



Schlussbericht zum Thema

**Entwicklung alternativer, ökologisch
unbedenklicher, effektiver und für Fische gut
verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den
Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne
Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen**

**FKZ: 2815NA061; 2815NA076;
2815NA077**

**Projektnehmer: Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover; Bayerische Landesanstalt
für Landwirtschaft; Kallert & Loy GbR**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung
und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des
Deutschen Bundestages im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere
Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖLN-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter
www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boeln@ble.de

ABSCHLUSSBERICHT: „Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen (**AbiAqua**)“, Az: 2815NA061, 2815NA076, 2815NA077

ABSCHLUSSBERICHT

Zuwendungsempfänger: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Parasitologie, Abteilung Fischkrankheiten und
Fischhaltung
Dr. Verena Jung-Schroers
Bünteweg 17
30559 Hannover

Titel: „Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher,
effektiver und für Fische gut verträglicher
Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius*
multifiliis ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen
(**AbiAqua**)“

Förderkennzeichen: 2815NA061, 2815NA076, 2815NA077

Laufzeit: 01.06.2016-31.05.2019, verlängert bis 30.12.2019

Kooperationspartner: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Institut für Fischerei (IFI)
Weilheimer Str. 8
82319 Starnberg
Ansprechpartner: Gregor Schmidt

Kallert & Loy GbR (KuL), Studien- und Projektbüro
Birkenweg 11
91325 Adelsdorf (Aisch)
Ansprechpartner: Dr. Dennis M. Kallert

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Hannover, den 20.12.2019

Kurzfassung

Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen (AbiAqua)

¹Jung-Schroers, V., ¹Teitge, F., ¹Steinhagen, D., ²Wedekind, H., ²Zielasko, M., ²Schmidt, G., ³Kallert, D. M., ³Loy, C.

¹Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Parasitologie, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Bünteweg 17, 30559 Hannover, verena.jung-schroers@tiho-hannover.de

²Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Fischerei (IFI), Weilheimer Str. 8, 82319 Starnberg, Helmut.Wedekind@lfl.bayern.de

³Kallert & Loy GbR, Studien- und Projektbüro, Birkenweg 11, 91325 Adelsdorf (Aisch), info@kul-lab.de

Im Rahmen des Projekts AbiAqua konnten neue alternative Strategien zur Bekämpfung der Ichthyophthiriose entwickelt werden. Zum einen wurden Methoden der Transmissionsunterbrechung erfolgreich durchgeführt, zum anderen erwiesen sich zwei Impfstrategien als sehr vielversprechend. Erstmals konnten chemischen Stimuli identifiziert werden, die infektiöse *Ichthyophthirius multifiliis* Theronten zur Wirtsfindung und Wirtserkennung nutzen. Die spezifischen Reaktionen ließen sich dazu nutzen, die Schwärmer mittels natürlicher Substanzen zu ungerichtetem Wirtsfindeverhalten zu stimulieren und sie über deren Erkennungsreaktionen in Wirtsnähe an Oberflächen abzufangen. Daneben konnte mittels andauernder Aktivierung und dem damit erhöhten Energieverbrauch der Erregerstadien das Zeitfenster, in dem diese einen neuen Wirt aufgesucht haben müssen, entscheidend verkürzt und die Wirtsinvasion quantitativ minimiert werden. *I. multifiliis* Schwärmer zeigten nach Zugabe von Aktivierungskomponenten ins Wasser eine verminderte Fähigkeit zur Wirtserkennung. Eine signifikant erhöhte Mortalität der Transmissionsstadien konnte dabei sowohl durch Zugabe von Reinsubstanzen als auch durch Abfangen auf speziellen Fallen-Prototypen erzielt werden. Vom Fisch abgehende Stadien konnten zudem durch Abfangmatten wirkungsvoll entfernt werden. Die Impfung über eine Tauchbadvakzine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Vorbehandlung der Fische in einem Ultraschallbad und die Impfung durch eine intraperitoneale Injektion formalininaktivierter *I. multifiliis* erwiesen sich als wirksam. Es konnte demnach ein System entwickelt werden, das die Aufnahme des Impfstoffes über die Haut verbessert und so zu signifikant besseren Impferfolgen führt.

Die im Rahmen dieses Projektes entwickelten neuartigen Ansätze bieten klare Vorteile gegenüber der direkten Anwendung von Desinfektionsmitteln und Therapeutika in der Speisefischproduktion. Sie sind ökologisch unbedenklich, ökonomisch für den Teichwirt und einfach in der Handhabung. Durch die Entwicklung neuer Ansätze zur Eindämmung der wichtigsten Parasitose in der Aquakultur konnte ein wertvoller Beitrag zum Ausbau der ökologischen Produktion in Deutschland und zu einer Stärkung des Tierwohls in der Fischzucht geleistet werden.

Development of alternative, ecologically harmless, effective and well tolerated fish control strategies against the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* without the use of therapeutic agents in trout farming (AbiAqua)

¹Jung-Schroers, V., ¹Teitge, F., ¹Steinhagen, D., ²Wedekind, H., ²Zielasko, M., ²Schmidt, G., ³Kallert, D. M., ³Loy, C.

¹Fish Disease Research Unit, University of Veterinary Medicine, Bünteweg 17, 30559 Hannover, verena.jung-schroers@tiho-hannover.de

²Bavarian State Research Center for Agriculture, Institute for Fisheries, Weilheimer Str. 8, 82319 Starnberg, Helmut.Wedekind@lfl.bayern.de

³Kallert & Loy GbR, Birkenweg 11, 91325 Adelsdorf (Aisch), info@kul-lab.de

In the AbiAqua project, new alternative strategies to combat ichthyophthiriosis could be developed. On the one hand, methods to interrupt parasite transmission were successfully developed, on the other hand, two vaccination strategies proved to be very promising. Chemical stimuli were used for the first time, which infectious *Ichthyophthirius multifiliis* theronts use for host identification and host recognition. The specific reactions could be exploited by stimulating the theronts to exert undirected host finding behavior using natural substances and to intercept them on surfaces via their recognition reactions in the vicinity of the host. In addition, by means of continuous activation and the increased energy consumption of the pathogen stages, the time window in which they must find a new host was decisively shortened and the host invasion was quantitatively minimized. *I. multifiliis* theronts showed a reduced ability to recognize hosts after adding activation components to the water. A significantly increased mortality of the transmission stages could be achieved by adding pure substances as well as by trapping on special trap prototypes. Stages leaving the fish could also be effectively removed using specially developed interception mats. Vaccination via an immersion bath vaccine with formalin-inactivated *I. multifiliis* after pretreatment of the fish in an ultrasound bath and vaccination by intraperitoneal injection of formalin-inactivated *I. multifiliis* were found to be effective. It was therefore possible to develop a system that improves the uptake of the vaccine through the skin and thus leads to significantly better vaccination results.

The novel approaches developed as part of this project offer clear advantages over direct disinfectants and therapeutic agents in edible fish production. They are ecologically harmless, economical for the fish farmer and easy to use. The development of new approaches to control the most important parasitosis in aquaculture will make a valuable contribution to the expansion of an ecological production of fish in Germany and elsewhere and to strengthening animal welfare in fish farming.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	13
1 Einführung	13
1.1 Gegenstand des Vorhabens	13
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen	13
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	15
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	16
3 Material und Methoden	21
3.1 Phase 1: Versuche unter kontrollierten Bedingungen (Labor und Semi-Feld-Versuche)	21
3.1.1 Entwicklung von Laborzyklen von <i>I. multifiliis</i> und <i>Tetrahymena sp.</i> (TiHo Fische)	21
3.1.1.1 Laborzyklus von <i>I. multifiliis</i> auf einer permanenten Zelllinie	21
3.1.1.2 Laborzyklus von <i>I. multifiliis</i> ohne permanenten Zelllinie	22
3.1.1.3 Laborzyklus von <i>Tetrahymena sp.</i>	23
3.1.2 Etablierung einer PCR zum Nachweis von <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> aus Mukusproben, Kiemenproben und Wasserproben (TiHo Fische)	24
3.1.3 Filtration des Haltungswassers zur Reduktion der im Wasser vorhandenen Parasitenstadien (TiHo Fische, IFI)	25
3.1.3.1 Ultrafiltration (Porengröße 0,03-0,1µm) (TiHo Fische, IFI)	26
3.1.3.2 Filtration über einen Trommelfilter (TiHo Fische)	31
3.1.4 Transmissionsunterbrechung (KuL, IFI)	32
3.1.4.1 Herstellung von Testsubstraten (KuL)	32
3.1.4.2 Allgemeine Methoden (KuL)	34
3.1.4.3 Auslösung Mucocystensekretion (KuL)	35
3.1.4.4 Auslösung Nahrungsverhalten (KuL)	35
3.1.4.5 Wirtsreaktion Theronten – Attachment & Verbleiben (KuL)	35
3.1.4.6 Attachment-Stimuli Identifikation (KuL)	37
3.1.4.7 Abfangversuche <i>in vitro</i> (KuL)	37
3.1.4.8 Tests zur Überlebensrate von Theronten (KuL)	38
3.1.4.9 Wirtsreaktion Theronten – Penetration (KuL)	38
3.1.4.10 Versuche zur Fallenentwicklung - Parasite traps (KuL)	39
3.1.4.11 Trophonten-Abfangtests (KuL)	40
3.1.4.12 Infektionsexperimente zur Transmissionsunterbrechung unter Laborbedingungen (IFI, TiHo, KuL)	41
3.1.4.13 Infektionsexperimente zur Transmissionsunterbrechung unter Semi-field- Bedingungen (IFI, KuL)	42

3.1.5	Impfungen (TiHo Fische)	44
3.1.5.1	Herstellung der Vakzinen (TiHo Fische)	45
3.1.5.2	Durchführung der Impfungen (TiHo Fische)	45
3.1.5.3	Infektion der geimpften Fische und Kontrolle der Effektivität der Impfstrategien (TiHo Fische)	48
3.2	Phase 2: Versuche unter Praxisbedingungen.....	49
3.2.1	Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung unter Praxisbedingungen (KuL, IFI) ...	49
3.2.1.1	Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung in Teichwirtschaft A.....	49
3.2.1.2	Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung in Teichwirtschaft B.....	51
3.2.2	Impfungen unter Praxisbedingungen (TiHo Fische).....	52
3.3	Methodenentwicklung & Optimierung (KuL).....	53
3.4	Statistik (TiHo-Fische, KuL, IFI)	54
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	56
4.1	Phase 1: Versuche unter kontrollierten Bedingungen.....	56
4.1.1	Entwicklung von Laborzyklen von <i>I. multifiliis</i> und <i>Tetrahymena sp.</i> (TiHo Fische)	56
4.1.1.1	Laborzyklus von <i>I. multifiliis</i> auf einer permanenten Zelllinie	56
4.1.1.2	Laborzyklus von <i>I. multifiliis</i> ohne permanenten Zelllinie	57
4.1.1.3	Laborzyklus von <i>Tetrahymena sp.</i>	57
4.1.2	Etablierung einer PCR zum Nachweis von <i>I. multifiliis</i> -DNA im Wasser und auf Haut und Kiemen von Fischen (TiHo Fische).....	58
4.1.2.1	Allgemeine Überprüfung der PCR.....	58
4.1.2.2	Etablierung des Nachweises von <i>I. multifiliis</i> DNA per qPCR-in Teichwasserproben	59
4.1.3	Filtration von Entwicklungsstadien von <i>I. multifiliis</i> aus dem Haltungswasser von Fischen (TiHo Fische, IFI).....	60
4.1.3.1	Ultrafiltration (Porengröße 0,03-0,1µm) (TiHo Fische, IFI).....	60
4.1.3.2	Filtration über einen Trommelfilter (TiHo Fische)	62
4.1.4	Versuche zur Transmissionsunterbrechung (KuL, IFI).....	62
4.1.4.1	Auslösung Mucocystensekretion (KuL).....	62
4.1.4.2	Auslösung Nahsuchverhalten (KuL)	64
4.1.4.3	Wirtsreaktion Theronten – Attachment & Verbleiben (KuL).....	66
4.1.4.4	Tests zur Überlebensrate von Theronten (KuL).....	74
4.1.4.5	Wirtsreaktion Theronten – Penetration (KuL).....	76
4.1.4.6	Versuche zur Fallenentwicklung („Parasite traps“) (KuL)	77
4.1.4.7	Trophonten-Abfangtests (KuL)	79
4.1.4.8	Challenge-Experimente unter Laborbedingungen: Dispersion von Stimuli (KuL, IFI)....	80
4.1.4.9	Challenge-Experimente unter Laborbedingungen: Parasite Traps (KuL, IFI).....	81
4.1.4.10	Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Trophonten-Abfangtest (KuL, IFI)	82
4.1.4.11	Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Substratdispersion (KuL, IFI) ..	83

