wenigen Lymphozyten und Riesenzellen, vereinzelt liegende degenerierte Muskelfasern.
Europäischer Wels, Tag 10 p. i. , HE-Färbung, 400x

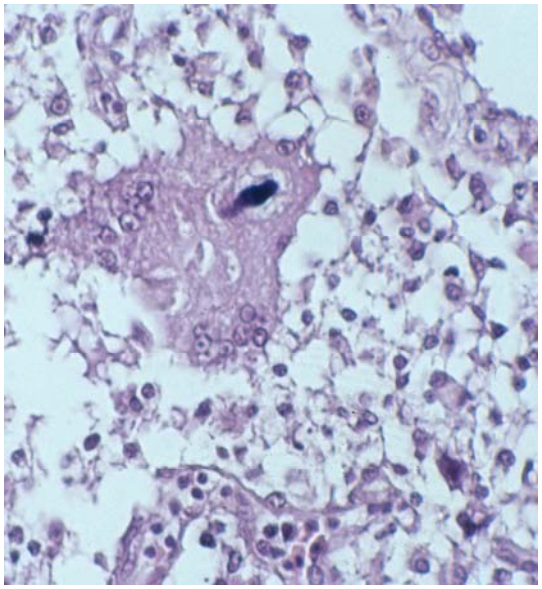

Abb. 21:
Lokalisiert vollständiger Ersatz der Muskulatur durch Riesenzellen, Makrophagen und Lymphozyten. Europäischer Wels, Tag 17 p. i., HE-Färbung, 400x

In den nach Grocott gefärbten histologischen Schnitten konnten ab Tag 4 p. i. und insgesamt bei 16 Welsen Hyphen nachgewiesen werden. Ab Tag 11 p. i. waren alle Tiere, die klinische Hautveränderungen aufwiesen, PCR- und Grocott-positiv.

Bereits zum ersten Entnahmezeitpunkt an Tag 1 p. i. konnten positive PCR-Ergebnisse erzielt werden. Bei insgesamt 29 von 36 Tieren konnten in der (Semi)-Nested PCR Banden im erwarteten Größenbereich detektiert werden. Die Fische der Kontrollgruppe zeigten keine Banden im erwarteten Größenbereich. Bei den Welsen der Kontrollgruppe konnten abgesehen von vereinzelt aufgetretenen geringgradig aufgetriebenen Injektionsstellen keine klinischen Auffälligkeiten beobachtet werden. Bei keinem der Tiere der Kontrollgruppe konnten Hyphen oder eine granulomatöse Entzündungsreaktion nachgewiesen werden.

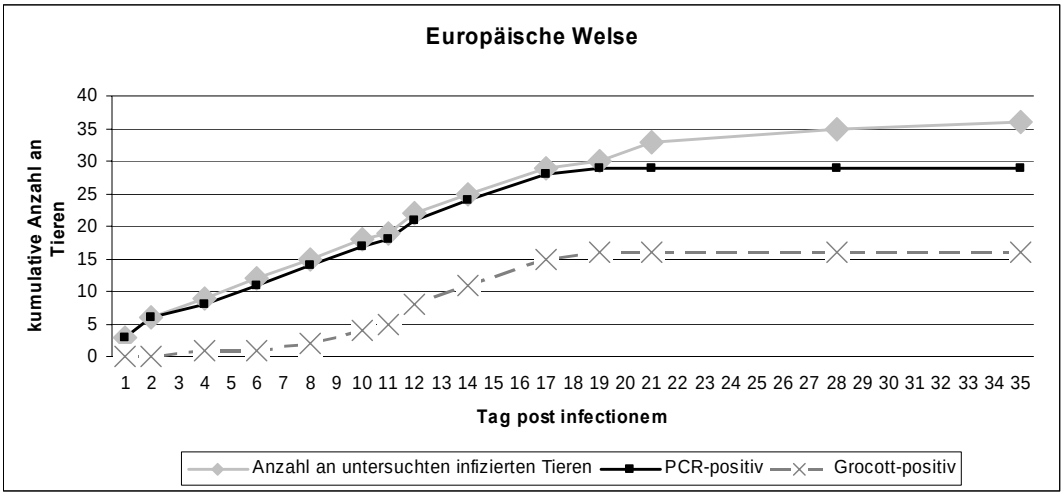

Abb. 22: Positive Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Versuchsverlauf bei den Europäischen Welsen

5.3. Regenbogenforellen

In den ersten 3 Tagen p. i. konnten weder bei den Versuchsgruppen noch bei der Kontrollgruppe Auffälligkeiten beobachtet werden. An Tag 4 p. i. wies eine Forelle der Versuchsgruppe B eine geringgradig aufgetriebene und aufgehellte Injektionsstelle auf. In der Folgezeit zeigten sich nur in Einzelfällen makroskopisch feststellbare Veränderungen in Form von Schuppenverlusten, Hämorrhagien und geringgradigen bis deutlichen Auftreibungen im Bereich der Injektionsstelle (**Abb. 23**).

An Tag 21 p. i. zeigte die Forelle mit der Entnahmenummer 10, die der Versuchsgruppe B entnommen wurde, abnorme Schwimmbewegungen. Im Bereich der Injektionsstelle waren eine Skoliose und eine deutliche Auftreibung mit herausragenden Hyphen festzustellen. Mit Ausnahme dieses Tieres konnten während des gesamten Versuchszeitraums bei den drei Versuchsgruppen keine Verhaltensauffälligkeiten und Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens beobachtet werden. Dasselbe gilt für die Tiere der Kontrollgruppe, bei denen keinerlei klinische Veränderungen festgestellt werden konnten.

Abb. 23: Aufgetriebener und hämorrhagischer Bereich im Injektionsbereich bei einer Regenbogenforelle

Ab Tag 14 p. i. zeigte sich das charakteristische histopathologische Bild des EUS mit angefärbten Hyphen in der Grocott-Reaktion, umgeben von ein- bis mehrschichtigen Lagen von Makrophagen, welches vereinzelt bis Tag 28 p. i. und insgesamt bei vier Tieren auftrat (**Abb. 24**). In der Muskulatur lokalisierte Hyphen konnten mit der Grocott-Reaktion vereinzelt ab Tag 6 p. i. und bei insgesamt zehn Tieren nachgewiesen werden. Bei einer an Tag 28 entnommenen Forelle konnten oberflächlich auf der Epidermis gelegene Hyphen angefärbt werden. Bei diesem Tier waren keinerlei makroskopische Veränderungen sichtbar, die PCR-Untersuchung verlief negativ und die histopathologische Untersuchung zeigte keinerlei entzündliche Prozesse. Das histopathologische Bild der Kontrolltiere blieb ohne besonderen Befund.

Innerhalb der ersten 28 Tage des Versuchszeitraumes wurden 14 Forellen PCR-positiv getestet. Darunter befanden sich alle Tiere, bei denen Hyphen in der Muskulatur nachgewiesen werden konnten. Die Fische der Kontrollgruppe waren allesamt PCR-negativ.

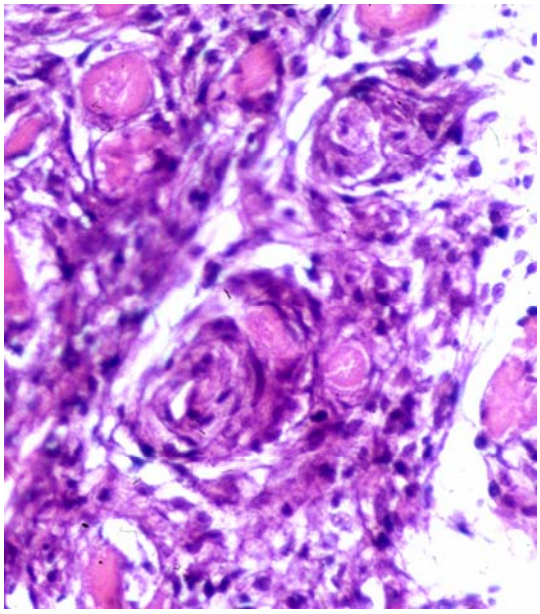

Abb. 24:
Beginnende Formation von mykotischen Granulomen in der Muskulatur.
Regenbogenforelle, Tag 21 p. i., HE-Färbung, 400x

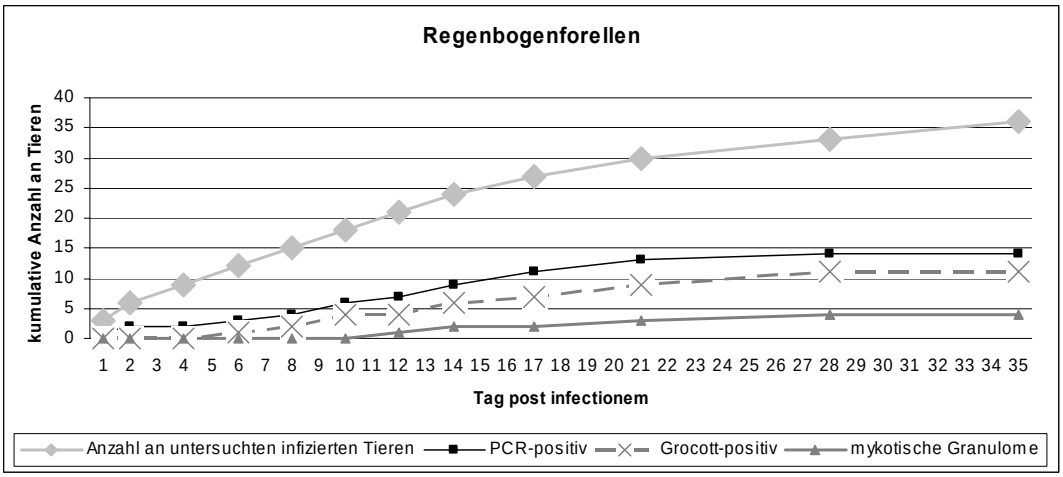

Abb. 25: Positive Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Versuchsverlauf bei den Regenbogenforellen

5.4. Europäische Aale

Während des gesamten Versuchszeitraums konnten weder bei den drei Versuchsgruppen noch bei der Kontrollgruppe Verhaltensauffälligkeiten oder Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens beobachtet werden. Makroskopisch sichtbare Hautveränderungen beschränkten sich auf eine Rötung der Injektionsstelle bei dem Aal mit der Entnahmenummer 2, der an Tag 2 p. i. der Versuchgruppe A entnommen wurde und auf Pigmentierungen der Haut im Injektionsbereich, die ab Tag 10 p. i. bei allen drei Versuchsgruppen und ebenso bei der Kontrollgruppe vereinzelt auftraten. Ulzerative Hautläsionen konnten während des gesamten Versuchszeitraums bei keinem Aal beobachtet werden.

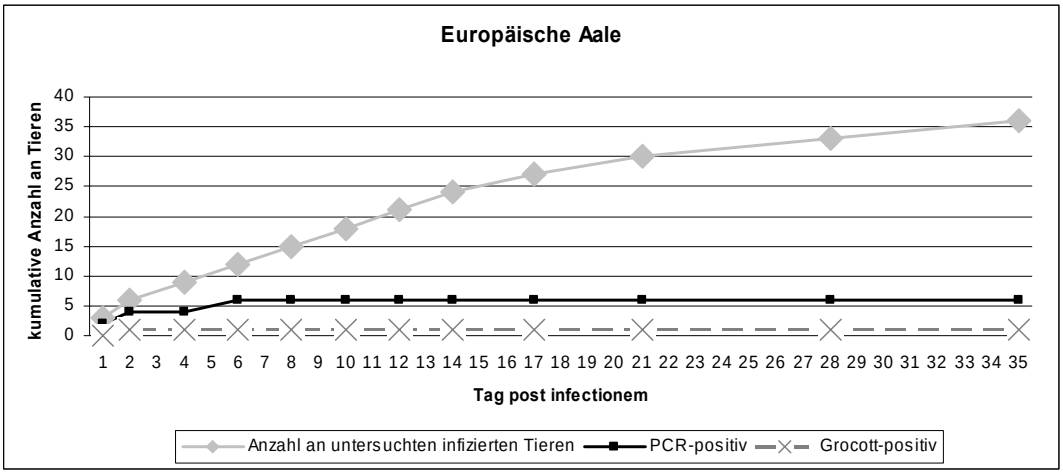

Abb. 26: Positive Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Versuchsverlauf bei den Europäischen Aalen

Bei dem Aal, der die Rötungen im Injektionsbereich aufwies, konnten mittels der Grocott-Reaktion lokalisiert in der Tiefe der Muskulatur wenige Hyphen nachgewiesen werden ohne eine erkennbare granulomartige zelluläre Entzündungsreaktion. Bei allen übrigen Tieren einschließlich der Kontrollgruppe konnten weder Hyphen noch eine Entzündungsreaktion oder mykotische Granulome nachgewiesen werden.

Innerhalb der ersten sechs Tage des Versuchszeitraums ergaben sich bei sechs Aalen schwach positive Banden im erwarteten Größenbereich, darunter befand sich auch das Grocott-positive Tier. Nach Tag 6 p. i. konnte *Aphanomyces invadans* bei keinem Aal der Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Sämtliche Fische der Kontrollgruppe waren PCR-negativ.

5.5. Vergleich von diagnostischer Sensitivität und Spezifität der PCR-Untersuchung und der histopathologischen Untersuchung anhand der Versuchsgruppe der Blauen Fadenfische

Neben der analytischen Sensitivität und Spezifität lässt sich auch die diagnostische Sensitivität und Spezifität bestimmen. Die Beurteilung eines diagnostischen Tests ist wichtig, um die Aussagekraft (predictive value) eines Tests einschätzen zu können. Dabei wird der zu überprüfende Test entweder gegen einen goldenen Standard verglichen oder, sofern der Status des getesteten Tieres bekannt ist, wird das Testergebnis mit dem bekannten Infektionsstatus in Relation gesetzt (PFEIFFER, 2002).
Die Sensitivität ergibt sich aus dem Anteil der positiv getesteten Tiere an der Gesamtheit der infizierten Tiere. Sie drückt die Fähigkeit einer Methode aus, erkrankte Tiere korrekt zu erfassen und gibt einen Anhaltspunkt, wie viele falsch negative Ergebnisse erwartet werden können. Die Spezifität ergibt sich aus dem Anteil der negativ getesteten Tiere an der Gesamtheit der nicht infizierten Tiere. Sie drückt die Fähigkeit der Methode aus, nicht erkrankte Tiere korrekt zu erfassen und gibt einen Anhaltspunkt, wie viele falsch positive Ergebnisse erwartet werden können.

Tabelle 11: PCR-Ergebnisse der Fadenfische

	Infiziert	**Nicht infiziert**	**Total**
Positives PCR-Ergebnis	29	0	29
Negatives PCR-Ergebnis	7	12	19
Total	36	12	48

Sensitivität = 29 : (29 + 7) = 0,805

Spezifität = 12 : (12 + 0) = 1,0

Tabelle 12: Ergebnis der histopathologischen Untersuchung der Fadenfische

	Infiziert	**Nicht infiziert**	**Total**
Positives Ergebnis der histopathologischen Untersuchung	18	0	18
Negatives Ergebnis der histopathologischen Untersuchung	18	12	30
Total	36	12	48

Sensitivität = 18 : (18 + 18) = 0,5

Spezifität = 12 : (12 + 0) = 1,0

Aus den Werten in **Tabellen 11** und **12** ergibt sich für die PCR-Untersuchung eine Sensitivität von 80 % und für die histopathologische Untersuchung eine Sensitivität von 50 %. Die Spezifität liegt für beide Methoden bei 100 %.

Tabelle 13: Gegenüberstellung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Untersuchung und der histopathologischen Untersuchung

	Sensitivität	**Spezifität**
PCR-Untersuchung	80 %	100 %
Histopathologische Untersuchung	50 %	100 %

V. Diskussion

1. Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für *Aphanomyces invadans*

Die von der OIE empfohlene Methode zur Diagnose des EUS basiert auf der Beobachtung bestimmter klinischer Symptome und einer Bestätigung durch das histopathologische Bild (OIE, 2003). Das OIE-manual verlangt keinen direkten Erregernachweis, da die Kultivierung von *Aphanomyces invadans* regelmäßig Schwierigkeiten bereitet.

Wesentlich für eine definitive Diagnose ist jedoch die Isolierung von *Aphanomyces invadans* aus tieferen Schichten der Muskulatur oder inneren Organen (LILLEY et al., 1998; CHINABUT & ROBERTS, 1999) und eine anschließende Speziesidentifizierung. Der Grund für die problematische Anzucht besteht einerseits darin, dass *Aphanomyces invadans* ein sehr langsam wachsender, empfindlicher und kulturell anspruchsvoller Organismus ist, der sehr leicht von Kontaminanten wie anderen Oomyceten, Pilzen und Bakterien überwuchert wird. Andererseits sind nur die terminalen Hyphenenden des Erregers im befallenen Fisch intakt, während das übrige Mycel abgestorben ist (ROBERTS et al., 1993; HATAI et al., 1994; CHINABUT & ROBERTS, 1999). Die Speziesidentifizierung anhand von Reinkulturen von *Aphanomyces invadans* erfordert einen hohen Zeit- und Materialaufwand, Wissen über den Umgang mit dem Erreger und ist anhand morphologischer Kriterien alleine nicht möglich (siehe II.8.). Für weiterführende molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung der Isolate wird wiederum DNA aus Reinkulturen benötigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum Nachweis von *Aphanomyces invadans* direkt aus infiziertem Wirtsgewebe, die die Anzucht des Erregers überflüssig macht. Dazu wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt. Diese ist in der Regel sehr sensitiv

und spezifisch und das Untersuchungsergebnis kann innerhalb eines Tages ermittelt werden. Weiterhin stellt die Methode geringere Anforderungen an das Probenmaterial, da auch abgestorbenes Erregermaterial ein positives Ergebnis ergibt, solange noch intakte DNA vorliegt. PCR-Methoden wurden bereits zum Nachweis anderer Oomyceten erfolgreich angewendet (GRIFFITH & SHAW, 1998; GROOTERS & GEE, 2002; OIDTMANN et al., 2004).

1.1. Auswahl der Primer

Die für die ribosomale RNA kodierende Genregion wurde bereits häufig als Zielregion für die Konstruktion von Primern ausgewählt. Sie enthält sowohl hochkonservierte als auch hypervariable Bereiche. Während die Gensequenzen für die 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA hochkonserviert sind, sind die dazwischenliegenden Sequenzen, die internal transcribed spacer 1 und 2, hypervariabel und werden oft für die Konstruktion speziesspezifischer Primer benutzt. Die in dieser Arbeit angewendeten Primer greifen ebenfalls in diesen Bereichen. Die internal transcibed spacer sind nicht kodierend, so dass hier auftretende Mutationen während der Evolution zu keiner Beeinträchtigung einer biologischen Funktion führen, was zu einer auch zwischen nahe verwandten Spezies vergleichsweise hohen Variabilität führt. Hier gelegene Primer ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit, auch Sequenzunterschiede bei eng verwandten Spezies zu erfassen. Fast alle Eukaryoten besitzen mehr als 100 Kopien der für die ribosomale RNA kodierenden Gene (BAINBRIDGE et al., 1990), worin ein weiterer Vorteil liegt, da die Zielsequenz damit mehrfach im Genom vorkommt. Die für die ribosomale RNA kodierende Genregion wurde bereits für vergleichende Sequenzuntersuchungen der ITS-Region zur molekularbiologischen Taxonomie auf dem Spezieslevel und sogar innerhalb einer Spezies verwendet, insbesondere auch für Untersuchungen zur genetischen Diversität von *Aphanomyces invadans* (LILLEY et al., 2003).