4.1.4.12	Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Parasite traps (KuL, IFI)	83
4.1.5	Impfungen (TiHo-Fische).....	83
4.2	Phase 2: Untersuchungen unter Praxisbedingungen.....	85
4.2.1	Untersuchungen zur Transmissionsunterbrechung (IFI, KuL).....	85
4.2.1.1	Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Fließkanäle	85
4.2.1.2	Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Hälterungsteiche.....	85
4.2.1.3	Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Änderungen am Behandlungsregime	86
4.2.1.4	Ergebnisse aus Teichwirtschaft B: Substratdispersion	86
4.2.1.5	Ergebnisse aus Teichwirtschaft B: Trophonten-Abfangtest	86
4.2.2	Impfungen unter Praxisbedingungen (TiHo-Fische)	87
4.2.2.1	Ergebnisse aus Impfversuch 1 (Setzlinge).....	87
4.2.2.2	Ergebnisse aus Impfversuch 2 (Speisefischanwärter)	88
5	Diskussion der Ergebnisse.....	90
6	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	100
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	102
8	Zusammenfassung.....	104
9	Literaturverzeichnis.....	105
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt	108

Abkürzungsverzeichnis

AK	Aktivierungskomponente(n)
BG	Biogel
BWA	Bottom-well Assay mit 35 mm Petrischalen mit mittiger Vertiefung
EPC-Zellen	Epithelioma Papillosum Cyprini-Zellen
HF	Roti-Histofix (Roth)
IA	Inosin*Arginin Salz
<i>I. multifiliis</i>	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
i.p.	intraperitoneal
K	Reinsubstanzen
kDa	Kilo-Dalton, Molekülgrößen-Einheit
LW	Leitungswasser
MX	Aktivierendes natürliches Substratgemisch X (Lebensmittelzusatz)
MY	Aktivierendes natürliches Substratgemisch Y (Lebensmittelzusatz)
n.sign.	nicht signifikant
OT	Objektträger
p.e.	Post infectionem
PA	Pellet-Assay
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT qPCR	Real Time quantitative PCR (quantitative Echtzeit PCR)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sp.	Spezies
Th	Theronten
VE	Vollentionisiertes Wasser

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Natürlich infizierte Karpfen (*Cyprinus carpio*), die im Rahmen der Diagnostikprechstunde vorgestellt wurden und von denen *I. multifiliis* gewonnen wurde.
- Abbildung 2:** Rundstrombecken, die zur Haltung der Fische in den Filtrationsversuchen verwendet wurden. Jedes der Becken hat ein Fassungsvermögen von 100 L und einen konisch zulaufenden Boden, an dem sich ein Ablauf befindet.
- Abbildung 3:** Ultrafiltrationsanlage, die in den Filtrationsversuchen verwendet wurde.
- Abbildung 4:** Aufbau der beiden Kreisläufe mit jeweils vier Rundstrombecken sowie der Ultrafiltrationsanlage für die Filtrationsversuche.
- Abbildung 5:** Anordnung des Binokulars und der wassergefüllten Wanne zur Auszählung von *I. multifiliis* Theronten auf der Haut von Fischen.
- Abbildung 6:** Sicht durch das Binokular. Auf Haut und Flossen der Fische sind Theronten von *I. multifiliis* zu erkennen.
- Abbildung 7:** Abgestorbene (links) und vitale (rechts) formalinfixierte *I. multifiliis* Theronten (gefärbt mit Bengalrosa).
- Abbildung 8:** An BG festgeheftete Theronten nach Trocknung und Färbung mit Methylgrün.
- Abbildung 9:** Abfangversuche in mittleren Volumina von 80-120 ml in PP-Schälchen.
- Abbildung 10:** Schematischer Aufbau des Bottom-Well-Assays (BWA).
- Abbildung 11:** Penetrations-Assay: Glasküvette mit Spalt zum Einbringen von Biogel-Schichten zur horizontalen Erfassung eindringender Theronten.
- Abbildung 12:** Prototyp einer beschichteten Theronten-Falle („parasite trap“) mit attraktivem Biogel und Biozid beschichtete Kunststoffplatte als Lockvorrichtung.
- Abbildung 13:** Hälterinnen mit Durchflusssystem in abgeschlossenem Quarantäne-Bereich für Challenge-Experimente.
- Abbildung 14:** Ultraschallbad zur Vorbehandlung der Fische vor der Impfung über eine Tauchbadvaccine.
- Abbildung 15:** Teichwirtschaft A. Oben links: Fließkanal mit befallenen Regenbogenforellen. Oben rechts: In Fließkanal eingebrachtes Trophonten-Fallenelement aus Stoff auf Metallgitter. Unten: Kleinteich mit befallenen Forellen-Setzlingen zur Behandlung mit Aktivierungskomponenten (AK).
- Abbildung 16:** Teichwirtschaft B: Naturteich mit befallenen Elsässer Saiblings-Setzlingen zur Durchführung der Substratdispersion und des Trophonten-Abfangtests.
- Abbildung 17:** Standardkurve von Verdünnungen einer Probe mit *I. multifiliis* DNA.
- Abbildung 18:** Schmelzkurven einer Verdünnungsreihe einer Probe zum Nachweis von *I. multifiliis*.
- Abbildung 19:** Amplifikationskurven der Messungen von Proben mit unterschiedlichen DNA-Gehalten von *I. multifiliis*.

- Abbildung 20:** Quantitativer Nachweis von *I. multifiliis* DNA aus Teichwasserproben.
- Abbildung 21:** Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Brütlingen mit *I. multifiliis*.
- Abbildung 22:** Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Setzlingen mit *I. multifiliis*.
- Abbildung 23:** Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Speisefischanwärtern mit *I. multifiliis*.
- Abbildung 24:** Auswirkungen eines Trommelfilters auf den Befall der Haut (links) und der Kiemen (rechts) von Setzlingen mit *I. multifiliis*.
- Abbildung 25:** Auswirkungen eines Trommelfilters auf den Befall der Haut (links) und der Kiemen (rechts) von Setzlingen mit *I. multifiliis*. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen.
- Abbildung 26:** Phasenkontrast-Aufnahmen von Theronten nach hyperosmotischer Desintegration (links) und nach aktiver Entleerung der Mucocysten (rechts).
- Abbildung 27:** Box-Whisker-Auftragung des visuellen Aktivitäts-Scoring (Median) von Theronten in einer Testserie ($N = 3$ pro Ansatz) nach Zugabe von Substanzen zur Auslösung des Nahrungsverhaltens. VE = Kontrolle (Wasser), MX = aktivierendes Substratgemisch, BGH = Biogel-Homogenisat, Mix = Gemisch aus Reinsubstanzen (K1-30), K1-7 = verschiedene Reinsubstanzen. Scores: 0 = keine Aktivierung, 3 = > 90 % aktiviert.
- Abbildung 28:** Auftragung der mittleren Aktivierungs-Scores von Reinsubstanzen-Verdünnungen nach Zugabe von 50 μ l Testlösung zu 1 ml Th-Lösung unmittelbar nach Zugabe (oben) und nach 1 h Inkubation (unten) ($N = 3$ pro Ansatz). K = Kontrolle (Wasser), MY = aktivierendes Substratgemisch, K5,6 = Reinsubstanzen. Scores: 0 = keine Aktivierung, 3 = > 90 % aktiviert.
- Abbildung 29:** Zahlreiche an BG 3-Pellet angeheftete Theronten (oben) sowie in einer mikroskopischen Auswertung der Pellets (unten).
- Abbildung 30:** Festgeheftete Theronten an verschiedenen BG-Substraten ($N = 6$).
- Abbildung 31:** Anzahl von Theronten an BG 3-Pellets nach verschiedenen Inkubationszeiten p.e. (600 Theronten/Well).
- Abbildung 32:** Anteil (%) von Theronten an BG 1 und BG 3-Pellets nach verschiedenen Inkubationszeiten p.e. (300 Theronten/Well).
- Abbildung 33:** Festgeheftete Theronten an verschiedenen BG-Substraten unter Zugabe von Substraten zur Attraktivitäts-steigerung ($N = 4$). S = Serum (Forelle), M = Mukushomogenisat, MX = aktivierendes Substratgemisch.
- Abbildung 34:** Anteil festgehefteter Theronten (%) an verschiedenen BG-Substraten unter Zugabe von Substraten zur Attraktivitätssteigerung ($N = 4$). MX = aktivierendes Substratgemisch, BG 3 + MX: zum Substrat gemischt, BG 3 + MX p = zu Theronten hinzu pipettiert.

- Abbildung 35:** Anzahl festgehefteter Theronten an BG 3-Substrat auf OT nach unterschiedlicher Expositionsdauer, teils nach Vorinkubation und unter Zugabe von Substrat zur Attraktivitäts-Verlängerung ($N = 3-5$). MX = aktivierendes Substratgemisch, ink = vorinkubiert in Wasser.
- Abbildung 36:** Anzahl festgehefteter Theronten an zwei verschiedenen BG-Substraten nach 30 min Exposition, teils nach Vorinkubation und teils unter Zugabe von Substrat zur Attraktivitäts-Verlängerung ($N = 3-5$). MX = aktivierendes Substratgemisch, ink = vorinkubiert in Wasser, ON = über Nacht inkubiert.
- Abbildung 37:** Anteil zugegebener Theronten an verschiedenen BG-Substrat-Pellets mit direkter Zugabe von MX-Lösung ($N = 4$). MX = aktivierendes Substratgemisch, p = zum Well hinzu pipettierte Lösung.
- Abbildung 38:** Anzahl Theronten an verschiedenen BG-Substrat-Pellets mit Zugabe von MX nach 2 h Inkubation ($N = 3$). MX = aktivierendes Substratgemisch.
- Abbildung 39:** Anzahl Theronten an verschiedenen BG 3 und BG 4 -Pellets mit Zugabe von Reinsubstanz-Komponenten ($N = 6$).
- Abbildung 40:** Anzahl lebender Theronten in 5 ml Volumen nach Inkubation über 10 (links) und 22 (rechts) h. Mannitol = 13 mosmol, Ino/Arg = Inosin-Arginin Salz 2 mg/ml, L-Arg = Arginin 1 mg/ml, MX = aktivierendes Substratgemisch.
- Abbildung 41:** Anteil toter Theronten (%) nach Inkubation mit MX über 18 h bei 12°C in 75 ml Einheiten ($N = 3$). K = Kontrolle (keine Zugabe), ÜS = Überstand, Sed = Bodenvolumen, MX = aktivierendes Substratgemisch.
- Abbildung 42:** Absterberate von Theronten (%) nach Inkubation mit MX und K6 nach 9,5 (MX) bzw. 26 (Kontrolle/K6) h in 10 ml (6 Well Platten) bei RT nach gestaffelter Zugabe von Stimuli.
- Abbildung 43:** Anzahl penetrierter Theronten in BG 3-Matrix im Glasküvetten-Versuch (links). In BG 3 penetrierte Theronten (rechts); h = härter angesetztes BG, s = viskoser angesetztes BG.
- Abbildung 44:** Abtötung von Theronten nach 30 min Inkubation im Bottom Well Assay mit unterschiedlich vorinkubierten BG; je 45 µl BG 3-Spot + Niclosamid (0,1 %) in 50 ml Volumen; w = weiches BG, h = hartes BG, K = Kontrolle (Frisch exponiert), MX = Zugabe aktivierendes Substratgemisch. Grün = Zeitpunkt 0, blau = am jew. Zeitpunkt verwendetes nicht vorinkubiertes BG, orange = vorinkubiertes BG.
- Abbildung 45:** Tests von Materialien zum Festheften und Encystieren der Trophonten.
- Abbildung 46:** Festhefterate von Trophonten an verschiedenen Materialien in halb bedeckten Wells von 6-Well Platten.