Wichtig bei der Auswahl der Primer war, dass sich die Basensequenzen der Primer von den Sequenzen anderer Vertreter der Gattung *Aphanomyces* und anderer Oomyceten, die Hautläsionen bei Fischen besiedeln können, unterscheiden. Besonders wichtig war dabei eine Unterscheidung vom engsten Verwandten, *Aphanomyces astaci*, dem Erreger der Krebspest. Fische kommen als potentielle Vektoren für *Aphanomyces astaci* in Frage (OIDTMANN et al., 2002), wodurch die Gefahr besteht, dass in Probenmaterial für eine PCR-Untersuchung auf *Aphanomyces invadans* *Aphanomyces astaci*-DNA enthalten ist. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer BO 73, BO 487 und BO 639 sind hochspezifisch für *Aphanomyces invadans*, was die Gefahr birgt, dass unbekannte *Aphanomyces invadans*-Stämme mit geringgradigen Sequenzunterschieden nicht erkannt werden. Als Alternative böten sich weniger spezifische Primer an, bei denen das PCR-Produkt mittels Restriktionsenzymverdau anhand eines charakteristischen Bandenmusters weiter verifiziert werden kann. Das Problem hierbei sind die bei EUS-erkrankten Fischen häufig vorkommenden saprophytischen *Aphanomyces* spp., die die Oberfläche der Läsionen besiedeln (ROBERTS et al., 1993; BLAZER et al., 1999). Diese *Aphanomyces spp.* werden mit solchen Primern möglicherweise mitamplifiziert und führen zu einem nicht eindeutigen oder falsch negativen Ergebnis.

Auf die Verwendung von anderen Autoren veröffentlichter *Aphanomyces invadans*-Primer wurde verzichtet, da zum Zeitpunkt von deren Veröffentlichung diese Arbeit bereits begonnen worden war. Daneben wurde in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung einer (Semi)-Nested PCR angestrebt, was die Verwendung zweier Primerpaare erforderte, die bereits veröffentlichten Primer waren aber jeweils für eine single-round PCR konstruiert worden.

1.2. Wahl des PCR-Protokolls

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit der Entwicklung einer (Semi)-Nested PCR das Ziel verfolgt, eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Ein Nachteil bei der Verwendung einer Nested-PCR ist verbunden mit ihrer hohen Sensitivität, welche die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch eine Kontamination des PCR-Ansatzes birgt. Um dies zu vermeiden, muß höchste Aufmerksamkeit auf die Vermeidung einer Kontamination durch Handschuhe, Pipettenspitzen oder Aerosole gelegt werden. Zur Kontrolle ist das Mitführen von Negativkontrollen obligatorisch.

1.3. Bestimmung der Spezifität und der analytischen Sensitivität

Die Spezifität der beiden Primerkombinationen wurde an der DNA von sieben *Aphanomyces invadans*-Stämmen, 19 weiteren Oomyceten, drei Pilzspezies, elf Bakterienspezies, vier protozoischen Ektoparasiten und Wirts-DNA bestimmt. Hierbei ergaben alle *Aphanomyces invadans*-Stämme ein Signal im erwarteten Größenbereich von 152 bp (Primer BO 487/BO 639), bei allen anderen getesteten Organismen wurde weder in der 1. Runde noch in der (Semi)-Nested PCR ein PCR-Produkt erhalten. Die von PHADEE et al. (2004) entwickelte PCR-Methode zum Nachweis von *Aphanomyces invadans* wurde bezüglich der Spezifität ihrer Primer an insgesamt 20 verschiedenen *Aphanomyces invadans*-Stämmen und Vetretern der Gattung *Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Achlya*, *Dictyuchus* und *Lagenidium* getestet. Das Austesten dieser größeren Anzahl an *Aphanomyces invadans*-Stämmen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da weitere *Aphanomyces invadans*-Stämme nicht zugänglich waren. Jedoch zeigte sich bei molekularbiologischen Studien an *Aphanomyces invadans* ein hoher Grad an genetischer Homogenität (LILLEY et al., 1997a; LILLEY et al., 1997b; LILLEY et al., 2001a; LILLEY et al., 2003), es wird sogar eine einzige klonale Abstammung postuliert (LILLEY et al., 2003), so dass zu erwarten ist, dass

die hier verwendeten Primer bei anderen *Aphanomyces invadans*-Stämmen ebenfalls ein PCR-Produkt generieren.

Unter Verwendung des angewendeten PCR-Protokolls konnte bei Einsatz von aus *Aphanomyces invadans*-Reinkulturen isolierter DNA noch bei einer DNA-Konzentration von 10 fg/µl eine Bande detektiert werden. Da 2,5 µl DNA-template in die PCR eingesetzt wurde, entspricht dies einem tatsächlichen Nachweis von 25 fg. Die Genomgröße von *Aphanomyces invadans* ist nicht bekannt. In Orientierung an *Saprolegnia monoica*, dessen Genomgröße auf 0,051 pg geschätzt wurde (MORT-BONTEMPS & FEVRE, 1995), würde dies 0,5 genomischen Einheiten entsprechen. Die Sensitivität wurde weiterhin an aus Zoosporen isolierter DNA bestimmt. Zoosporen stellen einzellige Fortpflanzungsformen dar, somit entspricht eine Spore einer genomischen Einheit. Hierbei konnte bei Einsatz der DNA von theotretisch 0,025 Sporen noch eine Bande detektiert werden. Da in diagnostischen Proben Wirts-DNA zusätzlich zur Erreger-DNA vorhanden ist, wurde versucht, die untere Nachweisgrenze des PCR-Protokolls unter realistischen Bedingungen zu untersuchen, wozu Verdünnungen einer Zoosporensuspension zu gesundem Fischgewebe zugegeben wurden und die Probe anschließend in die DNA-Extraktion eingesetzt wurde. Hier lag die untere Nachweisgrenze bei 10 Zoosporen, die in die Extraktion eingesetzt wurden, während bei 1 Zoospore keine Bande mehr detektiert werden konnte. Die Ursache für die im Vergleich zu den obigen Ergebnissen geringere Sensitivität liegt möglicherweise in einer Konkurrenz durch die Wirts-DNA oder daran, dass bei der DNA-Extraktion Substanzen mitaufgereinigt wurden, die die nachfolgende PCR inhibieren. Davon abgesehen scheint es möglich, dass hier die angestrebte Menge von 1 Spore aufgrund von Pipettierungenauigkeiten bei der Herstellung der Verdünnungsreihen nicht in die DNA-Extraktion gelangte. Vermutlich könnte die Nachweisgrenze auch durch eine Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge oder eine Erhöhung der Zyklenzahl noch gesteigert werden.

Bei der von PHADEE et al. (2004) entwickelten PCR-Methode, deren Primer ebenfalls in der ITS-Region greifen, lag die untere Nachweisgrenze bei 250 fg reiner *Aphanomyces invadans*-DNA und entspricht einer zehnfach geringeren Nachweisgrenze im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode. Da deren Primer in derselben Zielregion wie die eigenen Primer ansetzen, wäre eine ähnliche Sensitivität der Methoden zu erwarten. Die höhere Sensitivität der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode ist sehr wahrscheinlich in der Verwendung einer (Semi)-Nested PCR begründet, während deren Methode eine single-round PCR ist. Die Methode von PHADEE et al., (2004) wurde erfolgreich an experimentell infizierten und klinisch erkrankten Goldfischen (*Carassius auratus auratus*) getestet. Die Autoren räumten jedoch ein, dass ihre Methode aufgrund einer zu geringen Sensitivität zur Erkennung früher Stadien der Erkrankung oder schwach befallener Tiere nicht geeignet ist und weisen auf die Notwendigkeit eines sensitiveren Verfahrens, beispielsweise einer Nested PCR, hin. Ein Vergleich mit der von (LILLEY et al., 2003) entwickelten PCR-Methode ist nicht möglich, da keine Angaben zu ihrer Sensitivität gemacht wurden. Davon abgesehen wurde Material aus Reinkulturen und kein infiziertes Wirtsgewebe verwendet. Die Zielregion von deren Primern war die ITS1- Region.

2. Infektionsversuche

2.1. Wahl der Fischarten

Neben der Untersuchung der PCR-Methode auf Praxistauglichkeit bestand ein weiteres Ziel der Infektionsversuche darin, Erkenntnisse zur Empfänglichkeit in Deutschland wichtiger Fischarten zu gewinnen, um abschätzen zu können, inwieweit sich ein Ausbruch des EUS in Deutschland auf diese Fischarten auswirken würde. Die zwei wirtschaftlich bedeutsamsten Nutzfischarten in Deutschland sind die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und der Karpfen (*Cyprinus carpio*). Für den Karpfen wurde gezeigt,

dass er gegenüber dem EUS unempfänglich ist (AHMED & RAB, 1995; WADA et al., 1996; LILLEY et al., 1998), weshalb die Untersuchung dieser Fischart nicht in Betracht gezogen wurde. Die Regenbogenforelle ist die wichtigste europäische Nutzfischart mit einem Anteil von 44 % an der Gesamtfischproduktion in Süß- und Meerwasser (ARIEL & OLESEN, 2002) und einer jährlichen Produktion von 25.000 Tonnen pro Jahr in Deutschland (BOHL, 1999). Die Art wurde bereits experimentell infiziert. Ab einer Infektionsdosis von 1.000 injizierten Zoosporen konnten THOMPSON et al. (1999) und KHAN et al. (1998) eine Infektion hervorrufen, im Gegensatz dazu gelang dies MARSHALL (1998) mit Sporendosen von 5.000 und 15.000 Zoosporen nicht. Aufgrund dieser uneinheitlichen Ergebnisse und wegen der Bedeutung der Regenbogenforelle für die Aquakultur fiel die Wahl auf diese Fischart.

Zwei weitere verwendete Fischarten wurden in der Vergangenheit weder experimentell infiziert noch wurden EUS-Erkrankungsfälle bekannt. Es handelt sich hierbei um den Europäischen Wels (*Silurus glanis*) und den Europäischen Aal (*Anguilla anguilla*). Beiden Arten kommt eine zunehmende Bedeutung in der Aquakultur, besonders der Haltung in sogenannten Warmwasserkreislaufanlagen und Durchlaufanlagen unter Nutzung von aufgewärmtem Betriebswasser von Kraftwerken bei bevorzugten Temperaturen von 26 °C zu (BOHL, 1999; HOFFMANN, 2005). Diese Temperaturbedingungen kommen *Aphanomyces invadans*, dessen Temperaturoptimum in vitro bei 26 - 30 °C liegt (LILLEY & ROBERTS, 1997) , sehr entgegen. Zudem werden im Übergang vom Meer- zum Süßwasser gefangene sogenannte Glasaale in Warmwasser zu Satzaalen aufgezogen und damit zahlreiche Gewässer besetzt. Hierdurch könnte der Infektionserreger im Falle einer Infektion weitläufig verbreitet werden. Weiterhin sind Aale in der Lage, über Land zu wandern und den Erreger beherbergende Tiere könnten auf diese Weise das EUS ohne menschliches Zutun in EUS-freie Gewässersysteme verbreiten.

Blaue Fadenfische (*Trichogaster trichopterus*) sind als empfänglich beschrieben (HANJAVANIT et al., 1997; CATAP & MUNDAY, 2002) und sollten als Kontrollspezies dafür dienen, ob das verwendete *Aphanomyces invadans*-Isolat NJM9701 noch ausreichende Pathogenität besaß. Es war nicht abzusehen, inwieweit die jahrelange Laborkultur die Pathogenität des *Aphanomyces invadans*-Isolates NJM9701 beeinträchtigte.

2.2. Wahl der Infektionsmethode

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen wurde den Fischen intramuskulär eine Suspension mit *Aphanomyces invadans*-Zoosporen verabreicht. Die Infektion mittels intramuskulärer Injektion einer Zoosporensuspension ist die Standardmethode, um einerseits die Pathogenität von aus EUS-erkrankten Fischen gewonnenen Isolaten zu bestimmen (OIE, 2003) und andererseits die Empfänglichkeit von Fischarten gegenüber dem EUS zu untersuchen (LILLEY et al., 2001b). Bei dieser Art der Infektion wird dem Erreger die Möglichkeit gegeben, die Abwehrmechanismen der Fischhaut vollständig zu umgehen. Dies entspricht somit nicht dem natürlichen Infektionsweg. Eine Exposition der Fische über ein Sporenbad mit freischwimmenden Zoosporen scheint eine realistischere Methode zu sein. Versuche zeigten jedoch, dass mit dieser Art der Infektion bei Fischarten wie beispielsweise Menhaden-Heringen (*Brevoortia tyrannus*) (KIRYU et al., 2003), Schlangenkopffischen (*Channa striata*) und Mrigal (*Cirrhina mrigala*) (LILLEY et al., 2001b) eine Erkrankung ausgelöst werden kann, während dies bei anderen EUS-empfänglichen Fischarten wie Silberbarben (*Puntius gonionotus*) und Speisegouramis (*Osphronemus goramy*) selbst bei Induktion einer Hautläsion nicht möglich war (LILLEY et al., 2001b). Die Ursache dafür ist nicht bekannt, zeigt aber die Bedeutung unterschiedlicher Faktoren (siehe II.6.3.) für eine Infektion mit dem Erreger.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit injizierten Sporendosen von 1000 Zoosporen bei den Fadenfischen und Aalen und 2000 Zoosporen bei den Welsen und Regenbogenforellen entsprechen in ihrer Höhe sehr wahrscheinlich nicht den Mengen an infektiösen Einheiten, denen Fische bei Infektionen unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt sind. Der für die Infektionversuche verwendete *Aphanomyces invadans*-Referenzstamm NJM 9701 war zum Zeitpunkt der Versuche über sieben Jahre in Laborkultur. Es kann von einem Pathogenitätsverlust von *Aphanomyces invadans*-Stämmen während langjähriger Laborkultur ausgegangen werden (KIRYU et al., 2002). Eine geringere Sporendosis hätte zu falsch-negativen Ergebnissen zur Empfänglichkeit bei den untersuchten Fischarten führen können. Hinzu kommt die Möglichkeit, dass ein gewisser Anteil der Sporensuspension nach der Injektion aus dem Injektionskanal entweicht. Nicht praxisrelevante Ergebnisse zur Empfänglichkeit können bei einer sehr hohen Dosis nicht ausgeschlossen werden. Bei Infektionsversuchen mit gegenüber dem EUS unempfänglichen Fischarten konnte aber selbst mit hohen Sporendosen keine Erkrankung ausgelöst werden. So führte weder eine intramuskuläre Infektion von Karpfen (*Cyprinus carpio*) mit 3000 Zoosporen des Isolates NJM8997 (WADA et al., 1996) noch eine intramuskuläre Infektion von Tilapien (*Oreochromis niloticus*) mit 1000 Zoosporen des Isolates PA7 zu klinischen Symptomen (KHAN et al., 1998). In beiden Studien konnte mit den verwendeten *Aphanomyces invadans*-Stämmen bei anderen Fischarten die Erkrankung ausgelöst werden.

Ein Vergleich auf der Grundlage von Sporendosen alleine ist nicht aussagekräftig, da die Auswahl des Isolates bei einer bestimmten Fischart und die Zeitdauer der Laborkultur womöglich zu unterschiedlicher Virulenz führen. So verwendeten KIRYU et al. (2002) bei Versuchen mit Menhaden-Heringen die *Aphanomyces invadans*-Stämme WIC und PA7. Der Stamm WIC stellte sich als bei Menhaden-Heringen pathogener heraus. Die Autoren erklärten sich dies zum einen damit, dass das Isolat WIC sich kürzere Zeit in Laborkultur befand, zum anderen damit, dass WIC von einem Menhaden-

Hering isoliert wurde und somit besser an die Fischart und an die Brackwasserbedingungen, unter denen der Versuch stattfand, angepasst war. Im Gegensatz dazu stammte das Isolat PA7 von einem Schlangenkopffisch aus dem Süßwasser. Bei der Versuchsanordnung spielen weitere Faktoren, die möglicherweise einen Einfluß auf die Infektion haben und von denen einige noch nicht klar identifiziert sind, eine Rolle. Ein Versuchsansatz könnte möglicherweise dadurch verbessert werden, dass man die Virulenz von *Aphanomyces invadans*-Stämmen, die man testet, zuvor durch Fischpassage möglicherweise verbessert. Bislang wurde dieser Aspekt für *Aphanomyces invadans* noch nicht näher untersucht. Ergebnisse einer solchen Untersuchung würden helfen, Anhaltspunkte dafür zu bekommen, ob die in vitro Kultivierung über längere Zeit tatsächlich die Virulenz von *Aphanomyces invadans* beeinträchtigt.

2.3. Empfänglichkeit der untersuchten Fischspezies

Blauer Fadenfisch

Den Beweis für die erfolgte Infektion lieferten die klinischen Befunde sowie die postitiven Ergebnisse der PCR- und der pathohistologischen Untersuchung. Der Verlauf und die Schwere der Infektion entspricht weitgehend den Ergebnissen von CATAP & MUNDAY (2002), wobei diese mit 85 intramuskulär injizierten Zoosporen des *Aphanomyces invadans*-Isolates 24P pro Fisch eine deutlich geringere Dosis wählten. Die EUS-charakteristische Wirtsreaktion auf *Aphanomyces invadans* konnte in deren Studie zu einem früheren Zeitpunkt p. i. als in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Bereits ab Tag 4 konnten von den Autoren Hyphen in Dermis und Muskulatur, eingeschlossen von mehreren Lagen Epitheloidzellen, nachgewiesen werden. Dies gelang bei den in dieser Arbeit untersuchten Fadenfischen erst ab Tag 6 p. i. Der Grund liegt sehr wahrscheinlich in der um 3 - 4 °C höheren Wassertemperatur von 26 - 27 °C

bei deren Studie. Anhand von Infektionsversuchen bei Schlangenkopffischen mit unterschiedlichen Temperaturen konnte gezeigt werden, dass die Wirtsreaktion auf den Erreger bei höheren Temperaturen schneller und stärker ausgeprägt stattfindet (CHINABUT et al., 1995).

Europäischer Wels

In den bisher vom EUS betroffenen Regionen hat der Europäische Wels kein natürliches Verbreitungsgebiet und spielt dort auch in der Aquakultur keine Rolle. Infoldedessen liegen für diese Fischart keine Berichte über eine Beteiligung bei natürlichen EUS-Ausbrüchen vor und es gibt auch keine Untersuchungen, ob die Fischart experimentell infizierbar ist. In der vorliegenden Arbeit konnten bei 44 % der infizierten Welse invasiv wachsende Hyphen in der Muskulatur nachgewiesen werden. Ein Einschluß der vordringenden Hyphen in Form mykotischer Granulome, was laut zahlreicher Autoren charakteristisch für das EUS ist, trat jedoch nicht auf. Stattdessen trat eine eher diffuse granulomatöse Entzündung mit vornehmlicher Beteiligung von Makrophagen und im späteren Verlauf der Infektion einer Beteiligung von Riesenzellen am Entzündungsgeschehen auf. Die Ergebnisse zeigten, dass *Aphanomyces invadans* in der Muskulatur von Europäischen Welsen wachsen kann. Aufgrund des klinischen und pathohistologischen Bildes kann gesagt werden, dass beim Europäischen Wels durch eine Zoosporeninjektion ein EUS-analoges Krankheitsbild ausgelöst werden kann.

Von zwei Vertretern der Welsartigen aus der Familie der Ictaluridae, dem Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) und dem Schwarzen Katzenwels (*Ameiurus melas*), sind natürliche EUS-Fälle beschrieben (HAWKE et al., 2003). Auch hier fehlte der Einschluß der Hyphen in Form mykotischer Granulome. Die Autoren beschrieben eine eher diffuse granulomatöse Entzündung bei den EUS-befallenen Tieren, vorwiegend bestehend aus

Makrophagen und wenigen Lymphozyten und Plasmazellen. Mit dem gewonnenen *Aphanomyces invadans*-Isolat konnten die Autoren bei Gabelwelsen im Tierversuch erfolgreich das EUS auslösen. Die übereinstimmenden klinischen und histopathologischen Befunde der vorliegenden Arbeit und der Untersuchungen von HAWKE et al. (2003) können auf ein unterschiedliches immunologisches Reaktionsmuster bei Siluriformes hindeuten.