- Abbildung 47:** Anzahl von Trophonten auf einer Körperseite (inkl. Flossen) von Regenbogenforellen nach 7 d Inkubation p.e bei 16°C. Die Fische ($N = 30$) wurden unter wiederholter kumulativer Zugabe von MX (8 oder 24 mg Endkonzentration pro Becken), oder nach Vorinkubation der Theronten mit MX (vorinkubiert), einer Dosis von 330 Theronten/Fisch exponiert. 7 h VI = 7 h vorinkubiert.
- Abbildung 48:** Mittlere Trophontenzahlen auf der Körperoberfläche der Regenbogenforelle nach 7 d Inkubation nach vorheriger Exposition mit gleichen Mengen *I. multifiliis* Theronten.
- Abbildung 49:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 27 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Gruppe 1-13 und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6) und 7 Tage nach Infektion mit *I. multifiliis*.
- Abbildung 50:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 27 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Gruppe 1-13 und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6) und 7 Tage nach Infektion mit *I. multifiliis*. Mittels PCR erhobene Befunde.
- Abbildung 51:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 5 und 23 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvakzine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mikroskopisch erhobene Befunde.
- Abbildung 52:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 5 und 23 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvakzine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mittels PCR erhobene Befunde.
- Abbildung 53:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Speisefischanwärtern von Regenbogenforellen 5 und 13 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvakzine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mikroskopisch erhobene Befunde.
- Abbildung 54:** Anzahl Trophonten auf der Haut von Speisefischanwärtern von Regenbogenforellen 5 und 13 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvakzine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mittels PCR erhobene Befunde.
- Abbildung 55:** Durch Inkubation im Experiment von Theronten zu Trophonten transformierte Stadien von *I. multifiliis*.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Getestete Ansätze zur Etablierung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* auf EPC-Zellkulturen.
- Tabelle 2:** Getestete Ansätze zur Etablierung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* ohne Zellen.
- Tabelle 3:** Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde zur Etablierung einer PCR zum Nachweis von *I. multifiliis*.
- Tabelle 4:** Test 1 zur Filtrationsrate der in diesem Vorhaben verwendeten Ultrafiltrations-Versuchsanlage, gefiltert wurde Versuchseinheit 1, gefüllt mit reinem Quellwasser, ohne Fischbesatz.
- Tabelle 5:** Test 2 zur Filtrationsrate der in diesem Vorhaben verwendeten Ultrafiltrations-Versuchsanlage gefiltert wurde Versuchseinheit 1, gefüllt mit reinem Quellwasser, besetzt mit 50 Regenbogenforellen.
- Tabelle 6:** Getestete Impfstrategien.
- Tabelle 7:** Anzahl an Theronten mit sichtbarer Entleerung der Mucocysten (+) und nicht reagierender Individuen (-) nach Inkubation mit Testsubstraten auf OT.
- Tabelle 8:** Mittlere Anzahl an Trophonten auf mit Trophonten-Fallen behandelten Einheiten nach Größenklassen. K = Kontrolle.
- Tabelle 9:** Gemessene Wasserparameter während der Testbehandlung in Teichwirtschaft A.

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Im Kooperationsprojekt „Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen“ (AbiAqua) wurden verschiedene neue Ansätze zur Bekämpfung des einzelligen Parasiten *I. multifiliis* verfolgt. Der Parasit ist der Erreger der Weißpünktchenkrankheit und hat eine große ökonomische Bedeutung in der Teichwirtschaft. Der Parasit infiziert die Haut und die Kiemen von Süßwasserfischen, wobei diese eine schützende, adaptive Immunantwort gegen die Krankheit entwickeln können. Da in Deutschland keine Therapeutika zur Behandlung einer Infektion mit diesem Parasiten zugelassen sind, besteht ein Therapienotstand. Daher besteht im Sinne des Tierwohls und der Ökonomie in der deutschen Teichwirtschaft national wie international dringender Bedarf an neuen alternativen Ansätzen zur Eindämmung der Infektion und einer effektiven Verringerung der Mortalität. Im Rahmen dieses Projektes wurden alternative Behandlungsstrategien, die zu einer Reduktion der Parasiten und damit zu mehr Fischwohl und weniger Fischverlusten führen sollten, erprobt. Alle getesteten Methoden bzw. Substanzen wiesen eine gute Umweltverträglichkeit auf und hinterließen keine Rückstände im aquatischen Milieu.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Das Ziel des Kooperationsprojektes AbiAqua war es, ökologisch unbedenkliche, für Fische gut verträgliche, effektive Behandlungsstrategien gegen den Parasiten *I. multifiliis*, einen der ökonomisch wichtigsten Verlustfaktoren in der Teichwirtschaft, zu entwickeln. Infektionen mit diesem Erreger führen insbesondere in Forellенbetrieben teils zu hochgradigen Verlusten. Da derzeit in der EU keine wirksamen Medikamente zur Behandlung dieser Infektion bei Speisefischen zugelassen sind, besteht ein Therapienotstand. Zum einen ist dies aus tierschutzrechtlicher Sicht nicht zu vertreten, zum anderen kann ein Krankheitsausbruch zu erheblichen ökonomischen Verlusten führen und gefährdet nicht selten das Fortbestehen traditioneller Teichwirtschaften. Es fehlte hierfür bislang an innovativen Ansätzen als Alternativen für eine medikamentöse Behandlung im Krankheitsfall. Bei starkem Befall einer großen Anzahl an Fischen treten typischerweise innerhalb weniger Stunden Mortalität auf. Zu diesem Zeitpunkt sind i.d.R. weder Vakzinen noch andere Behandlungsmethoden effektiv (Jørgensen 2017). Um zum einen die hohe Mortalität vor allem bei Jungfischen zu mindern und zum anderen das Leiden der Tiere signifikant zu verringern, ist es daher wichtig, Maßnahmen bereits vor einem klinischen Krankheitsausbruch zu ergreifen. Dies kann durch eine vorherige Immunisierung der Fische oder durch die Minimierung der sich rapide erhöhenden Parasitenzahlen im System erfolgen. Die Entwicklung einer nicht auf Therapeutika basierenden Bekämpfungsstrategie kann demnach einen wichtigen Beitrag zur Förderung einer nachhaltigen Aquakultur und zur Erhaltung traditioneller Teichwirtschaften leisten. Insbesondere könnten die gewonnenen Erkenntnisse wesentlich zur Weiterentwicklung der Öko-Aquakultur beitragen, da hier die Vermeidung des Einsatzes von Medikamenten eine wichtige Grundvoraussetzung darstellt.

In AbiAqua wurden drei verschiedene Ansätze zur Reduktion des Parasiten verfolgt. Zum einen sollte die Zahl der infektiösen Parasitenstadien im Wasser und deren Verbreitung signifikant reduziert

werden. Dies sollte durch eine mechanische Entfernung der im Wasser befindlichen Parasitenstadien durch Filtration erreicht werden. Zum anderen sollte die Übertragung von Parasitenstadien im Wasser auf die Fische reduziert werden. Diese Blockierung der Übertragung sollte durch Methoden, welche die Parasitenstadien im Wasser inaktivieren, die Wirtserkennung verhindern oder die Vermehrungsstadien durch geeignete Methoden abfangen, erreicht werden. Die Fragestellung des Projektabschnitts Transmissionsunterbrechung war daher, welche Substanzen für eine artifizuell herbeigeführte Aktivierung der Wirtserkennungs- und Invasionsreaktionen der *I. multifiliis* Theronten, und damit für eine effiziente Transmissionsblockierung verwendet werden können. Hauptziel dieses Projektteils war es, durch den Einsatz von geeigneten Wirksubstraten zur Ausbringung in den Wasserkörper, sowie speziell konstruierten Abfangtools (Dispersion von Stoffen, Decoy (=Abfang)-Matrices oder Parasitenfallen), die Wirtsfindung der Theronten von *I. multifiliis* zu verhindern. Die Verringerung des Erregerdrucks verschafft den oft frisch besetzten Fischen die nötige Zeit, eine anhaltende Immunisierung gegen den Erreger zu entwickeln. Teilziele dieses Projektteils waren die Inaktivierung der freischwimmenden Parasitenstadien, deren Wirtsfindung und -erkennung zu verhindern, deren verfügbare Transmissionszeit zu verkürzen und die infektiösen Stadien durch neue innovative Methoden abzufangen bzw. abzutöten. Dazu sollen neu identifizierte Wirtserkennungs-Stimuli genutzt werden, um die Theronten zu ungerichteten Reaktionen zu veranlassen, welche die aktive Wirtsfindung durch Verlust der Infektiösität effektiv unterbinden können. Die Stimuli für das Festheften am Fisch und dessen Penetration durch *I. multifiliis* Theronten sind bislang unbekannt und sollten in diesem Projektabschnitt identifiziert und in alternative Methoden zur Transmissionsunterbrechung implementiert werden. Als dritter Aspekt sollte die Entwicklung von neuen Impfstrategien gegen den Parasiten erprobt werden. Dabei sollte auch erprobt werden, ob verschiedene vor der Impfung durchgeführte Maßnahmen die Aufnahme des Impfstoffes über die Haut und die Kiemen verbessern können und so zu einem verbesserten Impferfolg führen können. Die konkreten Fragestellungen waren, ob durch alternative Bekämpfungsstrategien eine effektive Bekämpfung von *I. multifiliis* in der Fischproduktion erzielt werden kann, ob die Menge freischwimmender Verbreitungsstadien von *I. multifiliis* durch Ausnutzung der chemischen Wirtssignale in Kombination mit mechanischer Entfernung effektiv reduziert werden können, ob eine gut verträgliche Vakzine mit Antigen-Aufnahme über die Haut bei Jungfischen wirksam gegen Infektionen mit *I. multifiliis* eingesetzt werden kann und welche Maßnahmen und kombinierte Methoden für ein innovatives, ökologisch orientiertes Behandlungsschema effektiv sind und weder die Umwelt belasten noch das Tierwohl gefährden.

Alle Maßnahmen wurden zunächst unter Laborbedingungen getestet. Nach Abschluss der Laboruntersuchungen wurden die vielversprechendsten Maßnahmen unter Praxisbedingungen angewendet. Bei allen durchgeführten Versuchen waren neben dem Aspekt des Natur- und Umweltschutzes insbesondere das Tierwohl und die Fischgesundheit von besonderer Bedeutung. Bei den zu erarbeitenden Ansätzen handelt es sich explizit um ökologisch unbedenklich einsetzbare, nicht-medikamentöse Methoden zur Reduktion der Parasitenstadien. Dies vermeidet den flächigen Einsatz von Bioziden, Desinfektionsmitteln und anderen fisch- und umweltschädlichen toxischen Substanzen. So soll die Nachhaltigkeit der Fischproduktion auch in kleineren Betrieben erhalten und verbessert, und das Tierwohl entscheidend gestärkt werden. Diese Aspekte stehen besonders im Einklang mit den Förderzielen des BÖLN-Programms.

Unter Berücksichtigung der förderpolitischen Ziele ist dies ein dringend benötigter Beitrag zur Verbesserung der ökonomischen Planungssicherheit der heimischen Teichwirtschaft und Fischzucht v.a. auch im Sinne der Biosicherheit und des Tierwohls. An den Zielen des geplanten Vorhabens sollte

deshalb ein hohes Bundesinteresse bestehen, weil die Etablierung neuer Management-Strategien angesichts fehlender Behandlungsmöglichkeiten dieser bedeutendsten Parasitose in der Fischzucht eine große Chance für die ökologische Aquakultur in Deutschland darstellt.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt AbiAqua war in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurden die zu testenden Ansätze unter kontrollierten Bedingungen im Labor entwickelt und überprüft. Dies bot die Möglichkeit, andere von außen einwirkende Faktoren weitestgehend zu minimieren und unterschiedliche Konzentrationen einfach zu testen. Die Filtrationsversuche wurden dabei durch die Projektpartner TiHo und IFI durchgeführt. Es wurden Versuche von Fischen unterschiedlicher Größe und mit zwei unterschiedlichen Filtrationsanlagen durchgeführt. Die Versuche zur Transmissionsunterbrechung wurden durch den Partner KuL gemeinsam mit den Partnern IFI und TiHo durchgeführt. Ausgehend von der experimentellen Analyse von Substraten zur Auslösung der Attachment- und Verbleibe- sowie Penetrationsreaktion der Theronten *in vitro*, sollten zunächst im Labormaßstab Stimuli isoliert und auf deren Verwendbarkeit hin getestet werden. Die Versuche zu unterschiedlichen Impfstrategien und Applikationsformen wurden durch den Partner TiHo bearbeitet. In der zweiten Phase wurden die Ansätze, die sich in den Laborexperimenten als am vielversprechendsten herausgestellt hatten, unter Praxisbedingungen wiederholt. Dies war notwendig, um eine Übertragbarkeit in eine reale Aquakulturanlage zu untersuchen. In dieser Praxisphase wurden aufgrund der Ergebnisse aus den Laborversuchen nur die Ansätze zur Transmissionsunterbrechung und verschiedene Impfstrategien eingesetzt. Die Implementierung in praxistaugliche Bekämpfungsmethoden der *in vitro* erfolgreichsten Ansätze zur Transmissionsunterbrechung sollte der nächste Schritt sein. Die bewährten Verfahren wurden auch in Betrieben mit *I. multifiliis* Infektionsgeschehen erprobt. Parallel wurden Methoden zum Abfangen der vom Fisch abgehenden Trophonten entwickelt, welche ebenfalls in Semi-Feld Ansätzen und in betroffenen Betrieben getestet wurden. Es wurden die zwei am effektivsten wirksamen Impfstoffe in einer Teichwirtschaft, die immer wieder auftretende Infektionen mit *I. multifiliis* zu verzeichnen hat, getestet. In Phase drei sollte nach Projektantrag der Wissenstransfer in die Praxis stattfinden. Nach Auswertung der Daten aus den Teichwirtschaften wurden Rückschlüsse gezogen, welche Methoden in welcher Weise für die Praxis zu empfehlen sind. Diese Empfehlungen wurden zu einem Merkblatt zusammengefasst und können nun interessierten Fischwirten, Betriebsleitern, Tierärzten und weiteren interessierten Gruppen zur Verfügung gestellt werden. Zudem sollen über die Projektlaufzeit hinausgehend die Erkenntnisse im Rahmen der Ausbildung von Fischwirten durch den Partner IFI weitervermittelt werden. Auch im Rahmen der tierärztlichen Ausbildung sollen die Ergebnisse durch den Partner TiHo vermittelt werden. Auf Veranstaltungen, wie den Fischereitagen der Bundesländer sowie nationalen und internationalen Kongressen und Fortbildungsveranstaltungen wurden bereits Teile der Ergebnisse präsentiert und es sollen auch über das Projekt hinaus die Ergebnisse durch alle Partner einem breitem Publikum präsentiert werden.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In traditionellen Teichwirtschaften in Deutschland können parasitäre Infektionen der Fische zu erheblichen Verlusten und damit zu großen ökonomischen Einbußen führen. Insbesondere durch die höheren Besatzdichten von in Aquakultur gehaltenen Fischen im Vergleich zu Wildfischen ist die Gefahr der Ausbreitung und der starken Vermehrung von Parasiten groß. Der bedeutendste Erreger, dessen Befall in kurzer Zeit zu sehr hohen Verlusten bei Süßwasserfischen führen kann, ist der Einzeller *Ichthyophthirius multifiliis*. Da ausgereifte Parasiten von *I. multifiliis* bis zu einem Millimeter groß sein können und mit bloßem Auge auf dem Fisch zu erkennen sind, werden Infektionen mit diesem Erreger auch als Weißpünktchen- oder Grießkörnchenkrankheit bezeichnet. Erfahrungen sowohl aus unseren eigenen Bestandsbetreuungen als auch aus Berichten von Fischtierärzten deutschlandweit zeigen, dass in den letzten Sommern Infektionen mit dem Ziliaten *I. multifiliis* in Forellenteichwirtschaften zu massiven Verlusten geführt haben.

In der Vergangenheit war eine erfolgreiche Behandlung von Infektionen mit *I. multifiliis* mittels Malachitgrünosalat oder Trichlorphon möglich. Beide Wirkstoffe dürfen nicht mehr zur Behandlung lebensmittelliefernder Tiere eingesetzt werden. Andere wirksame Therapeutika stehen in Deutschland nicht zur Verfügung, wodurch ein Therapienotstand besteht. Da eine medikamentöse Therapie zudem in Teichwirtschaften, deren Wasser in Kontakt zu natürlichen Gewässern steht, unter Umwelt- und Naturschutzaspekten zu vermeiden ist, sollten dringend alternative Behandlungsstrategien entwickelt werden. Dafür kann der komplexe Entwicklungszyklus des Parasiten und dessen Transmissions- und Infektionsbiologie genutzt werden.

Der Entwicklungszyklus von *I. multifiliis* dauert abhängig von der Wassertemperatur bis zu vier Wochen. Stadien des Parasiten besiedeln Haut und Kiemen der Fische als Trophonten. Diese Trophonten fallen im ausgereiften Stadium von Haut und Kiemen ab und gelangen auf den Boden des Teichs oder Beckens. Dort bilden sie eine Zyste (Tomont), in der sich innerhalb von 10 bis 12 Stunden bis zu 1000 Teilungsstadien (Tomite) entwickeln. Diese werden als Schwärmer (Theronten) entlassen und müssen frei schwimmend innerhalb von ca. 96 Stunden einen Wirtsfisch aufgesucht haben, sonst sterben sie ab (Baur et al. 2010). Studien konnten ein äußerst komplexes Verhaltensmuster belegen, mit dem der Parasit seinen Wirt aufsucht, erkennt und infiziert (Haas et al. 1999). Dabei reagieren die Stadien auf verschiedene chemische und physikalische Signale des Fisches (Wahli et al. 1991, Buchmann & Nielsen 1999, Haas et al. 1999). Erreichen sie so einen Wirt, dringen sie in die Epidermis von Haut und Kiemen ein und entwickeln sich zum Trophonten.

Aus Ermangelung zugelassener Therapeutika wurden bereits verschiedene alternative Behandlungsstrategien verfolgt, von denen keine eine zufriedenstellende Effektivität in der Bekämpfung des Parasiten zeigte. Beispielsweise wurden Natriumperkarbonat und Knoblauchextrakt eingesetzt (Buchmann et al. 2003). Natriumperkarbonat führte in Kombination mit einer Filterung durch Nylonnetze mit einer Porengröße von 80 µm nur zu einer Reduktion der Theronten (Heinecke & Buchmann 2009). In diesem Zusammenhang wurde auch Chinin als alternatives Therapeutikum getestet (Schumacher et al. 2011). Erste Ansätze zu Behandlung der Parasitenstadien im Wasser wurden durch Verwendung von Chlorophyll-Derivaten unternommen (Wohllebe et al. 2012). Parallel zu diesen bestehenden Ansätzen besteht dringend weiterer Forschungsbedarf, da deren konkreter Praxiswert bislang noch in Frage steht.

Es ist bekannt, dass Fische spezifische und nicht spezifische Immunantworten auf eine Infektion mit *I. multifiliis* entwickeln können (Buchmann et al. 2001, Sigh et al. 2004b, a, Alishahi & Buchmann 2006,

Jørgensen et al. 2008, von Gerssdorf Jørgensen et al. 2008, Jørgensen et al. 2011, Olsen et al. 2011). So können spezifische Antikörper gebildet werden, die den Parasiten immobilisieren oder es kann das Komplementsystem aktiviert und dadurch der Parasit abgetötet werden. Deshalb wurden erste Versuche mit Impfstoffen mit formalinaktivierten Erregern oder lebenden *I. multifiliis* Theronten durchgeführt (Buchmann et al. 2001, von Gerssdorf Jørgensen et al. 2008). Zur Zeit erscheinen die effektivsten Wege Fische gegen *I. multifiliis* zu immunisieren kontrollierte Infektionen sowie die Injektion von lebenden *I. multifiliis* Theronten in die Bauchhöhle zu sein (Dickerson & Findly 2014). Auch isolierte Komponenten des Parasiten können zur Immunisierung herangezogen werden. Hierbei erscheinen derzeit Impfstoffe, die von sogenannten i-Antigenen abgeleitet werden, als erfolgsversprechend (Dickerson & Findly 2014). Da es unterschiedliche Serotypen von *I. multifiliis* gibt und die gewonnenen i-Antigene spezifisch für den jeweiligen Serotyp sind, ist auch der Impfschutz dementsprechend nur gegen diesen Serotyp vorhanden (Wang & Dickerson 2002, Xu et al. 2009). Da Serotyp D dominiert, sind Impfungen mit i-Antigenen dennoch sehr vielversprechend. Bisher ist jedoch keine wirksame Vakzine gegen *I. multifiliis* erhältlich.

Eine Herausforderung, welche die Entwicklung von Impfstoffen gegen *I. multifiliis* mit sich bringt, ist die Tatsache, dass es sich bei dem Erreger um einen obligaten Parasiten handelt. Um große Mengen von *I. multifiliis* für die Impfstoffherstellung zu produzieren, sind daher bisher infizierte Fische als Träger unerlässlich. Im Rahmen dieses Projektes wurde untersucht, ob es möglich ist, einen Zyklus des Erregers auf einer permanenten Fischzellkultur beschichtet mit Fischmucus im Labor zu etablieren, wodurch keine infizierten Fische als Erregerlieferanten mehr benötigt werden würden. An der TiHo wurde daher versucht ein *in vitro*-Kultursystem von *Ichthyophthirius*-Theronten zu etablieren, dass in anderen Studien bereits beschrieben wurde (Nielsen & Buchmann 2000).