Europäischer Aal

Bei keinem der Aale aus den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit traten makroskopisch sichtbare Hautulzerationen auf. Histologisch konnten ebenso keine pathologischen Veränderungen beobachtet werden, abgesehen von einzelnen, womöglich direkt aus dem Infektionsmaterial stammenden Hyphen bei einem Aal an Tag 2 p. i., auf die jedoch keine erkennbare zelluläre Wirtsreaktion zu erkennen war. Es gibt keinerlei Untersuchungen bezüglich des EUS bei dieser Fischart. Zur Interpretation der Ergebnisse ist aber eine Orientierung an Fischarten möglich, die bei EUS-Ausbrüchen nicht in Mitleidenschaft gezogen wurden und somit als unempfänglich gegenüber dem EUS angesehen werden. Experimentelle Daten liegen zu Karpfen und Tilapien vor. Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurden von WADA et al. (1996) intramuskulär mit Zoosporen infiziert. Dabei konnten trotz einer hohen Dosis von 3000 injizierten Zoosporen pro Fisch keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen beobachtet werden. Bei der histopathologischen Untersuchung zeigten sich Hyphen, die auf den Injektionsbereich beschränkt blieben und ab Tag 15 p. i. von mykotischen Granulomen umschlossen waren. KHAN et al. (1998) injizierten Tilapien (*Oreochromis niloticus*) intramuskulär 1000 Sporen. Siebzehn von zwanzig Tieren zeigten keine pathologischen Veränderungen. Bei drei Tilapien konnten geringgradige Schwellungen im Injektionsbereich festgestellt werden, zwei dieser Tiere starben nach 20 bzw. 21 Tagen. Die

histopathologische Untersuchung der beiden Tiere zeigte eine deutliche granulomatöse Reaktion mit Hyphen innerhalb der mykotischen Granulome. Die Autoren schlossen daraus, dass *Aphanomyces invadans* bei immunsupprimierten Tilapien zu einer Infektion führen kann, betrachteten die Fischart aber weiterhin als unempfänglich. Der auf einen Aal an Tag 2 p. i. beschränkte Nachweis von Hyphen, fehlende klinische Anzeichen und fehlende EUS-typische pathologische Veränderungen lassen vermuten, dass Europäische Aale nicht oder wenig empfänglich gegenüber einer natürlichen EUS-Infektion sind. Bei der PCR-Untersuchung konnte ab Tag 6 p. i. bei keinem Aal mehr der Erreger nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es den Tieren innerhalb kurzer Zeit gelungen ist, ein Ausbrechen der Infektion erfolgreich zu bekämpfen, ohne dass der Erreger die Möglichkeit hatte, in der Muskulatur zu wachsen.

Regenbogenforellen

Die beobachteten klinischen Veränderungen waren bei den Regenbogenforellen während des gesamten Versuchszeitraums geringgradig ausgeprägt und beschränkten sich auf aufgetriebene und hämorrhagische Bereiche, die von weitgehend intakter Haut bedeckt waren. Es traten keine Todesfälle auf. Tiefergehende ulzerative Läsionen waren nicht zu sehen. Obwohl histopathologisch von Tag 6 bis Tag 28 p. i. Hyphen nachgewiesen werden konnten, konnten die für das EUS charakteristischen mykotischen Granulome erst ab Tag 12 p. i. und insgesamt nur bei vier Forellen festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die Wassertemperatur von 18 °C ein Grund für das späte und bei einer geringen Anzahl von Tieren nachgewiesene Auftreten der mykotischen Granulome ist. Das Immunsystem von Regenbogenforellen arbeitet bei dieser Temperatur sehr gut, während die Temperatur dem Erreger, dessen Wachstumsoptimum in vitro bei 26 - 30 °C liegt, vermutlich weniger entgegenkommt.

THOMPSON et al. (1999) infizierten Regenbogenforellen intramuskulär mit Zoosporen des *Aphanomyces invadans*-Isolates PA7 und verwendeten zur Injektion verschiedene Sporendosen. Bei einer mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Dosis von 1000 Zoosporen konnten keine sichtbaren Hautläsionen beobachtet werden, bei 48 % dieser Forellen konnten mittels immunhistochemischer Färbung Hyphen nachgewiesen werden. Bei zwei von 25 Forellen führte die Infektion zum Tod. Es wurden keine Angaben dazu gemacht, ab welchem Zeitpunkt p. i. und in welchem Ausmaß die mykotischen Granulome nachweisbar waren. Bei einer Sporendosis von 100 Zoosporen traten im Versuchsverlauf weder sichtbare Hautläsionen auf noch konnten immunhistochemisch Hyphen nachgewiesen. Erst bei Sporendosen von 10.000 und 100.000 Zoosporen konnten makroskopisch sichtbare Hautläsionen beobachtet werden. In einer weiteren Studie zur Empfänglichkeit von Regenbogenforellen konnten bei vergleichbaren Bedingungen (Wassertemperatur von 18 °C, Sporendosis betrug 1000 Zoosporen) ab Tag 10 p. i. mykotische Granulome beobachtet werden (KHAN et al., 1998). Todesfälle traten ab Tag 14 p. i. auf. Zu klinischen Erscheinungen wurden keine Angaben gemacht und es wurde nicht erwähnt, wie hoch der Prozentsatz der histopathologischen Veränderungen und der an der Infektion gestorbenen Tiere lag.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei einer Forelle mit der Grocott-Reaktion Hyphen in der Epidermis dargestellt werden. Mykotische Granulome oder eine granulomatöse Wirtsreaktion konnten nicht nachgewiesen werden. Die PCR-Untersuchung fiel bei diesem Tier negativ aus. An diesem Fall zeigt sich die eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich des Infektionserregers bei dieser Färbemethode. Es ist anzunehmen, dass es sich hier um eine auf die Epidermis beschränkte Besiedlung mit ubiqitär vorkommenden Oomyceten handelt, die EUS-Läsionen häufig sekundär besiedeln (ROBERTS et al., 1993; BLAZER et al., 1999).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich für Regenbogenforellen keine eindeutigen Schlüsse ziehen. Zwar traten nur bei wenigen Forellen klinische Veränderungen auf, die zudem geringgradig ausgeprägt waren, es konnten jedoch bei elf Tieren und bis Tag 28 p. i. Hyphen in der Muskulatur nachgewiesen werden. Da es diesen Regenbogenforellen folglich nicht gelang, den Erreger in diesem Zeitraum zu eliminieren, könnte die Regenbogenforelle zumindest als Carrier für *Aphanomyces invadans* fungieren. Unter bestimmten Bedingungen, die z. B. zu einer Immunsuppression führen, können vermutlich auch Regenbogenforellen am EUS erkranken.

Allgemeine abschließende Betrachtung der Ergebnisse der Infektionsversuche

Die Ergebnisse dieser Studie liefern klare Hinweise dafür, dass Europäische Welse gegenüber dem EUS empfänglich sind. Regenbogenforellen und Europäische Aale scheinen nicht oder nur geringgradig empfänglich zu sein. Zu beachten ist allerdings die beschränkte Anzahl an Versuchstieren. Die Empfänglichkeit könnte unter anderen Bedingungen möglicherweise höher sein. Eine Veränderung einzelner Parameter der Versuchsanordnung wäre erforderlich, um diesbezüglich eine bessere Aussage machen zu können. Es könnten andere *Aphanomyces invadans*-Stämme, frisch isolierte Stämme oder solche, deren Virulenz durch Fischpassage wieder erhöht wurde, verwendet werden. Weitere Möglichkeiten der Variierung von Versuchsparametern wäre ein Miteinbeziehen von Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluß auf den Infektionsverlauf beim EUS haben. Zu nennen wären hier variierende Infektionsdosen, niedrigere oder rasch absinkende Wassertemperaturen, eine Veränderung der Salinität oder eine zusätzliche Belastung der Versuchsfische durch Co-Pathogene wie Bakterien oder Viren.

2.4. Vergleich von diagnostischer Sensitivität und Spezifität der PCR-Untersuchung und der histopathologischen Untersuchung anhand der Versuchsgruppen der Blauen Fadenfische

Die Ergebnisse der Infektionsversuche zeigten, dass der Erreger mittels PCR bereits zu einem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte, zu dem bei der histopathologischen Untersuchung einschließlich der Grocott-Reaktion noch keine Hyphen dargestellt werden konnten und die pathologischen Veränderungen noch nicht dem EUS-charakteristischen Bild entsprachen. Hierin liegt vermutlich der Grund für die geringere Sensitivität der histopathologischen Untersuchung gegenüber der PCR-Untersuchung. In den Anfangsstadien der Infektion können auch bei natürlichen Infektionen Hyphen nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden (CALLINAN et al., 1989; VISHWANATH et al., 1997), was daran liegen könnte, dass frühe Hyphenstadien zu wenig Mucopolysaccharide, die mit der Grocott-Reaktion sichtbar gemacht werden, produzieren (MILES et al., 2003). Weiterhin ist der Nachweis der Hyphen bei natürlichem Infektionsweg im Anfangsstadium auf die Epidermis und die Dermis beschränkt. Eine Unterscheidung von wundparasitierenden Oomyceten ist an Grocott-gefärbten histologischen Präparaten nicht möglich.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der PCR-Methode um einen reinen Erregernachweis handelt und sie keine Aussagen über das Ausmaß der Infektion macht, während die histopathologische Untersuchung die durch den Erreger verursachten pathologischen Veränderungen auch qualitativ darstellt. Jedoch ist der Nachweis hyphenartiger Strukturen alleine unspezifisch in Hinblick auf den Erreger. Er kann von einer Vielzahl von Oomyceten und Pilzen herrühren. Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung konnten MILES et al. (2003) an histologischen Schnitten von EUS-infizierten Schlangenkopffischen *Aphanomyces invadans*-Strukturen darstellen. 58 % der 48 untersuchten Fische ergaben ein positives Ergebnis, zum Vergleich wurden diese Proben nach Grocott gefärbt, bei denen bei 48 % der Fische

Hyphen angefärbt werden konnten. Angaben dazu, zu welchen Zeitpunkten p. i. die Fische untersucht wurden, wurden nicht gemacht, was einen direkten Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nicht sinnvoll erscheinen läßt.

PHADEE et al. (2004) testeten ihre PCR-Methode an experimentell mit *Aphanomyces invadans* infizierten Goldfischen und konnten den Erreger bei allen Tieren nachweisen, entnahmen jedoch die Fische erst bei Auftreten von deutlichen Hautläsionen für die PCR-Untersuchung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei klinisch erkrankten Tieren im Bereich der Läsionen deutlich mehr Erregermaterial als im Anfangsstadium der Infektion vorhanden ist. Da bei den eigenen Untersuchungen bereits Fische in der Inkubationszeit entnommen wurden, läßt sich schwer vergleichen, welche der beiden Methoden den Erreger an infizierten Fischen sensitiver nachweist.

3. Abschließende Betrachtung und Ausblick

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten PCR-Methode zum Nachweis von *Aphanomyces invadans* steht ein zuverlässiges Diagnoseverfahren bereit, mit dem der Erreger mit wenig Zeit- und Materialaufwand direkt aus Fischgewebe nachgewiesen werden kann. Der Nachweis des Erregers gelang bei den Blauen Fadenfischen ab dem ersten Entnahmezeitpunkt einen Tag nach der Infektion.

Es besteht die berechtigte Hoffnung, dass das entwickelte Nachweisverfahren von *Aphanomyces invadans*, dem ursächlichen Infektionserreger des EUS, Verwendung in der Routinediagnostik finden kann. Aufgrund der hohen Sensitivität des Verfahrens wäre ein Screening von Fischsendungen auf das Vorhandensein von *Aphanomyces invadans*, die für die Aquakultur und den Zierfischmarkt nach Deutschland eingeführt werden, um eine Einschleppung des Erregers zu vermeiden, eine weitere Einsatzmöglichkeit.

Die EUS-Ausbrüche beschränkten sich in der Vergangenheit auf den asiatisch-pazifischen Raum und den Osten der Vereinigten Staaten, in beiden Fällen aber mit deutlicher Ausbreitungstendenz. So traten die Epizootien im asiatischen Raum innerhalb eines Zeitraums von nur 30 Jahren in 18 verschiedenen Ländern auf, während die EUS-Fälle in den Vereinigten Staaten sich zunächst auf Mündungsgebiete an der Ostküste beschränkten, in der Folge aber auch weiter im Landesinneren im reinen Süßwasser auftraten. Es besteht die Gefahr einer Einschleppung des Erregers in andere Regionen der Welt, insbesondere nach Europa. Obwohl das Auftreten der Krankheit bisher auf tropische und subtropische Regionen in einem Bereich zwischen dem 35. Grad nördlicher Breite und dem 35. Grad südlicher Breite beschränkt blieb (LILLEY et al., 1998), ist es nicht auszuschließen, dass die Krankheit auch in gemäßigten Klimazonen auftreten wird. EUS-Ausbrüche bei Temperaturen deutlich unter 20 °C sind möglich, wie Erkrankungsfälle in Fischteichen in Louisiana während der Wintermonate bei 10 - 15 °C (HAWKE et al., 2003) und die erfolgreiche experimentelle Infektion von Ayu bei einer Temperatur von 15 – 16 °C (WADA et al., 1996) belegen.

Für als exotisch gelistete Fischkrankheiten gilt nach der EU-Richtlinie 91/67/EWG betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur, dass Drittländer, die lebende Fische in die EU exportieren, bescheinigen müssen, frei von der entsprechenden exotischen Krankheit zu sein. Für anderweitig gelistete Krankheiten gilt generell das Prinzip des gleichen Status. Das bedeutet, dass das exportierende Drittland frei von einer bestimmten Krankheit sein muss, wenn das Land oder die Region, in die eingeführt wird, frei von dieser Krankheit ist. Das EUS ist jedoch weder als exotisch in Liste 1 der EU-Richtlinie 91/67/EWG noch in einer anderen Liste dieser Richtlinie aufgeführt. Drittländer, in denen das EUS endemisch ist, können somit lebende Fische unter Beachtung des Status anderer Krankheiten in die EU exportieren. Zwar müssen hierbei im Ursprungsland ausgestellte tierärztliche Gesundheitszeugnisse mitgeführt werden, damit können jedoch Fische

innerhalb der Inkubationszeit, subklinisch erkrankte Fische und Carrier nicht erfasst werden. Dieselbe Gefahr besteht beim Import von tropischen Zierfischen, für die generell keine Importerlaubnis erforderlich ist. LILLEY et al. (1997a) sehen eine Ursache für die Verbreitung des EUS im asiatisch-pazifischen Raum innerhalb relativ kurzer Zeit im Transport von Fischen für die Aquakultur und den Zierfischhandel. Diese Aussage belegen EUS-Fälle bei aus Singapur importierten Zierfischen in Japan (HATAI et al., 1994; HANJAVANIT et al., 1997). Somit besteht eine reelle Gefahr, dass das EUS früher oder später den Sprung nach Europa schafft. Eine Identifizierung von potentiellen Importrouten, über die der Erreger eingeschleppt werden könnte, wäre erforderlich, um diese Gefahr zu verringern. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die potentiellen Konsequenzen für die Aquakultur und Wildfischbestände, die ein Auftreten der Erkrankung in Europa nach sich ziehen würde, abschätzen zu können. Zu nennen wäre hier eine Untersuchung weiterer Fischarten auf ihre Empfänglichkeit sowie eine Exposition der diversen Fischarten unter anderen Versuchsbedingungen, insbesondere durch Variierung der Infektionsdosis, der Wassertemperatur und einer Verwendung von frisch isolierten *Aphanomyces invadans*-Stämmen.

VI. Zusammenfassung

In der Literaturübersicht wird der derzeitige Kenntnisstand zum epizootischen ulzerativen Syndrom (EUS), einer Erkrankung bei zahlreichen Süß- und Brackwasserfischen, die sich innerhalb kurzer Zeit in vielen Teilen der Welt ausgebreitet hat und eine potentielle Bedrohung für europäische Süß- und Brackwasserfische darstellt, zusammengefasst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zuallererst, eine PCR-Methode geeignet zum Nachweis von *Aphanomyces invadans* direkt aus erkrankten Fischen zu entwickeln, und weiterhin, die Empfänglichkeit ausgewählter Süßwasserfischarten, die von Bedeutung für die europäische Aquakultur sind, gegenüber diesem Erreger zu untersuchen. Hierzu wurde eine Semi-Nested PCR-Methode angewandt, die Teile der ITS-Region amplifiziert (Genabschnitte, die zwischen den die ribosomale RNA kodierenden Genen liegen). Die PCR-Methode erwies sich sowohl als hochspezifisch gegenüber allen untersuchten *Aphanomyces invadans*-Stämmen als auch hochsensitiv. Die Spezifität wurde unter Einsatz von DNA verschiedener Oomyceten, anderer relevanter Pathogene und Kommensalen sowie Wirts-DNA in die PCR untersucht. Die untere Nachweisgrenze der Semi-Nested PCR lag bei Einsatz von genomischer DNA aus Mycel bei 25 fg und bei Einsatz von *Aphanomyces invadans*-Zoosporen in die DNA-Extraktion bei 0,025 Zoosporen.

Um die PCR-Methode an diagnostischen Proben zu testen, wurden Infektionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden Blaue Fadenfische (*Trichogaster trichopterus*) und drei in Deutschland wirtschaftlich bedeutsame Fischarten ausgewählt: Regenbogenforellen (*Oncorynchus mykiss*), Europäische Welse (*Silurus glanis*) und Europäische Aale (*Anguilla anguilla*). 36 Fischen von jeder der vier Spezies wurde intramuskulär eine *Aphanomyces invadans*-Sporensuspension injiziert. Während eines

Versuchszeitraumes von 35 Tagen wurden laufend Fische zu vorher festgelegten Entnahmezeitpunkten euthanasiert, auf Hautveränderungen untersucht und Probenmaterial aus dem Injektionsbereich für die PCR-Untersuchung und eine histopathologische Untersuchung entnommen. Die Fadenfische und die Welse zeigten im Versuchsverlauf deutlich sichtbare, teilweise ulzerative Hautläsionen. Während bei der histopathologischen Untersuchung der Fadenfische die EUS-typischen mykotischen Granulome, die die Hyphen umschlossen, auftraten, konnten bei den Welsen zwar zahlreiche Hyphen nachgewiesen werden, die Entzündungreaktion bestand hier jedoch aus einer losen Anordnung von Makrophagen, wenigen Lymphozyten und Riesenzellen. Bei den Regenbogenforellen traten nur geringgradige, bei keinem Tier ulzerative Hautveränderungen auf. Nur bei vier Regenbogenforellen konnten die EUS-typischen mykotischen Granulome nachgewiesen werden. Keiner der Aale wies makroskopisch sichtbare Hautveränderungen auf mit Ausnahme eines Aals mit einer geröteten Injektionsstelle, der an Tag 2 post infectionem entnommen wurde. Bei diesem Tier konnten mit Hilfe der Grocott-Reaktion lokalisiert einzelne Hyphen sichtbar gemacht werden. Das Auftreten mykotischer Granulome oder einer zellulären Wirtsreaktion konnte bei den Aalen nicht beobachtet werden.

Die PCR-Methode wurde für den Nachweis von *Aphanomyces invadans* aus den Fischen der Infektionsversuche angewandt. Der Erregernachweis gelang bei allen Fischen, die makroskopisch sichtbare Hautläsionen zeigten. Bei den Fadenfischen und den Welsen gelang der Erregernachweis bei allen Versuchsgruppen ab dem ersten Entnahmezeitpunkt an Tag 1 p. i. Die Ergebnisse zeigen, dass die PCR-Methode sich für den Nachweis von *Aphanomyces invadans* bei erkrankten Fischen eignet. Zur Empfänglichkeit von Europäischen Welsen und Aalen lagen bisher keine Daten vor. Die Ergebnisse der Infektionsversuche liefern klare Hinweise dafür, dass Europäische Welse gegenüber dem EUS empfänglich sind, während Aale nicht und Regenbogenforellen nur geringgradig empfänglich zu sein scheinen.

VII. Summary

A PCR assay for the detection of *Aphanomyces invadans*, the Oomycete associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS), and susceptibility of three European freshwater fish species to the pathogen

A literature review is presented, which summarises the present knowledge on the epizootic ulcerative syndrome, a disease affecting freshwater and estuarine fish, that has spread rapidly to many parts of the world and poses a potential threat to European freshwater and estuarine fish.

The two objectives of this study were firstly, to develop a PCR-method suitable for the detection of *Aphanomyces invadans* directly from clinical specimen and secondly, to test the susceptibility of selected freshwater fish species, which are relevant in the European aquaculture industry, to this pathogen.