Um auf infizierte Fische als Erregerquelle verzichten zu können, wurde alternativ auch die Vakzinierung mit transformierten *Tetrahymena*, einem einfach im Labor zu kultivierenden Ziliaten getestet. Bei *Tetrahymena* sp. handelt es sich um eine Gattung eukaryotischer Einzeller, die ebenso wie *Ichthyophthirius* sp. dem Stamm der Ciliophora angehört und eine vergleichbare Zelloberfläche wie *Ichthyophthirius* sp. ausweist. *Tetrahymena* sp. kommt freilebend in Meer- und Süßwasser vor. Nur eine Spezies dieser Gattung ist als fischpathogen beschrieben, während die anderen Spezies der Gattung keine Pathogenität für Fische aufweisen. *Tetrahymena* sp. eignet sich gut als Modellorganismus für Studien an Ciliophora, da der Organismus nicht auf einen Wirt angewiesen ist und sich einfach im Labor vermehren lässt. Zudem sind Kreuzimmunitäten zwischen *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. beschrieben. Studien ergaben, dass auch eine Impfung mit lebenden oder Formalinaktivierten nicht-transformierten *Tetrahymena* sp. zu einem Impfschutz gegen *I. multifiliis* zu führen scheint (Dickerson et al. 1984, Buchmann et al. 2001, Sigh & Buchmann 2002). Somit ist diese Alternative möglicherweise für die kommerzielle Impfstoffherstellung erfolgversprechender. Zudem wäre es denkbar, i-Antigene von *I. multifiliis* in Zellen, zum Beispiel *E. coli* oder in *Tetrahymena thermophila*, einem Ziliaten mit gleicher Codon-Usage wie *I. multifiliis* zu exprimieren, um diese zu gewinnen und daraus einen Impfstoff herzustellen (Dickerson & Findly 2014). Da das Genom von *I. multifiliis* vollständig sequenziert vorliegt (Coyne et al. 2011), können für diagnostische Zwecke sowie für die Impfstoffherstellung geeignete Proteine ausgewählt und für die Entwicklung einer Sub-Unit-Vakzine eingesetzt werden.

Als wesentlicher Hinderungsgrund für die Entwicklung einer im Feld einsatzfähigen Vakzine stellte sich die Entwicklung eines geeigneten Applikationssystems heraus. Nach intramuskulärer oder intraperitonealer Injektion von lebenden oder abgetöteten Parasitenstadien, Ziliaten oder

Antigenpräparationen konnte zwar ein wirksamer Schutz induziert werden, in Arbeiten zur Immunantwort von Fischen auf *I. multifiliis* zeigte sich jedoch, dass die Beteiligung der mukosalen Immunantwort der Haut oder Kiemen für den Schutz eine wichtige Rolle zukommt (Dickerson & Findly 2014). Die vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten machen deutlich, dass die Vakzine für einen wirksamen Schutz über Haut oder Kiemen in den Organismus aufgenommen werden muss. Deshalb sollte in diesem Vorhaben die Entwicklung von neuen Applikationssystemen für einen Impfstoff über die Haut eine zentrale Rolle spielen. Um die Permeabilität der Haut von Fischen für den Impfstoff zu erhöhen, sollten zum einen kurze Pulse von Ultraschall in geringer Intensität (Navot et al. 2011, Labarca et al. 2015) sowie das Erzeugen von Mikroläsionen in der Haut eingesetzt werden, bevor Regenbogenforellen in einem Bad mit Oberflächenproteinen von *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. vakziniert werden. Das Erzeugen von Mikroläsionen wurde bereits mit einem Stempel mit mehreren Nadeln, der kleine Läsionen in der Haut als Aufnahmestellen für den Impfstoff setzt, erfolgreich getestet (Plant & LaPatra 2011). Nach Anwendung des Stempels sollen die Forellen in ein Bad mit von *I. multifiliis* isolierten oder in *Tetrahymena* exprimierten Oberflächen-Antigenen eingesetzt werden. Des Weiteren sollen Forellen einer Ultraschallbehandlung (30 sec. Pulse von 65mW/cm², 37 kHz) ausgesetzt werden (Labarca et al. 2015).

Eine weitere wirksame Methode zur Vorbeugung vor einer Infektion mit einem Pathogen ist der Schutz der Wirte vor infektiösen Parasitenstadien, z. B. durch Entfernen der Stadien aus dem Wasser von Aquakulturanlagen. Hierzu erhöhen Teichwirte falls möglich den Wasserdurchlauf wodurch infektiöse Schwärmer (Theronten) ausgeschwemmt werden sollen. Des Weiteren wurden in der Literatur Versuche zum Entfernen von *I. multifiliis*-Schwärmern durch den Einsatz von Filtern beschrieben (Heinecke & Buchmann 2009). Die Mikro-Filtration kann das Teichwasser auch von partikulärem organischem Material reinigen, was das Fischwohl verbessert und die Effektivität von Wasserstoffperoxid steigert (Heinecke & Buchmann 2009). Die Autoren befürchten jedoch, dass Nano-Filtrationseinheiten, die auch Schwärmer von *I. multifiliis* aus dem Wasser entfernen, durch organisches Material verstopft werden (Heinecke & Buchmann 2009). Da Infektionen mit *I. multifiliis* in der Forellenzucht nach unserer Erfahrung insbesondere in der Brut- und Setzlingsaufzucht zu erheblichen Verlusten führen können, ist hier der wesentliche Einsatzort zu suchen. Durch Nano- bzw. Ultrafiltration können Parasitenstadien aus dem zulaufenden Wasser für Teiche oder Tanks ausfiltriert werden. Solche Filtrationseinheiten könnten im Zulauf vor Teichen oder in die Wasserführung zwischen Anlagenteilen eingefügt werden. Ebenso erscheint ihr Einsatz in Teilkreisläufen im rückgeführten Wasser praktikabel.

Ein weiterer Ansatz zur Verringerung der Parasitenlast, v.a. in Teichsystemen und bei erhöhtem Befall, liegt in der Überlegung der „Ablenkung“ bzw. des „Abfangens“ von *I. multifiliis* Schwärmern. Theronten von *I. multifiliis* zeigen abgesehen von einer ausgeprägten phototaktischen Reaktion, wie alle Ziliaten bei ihren Reaktionen auf Umweltreize, generell keine gerichteten Schwimmbewegungen (Taxis), sondern stets lokomotorische Antworten ohne gezielte Orientierung (Kinese), die ihre Chance auf einen möglichen Wirt zu treffen erhöhen. Da sich im aquatischen Milieu um einen sich bewegenden Fisch keine stabilen Stoffgradienten ausbilden, erscheint für die Wirtsfindung der *I. multifiliis*-Schwärmer an Stelle einer Fernorientierung nur eine gut ausgebildete Nahorientierung sinnvoll. Damit existiert bis auf die phototaktische Reaktion der Theronten oder Schwärmer keine Möglichkeit zu einer effektiven Akkumulation. Dennoch ist diese in gewissem Maße im Nahbereich möglich, da der Parasit durch die Wirtsfinde-Reaktionen die Wahrscheinlichkeit, auf einen Wirt zu treffen, steigert; er zeigt demnach eine positive Chemokinese (Orthokinese). Durch die fehlende Fernorientierung bzw. Akkumulation von *I. multifiliis* Theronten ist eine Bekämpfung der Ichthyophthiriose durch einfaches

Einbringen von Lockstoff-Fallen, wie sie z.B. bei Schadinsekten im Waldbau Verwendung finden, nicht möglich. Die spezifischen Wirtsfinde- (Naherkennungs-) Reaktionen von *I. multifiliis* ließen sich jedoch dazu nutzen, die Theronten mittels geeigneter Substrate zu andauernd ungerichtetem Wirtsfindeverhalten zu stimulieren und sie über die spezifischen Reaktionen in Wirtsnähe auch abzufangen. Auf diese Weise könnte neben der wirksamen Entfernung der Erreger durch deren Desorientierung das Zeitfenster, in dem die Theronten einen neuen Wirt aufgesucht haben müssen, verkürzt werden. Dies hätte eine deutlich erhöhte Mortalität der Transmissionsstadien zur Folge.

Bei der Wirtsfindung reagieren *I. multifiliis*-Theronten auf plötzliche Wasserbewegungen mit einer starken Erhöhung der Schwimgeschwindigkeit und steigern dadurch die Wahrscheinlichkeit auf einen Wirt zu treffen. Ebenso reagieren sie spezifisch auf Fischmucus, auf Fraktionen des Mucus bzw. auf darin enthaltene Komponenten. Die chemischen Stimuli, welche die Theronten zur Wirtsfindung (Schwimmreaktionen) verwenden, sind hinlänglich untersucht. Durch mindestens vier verschiedene chemische Stimuli aus Fischmucus/-haut ausgelöst, zeigten die Parasiten demnach acht von 12 möglichen, verschiedenen Verhaltensweisen (Hofmann 1995, Kerschensteiner 1997, Ketzler 1997, Haas et al. 1998, 1999). Die wichtigsten Wirtsfinde-Reaktionen beim freien Schwimmen sind eine schnelle Schwimmbeschleunigung („burst“) und „Richtungswechsel & Orientierung“, welche beide in nächster Nähe zu einem Fischsubstrat erfolgen. Induziert werden burst und Richtungswechsel durch freie Aminosäuren und bislang noch unbekannte makromolekulare Substanzen der Fischhaut bzw. des Mucus. Auch Fischblut löst laut älterer Studien Chemokinese aus. Beim Annähern des *I. multifiliis*-Schwärmers an festes Substrat werden die entscheidenden Reaktionen zur Fisch-Erkennung durch Glykoproteine und Glykokonjugate (> 30 kDa, vermutlich Polysaccharide) ausgelöst (Kerschensteiner 1997, Haas et al. 1999), welche ebenfalls für das sog. „dipping“ - den ersten kurzen Kontakt - verantwortlich sind. Stimuli für die nun folgenden Festhefte- („attachment“) und die Penetrationsreaktion, also die eigentlichen Wirtserkennungssignale der Theronten, sind bislang weitgehend unbekannt. Diese Stimuli könnten aber helfen, die Verbreitungsstadien wirksam zu bekämpfen, indem man die für Theronten attraktiven Substanzen in geeigneter Form anbietet und sich die Infektions-Reaktionen der Theronten zunutze macht. Bisher ist bekannt, dass Theronten im Bioassay nach Zugabe von Karpfenmukushomogenat bereits nach weniger als einer Minute nicht mehr auffindbar waren, da sie sich an Oberflächen festhefteten (Hofmann 1995).

Ogbleich Oberflächenschleim von Fischen eigentlich die äußere Barriere der Fische gegen Krankheitserreger ist, wird aus der angeführten Literatur deutlich, dass chemische Komponenten des Mucus bzw. darin enthaltene Komponenten aus der Fischhaut als chemische Erkennungssignale für das Wirtsfinde- und Anheftungsverhalten von *I. multifiliis* Theronten dienen. Bislang ist das Auslösen von Wirtsfinde-Reaktionen durch diese Substanzen noch nicht als Möglichkeit für einen Schutz der Fische vor Infektionen mit diesem Parasiten untersucht worden. Die Penetration der Fischhaut durch Theronten bietet einen weiteren bislang nicht verfolgten Ansatzpunkt zur Transmissionsblockierung. Nach dem Festheften der Theronten am Wirt erfolgt die schlagartige Sekretion eines klebrigen Inhalts aus den Mucocysten des Ziliaten. Diese Sekretion konnte experimentell als notwendig für eine erfolgreiche Wirtsinvasion eingestuft werden (Erwing & Kocan 1992). Die Sezernierung dient vermutlich dazu, die Ziliaten am Wirt zu verankern und das Eindringen in die Epidermis zu erleichtern. Wodurch diese Reaktion ausgelöst wird, ist bislang unbekannt. Weiterhin wurde beobachtet, dass *I. multifiliis* Theronten mit verdünntem Fischserum getränkte Agarblöcke sogar penetrierten (Lom & Cerkasova 1974). Zusammen mit dem Wissen zu den Festhefte- und Penetrationsstimuli würde die Identifikation des Mucocysten-Stimulus die Kenntnisse der Wirtsinvasion von Theronten vervollständigen. Kombiniert mit den Stimuli zur Nahakkumulation durch Schwimmreaktionen böten

ABSCHLUSSBERICHT: „Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen (**AbiAqua**)“, Az: 2815NA061, 2815NA076, 2815NA077

diese Resultate einen höchst vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung einfacher Methoden zur Transmissionsblockierung des Parasiten, z.B. durch Ausbringen geeigneter Trägersubstanzen. Keiner dieser Ansätze zur Bekämpfung der Ichthyophthiriose wurde bisher experimentell verfolgt. Die Entwicklung einfacher Abfangtools zur signifikanten Reduktion der Transmissionsstadien erscheint daher als innovative Alternative zur Therapie und äußerst vielversprechende Bekämpfungsmethode.