A semi-nested PCR assay was used, which amplifies parts of the ITS-region (regions between the ribosomal RNA coding genes). The PCR assay proved to be highly specific for all *Aphanomyces invadans* strains tested as well as highly sensitive. Specificity was tested by submitting DNA of various Oomycetes, of other relevant pathogens and commensals as well as host tissue DNA to the PCR. The detection limit of the semi-nested PCR was 25 fg using genomic DNA isolated from mycelium and 0,025 spore when using DNA of *Aphanomyces invadans*-zoospores.

Infection experiments were performed in order to test the PCR method using clinical samples. For this purpose, three-spot gouramis (*Trichogaster trichopterus*), and three fish species with economic importance in Germany were chosen: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), European catfish (*Silurus glanis*) and European eels (*Anguilla anguilla*). 36 fish from each of the four

species were injected intramuscularly with a suspension of *Aphanomyces invadans*-spores. During the 35 day period of the trial fish were periodically sacrificed at previously defined time points, examined for gross lesions and samples were taken from the injection site for PCR and histopathology. Three-spot gouramis and catfish were showing clearly visible, sometimes ulcerative lesions during the course of the trial. While the three-spot gouramis showed the EUS-typical mycotic granulomas surrounding the invading hyphae, numerous hyphae could also be seen in histological sections of the catfish, but the inflammative host response was consisted of a diffuse arrangement of macrophages, small numbers of lymphocytes and multinucleated giant cells. The rainbow trout showed only mild and never ulcerative cutaneous lesions. The EUS-typical mycotic granulomas could only be demonstrated from four rainbow trout. None of the eels showed grossly visible cutaneous lesions with the exception of one eel with localised reddening at the injection site sampled on day 2 post infectionem. Here a few focal hyphae could be seen in Grocott-stained tissue sections. No mycotic granulomas or any cellular host response could be seen by the eels.

The new PCR assay was applied to detect *Aphanomyces invadans* in the fish from the challenge experiments. Detection succeeded in all fish with grossly visible lesions. Three-spot gouramis and catfish tested positive on day 1 post infectionem (first day of sampling). The results demonstrate the suitability of the method to detect *Aphanomyces invadans* in infected fish.

No previous data existed on the susceptibility of European catfish and European eel. The results presented clearly indicate that European catfish are susceptible to the EUS, while rainbow trout seem to be marginally and European eel seem to be not susceptible.

VIII. Literaturverzeichnis

ACIAR (1998):
Reducing fish losses due to epizootic ulcerative syndrome - an ex ante evaluation. Australian Center for International Agricultural Research. Impact Assessment Series 7. 24 Seiten.

Ahmed, M. and Rab, M. A. (1995):
Factors affecting outbreaks of epizootic ulcerative syndrome in farmed and wild fish in Bangladesh. Journal of Fish Diseases 18, 263-271.

Alderman, D. J. and Polglase, J. L. (1984):
A comparative investigation of the effects of fungicides on *Saprolegnia parasitica* and *Aphanomyces astaci*. Transactions of the British Mycological Society 83, 313-318.

Alderman, D. J. and Polglase, J. L. (1988):
Pathogens, parasites and commensales. In: Freshwater Crayfish: Biology, management and exploitation. D. M. Holdich and R. S. Lowery (Eds). 167-212. Croom Helm Ltd.: London.

Ariel, E. and Olesen, N. J. (2002):
Finfish in aquaculture and their diseases - A retrospective view on the European Community. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 22, 72-83.

Bainbridge, B. W., Spreadbury, C. L., Scalise, F. G. and Cohen, J. (1990):
Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. FEMS Microbiology Letters 66, 113-118.

Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. and Doolittle, W. F. (2000):
A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. Science 290, 972-977.

Blazer, V. S., Vogelbein, W. K., Densmore, C. L., May, E. B., Lilley, J. H. and Zwerner, D. E. (1999):
Aphanomyces as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. Journal of Aquatic Animal Health 11, 340-349.

Blazer, V. S., Lilley, J. H., Schill, W. B., Kiryu, Y., Densmore, C. L., Panyawachira, V. and Chinabut, S. (2002):
Aphanomyces invadans in Atlantic menhaden along the east coast of the United States. Journal of Aquatic Animal Health 14, 1-10.

Bly, J. E. and Clem, L. W. (1991):
Temperature-mediated processes in teleost immunity: in vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish. Veterinary Immunology and Immunopathology 28, 365-377.

Bohl, M. (1999):
Zucht und Produktion von Süßwasserfischen. VerlagsUnion Agrar: Frankfurt (Main).

Boonyaratpalin, S. (1989):
Bacterial Pathogens Involved in the Epizootic Ulcerative Syndrome of Fish in Southeast Asia. Journal of Aquatic Animal Health 1, 272-276.

Burke, J. B. and Rodgers, L. J. (1981):
Identification of pathogenic bacteria associated with the occurence of 'red spot' in sea mullet, *Mugil cephalus* L., in south-eastern Queensland. Journal of Fish Diseases 4, 153-159.

Burkholder, J. M., Noga, E. J., Hobbs, C. H. and Glasgow Jr., H. B. (1992):
New phantom dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. Nature 358, 407-410.

Callinan, R. B. (1994):
A comparative review of *Aphanomyces* species associated with epizootic ulcerative syndrome, red spot disease and mycotic granulomatosis. R. J. Roberts, B. Campbell and I. H. MacRae. Proceedings of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative Syndrome. Bangkok. Aquatic Animal Health Research Institute.

Callinan, R. B. and Keep, J. A. (1989):
Bacteriology and parasitology of red spot disease in sea mullet, *Mugil cephalus* L., from eastern Australia. Journal of Fish Diseases 12, 467-479.

Callinan, R. B., Fraser, G. C. and Virgona, J. L. (1989):
Pathology of red spot disease in sea mullet, *Mugil cephalus* L., from eastern Australia. Journal of Fish Diseases 12, 467-479.

Callinan, R. B., Paclibare, J. O., Bondad-Reantaso, M. G., Chin, J. C. and Gogolewski, R. P. (1995):
Aphanomyces species associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in the Philippines and red spot disease (RSD) in Australia: preliminary comparative studies. Diseases of Aquatic Organisms 21, 233-238.

Campbell, R. E., Lilley, J. H., Taukhid, Panyawachira, V. and Kanchanakhan, S. (2001):
In vitro screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. Aquaculture Research 32, 223-233.

Catap, E. S. and Munday, B. L. (1998):
Effects of Variations of Water Temperature and Dietary Lipids on the Expression of Experimental Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) in Sand Whiting, *Sillago ciliata*. Fish Pathology 33, 327-335.

Catap, E. S. and Munday, B. L. (2002):
Development of a method for reproducing epizootic ulcerative syndrome using controlled doses of *Aphanomyces invadans* in species with different salinity requirements. Aquaculture 209, 35-47.

Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1985):
Repeated zoospore emergence as a possible adaption to parasitism in *Aphanomyces*. Experimental Mycology 9, 259-263.

Chinabut, S. (1998):
Epizootic Ulcerative Syndrome: Information up to 1997. Fish Pathology 33, 321-326.

Chinabut, S. and Roberts, R. J. (1999):
Pathology and histopathology of epizootic ulcerative syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute: Bangkok.

Chinabut, S., Roberts, R. J., Willoughby, L. G. and Pearson, M. D. (1995):
Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. Journal of Fish Diseases 18, 41-47.

Costa, H. H. and Wijeyaratne, M. J. S. (1989):
Epidemiology of epizootic ulcerative syndrome occurring for the first time among fish in Sri Lanka. Journal of Applied Ichthyology 1, 48-52.

Dams, E., Hendricks, L., Van der Peer, Y., Vandenbeempt, I. and De Wachter, R. (1988):
Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Research 16, 87-173.

David, J. C. and Kirk, P. M. (1997):
Index of Fungi. 6 (13), 706.

Dick, M. W. (1995):
Sexual reproduction in the peronosporomycetes (chromistan fungi). Canadian Journal of Botany 73, 714-724.

Dick, M. W. (2001):
The Peronosporomycetes. In: The Mycota VII, Part A. Systematics and Evolution. E. G. McLaughlin and P. A. Lemke (Eds). 39-72. Springer Verlag: Berlin.

Dieguez-Uribeondo, J., Huang, T. S., Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1995):
Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Mycological Research 99, 574-578.

Dykstra, M. J. and Kane, A. S. (2000):
Pfiesteria piscicida and ulcerative mycosis of Atlantic menhaden - Current status of understanding. Journal of Aquatic Animal Health 12, 18-25.

Dykstra, M. J., Noga, E. J., Levine, J. F., Moye, D. W. and Hawkins, J. H. (1986):
Characterisation of the *Aphanomyces* species involved with ulcerative mycosis (UM) in menhaden. Mycologia 78, 664-672.

Dykstra, M. J., Levine, J. F., Noga, E. J., Hawkins, J. H., Gerdes, P., Hargis jr., W. J., Grier, H. J. and Te Strake, D. (1989):
Ulcerative mycosis: a serious menhaden disease of the southeastern coastal fisheries of the United States. Journal of Fish Diseases 12, 175-178.

Egusa, S. and Masuda, N. (1971):
A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathology 6, 41-46.

Ellis, A. E. (1982):
Difference between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In: Microbial diseases of fish. R. J. Roberts (Ed). 1-29. ACADEMIC PRESS INC. LTD.: London.

Fowles, B. (1976):
Factors affecting growth and reproduction in selected species of *Aphanomyces*. Mycologia 68, 1221-1232.

Fraser, G. C., Callinan, R. B. and Calder, L. M. (1992):
Aphanomyces species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. Journal of Fish Diseases 15, 173-181.

Frerichs, G. N. (1995):
Viruses associated with the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fish in south-east Asia. Veterinary Research 26, 449-454.

Frerichs, G. N., Millar, S. D. and Alexander, M. (1989):
Rhabdovirus infection of ulcerated fish in South-East Asia. In: Viruses of Lower Vertebrates. W. Ahne and E. Kurstak (Eds). 396-410. Springer-Verlag: Berlin.

Frerichs, G. N., Millar, S. D. and Chinabut, S. (1993):
Clinical response of snakeheads (*Ophicepalus striatus*) to experimental infection with snakehead fish rhabdovirus and snakehead cell line retrovirus. Aquaculture 116, 297-301.

Griffith, G. W. and Shaw, D. S. (1998):
Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. Applied and Environmental Microbiology 64, 4007-4014.

Grocott, R. G. (1955):
A stain for fungi in tissue sections and smears. American Journal of Clinical Pathology 25, 975-979.

Grooters, A. M. and Gee, M. K. (2002):
Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. Journal of Veterinary Internal Medicine 16, 147-152.

Hanjavanit, C., Suda, H. and Hatai, K. (1997):
Mycotic granulomatosis found in two species of ornamental fishes imported from Singapore. Mycoscience 38, 433-436.

Hatai, K. and Egusa, S. (1978):
Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis - 2. Some of the note on the MG-fungus. Fish Pathology 13, 85-89.

Hatai, K., Egusa, S., Takahashi, S. and Ooe, K. (1977):
Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis - 1. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured ayu infected with the disease. Fish Pathology 11, 129-133.

Hatai, K., Takahashi, S. and Egusa, S. (1984):
Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis - 4. Changes of blood constituents in both ayu, *Plecoglossus altivelis* experimentally inoculated and naturally infected with *Aphanomyces piscicida*. Fish Pathology 19, 17-23.

Hatai, K., Nakamura, K., Rha, S. A., Yuasa, K. and Wada, S. (1994):
Aphanomyces infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). Fish Pathology 29, 95-99.

Hawke, J. P., Grooters, A. M. and Camus, A. C. (2003):
Ulcerative mycosis caused by *Aphanomyces invadans* in channel catfish, black bullhead, and bluegill from southeastern Louisiana. Journal of Aquatic Animal Health 15, 120-127.

Hedrick, R. P., Eaton, W. D., Fryer, J. L., Groberg, W. G. J. and Boonyaratpalin, S. (1986):
Characteristics of a birnavirus isolated from cultured sand goby, *Oxyeleotris marmoratus*. Diseases of Aquatic Organisms 1, 219-225.

Hoffmann, R. W. (2005):
Fischkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart.

Huang, T. S., Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1994):
Analysis of genetic diversity in crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. Aquaculture 126, 1-10.

Jarman, S. N., Deagle, B. E. and Gales, N. J. (2004):
Group specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. Molecular Ecology 13, 1313-1322.

Ji, N., Peng, B., Wang, G., Wang, S. and Peng, X. (2004):
Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. Journal of Microbiological Methods 57, 409-413.

John, K. R., George, M. R., Richards, R. H. and Frerichs, G. N. (2001):
Characteristics of a new reovirus isolated from epizootic ulcerative syndrome infected snakehead fish. Diseases of Aquatic Organisms 46, 83-92.

Johnson, R. A., Zabrecky, J., Kiryu, Y. and Shields, J. D. (2004):
Infection experiments with *Aphanomyces invadans* in four species of estuarine fish. Journal of Fish Diseases 27, 287-295.

Kanchanakhan, S. (1996):
Epizootic ulcerative syndrome (EUS): a new look at the old story. The AAHRI Newsletter 5, 2-3.

Kanchanakhan, S. (1997):
Variability in the isolation of viruses from fish affected by epizootic ulcerative syndrome (EUS). The AAHRI Newsletter 6, 1-5.

Khan, M. H. and Lilley, J. H. (2002):
Risk factors and socio-economic impacts associated with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) in Bangladesh. FAO Fisheries Technical Paper No. 406. J. R. Arthur, Phillips, M. J., Subasinghe, R. P., Reantaso, M. B., MacRae, I. H. 27-39.

Khan, M. H., Marshall, L., Thompson, K. D., Campbell, R. E. and Lilley, J. H. (1998):
Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the Oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 18, 192-197.

Khan, M. H., Lilley, J. H., Majumder, B., Sarker, M. G. A., Alauddin, M., Hoque, A., Ahmed, G. U. and Chowdhury, M. B. (2001):
Cross-sectional survey of epizootic ulcerative syndrome (EUS) cases in Bangladesh. Proceedings of the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Cebu City, Philippines.

Kiryu, Y., Shields, J. D., Vogelbein, W. K., Zwerner, D. E. and Kator, H. (2002):
Induction of skin ulcers in Atlantic menhaden by injection and aqueous exposure to the zoospores of *Aphanomyces invadans*. Journal of Aquatic Animal Health 14, 11-24.

Kiryu, Y., Shields, J. D., Vogelbein, W. K., Kator, H. and Blazer, V. S. (2003):
Infectivity and pathogenicity of the oomycete *Aphanomyces invadans* in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. Diseases of Aquatic Organisms 54, 135-146.

Kurata, O., Kanai, H. and Hatai, K. (2000):
Hemagglutinating and hemolytic capacities of *Aphanomyces piscicida*. Fish Pathology 35, 29-33.

Kurata, O., Sanpei, K., Hikiji, K. and Hatai, K. (2002):
A galactose-binding protein revealed as a hemagglutinin in *Aphanomyces piscicida*. Fish Pathology 37, 1-6.

Le Morvan-Rocher, C., Troutaud, D. and Deschaux, P. (1995):
Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. Developmental and Comparative Immunology 19, 87-95.

Leipe, D. D., Wainright, P. O., Gunderson, J. H., Porter, D., Patterson, D. J., Valois, F., Himmerich, S. and Sogin, M. L. (1994):
The Stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequenzes from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. Phycologia 33, 369-377.

Levine, J. F., Hawkins, J. H., Dykstra, M. J., Noga, E. J., Moye, D. W. and Cone, R. S. (1990a):
Species distribution of ulcerative lesions on finfish in the Tar-Pamlico River Estuary, North Carolina. Diseases of Aquatic Organisms 8, 1-5.

Levine, J. F., Hawkins, J. H., Dykstra, M. J., Noga, E. J., Moye, D. W. and Cone, R. S. (1990b):
Epidemiology of ulcerative mycosis in Atlantic menhaden in the Tar-Pamlico River Estuary, North Carolina. Journal of Aquatic Animal Health 2, 162-171.

Lilley, J. H. and Inglis, V. (1997):
Comparative effects of various antibiotics, fungicides, and disinfectants on *Aphanomyces invaderis* and other saprolegniceous fungi. Aquaculture research 28, 461-469.

Lilley, J. H. and Roberts, R. J. (1997):
Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. Journal of Fish Diseases 20, 135-144.

Lilley, J. H., Hart, D., Richards, R. H., Roberts, R. J., Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1997a):
Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish-kills. The Veterinary Record 140, 653-654.

Lilley, J. H., Thompson, K. D. and Adams, A. (1997b):
Characterisation of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. Diseases of Aquatic Organisms 30, 187-197.

Lilley, J. H., Callinan, R. B., Chinabut, S., Kanchanakhan, S., MacRae, I. H. and Phillips, M. J. (1998):
Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical Handbook. Bangkok. The Aquatic Animal Health Research Institute. 88 Seiten.

Lilley, J. H., Bangyeekhun, E., Panyawachira, V. and Cerenius, L. (1999):
Zoospore physiology of *Aphanomyces invadans* 1. Polyplanetism. The AAHRI Newsletter 8, 6-8.

Lilley, J. H., Beakes, G. W. and Hetherington, C. S. (2001a):
Characterization of *Aphanomyces invadans* isolates using pyrolysis mass spectrometry (PyMS). Mycoses 44, 383-389.

Lilley, J. H., Chinabut, S. and Miles, D. J. C. (2001b):
Applied studies on EUS - The ecology, immunogenicity and treatment of *Aphanomyces invadans*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland and Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Thailand.

Lilley, J. H., Callinan, R. B. and Khan, M. H. (2002):
Social, economic and biodiversity impacts of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). FAO Fisheries Technical Paper No. 406. J. R. Arthur, Phillips, M. J., Subasinghe, R. P., Reantaso, M. B., MacRae, I. H. 127-139.

Lilley, J. H., Hart, D., Panyawachira, V., Kanchanakhan, S., Chinabut, S., Söderhäll, K. and Cerenius, L. (2003):
Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. Journal of Fish Diseases 26, 263-275.

Lio-Po, G. D., Traxler, G. S., Albright, L. J. and Leano, E. M. (2000):
Characterization of a virus obtained from snakeheads *Ophicephalus striatus* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms 43, 191-198.

Lio-Po, G. D., Albright, L. J., Traxler, G. S. and Leano, E. M. (2001):
Pathogenicity of the epizootic ulcerative syndrome (EUS)-associated rhabdovirus to snakehead *Ophicephalus striatus*. Fish Pathology 36, 57-66.

Llobrera, A. and Gacutan, R. O. (1987):
Aeromonas hydrophila associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de Bay, Philippines. Aquaculture 67, 273-278.

Luttrell, E. S. (1974):
Parasitism of fungi on vascular plants. Mycologia 66, 1-15.

Marshall, L. (1998):
Histopathological assessment of an experimental challenge with *Aphanomyces invadans*, the necessary agent of epizootic ulcerative syndrome (EUS), in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different temperatures and in three native fish species: roach (*Rutilus rutilus*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). BSc thesis. Institute of Aquaculture. Stirling. University of Stirling. 82 Seiten.

Mastan, S. A. and Qureshi, T. A. (2001):
Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. Journal of Environmental Biology 22, 187-192.

McKenzie, R. A. and Hall, W. T. K. (1976):
Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). Australian Veterinary Journal 52, 230-231.

McQueen, A., MacKenzie, K. and Roberts, R. J. (1973):
Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) 3. The effect of temperature on the inflammatory response to the metacercariae of *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) (Digenea: Heterophyideae). Journal of Fish Biology 5, 241-247.

McVicar, A. H. (1982):
Ichthyophonus infections in fish. In: Microbial diseases of fish. R. J. Roberts (Ed). 243-269. ACADEMIC PRESS INC. LTD: London.

Meyer, F. P. and Jorgenson, T. A. (1983):
Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Transactions of the American Fisheries Society 112, 818-824.

Miles, D. J. C., Polchana, J., Lilley, J. H., Kanchanakhan, S., Thompson, K. D. and Adams, A. (2001):
Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. Aquaculture 195, 1-15.