3 Material und Methoden

3.1 Phase 1: Versuche unter kontrollierten Bedingungen (Labor und Semi-Feld-Versuche)

3.1.1 Entwicklung von Laborzyklen von *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. (TiHo Fische)

3.1.1.1 Laborzyklus von *I. multifiliis* auf einer permanenten Zelllinie

Es wurde eine permanente Zellkultur aus Karpfenzellen, Epithelioma Papillosum Cyprini-Zellen (EPC-Zellen) verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium (Earls Minimal Essential Medium mit fetalem Kälberserum, Penicillin und Streptomycin und nicht essentiellen Aminosäuren) für die verschiedenen Versuchsansätze entweder in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² oder in Makrotiterplatten mit 12 Vertiefungen und einer Fläche von 3,9 cm² je Vertiefung in einer Konzentration von ca. 300.000 Zellen pro ml (1 ml pro Vertiefung einer Makrotiterplatte, 20 ml pro Zellkulturflasche) ausgesät. In einem Ansatz wurde dem Zellkulturmedium zusätzlich Amphotericin B zugegeben, um Wachstum von Pilzen zu unterdrücken. Nach einer Inkubationszeit der Zellen von 24-48 Stunden bei 25°C, wurden sie für die Versuche eingesetzt. Für die Entwicklung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* wurden von der Haut natürlich infizierter Karpfen aus Teichwirtschaften, die im Rahmen der Diagnostikprechstunde in der Abteilung Fischkrankheiten vorgestellt wurden, Parasitenstadien gewonnen (Abbildung 1). Es wurden Trophonten des Erregers von der Haut infizierter Karpfen gesammelt. Die gesammelten Trophonten wurden unterschiedlich behandelt, bevor sie auf die Zellkulturen gegeben wurden. Ein Überblick über die verschiedenen Vorbehandlungen ist in Tabelle 1 dargestellt. In einem ersten Ansatz wurden die Trophonten in gefiltertem Aquarienwasser, das mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtriert wurde und nach der Filtration stark belüftet wurde, aufgenommen. Hierbei wandern die beweglichen Trophonten aus dem Mukus auf und können in frisches, gefiltertes Aquarienwasser pipettiert werden. Die so aufgereinigten Trophonten wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und auf die Zellen pipettiert (5 Trophonten je Vertiefung einer Makrotiterplatte bzw. 50-60 Trophonten pro Zellkulturflasche). In einem zweiten Ansatz wurden nicht nur die Trophonten, sondern ebenfalls Mukus von den Fischen gesammelt. Auch bei diesem Ansatz wurden Trophonten auf EPC-Zellen in Makrotiterplatten pipettiert (5 Trophonten je Vertiefung). Zusätzlich wurden hier aber 300 µl Fischmucus je Vertiefung einer Makrotiterplatte zugegeben. In einem dritten Ansatz wurden die Trophonten zunächst in filtriertes Aquarienwasser in einer Petrischale gegeben. Die Petrischalen wurden bei 20°C oder bei 25°C bebrütet und abhängig von der Bebrütungstemperatur entwickelten sich zunächst Tomonten, aus denen nach 24-48 Stunden Theronten entlassen wurden. Diese Theronten wurden unter dem Mikroskop mit einer Pipette gesammelt und auf die Zellen in Makrotiterplatten gegeben. Dieser Ansatz wurde mit einem Zusatz von Mukus zu den Zellen (300 µl je Vertiefung einer Makrotiterplatte) wiederholt. Alle beschriebenen Ansätze wurden mit einem Zusatz von gelöstem Agar Agar zu den Zellen vor der Zugabe von *I. multifiliis* wiederholt. Dabei wurde das gelöste Gel nicht unmittelbar auf die Zellen aufgetragen, sondern vorsichtig auf eine dünne Schicht Nährmedium gegossen. Die Bebrütung aller beimpften Zellkulturen erfolgte bei 20°C oder bei 25°C für mindestens drei Tage im Brutschrank, wobei täglich eine Auswertung der vorhandenen Parasitenstadien unter dem Mikroskop stattfand.



Abbildung 1: Natürlich infizierte Karpfen (*Cyprinus carpio*), die im Rahmen der Diagnostikprechstunde vorgestellt wurden und von denen *I. multifiliis* gewonnen wurde.

Tabelle 1: Getestete Ansätze zur Etablierung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* auf EPC-Zellkulturen

Ansatz-Nr.	Zellkulturgefäß	Zellkulturmedium	Weiterer Zusatz	Zugegebenes Stadium von <i>I. multifiliis</i>	Bebrütungs-temperatur
1	Zellkulturflasche	Ohne Amphotericin B	-	Trophonten	25°C
2	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	-	Trophonten	25°C
3	Zellkulturflasche	Mit Amphotericin B	-	Trophonten	25°C
4	Makrotiterplatte	Mit Amphotericin B	-	Trophonten	25°C
5	Zellkulturflasche	Ohne Amphotericin B	-	Trophonten	20°C
6	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	-	Trophonten	20°C
7	Zellkulturflasche	Mit Amphotericin B	-	Trophonten	20°C
8	Makrotiterplatte	Mit Amphotericin B	-	Trophonten	20°C
9	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Mucus	Trophonten	25°C
10	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Mucus	Trophonten	20°C
11	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Agar Agar	Trophonten	25°C
12	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Agar Agar	Trophonten	20°C
13	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	-	Theronten	25°C
14	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	-	Theronten	20°C
15	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Mucus	Theronten	25°C
16	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Mucus	Theronten	20°C
17	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Agar Agar	Theronten	25°C
18	Makrotiterplatte	Ohne Amphotericin B	Agar Agar	Theronten	20°C

3.1.1.2 Laborzyklus von *I. multifiliis* ohne permanenten Zelllinie

Zur Etablierung eines Laborzyklus ohne eine permanente Zellkultur wurden Trophonten von *I. multifiliis* ebenfalls von der Haut natürlich infizierter Karpfen aus Teichwirtschaften gewonnen. Die infizierten Fische wurden im Rahmen der Diagnostikprechstunde euthanasiert. Für die Gewinnung der Parasitenstadien wurden in drei verschiedenen Versuchsansätzen Leitungswasser, gefiltertes Aquarienwasser und Volvic-Mineralwasser verwendet. Das Aquarienwasser wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtriert und nach der Filtration stark belüftet. Den Fischen wurden ggf. mit einer Schere die Kiemendeckel entfernt, um ein Auswandern von Parasitenstadien aus den Kiemen zu erleichtern. Die toten Fische wurden einzeln in eine Petrischale mit gefiltertem, vorher stark belüftetem Aquarienwasser gelegt und komplett mit Wasser bedeckt. Die Petrischale wurde anschließend unter einem Binokular platziert und der Fisch wurde beobachtet. Sobald Trophonten von *I. multifiliis* den Fisch verließen, wurden diese mit einer

Pipette aus dem Wasser gewonnen und in eine Vertiefung einer Makrotiterplatte gegeben. Entscheidend war, die Trophonten möglichst zügig, bevor sie sich angeheftet hatten, aus der Schale zu pipettieren. Die Anheftung geschieht meist innerhalb der ersten 60 Minuten nach Verlassen des Fisches, kann aber bereits sehr kurz nach dem Verlassen des Fisches erfolgen. Pro Vertiefung wurden 2-7 Trophonten in die Makrotiterplatte eingesetzt und jede Vertiefung wurde mit 1 ml filtriertem Aquarienwasser oder einer der beschriebenen Alternativen aufgefüllt. Die Makrotiterplatten wurden bei 25°C oder 20°C im Brutschrank für 12-24 Stunden bebrütet. Anschließend wurde der Überstand jeder Vertiefung abpipetiert und die darin enthaltenen Theronten gesammelt. Die Flüssigkeit in den Makrotiterplatten wurde mit frischem Wasser einer der beschriebenen Alternativen wieder auf 1 ml aufgefüllt. Innerhalb der folgenden zwei Tage wurde die Entwicklung der Parasitenstadien weiter beobachtet und bei Gelegenheit wurden, wie beschrieben, weitere Parasitenstadien geerntet. Die Makrotiterplatten wurden während dieser Zeit bei 25°C bzw. 20°C im Brutschrank inkubiert. In Tabelle 2 sind die getesteten Ansätze zur Etablierung eines Laborzyklus ohne permanente Zelllinie aufgeführt.

Tabelle 2: Getestete Ansätze zur Etablierung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* ohne Zellen

Ansatz-Nr.	Kulturgefäß	Wasser	Zugegebenes Stadium von <i>I. multifiliis</i>	Bebrütungs-temperatur
1	Makrotiterplatte	Leitungswasser	Trophonten	25°C
2	Makrotiterplatte	Leitungswasser	Trophonten	20°C
4	Makrotiterplatte	Gefiltertes Aquarienwasser	Trophonten	25°C
5	Makrotiterplatte	Gefiltertes Aquarienwasser	Trophonten	20°C
5	Makrotiterplatte	Volvic	Trophonten	25°C
6	Makrotiterplatte	Volvic	Trophonten	20°C

3.1.1.3 Laborzyklus von *Tetrahymena* sp.

Ein weiterer Laborzyklus wurde mit dem Einzeller *Tetrahymena thermophila* entwickelt. Eine Kultur von *Tetrahymena* sp. wurde uns von Frau Prof. Petermann, Universität Salzburg, zur Verfügung gestellt. Die Einzeller wurden in Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 260 ml bzw. 60 ml reinem Volvic-Wasser gehalten. Ein Ansatz wurde im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 18°C und ein weiterer Ansatz wurde bei Raumtemperatur (ca. 20°C) gehalten. Zu den Einzellern wurden autoklavierte Bio-Weizenkörner (6 bzw. 2 Stück, je nach Kulturgefäß) ins Wasser gegeben. Aufgrund dieser Zugabe vermehren sich Bakterien, die die Weizenkörner als Substrat nutzen und dienen *Tetrahymena* sp. schließlich als Nahrung. Die Kulturen wurden nach Bedarf alle ein bis zwei Wochen frisch angesetzt, indem ca. 1000-2000 Einzellern in ca. 1,5-2 ml Altkultur zusammen mit fischen Weizenkörnern in neu vorbereitete Kulturflaschen mit frischem Volvic-Wasser überführt wurden.

3.1.2 Etablierung einer PCR zum Nachweis von *Ichthyophthirius multifiliis* aus Mukusproben, Kiemenproben und Wasserproben (TiHo Fische)

Basierend auf dem Vergleich von 18S-ribosomalen RNA-Gensequenzen von *Ichthyophthirius multifiliis* und *Tetrahymena* sp. wurden Primer und eine Sonde für die Verwendung in einer quantitativen Real-time PCR (qPCR) zum Nachweis und zur Quantifizierung von DNA von *I. multifiliis* entwickelt. Zur Quantifizierung der Gesamtkopienzahl wurde ein rekombinantes Plasmid hergestellt, das als Standard verwendet wurde. Die Auswertung der Methode ergab, dass die PCR sowohl mit der qPCR-Chemie von SYBR Green als auch mit der TaqMan Probe verwendet werden kann.

a) DNA-Extraktion

Hautschleim-, Kiemen- und Wasserfiltratproben wurden in einem QIAgen Tissuelyser II (Qiagen, Deutschland) lysiert. Anschließend wurde die DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß dem Handbuch des Herstellers extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Proben mit Nuklease-freiem Wasser (ThermoFisher Scientific, USA) auf $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ verdünnt und bis zur PCR-Analyse bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

b) qPCR

Zur Quantifizierung der DNA von *I. multifiliis* wurde eine RT-qPCR auf SYBRGreen-Basis verwendet. Alle Proben wurden in Duplikaten unter Verwendung des Maxima SYBR Green 2 × Mastermix (Thermo Fisher Scientific) in einem ABI StepOnePlus Cycler (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt hergestellt: $1 \times$ Maxima SYBR Green-Mastermix (mit 10 nM ROX), $0,2 \mu\text{M}$ jedes Primers (Sequenzen sind in Tabelle 3 dargestellt), $20 \times$ verdünnte cDNA, aufgefüllt mit Nuklease-freiem Wasser zu einem Endvolumen von $20 \mu\text{l}$. Zur Quantifizierung der Kopienzahl der DNA wurde eine Standardkurve unter Verwendung von rekombinanten DNA-Plasmiden von 10^1 bis 10^7 18S-Genkopien erstellt. Die Ergebnisse wurden auf die Menge der aus den Proben extrahierten DNA normiert und als Genomkopienzahl pro 250 ng extrahierter Gesamt-DNA angegeben.

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde zur Etablierung einer PCR zum Nachweis von *I. multifiliis*

Name	Sequenz	Produktgröße
Ichthyo_18S_F1	GACAAGAAATAGCAAGCCAGGAGA	786 bp
Ichthyo_18S_R1	CACCACCACCCAAAGAATCAA	
Ichthyo_18S_qF2	ACTTCTGCCTATTTAGCTGGG	147 bp
Ichthyo_18S_qR2	GATGTATCCGGGCTATAACCTG	
Ichthyo_18S_probe_2	[FAM] TCGGCCTCACTGGTTCGACTG [BHQ1]	

c) Etablierung der PCR aus Wasserproben

Zur Etablierung einer diagnostischen Methode, die ohne die Beprobung von Fischen auskommt, aber dennoch eine Einschätzung des Parasitendrucks auf eine Fischpopulation und ggf. eines Infektionsgeschehens ermöglicht, wurde das Wasser aus Haltungseinrichtungen (Teiche, Hälter, Becken) auf Praxisbetrieben beprobt. Pro untersuchter Haltungseinheit wurden 2 Liter des Wassers

entnommen und wie oben beschrieben mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtriert. Aus den so gewonnenen Filtern wurde DNA extrahiert und im Anschluss mittels PCR untersucht. Um abzuschätzen ob und wie geeignet die PCR zur Untersuchung solcher Wasserproben ist, wurden parallel Stichproben von mindestens 10 Fischen aus diesen Haltungseinheiten im Rahmen tierärztlicher Diagnostik beurteilt und dokumentiert. Dabei wurde neben der Befallsstärke von *I. multifiliis* auch der Befall mit anderen Parasiten sowie etwaige Maßnahmen, die zur Bekämpfung einer möglichen Infektion getroffen wurden, erhoben.

3.1.3 Filtration des Haltungswassers zur Reduktion der im Wasser vorhandenen Parasitenstadien (TiHo Fische, IFI)

Für die Durchführung der vorgesehenen Versuche am Institut für Fischerei musste eine epidemiologisch eigenständige Versuchsanlage geplant und errichtet werden. Dafür wurden mögliche Konzepte zur Haltung der Versuchsfische und der praktischen Durchführung der Versuche entworfen und nach Abwägung sämtlicher Vor- und Nachteile das praxistauglichste ausgewählt. Damit verbundene, notwendige Standortvorbereitungen wurden ebenfalls getroffen. Dafür wurde ein Teil der überdachten Außenanlage des Instituts für Fischerei räumlich abgetrennt. Für die Trennwände wurden Rahmen aus Vierkantholz (Kantenlänge 8 cm) gefertigt und mit einer stabilen, wasserundurchlässigen Silofolie verkleidet. Um sicherzustellen, dass nur befugte Personen Zutritt zu dem Versuchsteil haben, wurde dieses mit einer absperbaren Türe versehen. Im Versuchsteil wurden 6 gleichförmige Versuchseinheiten (280 x 60 x 60 cm) mit einem maximalen Füllungsvermögen von ca. 1 m³ aufgestellt und deren Wasserablauf mittels 100 mm KG-Rohren an ein Sammelrohr angeschlossen. Jede dieser Einheiten hatte einen eigenen Zulaufhahn, über den frisches Quellwasser eingeleitet werden konnte sowie einen eigenen Belüfter. Da bei diesen Versuchen infektiöse Stadien des Erregers die Anlage über das Ablaufwasser der Versuchseinheiten hätten verlassen können, wurde ein Desinfektionsplan entworfen und umgesetzt. Als erstes wurde das Ablaufwasser aus allen 6 Versuchseinheiten gemeinsam über ein Sammelrohr durch einen UV-Klärer geleitet. Diese UV-Behandlung des Wassers ist bekanntermaßen dazu geeignet einen Großteil der Schwärmer-Stadien des Parasiten *I. multifiliis* abzutöten. Zudem sollten die überlebenden Schwärmer massiv geschädigt und in ihrer Überlebenszeit deutlich eingeschränkt werden. Nur diese Stadien konnten aus den Versuchsrinnen in das Ablaufwasser gelangen. Anschließend wurde das behandelte Wasser in einem Auffangbecken mit einem Volumen von über 3,5 m³ gesammelt, womit eine erhebliche Standzeit erzielt wurde, bevor das Wasser aus diesem Auffangbecken weiter abfloss. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass bereits hier annähernd alle aus den Versuchen resultierenden Schwärmer abgestorben waren. Zuletzt wurde das Wasser in den Siebenquellenbach, welcher auf dem Gelände des Instituts für Fischerei entspringt, geleitet. Dieser ist bis zu einem Abbruch auf einer Länge von ca. 300 m ohne Fischbesatz. Schwärmer, die die bisherige Prozedur eventuell hätten überleben können, fanden also bis hierhin keinen Wirt. Aufgrund des hohen Abbruchs ist ein Aufstieg von Fischen in Richtung Institut ausgeschlossen. Die Rinnen selber wurden nach jedem Teilversuch gründlich gereinigt und desinfiziert. Nach Fertigstellung der Versuchsanlage wurden unter Praxisbedingungen Vorversuche über jeweils 23 Tage zur Haltung von Regenbogenforellen in den eingerichteten Versuchseinheiten durchgeführt. Um das Ausschwemmen der Schwärmerstadien des Parasiten aus den Versuchseinheiten zu verhindern, sollte der Durchfluss so gering wie möglich gehalten werden. Daher galten diese Vorversuche in erster Linie der Bestimmung der benötigten Frischwasser-

Durchflussmengen und der Belüftungsintensität bei unterschiedlichen Besatzdichten. Bei entsprechend starker Belüftung erwies sich ein permanenter Durchfluss von 2 l/min auch bei einem für die anstehenden Versuche maximalen Besatz von 50 Regenbogenforellen-Speisefischanwärtern als ausreichend. Zur Sicherstellung des Wohlergehens der für diese Versuche eingesetzten Fische wurden zusätzlich regelmäßig Messungen der Wasserparameter durchgeführt. Diese befanden sich stets im Toleranzbereich für Regenbogenforellen.

Für die Filtrationsversuche an der TiHo wurden zwei Kreislaufanlagen mit jeweils 4 separaten Rundstrombecken verwendet. Jedes der Becken hatte ein Fassungsvermögen von 100 Liter und einen konisch zulaufenden Boden, an dem sich ein Ablauf befand (Abbildungen 2 und 4). Auf diese Weise setzten sich Kot und Futterreste am Boden der Becken ab und konnten einfach entfernt werden. Durch Pumpen wurde eine Kreisströmung in den Becken erreicht, die eine Haltung von Forellen, die einen hohen Sauerstoffbedarf aufweisen, auch über längere Zeiträume möglich machte. In den einzelnen Versuchsansätzen diente jeweils ein Kreislauf als Kontrolle, während der andere Kreislauf an die jeweilige Filtrationsanlage angeschlossen wurde. Alle Daten wurden für jedes Becken eines Kreislaufs separat erhoben und ausgewertet. Auf diese Weise konnten mögliche Beckeneffekte ausgeschlossen werden.



Abbildung 2: Rundstrombecken, die zur Haltung der Fische in den Filtrationsversuchen verwendet wurden. Jedes der Becken hat ein Fassungsvermögen von 100 Liter und einen konisch zulaufenden Boden, an dem sich ein Ablauf befindet.

3.1.3.1 Ultrafiltration (Porengröße 0,03-0,1 μ m) (TiHo Fische, IFI)

Für die Ultrafiltration wurde eine Filtrationsanlage der Firma A3 water solutions GmbH (Saerbeck) verwendet (Abbildung 3). Das verwendete Ultrafiltrationsverfahren ist ein mechanisch-physikalisches Trennverfahren, bei dem durch eine Porenmembran makromolekulare Stoffe aus dem zugeführten Wasser zurückgehalten werden können. Die verwendete Membran wies eine Porengröße von 20kDa auf, was etwa 0,03-0,1 μ m entspricht. Es handelte sich um eine keramische Membran, die laut

ABSCHLUSSBERICHT: „Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen (**AbiAqua**)“, Az: 2815NA061, 2815NA076, 2815NA077

Hersteller eine gute chemische, thermische und mechanische Beständigkeit aufwies und in Form eines Membranfiltrationsmoduls in die Ultrafiltrationsanlage eingebaut war. Bei der Ultrafiltration wurde das zugeführte Wasser aus den Fischhaltungsbecken in ein mit Partikeln konzentriertes Konzentrat und ein partikelfreies Filtrat getrennt. Die Theronten von *I. multifiliis*, die sich frei im Wasser befinden, sollten auf diese Weise herausgefiltert werden. Mit der beschriebenen Ultrafiltrationsanlage wurden drei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt:



Abbildung 3: Ultrafiltrationsanlage, die in den Filtrationsversuchen verwendet wurde.