Miles, D. J. C., Thompson, K. D., Lilley, J. H. and Adams, A. (2003):
Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. Diseases of Aquatic Organisms 55, 77-84.

Miyazaki, T. and Egusa, S. (1972):
Studies on mycotic granulomatosis in fresh water fishes - 1. Mycotic granulomatosis in goldfish. Fish Pathology 7, 15-25.

Miyazaki, T. (1994):
Comparison among mycotic granulomatosis, saprolegniasis and anaaki-byo in fishes: a Japanese experience. R. J. Roberts, B. Campbell and I. H. MacRae. Proceedings of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative Syndrome. Bangkok. Aquatic Animal Health Research Institute

Mohan, C. V. and Shankar, K. M. (1994):
Epidemiological analysis of epizootic ulcerative syndrome of fresh and brackishwater fishes of Karnataka, India. Current Science 66, 656-658.

Mondal, S. K. and De, A. B. (2001):
A fatal oomycotic disease of the fresh water fish *Aplocheilus panchax* in India caused by *Aphanomyces laevis*. Mycopathologia 154, 21-24.

Mort-Bontemps, M. and Fevre, M. (1995):
Electrophoretic karyotype of *Saprolegnia monoica*. FEMS Microbiology Letters 131, 325-328.

Munro, A. L. (1982):
The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. In: Microbial diseases of fish. R. J. Roberts (Ed). 131-149. ACADEMIC PRESS INC. LTD.: London.

Noga, E. J. and Dykstra, M. J. (1986):
Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). Journal of Fish Diseases 9, 47-53.

Noga, E. J., Levine, J. F., Dykstra, M. J. and Hawkins, J. H. (1988):
Pathology of ulcerative mycosis in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. Diseases of Aquatic Organisms 4, 189-197.

Noga, E. J., Dykstra, M. J. and Wright, J. F. (1989):
Chronic inflammatory cells with epithelial cell characteristics in teleost fishes. Veterinary Pathology 26, 429-437.

Noga, E. J., Wright, J. F., Levine, J. F., Dykstra, M. J. and Hawkins, J. H. (1991):
Dermatological diseases affecting fishes of the Tar-Pamlico Estuary, North Carolina. Diseases of Aquatic Organisms 10, 87-92.

Noga, E. J., Smith, S. A., Burkholder, J. M., Hobbs, C. and Bullis, R. A. (1993):
A new ichthyotoxic dinoflagellate: cause of acute mortality in aquarium fishes. The Veterinary Record 133, 96-97.

Noga, E. J., Khoo, L., Stevens, J. B., Fan, Z. and Burkholder, J. M. (1996):
Novel toxic dinoflagellate causes epidemic disease in estuarine fish. Marine Pollution Bulletin 32, 219-224.

Ogbonna, C. I. C. and Alabi, R. O. (1991):
Studies on species of fungi associated with mycotic infections of fish in a Nigerian freshwater fish pond. Hydrobiologia 220, 131-135.

Oidtmann, B., Cerenius, L., Schmidt, I., Hoffmann, R. and Söderhäll, K. (1999):
Crayfish plague epizootics in Germany - classification of two German isolates of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by random amplification of polymorphic DNA. Diseases of Aquatic Organisms 35, 235-238.

Oidtmann, B., Heitz, E., Rogers, D. and Hoffmann, R. (2002):
Transmission of crayfish plague. Diseases of Aquatic Organisms 52, 159-167.

Oidtmann, B., Schaefers, N., Cerenius, L., Söderhäll, K. and Hoffmann, R. (2004):
Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR. Veterinary Microbiology 100, 269-282.

OIE (2003):
OIE diagnostic manual for aquatic animal diseases. 3rd edition. Office International des Épizooties, Paris.

OIE (2005):
Aquatic Animal Health Code. World Organisation for Animal Health. Eighth Edition.

Pal, J. and Pradhan, K. (1990):
Bacterial involvement in ulcerative condition of air-breathing fish from India. Journal of Fish Biology 36, 833-839.

Pathiratne, A. and Jayasinghe, R. P. P. K. (2001):
Environmental influence on the occurence of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in freshwater fish in the Bellanwila-Attidiya wetlands, Sri Lanka. Journal of Applied Ichthyology 17, 30-34.

Pearce, M. (1990):
Epizootic ulcerative syndrome technical report December 1987 - September 1989. Fisheries Report No. 22. Northern Territory, Australia. Northern Territory Department of Primary Industry and Fisheries. 82 Seiten.

Pfeiffer, D. U. (2002):
Veterinary epidemiology – an introduction. http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/epidivision/Pfeiffer/files/Epinotes.pdf.

Phadee, P., Kurata, O., Hatai, K., Hirono, I. and Aoki, T. (2004):
Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. Journal of Aquatic Animal Health 16, 220-230.

Pickering, A. D. and Willoughby, L. G. (1982):
Saprolegnia infections of salmonid fish. In: Microbial diseases of fish. R. J. Roberts (Ed). 271-297. ACADEMIC PRESS INC. LTD.: London.

Plumb, J. A., Grizzle, J. M. and Defigueriedo, J. (1976):
Necrosis and bacterial infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following hypoxia. Journal of Wildlife Diseases 12, 247-253.

Roberts, R. J. and Schlotfeld, H.-J. (1989):
Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey: Berlin und Hamburg.

Roberts, R. J., Willoughby, L. G. and Chinabut, S. (1993):
Mycotic aspects of epizootic ulcerative syndrome (EUS) of Asian fishes. Journal of Fish Diseases 16, 169-183.

Roberts, R. J., Frerichs, G. N., Tonguthai, K. and Chinabut, S. (1994):
Epizootic Ulcerative Syndrome of farmed and wild fishes. In: Recent Advances in Aquaculture V. J. F. Muir and R. J. Roberts (Eds). 207-239. Blackwell Science.

Rodgers, L. J. and Burke, J. B. (1981):
Seasonal variation in the prevalence of red spot disease in estuarine fish with particular reference to the sea mullet, *Mugil cephalus* L. Journal of Fish Diseases 4, 297-307.

Sammut, J., White, I. and Melville, M. D. (1996):
Acidification of an estuarine tributary in eastern Australia due to drainage of acid sulfate soils. Marine and Freshwater Research 47, 669-684.

Scott, W. W. (1961):
A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 151, 1-95.

Shaheen, A. A., Elsayed, E. and Faisal, M. (1999):
Isolation of *Aphanomyces sp(p)*. associated with skin lesions and mortalities in the striped (*Mugil cephalus*) and thin lip (*Liza ramada*) grey mullets. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 19, 79-82.

Shanor, L. and Saslow, H. B. (1944):
Aphanomyces as a fish parasite. Mycologia 36, 413-415.

Sihalath, S. (1999):
Studies on zoospore physiology and chemotaxis of *Aphanomyces invadans*. MSc thesis. Institute of Aquaculture. Stirling. Universitiy of Stirling.

Söderhäll, K. and Unestam, T. (1975):
Properties of extracellular enzymes from *Aphanomyces astaci* and their relevance in the penetration process of crayfish cuticle. Physiologia Plantarum 35, 140-146.

Srivastava, R. C. (1979):
Aphanomycosis - a new threat to fish population. Mykosen 22, 25-29.

Subasinghe, R. P. (1993):
Effects of controlled infections of *Trichodina* sp. on transmission of epizootic ulcerative syndrome (EUS) to naive snakehead, *Ophicephalus striatus* Bloch. Journal of Fish Diseases 16, 161-164.

Thompson, K. D., Lilley, J. H., Chinabut, S. and Adams, A. (1997):
The antibody response of snakehead, *Channa striata* Bloch, to *Aphanomyces invaderis*. Fish and Shellfish Immunology 7, 349-353.

Thompson, K. D., Lilley, J. H., Chen, S.-C., Adams, A. and Richards, R. H. (1999):
The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. Fish and Shellfish Immunology 9, 195-210.

Timur, G. and Roberts, R. J. (1977):
The experimental pathogenesis of focal tuberculosis in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Journal of Comparative Pathology 87, 83-87.

Tonguthai, K. (1985):
A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute: Bangkok.

Valairatana, W. and Willoughby, L. G. (1994):
The Aquatic fungi *Aphanomyces* and *Phytium*, as wound pathogens on a soft shell turtle (*Trionyx cartilogineus*). The AAHRI Newsletter 3, 1-3.

Virgona, J. L. (1992):
Environmental factors influencing the prevalence of a cutaneous disease (red spot) in the sea mullet *Mugil cephalus* L., in the Clarence River, New South Wales, Australia. Journal of Fish Diseases 15, 363-378.

Vishwanath, T. S., Mohan, C. V. and Shankar, K. M. (1997):
Clinical and histopathogical characterisation of different types of lesions associated with epizootic syndrome (EUS). Journal of Aqaculture in the Tropics 12, 35-42.

Vishwanath, T. S., Mohan, C. V. and Shankar, K. M. (1998):
Epizootic ulcerative syndrome (EUS), associated with a fungal pathogen, in Indian fishes: histopathology - "a cause for invasiveness". Aquaculture 165, 1-9.

Vogelbein, W. K., Shields, J. D., Haas, L. W., Reece, K. S. and Zwerner, D. E. (2001):
Skin ulcers in estuarine fishes: a comparative pathological evaluation of wild and laboratory-exposed fish. Environmental Health Perspectives 109, 687-693.

Wada, S., Yuasa, K., Rha, S. A., Nakamura, K. and Hatai, K. (1994):
Histopathology of *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). Fish Pathology 29, 229-237.

Wada, S., Rha, S. A., Kondoh, T., Suda, H., Hatai, K. and Ishii, H. (1996):
Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. Fish Pathology 31, 71-80.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990):
Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds). Academic Press: San Diego, California.

Willoughby, L. G. (1995):
Aphanomyces invaderis, the fungal pathogen of EUS. C/N ratios and morphogenesis. The AAHRI Newsletter 4, 1-2.

Willoughby, L. G. (1999):
Mycological observations and the EUS fungus, *Aphanomyces invadans*. The AAHRI Newsletter 8, 1-8.

Willoughby, L. G. and Roberts, R. J. (1994):
Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. Journal of Fish Diseases 17, 541-543.

Willoughby, L. G. and Roberts, R. J. (1994):
Loss and recovery of zoospore motility in an isolate of *Aphanomyces* from a diseased fish. Mycological Research 98, 1463-1464.

Willoughby, L. G. and Chinabut, S. (1996):
Self-staling in *Aphanomyces invaderis*, the fungal pathogen of freshwater tropical fish affected by epizootic ulcerative syndrome (EUS). The AAHRI Newsletter 5, 2-3.

Willoughby, L. G., Roberts, R. J. and Chinabut, S. (1995):
Aphanomyces invaderis sp. nov., the fungal pathogen of freshwater tropical fishes affected by epizootic ulcerative syndrome (EUS). Journal of Fish Diseases 18, 273-275.

IX. Anhang

1. Empfängliche Fischarten

In der nachfolgenden **Tabelle 14** sind alle Fischarten aufgelistet, die bei natürlichen Ausbrüchen vom EUS betroffen waren oder die experimentell mit dem Erreger infiziert werden konnten. Die Einteilung bezüglich der Prävalenz wurde dabei nach bestem Wissen erstellt.

Tabelle 14: Für das EUS empfängliche Fischarten (durch die histopathologische Untersuchung oder Isolierung von *Aphanomyces invadans* bestätigt)

wissenschaftlicher Name (umgangssprachlicher Name)	Referenz	Region	Bedeutung	Prävalenz
Asien (mit Japan) und Australien				
Acanthopagrus australis (yellowfin bream)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südwestlicher Pazifik	Fischerei, Aquakultur	++
Amblypharyngodon mola (Brassenbarbe)	ROBERTS et al., 1994	Asien	Fischerei	++
Anabas testudineus (Kletterfisch)	ROBERTS et al., 1994; LILLEY et al., 2001b	Asien	Fischerei	++
Bidyanus bidyanus (Australischer Silberbarsch)	CALLINAN, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al., 1998	Australien	Fischerei, Aquakultur	++
*Carassius auratus auratus** (Goldfisch)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	weltweit	Zierfisch	++
Carassius carassius (Karausche)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Europa, Asien	Fischerei, Zierfisch	++
Catla catla	ROBERTS et al., 1994	Asien	Aquakultur	++
Channa sp.* (Schlangenkopffisch)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südostasien	Aquakultur, Fischerei, Zierfisch	+++
Cirrhinus ariza	LILLEY et al., 2001b	Asien	Fischerei	++
Cirrhinus mrigala (Mrigal)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Aquakultur	++
Clarias batrachus (Froschwels)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei, Aquakultur	++

wissenschaftlicher Name (umgangssprachlicher Name)	Referenz	Region	Bedeutung	Prävalenz
Clarias gariepinus (Afrikanischer Raubwels)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südafrika, Asien und Europa (Aquakultur)	Fischerei, Aquakultur	++
Colisa lalia (Zwerggurami)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südostasien	Zierfisch, Wildfisch	++
Esomus sp. (Flugbarben)	VISHWANATH et al., 1998	Asien	Fischerei, Aquakultur	++
Etroplus sp. (Indische Buntbarsche)	VISHWANATH et al., 1998	Südostasien	Wildfisch	++
Fluta alba (Swamp eel)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei	++
Glossogobius giurus (Flachkopfgrundel)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Ostafrika, Asien	Wildfisch	++
Glossogobius sp.	VISHWANATH et al., 1998; LILLEY et al., 2001b	Asien	Wildfisch	++
Heteropneustes fossilis (Kiemensackwels)	ROBERTS et al., 1994	Asien	Fischerei, Aquakultur, Zierfisch	++
Johnius sp. (croaker fish)	CHINABUT, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al., 1998	Nordwestlicher Pazifik	Fischerei	++
Labeo rohita (Rohu)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei, Aquakultur	++
Lepidocephalichthyes guntea	LILLEY et al., 2001b	Asien	Wildfisch	+
Lepomis macrochirus (Blauer Sonnenbarsch)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	weltweit	Aquakultur, Zierfisch	++
Liza diadema (Meeräsche)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Pazifik	Fischerei, Aquakultur	++
Macquaria ambigua (golden perch)	CALLINAN, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al., 1998	Australien	Fischerei, Aquakultur	++
Macrognathus siamensis	PHADEE et al., 2001	Asien	Fischerei	keine Angabe
Mastacembelus armoratus (Stachelaal)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südostasien	Wildfisch, Fischerei	++
Mastacembelus pancalus (Stachelaal)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südostasien	Wildfisch, Fischerei	++
Morulius calbasu (orange-fin labeo)	KHAN et al., 2001; zitiert in LILLEY et al., 2001	Asien	Fischerei	keine Angabe
Mugil cephalus (Graue Meeräsche)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Ostpazifik, Westatlantik, Ostatlantik, Mittelmeer	Fischerei, Aquakultur	+++
Mugil sp. (Meeräschen)	VISHWANATH et al., 1998	Weltweit	Fischerei	++

wissenschaftlicher Name (umgangssprachlicher Name)	Referenz	Region	Bedeutung	Prävalenz
Mystus sp. (Stachelwelse)	VISHWANATH et al., 1998	Asien	Aquakultur	++
Nandus nandus (Nanderbarsch)	LILLEY et al., 2001b	Asien	Fischerei	++
Nematalosa sp. (gizzard shad)	VINOBA, unveröffentlicht; zitiert in LILLEY et al., 2001	Asien	Fischerei	keine Angabe
Notopterus notopterus (Fähnchen-Messerfisch)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südost-Asien	Wildfisch	++
Osphronemus goramy (Speisegurami)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Aquakultur	++
Oxyeleotris marmoratus (Marmorgrundel)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südost-Asien	Wildfisch	++
Oxyeleotris sp. (Schäfergrundel)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Wildfisch	++
Parambassis ranga (Indischer Glasbarsch)	KHAN et al., 2001; zitiert in LILLEY et al., 2001	Asien	Wildfisch	keine Angabe
Platycephalus sp. (Schaufelköpfe)	VISHWANATH et al., 1998	Küstengewässer, Indien und Madagaskar	Fischerei	++
*Plecoglossus altivelis** (Ayu)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Japan	Fischerei, Aquakultur	+++
Psettodes sp. (spiny turbot)	CHINABUT, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al., 1998	Gesamter Indo-Westpazifik	Fischerei	++
Puntius gonionotus (Silberbarbe)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei, Aquakultur	+++
*Puntius schwanenfeldi** (Brassenbarbe)	KHAN et al., 1998	Südostasien	Fischerei	+++
Puntius sp. (Barbe)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Wildfisch, Fischerei, Zierfisch	+++
Rhodeus ocellatus (Japanischer Bitterling)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Japan, in Europa eingesetzt	Zierfisch, Wildfisch	++
Rohtee sp. (Keti)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei	++
Scatophagus sp. (Argusfische)	VISHWANATH et al., 1998	Indo-Pazifik	Aquakultur, Zierfisch	++
Siganus sp. (spinefoot)	VINOBA, unveröffentlicht; zitiert in LILLEY et al., 2001	Asien	Wildfisch	keine Angabe
*Sillago ciliata** (Wittling)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Westl. Pazifik	Fischerei	++

wissenschaftlicher Name (umgangssprachlicher Name)	Referenz	Region	Bedeutung	Prävalenz
Sillago sp.	VISHWANATH et al., 1998	Westl. Pazifik	Fischerei	++
Therapon sp.	VISHWANATH et al., 1998	Indo-Westpazifik	Fischerei	++
Trichogaster pectoralis (Schlangenhaut-fadenfisch)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Südostasien	Wildfisch, Zierfisch	++
*Trichogaster trichopterus** (Blauer Fadenfisch)	CATAP & MUNDAY, 2002	Südostasien	Zierfisch	++
Tridentiger obscurus (Japanese trident goby)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Fischerei	++
Tylosurus sp. (needlefish)	VINOBA, unveröffentlicht; zitiert in LILLEY et al., 2001	Asien	Wildfisch	keine Angabe
Upeneus bensai (goatfish, Meerbarbe)	CHINABUT, unveröffentlicht, zitiert in LILLEY et al., 1998	Westpazifik	Fischerei	++
Valamugil sp. (Meeräschen)	VISHWANATH et al., 1998	Indo-Pazifik	Fischerei	++
Wallago attu (Hubschrauber-Wels)	VISHWANATH et al., 1998	Asien	Fischerei	++
Xenentodon cancila (Round-tailed garfish, Indischer Hornhecht)	CHINABUT & ROBERTS, 1999	Asien	Wildfisch	++
Nordamerika				
Alosa mediocris (Hickory shad, Westatl. Alse)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
Ameiurus melas (Schwarzer Katzenwels)	HAWKE et al., 2003	Nordamerika	Fischerei, Aquakultur	++
Bairdiella chrysuna (Silver perch)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
*Brevoortia tyrannus** (Menhaden-Hering)	NOGA & DYKSTRA, 1986	Westatlantik	Fischerei	+++
Cynoscion regalis (Weakfish, Königs-Corvina)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
Fundulus heteroclitus (Mummichog)	JOHNSON et al., 2004	Westatlantik	Wildfisch, Zierfisch	+
Fundulus majalis (Striped killifish)	JOHNSON et al., 2004	Westatlantik	Wildfisch, Zierfisch	+++
*Ictalurus punctatus** (Getüpfelter Gabelwels)	BLAZER et al., 2002; HAWKE et al., 2003	Nordamerika, Europa (eingesetzt)	Fischerei, Aquakultur	++
Lagodon rhomboides (Pinfish, Meerbrasse)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+

wissenschaftlicher Name (umgangssprachlicher Name)	Referenz	Region	Bedeutung	Prävalenz
Leiostomus xanthunus (Spot, Punkt-Umberfisch)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
Lepomis macrochirus (Blauer Sonnenbarsch)	BLAZER et al., 2002; HAWKE et al., 2003	Nordamerika, in vielen Ländern eingeführt	Aquakultur, Zierfisch	++
Micropogonias undulatus (Atlantic croaker, Atl. Umberfisch)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
Morone saxatilis (Striped bass, Felsenbarsch)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei, Aquakultur	+
Paralichthys lethostigma (Southern flounder)	NOGA et al., 1991**	Westatlantik	Fischerei	+
Pomatomus saltatrix (Bluefish)	NOGA et al., 1991**	West – und Ostatlantik inkl. Mittelmeer	Fischerei, Aquakultur	+
Trinectes maculatus (Hogchocker, Zwergflunder)	NOGA et al., 1991**; JOHNSON et al., 2004	Westatlantik	Fischerei	+++
Europa				
*Oncorhynchus mykiss** (Regenbogenforelle)	KHAN et al., 1998	Europa, Nordamerika	Fischerei, Aquakultur	++
*Rutilus rutilus** (Rotauge)	KHAN et al., 1998	Europa	Wildfisch	+
*Scardinius erythrophthalmus** (Rotfeder)	MIYAZAKI, 1994, zitiert in LILLEY et al., 1998	Europa	Wildfisch	+

+: geringe Prävalenz (< 5 %); ++: mittlere Prävalenz (5 - 80 %) ; +++: hohe Prävalenz (> 80 %); ***:** experimentell infiziert; ****:** ohne histopathologische Untersuchung; tiefe Hautulzera mit 7,5-12 µm breiten, unseptierten Hyphen

2. Gelbilder der PCR-Optimierung

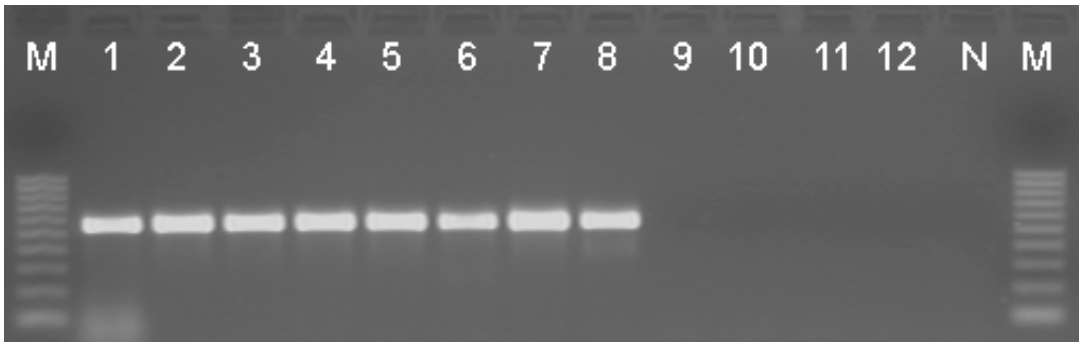

Abb. 27: Groboptimierung der Annealing-Temperatur in °C des Primerpaares BO 73/BO 639, 20 Zyklen

M: DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 46 °C; **2:** 46,3 °C; **3:** 47,4 °C; **4:** 49,2 °C; **5:** 51,5 °C; **6:** 54,1 °C; **7:** 56,8 °C; **8:** 59,2 °C; **9:** 62 °C; **10:** 64,1 °C; **11:** 65,7 °C; **12:** 66,5 °C

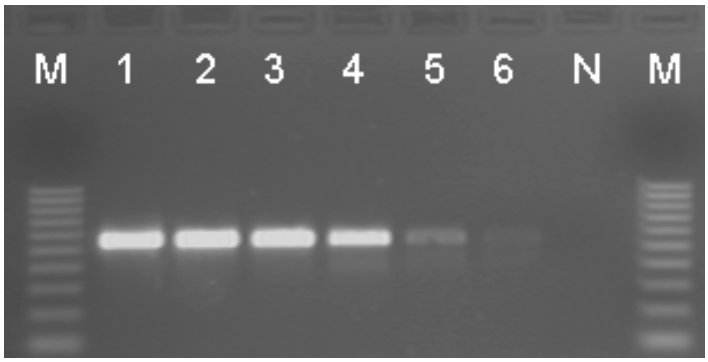

Abb. 28: Feinoptimierung der Annealing-Temperatur in °C des Primerpaares BO 73/BO 639, 20 Zyklen

M: DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 57 °C; **2:** 57,3 °C; **3:** 58,1 °C; **4:** 59,2 °C; **5:** 60,3 °C; **6:** 61 °C

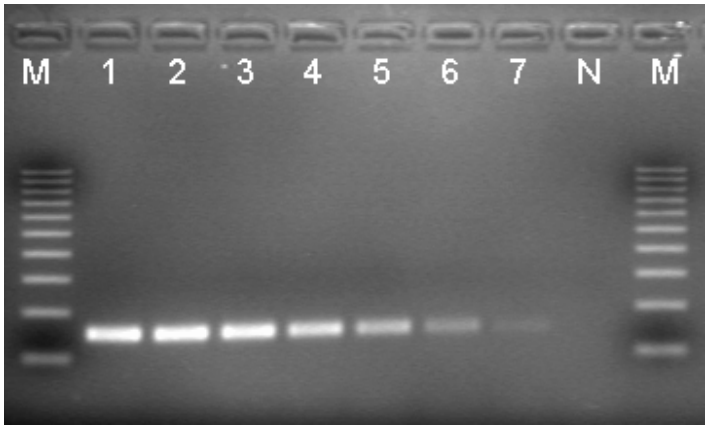

Abb. 29: Feinoptimierung der Annealing-Temperatur in °C des Primerpaares BO 487/BO 639, 30 Zyklen

M: DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 53,8 °C; **2:** 54,8 °C; **3:** 56 °C; **4:** 57,1 °C; **5:** 58,1 °C; **6:** 59 °C; **7:** 60 °C

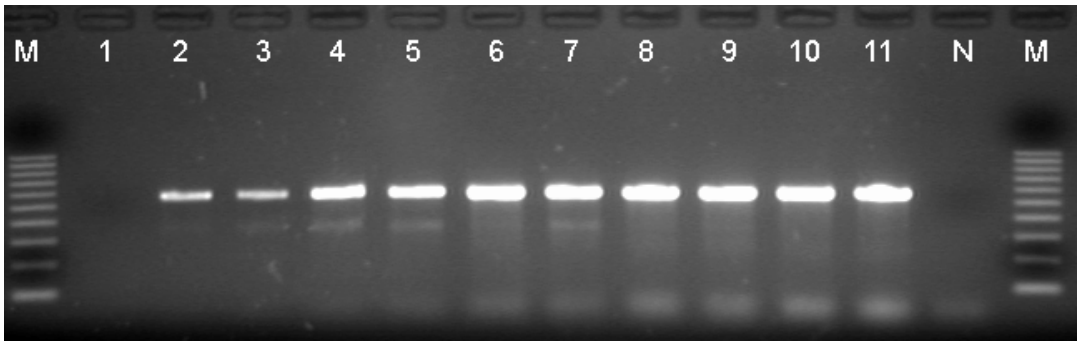

Abb. 30: Optimierung der Primerkonzentrationen des Primerpaares BO 73/BO 639, 20 Zyklen

M: DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 0,05 µM; **2:** 0,1 µM; **3:** 0,2 µM; **4:** 0,4 µM; **5:** 0,6 µM; **6:** 0,8 µM; **7:** 1,0 µM; **8:** 1,25 µM; **9:** 1,5 µM; **10:** 1,75 µM; **11:** 2,0 µM

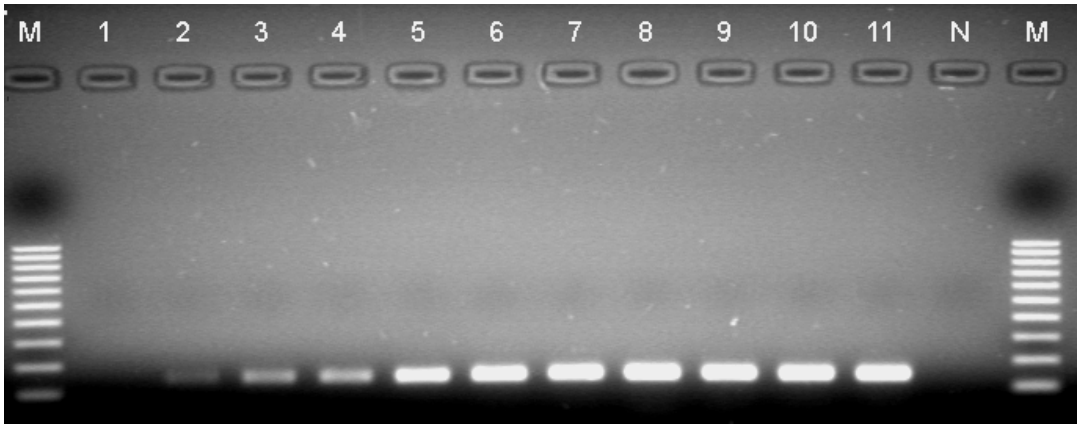

Abb. 31: Optimierung der Primerkonzentrationen des Primerpaares BO 487/BO 639, 30 Zyklen

M: DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 0,05 µM; **2:** 0,1 µM; **3:** 0,2 µM; **4:** 0,4 µM; **5:** 0,6 µM; **6:** 0,8 µM; **7:** 1,0 µM; **8:** 1,25 µM; **9:** 1,5 µM; **10:** 1,75 µM; **11:** 2,0 µM

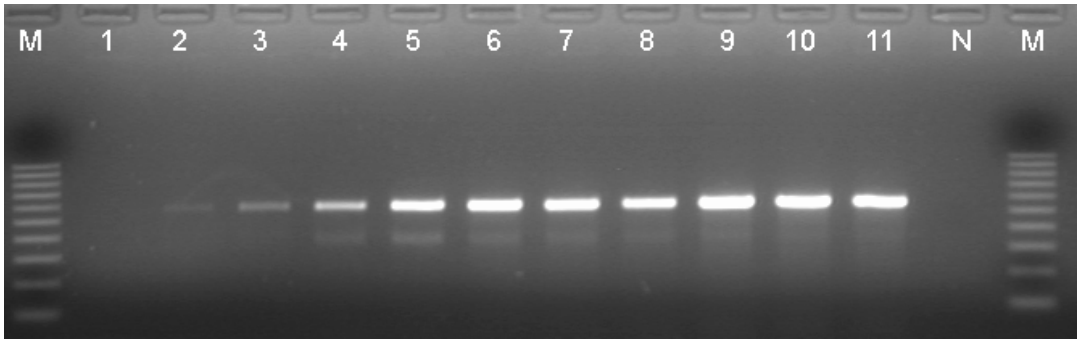

Abb. 32: Optimierung der Primerkonzentrationen des Primerpaares BO 73/BO 639 mit gespikten Proben, 20 Zyklen

M: DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 0,05 µM; **2:** 0,1 µM; **3:** 0,2 µM; **4:** 0,4 µM; **5:** 0,6 µM; **6:** 0,8 µM; **7:** 1,0 µM; **8:** 1,25 µM; **9:** 1,5 µM; **10:** 1,75 µM; **11:** 2,0 µM

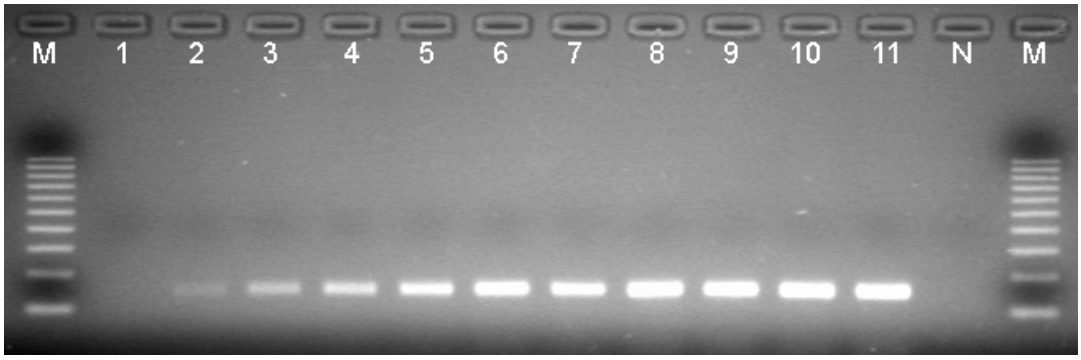

Abb. 33: Optimierung der Primerkonzentrationen des Primerpaares BO 487/BO 639 mit gespikten Proben, 30 Zyklen

M: DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter); **N:** Negativkontrolle; **1:** 0,05 µM; **2:** 0,1 µM; **3:** 0,2 µM; **4:** 0,4 µM; **5:** 0,6 µM; **6:** 0,8 µM; **7:** 1,0 µM; **8:** 1,25 µM; **9:** 1,5 µM; **10:** 1,75 µM; **11:** 2,0 µM

3. Gelbilder zur Spezifität der Primer

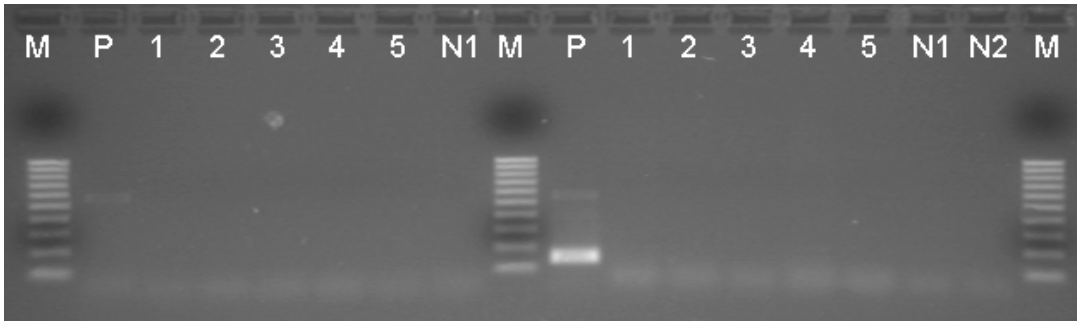

Abb. 34: Austestung der Spezifität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll mit DNA verschiedener Fischspezies, links PCR mit den Primern BO 73/BO 639, rechts Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **P:** Positivkontrolle; **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** *Anguilla anguilla*; **2:** *Cyprinus carpio*; **3:** *Oncorynchus mykiss*; **4:** *Silurus glanis*; **5:** *Trichogaster trichopterus*

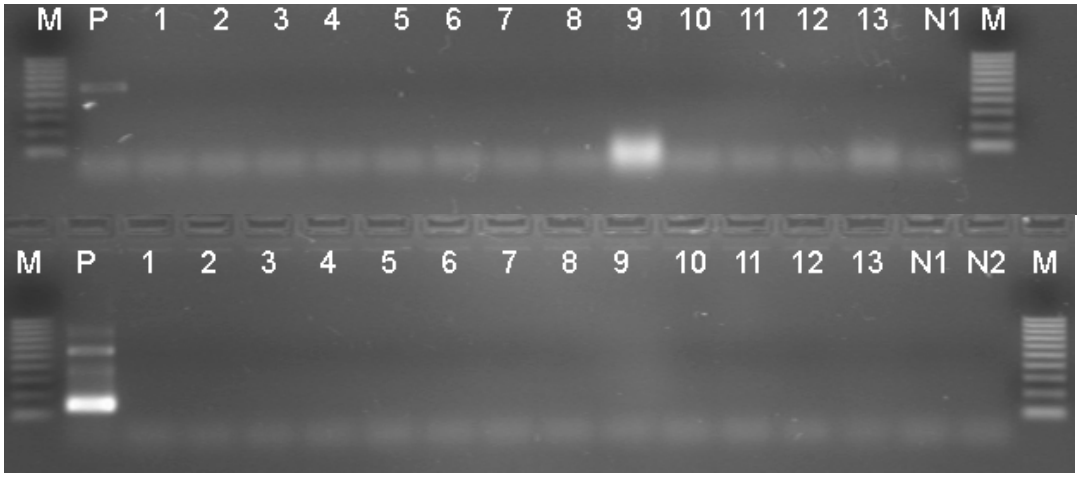

Abb. 35: Austestung der Spezifität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll mit DNA verschiedener Oomyceten- und Pilzisolate, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **P:** Positivkontrolle; **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** *Saprolegnia parasitica*; **2:** *Saprolegnia diclina*; **3:** *Saprolegnia litoralis*; **4:** *Saprolegnia terrestris*; **5:** *Saprolegnia ferax*; **6:** *Saprolegnia furcata*; **7:** *Achlya racemosa*; **8:** *Phytium flevoense*; **9:** *Isoachlya eccentrica*; **10:** *Isoachlya turoloides*; **11:** *Aspergillus flavus*; **12:** *Fusarium solani*; **13:** *Candida albicans*

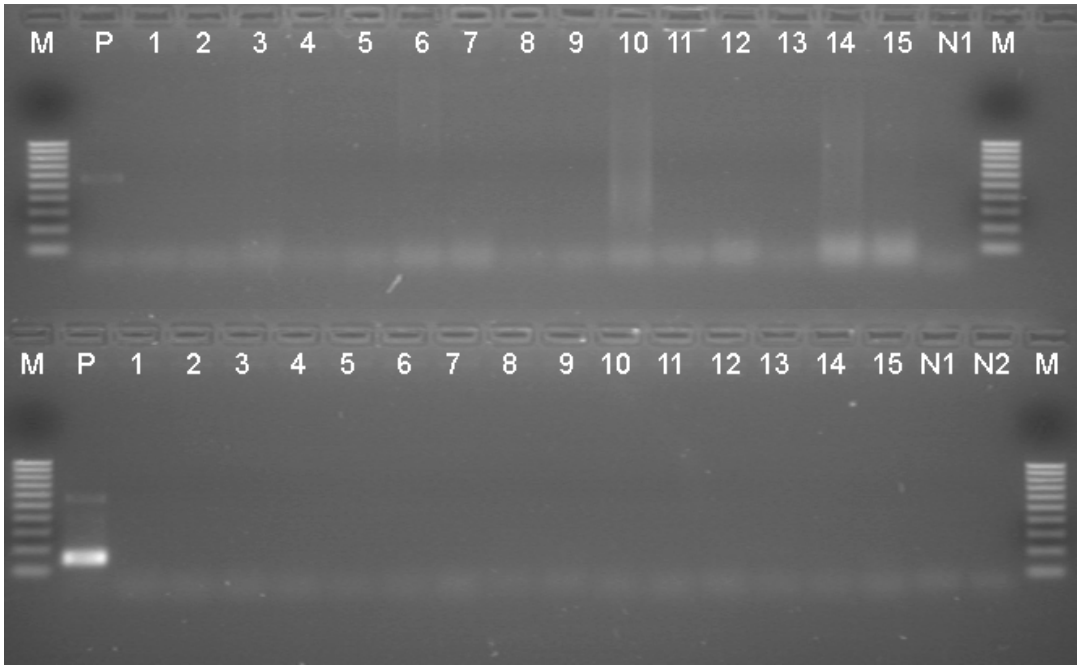

Abb. 36: Austestung der Spezifität der Semi-Nested PCR nach dem optimierten Protokoll mit DNA verschiedener Bakterienisolate und Protozoen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern BO 487/BO 639

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **P:** Positivkontrolle; **N1:** Negativkontrolle; **N2:** Negativkontrolle der Semi-Nested PCR; **1:** *Aeromonas hydrophila*; **2:** *Aeromonas salmonicida*; **3:** *Citrobacter freundii*; **4:** *Edwardsiella tarda*; **5:** *Escherichia coli*; **6:** *Flavobacterium psychrophilum*; **7:** *Listonella anguillarum*; **8:** *Mycobacterium fortuitum*; **9:** *Mycobacterium marinum*; **10:** *Pseudomonas aeruginosa*; **11:** *Staphylococcus aureus*; **12:** *Chilodonella* sp.; **13:** *Costia necatrix*; **14:** *Ichthophthirius multifiliis*; **15:** *Trichodina* sp.

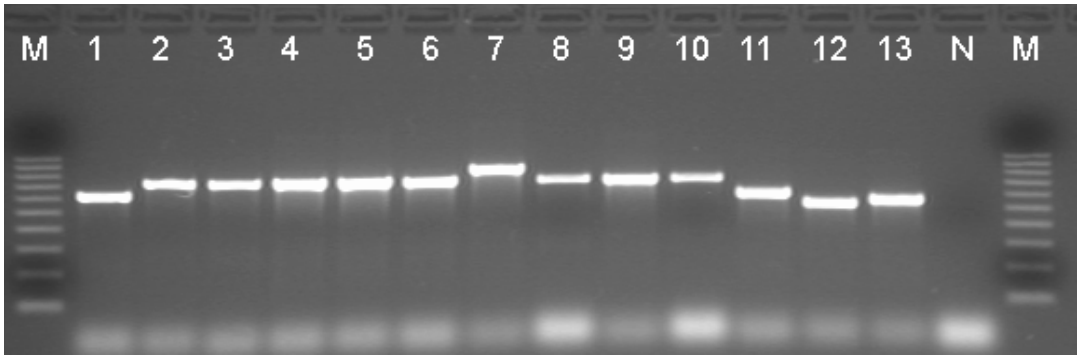

Abb. 37: Darstellung der Positivkontrollen der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung getesteten Oomyceten- und Pilzisolate mit den Primern ITS 1/ITS 4

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **1:** *Saprolegnia parasitica*; **2:** *Saprolegnia diclina*; **3:** *Saprolegnia litoralis*; **4:** *Saprolegnia terrestris*; **5:** *Saprolegnia ferax*; **6:** *Saprolegnia furcata*; **7:** *Achlya racemosa*; **8:** *Phytium flevoense*; **9:** *Isoachlya eccentrica*; **10:** *Isoachlya turoloides*; **11:** *Aspergillus flavus*; **12:** *Fusarium solani*; **13:** *Candida albicans*

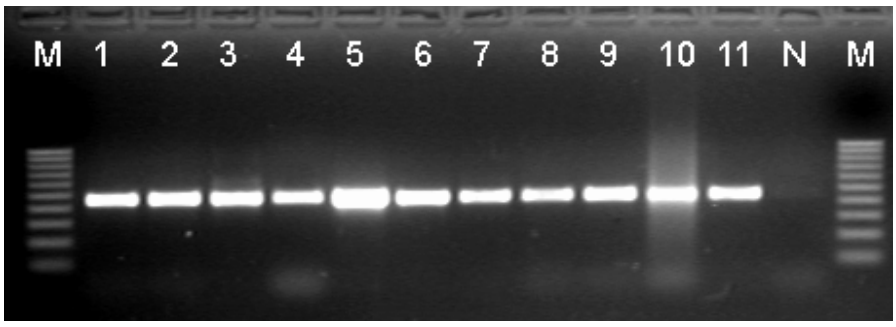

Abb. 38: Darstellung der Positivkontrollen der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung getesteten Bakterienisolate mit den Primern EUB933f/EUBr1387

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **1:** *Aeromonas hydrophila*; **2:** *Aeromonas salmonicida*; **3:** *Citrobacter freundii*; **4:** *Edwardsiella tarda*; **5:** *Escherichia coli*; **6:** *Flavobacterium psychrophilum*; **7:** *Listonella anguillarum*; **8:** *Mycobacterium fortuitum*; **9:** *Mycobacterium marinum*; **10:** *Pseudomonas aeruginosa*; **11:** *Staphylococcus aureus*

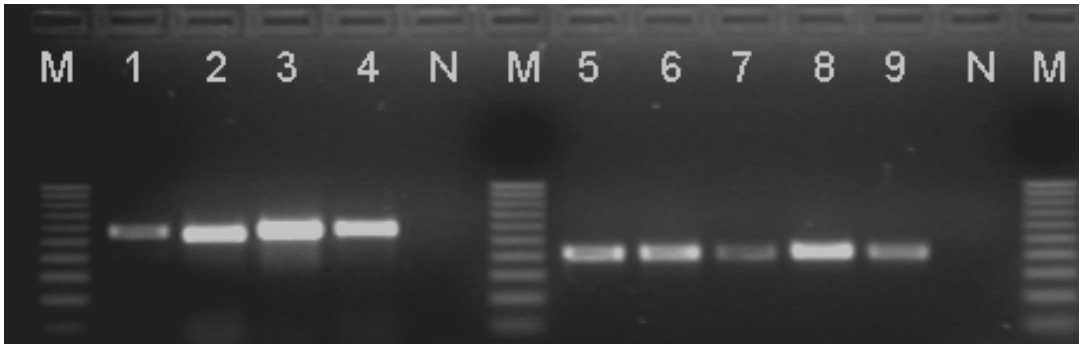

Abb. 39: Darstellung der Positivkontrollen der im Rahmen der Spezifitätsüberprüfung getesteten DNA von Protozoen mit den Primern NS 1/NS 2 und von DNA verschiedener Fischspezies mit den Primern ChordVf/ChordVr

M: DNA-Größenstandard (100 bp); **N1:** Negativkontrolle; **1:** *Chilodonella* sp.; **2:** *Costia necatrix*; **3:** *Ichthophthirius multifiliis*; **4:** *Trichodina* sp.; **5:** *Anguilla anguilla*; **6:** *Cyprinus carpio*; **7:** *Oncorynchus mykiss*; **8:** *Silurus glanis*; **9:** *Trichogaster trichopterus*

4. Gelbilder der Infektionsversuche

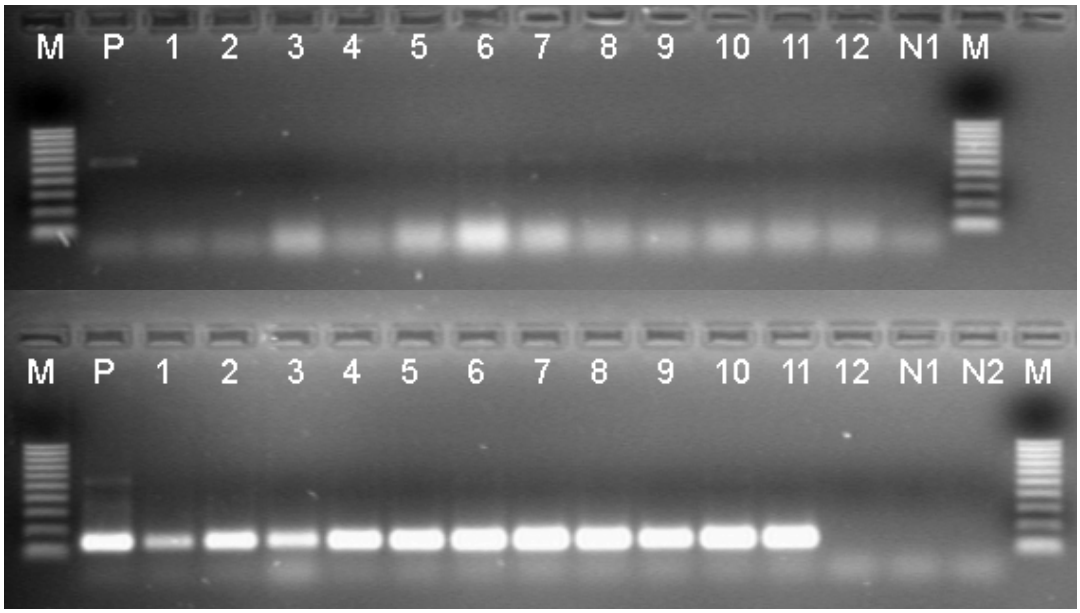

Abb. 40: Versuchsgruppe **A** der Blauen Fadenfische, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

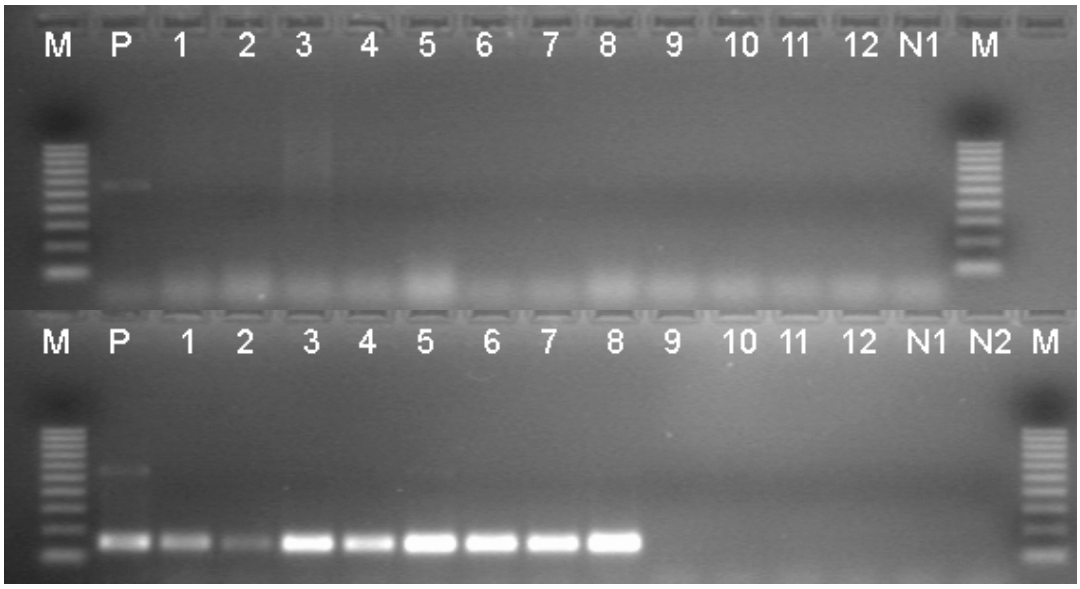

Abb. 41: Versuchsgruppe **B** der Blauen Fadenfische, oben PCR mit den

Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

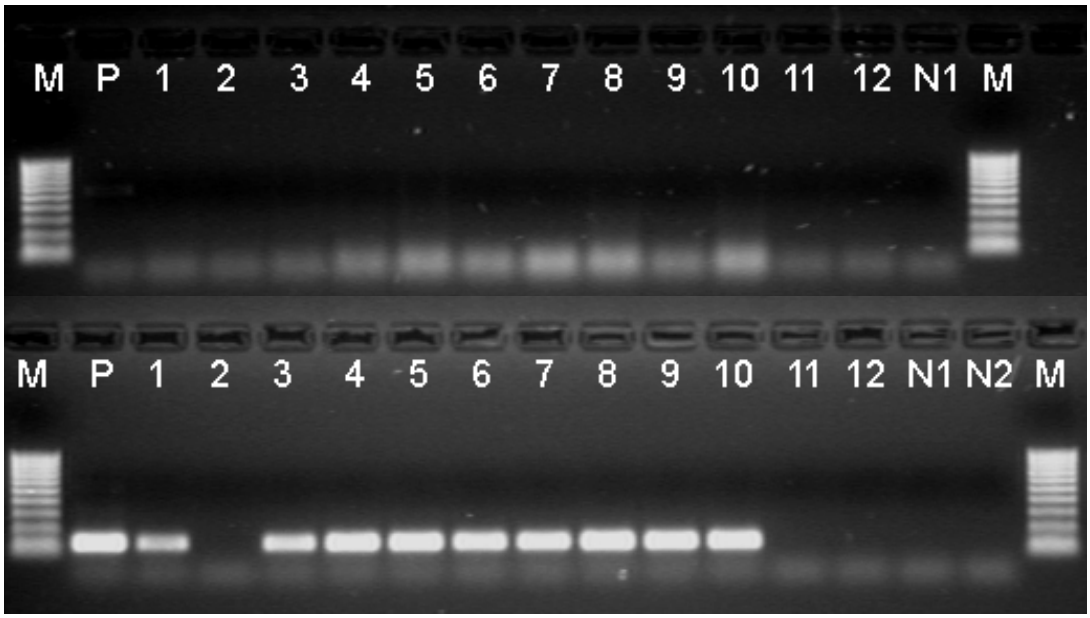

Abb. 42: Versuchsgruppe **C** der Blauen Fadenfische, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

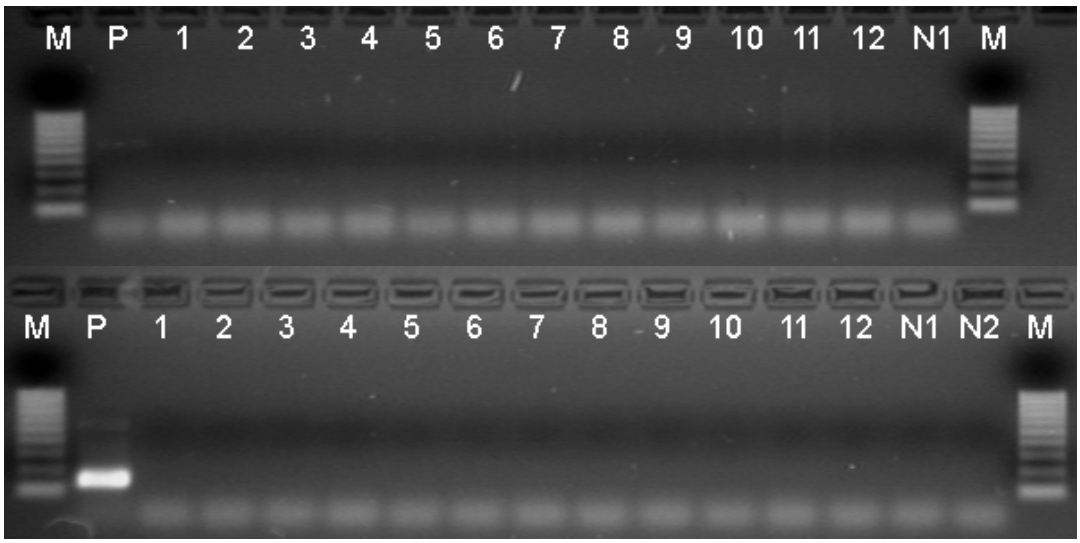

Abb. 43: Versuchsgruppe **K** der Blauen Fadenfische, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

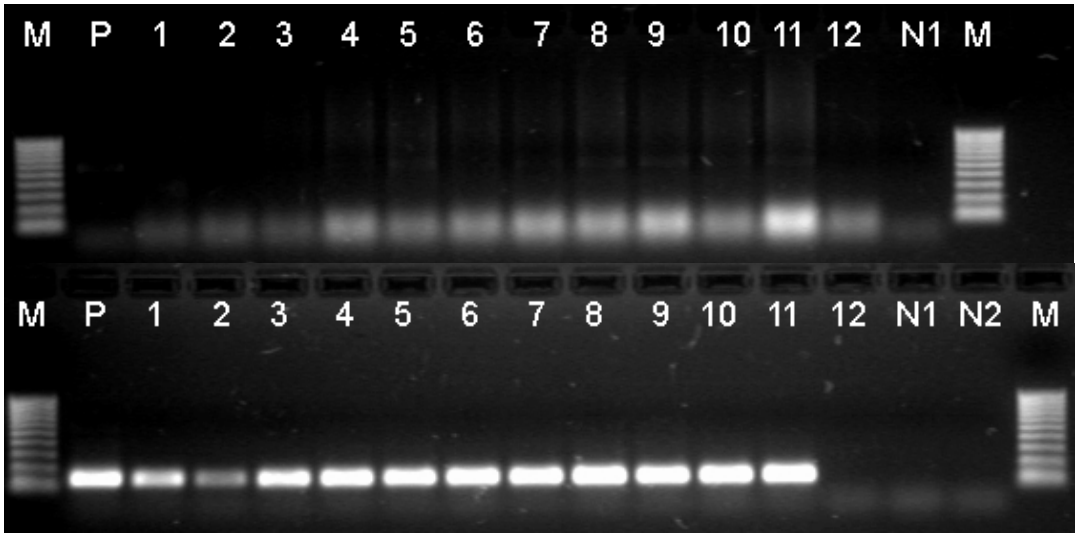

Abb. 44: Versuchsgruppe **A** der Europäischen Welse, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

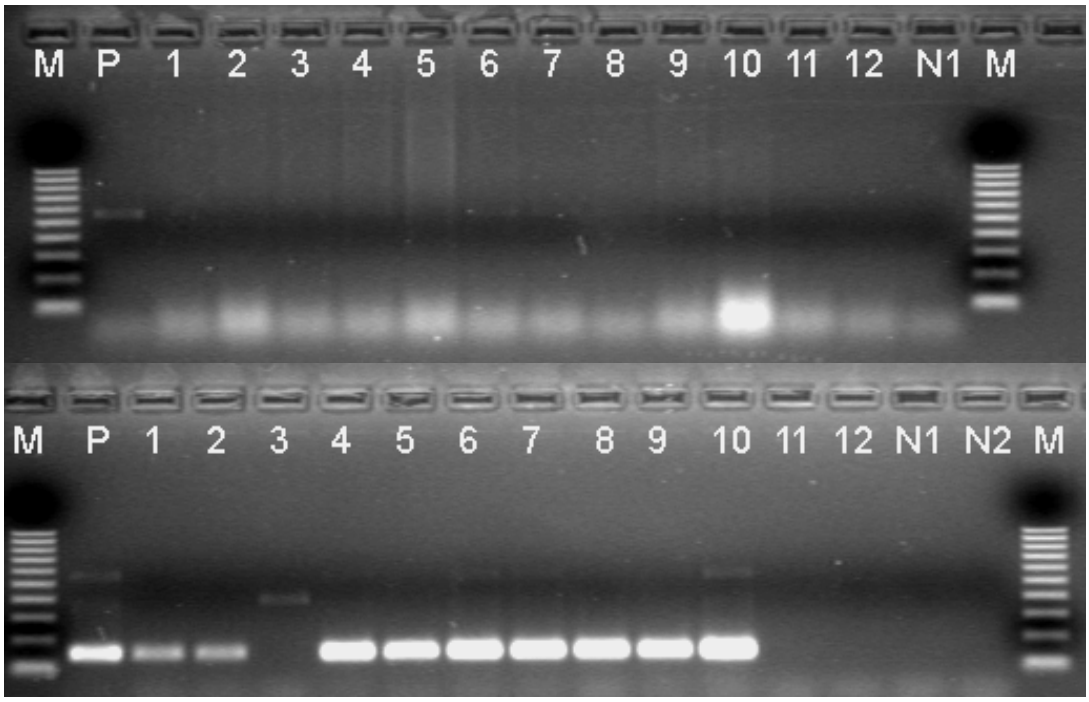

Abb. 45: Versuchsgruppe **B** der Europäischen Welse, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

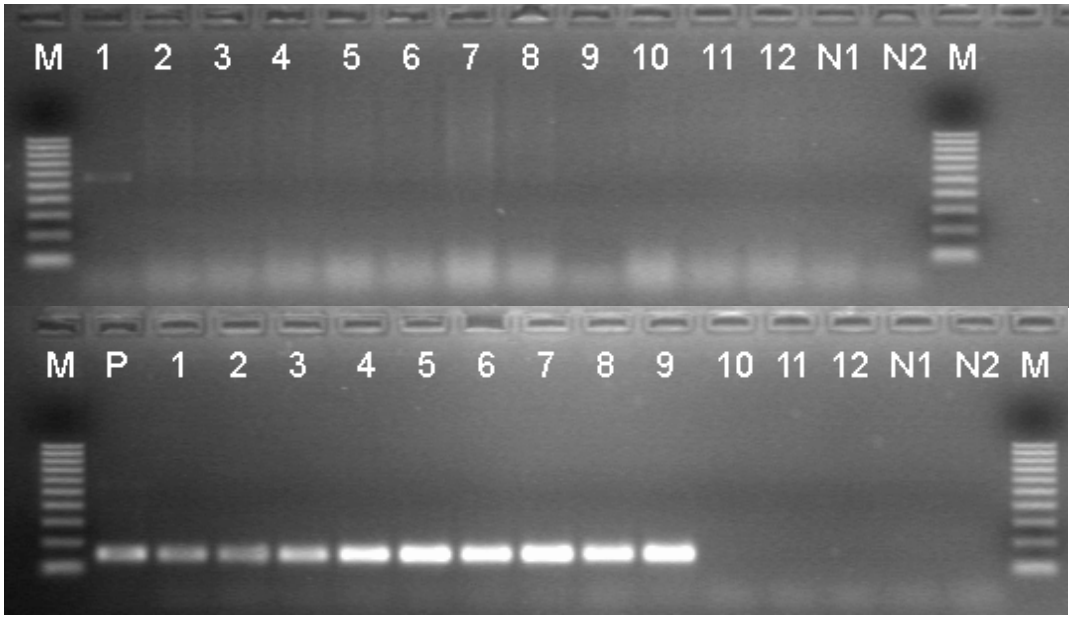

Abb. 46: Versuchsgruppe **C** der Europäischen Welse, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

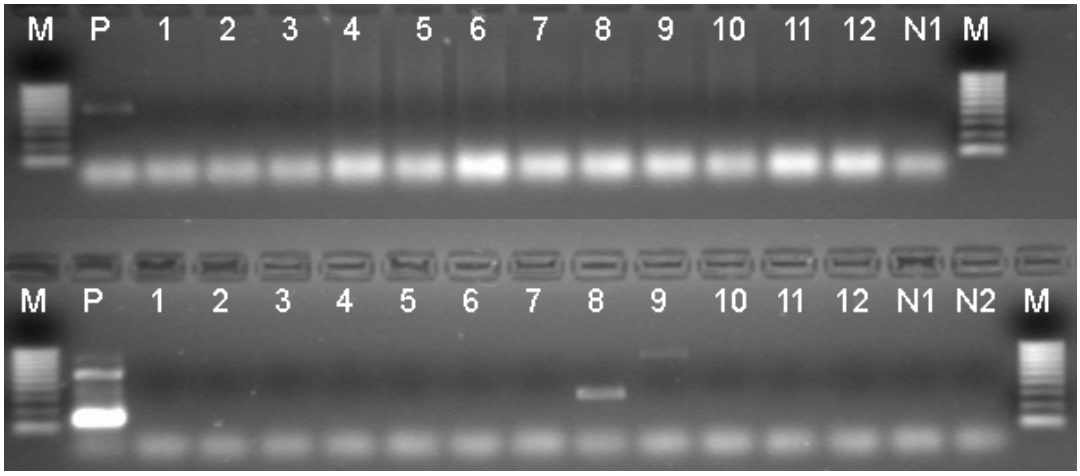

Abb. 47: Versuchsgruppe **K** der Europäischen Welse, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

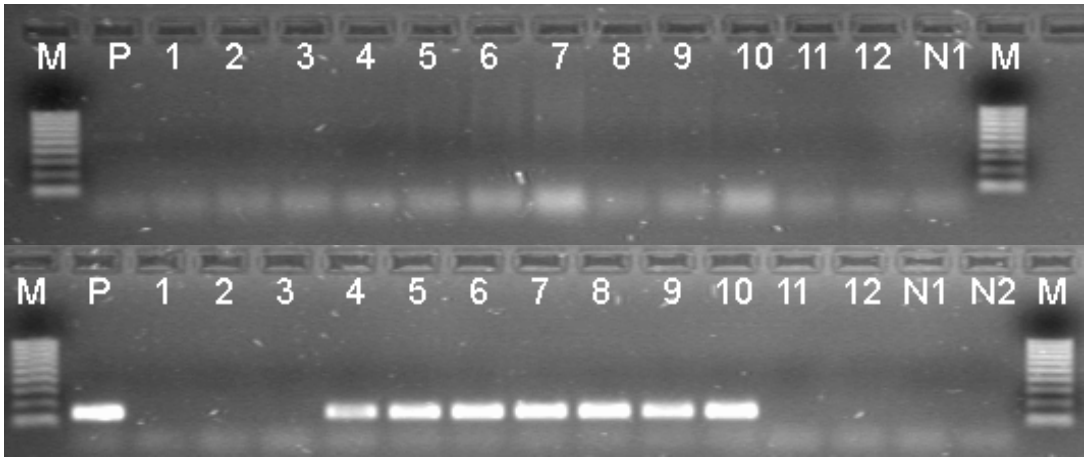

Abb. 48: Versuchsgruppe **A** der Regenbogenforellen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

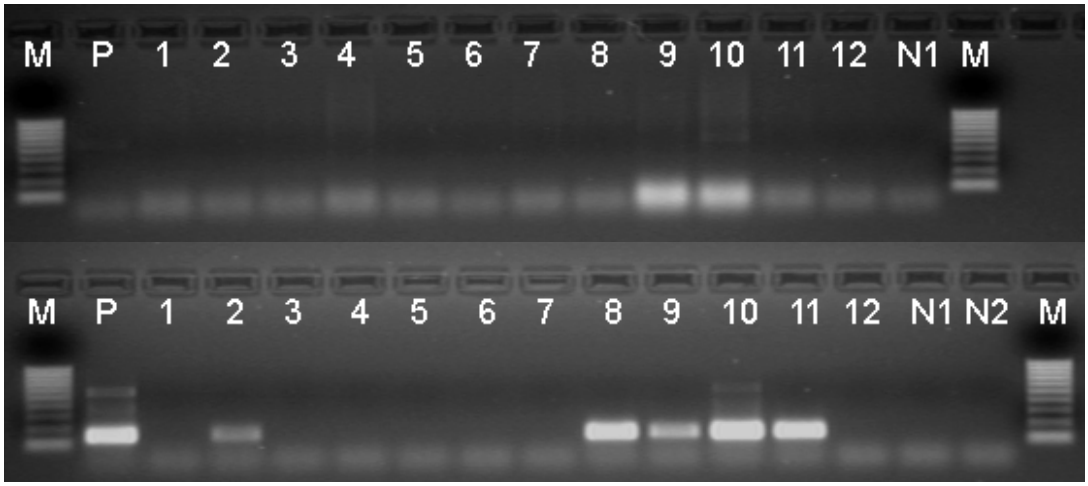

Abb. 49: Versuchsgruppe **B** der Regenbogenforellen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

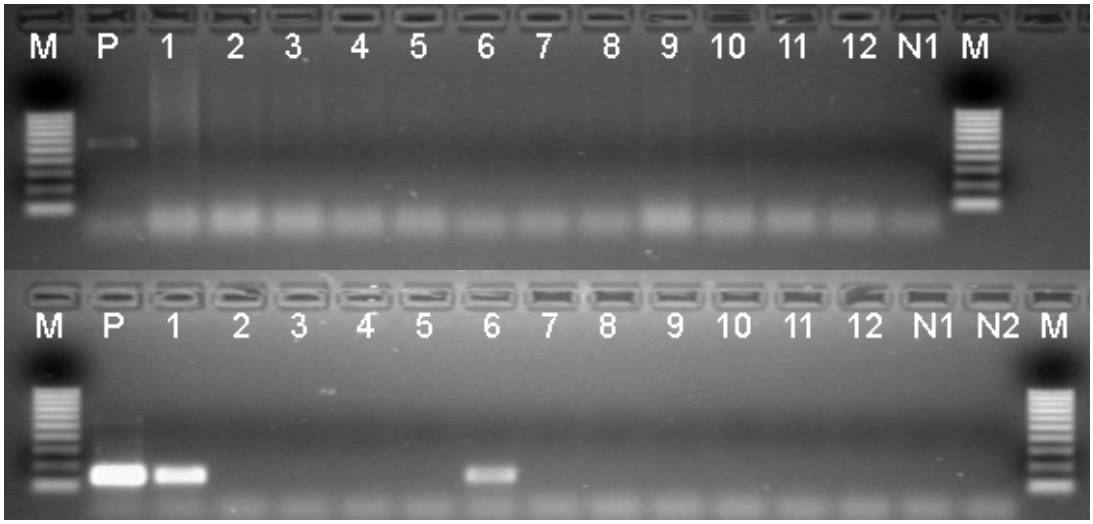

Abb. 50: Versuchsgruppe **C** der Regenbogenforellen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

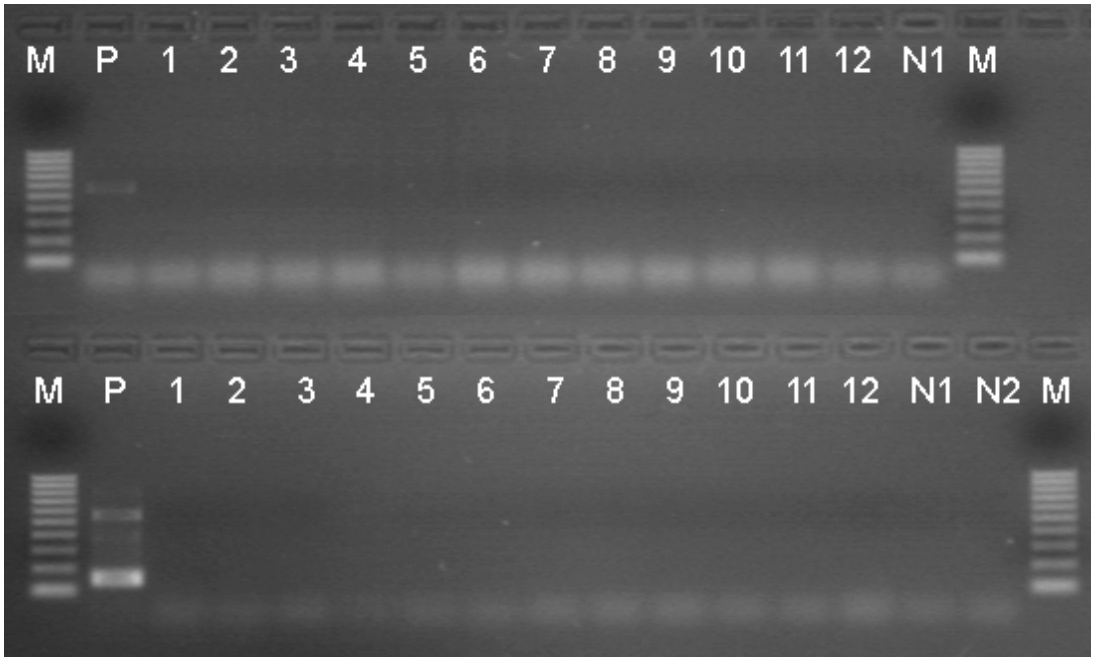

Abb. 51: Versuchsgruppe **K** der Regenbogenforellen, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

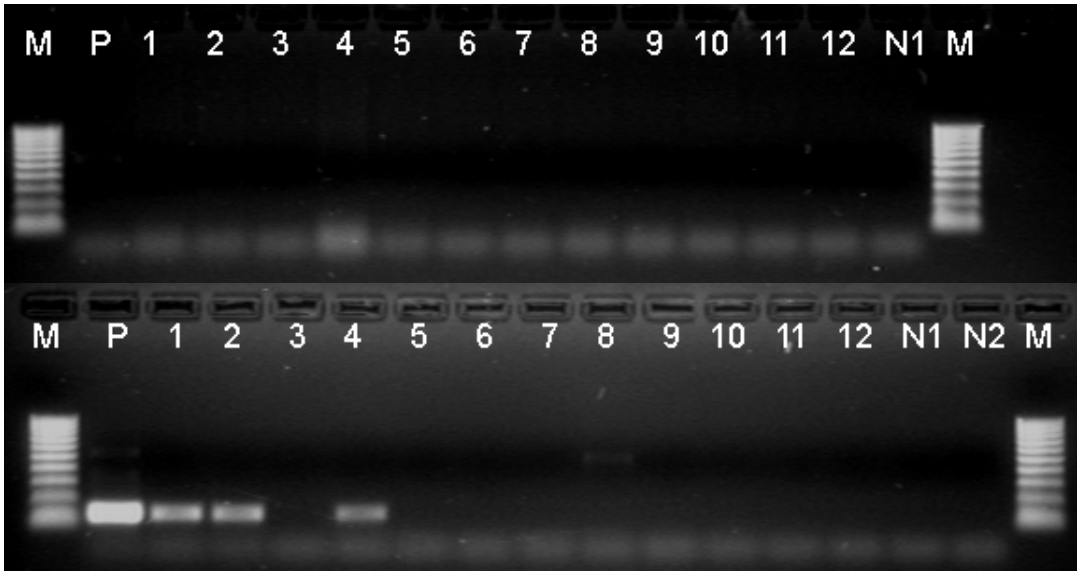

Abb. 52: Versuchsgruppe **A** der Europäischen Aale, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

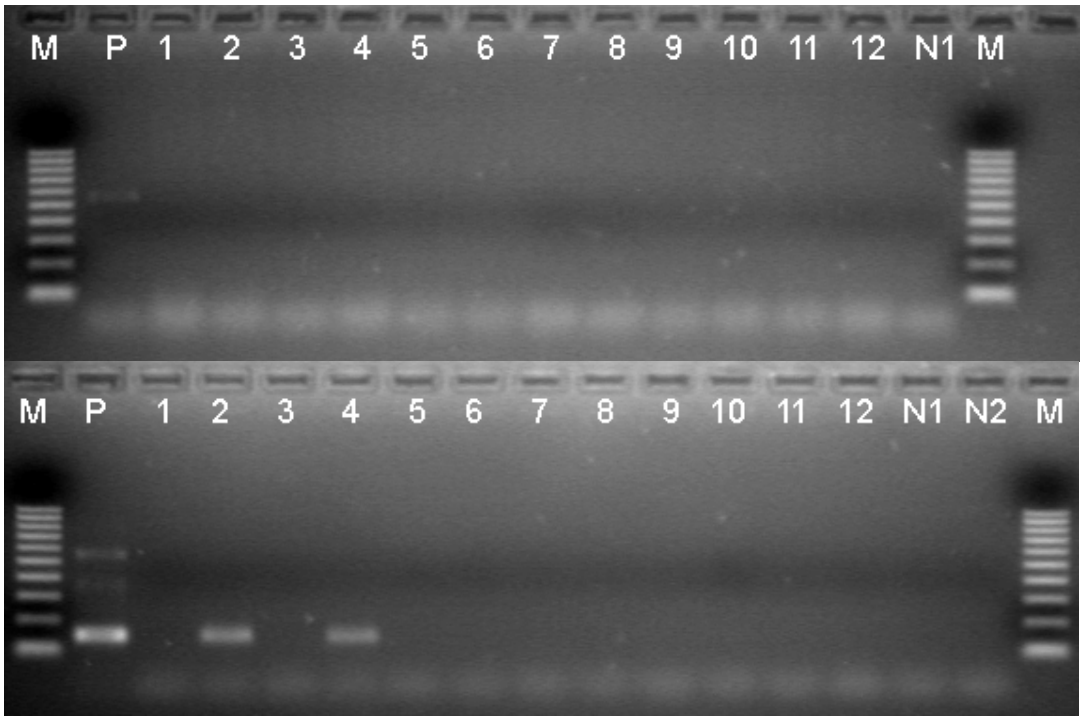

Abb. 53: Versuchsgruppe **B** der Europäischen Aale, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

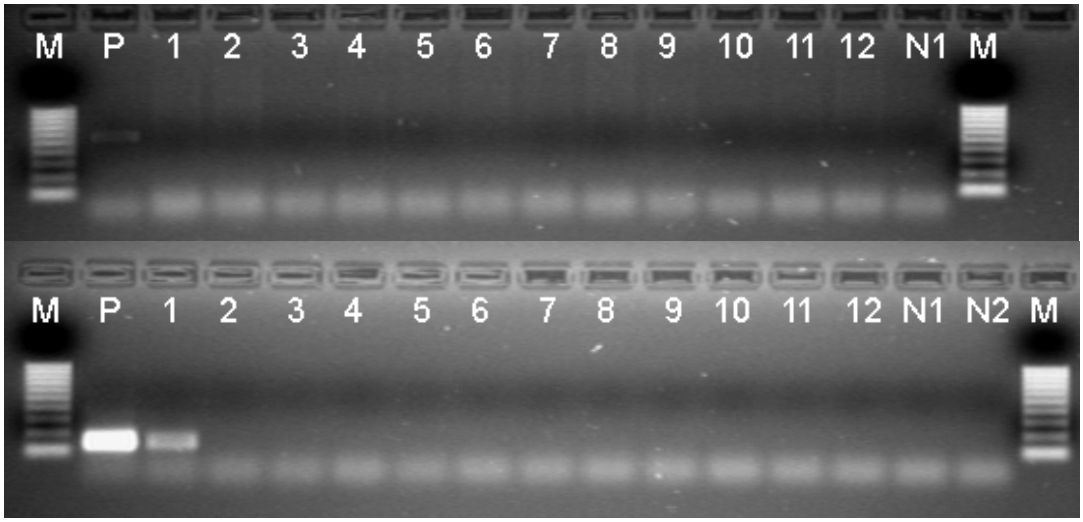

Abb. 54: Versuchsgruppe **C** der Europäischen Aale, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

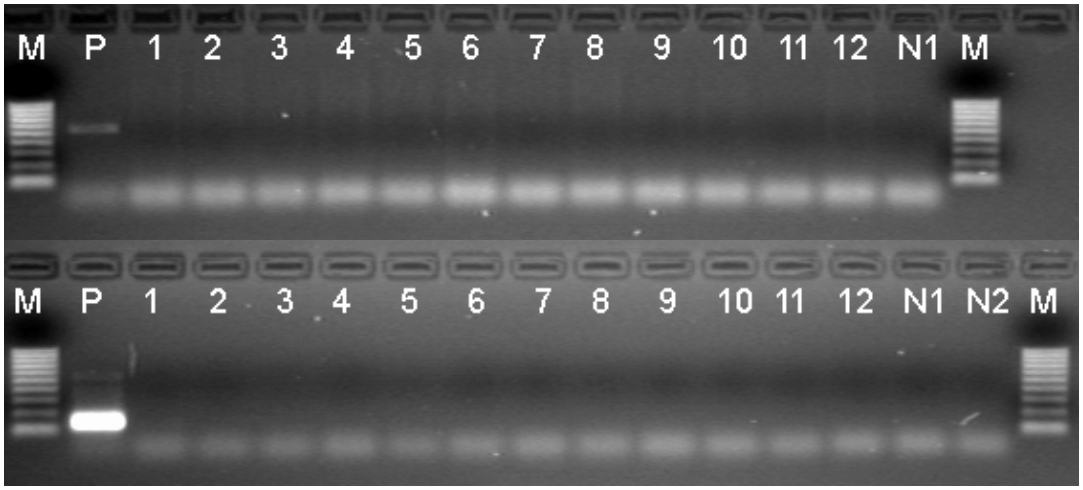

Abb. 55: Versuchsgruppe **K** der Europäischen Aale, oben PCR mit den Primern BO 73/BO 639, unten Semi-Nested PCR mit den Primern 487/639

X. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung und der Korrektur dieser Arbeit ganz herzlich danken. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit, erste Erfahrungen im Fischsektor sammeln zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Dr. habil. Birgit Oidtmann für die wissenschaftliche Betreuung, ihre jederzeit gewährte Ansprechbarkeit und die engagierte und freundschaftliche Hilfe während der gesamten Arbeit.

Bei allen Institutsmitarbeitern, die mir bei der Durchführung dieser Doktorarbeit geholfen haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken – allen voran Sheila Geiger für die große Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten, weiterhin Antoinette von Siegritz-Pesch für die Einarbeitung in die mykologischen Arbeitsmethoden, Andre Hohenegger für die Hilfe bei der Beschaffung und der Betreuung der Fische sowie Christine Kühnhauser-Vogt und Verena Ziemen für die Einarbeitung in die histologischen Arbeitsmethoden.

Meinen Mit-Doktoranden M'hamed Oumouna, Amine Oucible, Miriam Dahhan, Friederike Weinzierl und Christoph Dörfler gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die jederzeit gewährte Hilfe und die super Zeit in München auch außerhalb der Institutsmauern.

Herrn André Michas danke ich für die Hilfe bei computertechnischen Fragen.

Nina Schnabl danke ich für die Beschaffung nicht ganz alltäglicher Medien zur Oomycetenkultivierung.

Britta danke ich von ganzem Herzen für die moralische Unterstützung während der gesamten Arbeit und für ihre Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

Abschließend danke ich meinen Eltern, meiner Schwester Bettina und besonders meinen Großeltern für ihre bedingungslose Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.

XI. Lebenslauf

Name	Peter Steinbauer
Anschrift	Zenettistr. 39 a 80337 München
Geburtsdatum	13.05.1977
Geburtsort	Wangen im Allgäu
Nationalität	deutsch
Schulbildung:	
1983 - 1987	Berger-Höhe-Grundschule in Wangen
1987 - 1996	Rupert-Neß-Gymnasium in Wangen 1996 Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	
1996 - 1997	Kreiskrankenhaus in Wangen
Studium:	
1997 - 2003	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
17.02.2003	Staatsexamen
Approbation	19.03.2003
Dissertation	seit Mai 2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München