Abbildung 4: Aufbau der beiden Kreisläufe mit jeweils vier Rundstrombecken sowie der Ultrafiltrationsanlage für die Filtrationsversuche.

a) Versuche mit Brütlingen (TiHo Fische):

Für die Versuche mit Brütlingen (4,4-6,3 cm bei 1,32-4,37 g) wurden aufgrund der Größe der Fische pro Kreislauf (Kontrolle und Filtration) nur zwei Becken (jeweils 100 Liter Wasservolumen) besetzt. Die Brütlinge wurden mit den im Laborzyklus produzierten Theronten von *I. multifiliis* in einer Konzentration von ca. 332 Theronten pro Fisch (ca. 146.000 Theronten insgesamt) in einem Becken mit 10 Liter Wasser, das stark belüftet wurde, über einen Zeitraum von 2 Stunden infiziert. Im Anschluss wurden die Fische auf die vier Becken der beiden Kreisläufe aufgeteilt. Pro Becken wurden 110 Brütlinge eingesetzt. Die Fische wurden bei Wassertemperaturen von 18°C-20°C über einen Zeitraum von 14 Tagen in den Rundstrombecken gehalten. Die erste Probenahme von 20 Fischen pro Becken fand 5 Tage nach Start des Versuchs statt. Die Fische wurden einzeln in wassergefüllte, einen Liter fassende Schalen gesetzt und die auf der Haut des Körpers und der Flossen vorhandenen Stadien von *I. multifiliis* wurden unter einem Binokular bei 0,7-facher Vergrößerung ausgezählt (Abbildungen 5 und 6). Im Anschluss wurden weitere Proben von 20 Fischen aus jedem der vier besetzten Becken alle zwei Tage auf die gleiche Weise untersucht.

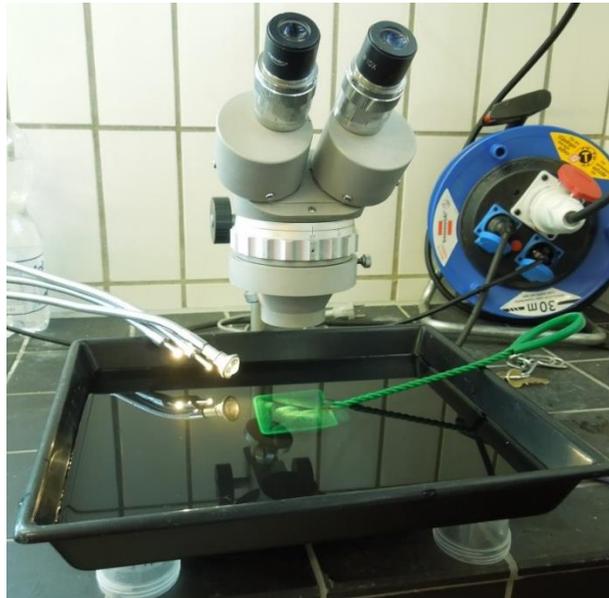


Abbildung 5: Anordnung des Binokulars und der wassergefüllten Wanne zur Auszählung von *I. multifiliis* auf der Haut von Fischen.

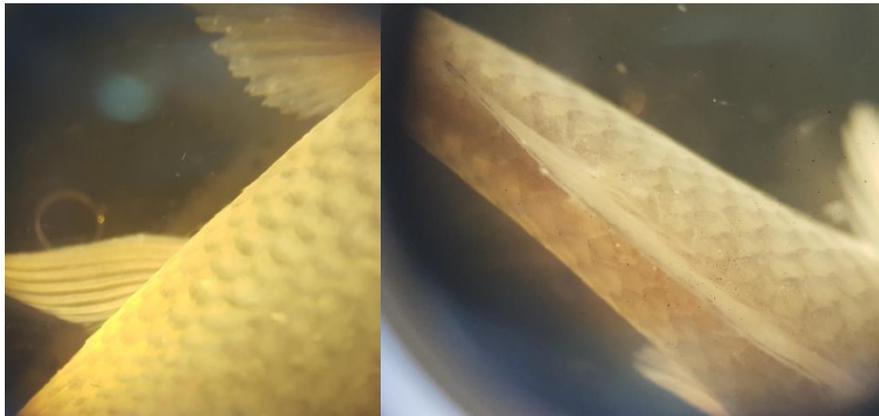


Abbildung 6: Sicht durch das Binokular. Auf Haut und Flossen der Fische sind Trophonten von *I. multifiliis* zu erkennen.

b) Versuche mit Setzlingen (TiHo Fische)

Für den Versuch mit Regenbogenforellensetzlingen (11,2-15,8 cm bei 16,2-41,5 g) wurden pro Kreislauf (Kontrolle und Filtration) vier Becken (jeweils 100 Liter Wasservolumen) besetzt. Die Setzlinge wurden mit den im Laborzyklus produzierten Theronten von *I. multifiliis* in einer Konzentration von 307 Theronten pro Fisch (ca. 162.000 Theronten insgesamt) in einem Becken mit 30 Liter Wasser, das stark belüftet wurde, über einen Zeitraum von 2 Stunden infiziert. Im Anschluss wurden die Fische auf die acht Becken der beiden Kreisläufe aufgeteilt. Pro Becken wurden 66 Setzlinge eingesetzt. Die Fische wurden bei Wassertemperaturen von 16°C über einen Zeitraum von 14 Tagen in den Rundstrombecken gehalten. Die erste Probennahme von 15 Fischen pro Becken fand am ersten Tag statt nach Start des Versuchs statt. Die Fische wurden einzeln in wassergefüllten 1 Liter fassende Aquarien gesetzt und die auf der Haut des Körpers und der Flossen vorhandenen Stadien von *I. multifiliis* wurden unter einem Binokular bei 0,7-facher Vergrößerung ausgezählt. Im Anschluss wurden weitere Proben von 15 Fischen aus jedem der acht besetzten Becken alle vier Tage auf die gleiche Weise untersucht.

c) Versuche mit Speisefischanwärttern (TiHo Fische, gemeinsam mit IFI):

Die Versuche mit Speisefischanwärttern sollten ursprünglich laut Projektantrag am IFI durchgeführt werden. Hierfür wurden zwei Versuchseinheiten (1 und 2) genutzt. An Versuchseinheit 1 wurde eine Ultrafiltrations-Versuchsanlage der Firma A3, an Versuchseinheit 2 ein handelsüblicher Außenfilter (CristalProfi e1902 greenline) von JBL angeschlossen. Nach Abschluss der Filter-Installation sollten die Filter eine Woche ohne Fischbesatz in reinem Quellwasser „einlaufen“. Währenddessen wurde die Filtrationsrate der Ultrafiltrations-Versuchsanlage beobachtet und zu Beginn, nach einer und vier Stunden sowie nach einem Tag und einer Woche dokumentiert. In dieser Zeit nahm die Filtrationsrate von 4,00 l/min (Beginn) über 3,15 l/min (1 h), 3,00 l/min (4 h) und 2,90 l/min (1 d) ab und pendelte sich nach einer Woche bei 2,5 l/min ein. Diese Menge wurde als noch akzeptabel betrachtet, da sie über der Wasserdurchflussrate (2 l/min) der Versuchseinheiten lag. Daraufhin wurden jeweils 50 infizierte Regenbogenforellen in die Versuchseinheiten gesetzt. Diese wurden belüftet und die Wasserdurchflussrate von 2 l/min beibehalten. Die Überprüfung der Infektion erfolgte über einen Abstrich unterhalb der Rückenflosse bei je 5 Fischen pro Rinne. Da bei diesem Versuch die Reinfektion der entscheidende Faktor war, wurde die Infektion nur mit ja/nein bestimmt. Die Filtrationsrate der

Ultrafiltrations-Versuchsanlage nahm nach dem Fischbesatz innerhalb kürzester Zeit von 2,5 l/min auf 0,70 l/min ab. Auch war die zugesetzte Filtermembran (Porengröße 20 kDa) ohne Säure- bzw. Basenzusätze nicht mehr frei zu spülen, weshalb der Versuch bereits nach einem Tag vorzeitig beendet werden musste. Daraufhin wurde die Ultrafiltrations-Versuchsanlage von der Versuchseinheit abgekoppelt und bestmöglich gereinigt und gespült. Zur Erfolgskontrolle dieser Maßnahmen wurde die Anlage erneut an die noch mit Fischen besetzte Versuchseinheit 1 angeschlossen und eingeschaltet. Die hierdurch erreichte Filtrationsrate lag bei nur noch 1,35 l/min, welche nach einer Stunde auf 0,60 l/min, nach vier Stunden auf 0,35 und nach einem Tag auf 0,15 l/min sank. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von weiteren Versuchen mit dieser Membran abgesehen und der Hersteller der Anlage um Nachbesserung gebeten. Daraufhin wurde von diesem eine neue, grobporigere Membran (0,2 µm) geliefert. Vorab wurde diese in Versuchseinheit 1 mit reinem Quellwasser, anschließend mit einem nichtinfizierten Besatz von 50 Regenbogenforellen getestet und die Filtrationsrate über 13 bzw. 2 Tage dokumentiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Test 1 zur Filtrationsrate der in diesem Vorhaben verwendeten Ultrafiltrations-Versuchsanlage, gefiltert wurde Versuchseinheit 1, gefüllt mit reinem Quellwasser, ohne Fischbesatz

Versuchstag	Uhrzeit	Filtrationsrate in l/min
1	11:30	17,10
1	12:30	16,30
1	13:30	16,15
1	14:30	16,55
1	16:00	17,25
1	18:00	17,80
2	10:00	16,75
2	11:00	16,75
2	12:00	16,70
3	10:00	11,35
3	13:00	11,30
4	11:30	8,50
4	14:30	8,25
5	10:00	7,00
6	10:00	6,00
7	10:00	5,65
8	10:00	5,20
9	10:00	4,75
10	10:00	4,50
11	10:00	4,30
12	10:00	4,15
13	10:00	3,65

Tabelle 5: Test 2 zur Filtrationsrate der in diesem Vorhaben verwendeten Ultrafiltrations-Versuchsanlage gefiltert wurde Versuchseinheit 1, gefüllt mit reinem Quellwasser, besetzt mit 50 Regenbogenforellen

Versuchstag	Uhrzeit	Filtrationsrate in l/min
1	12:00	3,95
1	12:30	3,1
1	13:00	2,55
1	13:30	1,9
1	14:00	1,5
1	14:30	1,25
1	15:00	1,2
2	11:00	0,8

Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich wird, nahm die Filtrationsrate auch mit der neuen, deutlich grobporigeren Membran, insbesondere in mit Fischen besetztem Wasser, innerhalb kürzester Zeit deutlich ab. Weitere Membranen konnte der Hersteller nicht zur Verfügung stellen. Aus Tierwohlgründen wurde auf weitere Versuche mit infizierten Fischen am Institut für Fischerei verzichtet, da mit den zur Verfügung stehenden Membranen der Ultrafiltrations-Versuchsanlage keine auswertbaren Ergebnissen zu erwarten waren. In Absprache mit allen am Vorhaben beteiligten Kooperationspartnern wurde dieser Teilversuch komplett von der TiHo übernommen.

An der TiHo wurden für den Versuch mit größeren Regenbogenforellen (Speisefischanwärtern; 22-29 cm bei 113-236 g) pro Kreislauf (Kontrolle und Filtration) vier Becken (jeweils 100 Liter Wasservolumen) besetzt. Die Regenbogenforellen waren natürlich infiziert und stammten aus einer Teichwirtschaft. Pro Becken wurden 32 Fische eingesetzt. Die Fische wurden bei Wassertemperaturen von 16°C über einen Zeitraum von 14 Tagen in den Rundstrombecken gehalten. Die erste Probennahme von insgesamt 80 Fischen fand bei Anlieferung statt. Die Fische wurden einzeln in ein Narkosebecken mit 100 mg/L Tricain (MS 222) gesetzt um nach leichter Sedation in einer mit Wasser gefüllten Schale (ca. 1,5 Liter) unter dem Binokular beurteilt zu werden. Dabei wurden die auf der Haut des Körpers und der Flossen vorhandenen Stadien von *I. multifiliis* bei 0,7-facher Vergrößerung ausgezählt. Im Anschluss wurden weitere Proben von 10 Fischen aus jedem der acht besetzten Becken alle vier Tage auf die gleiche Weise untersucht.

3.1.3.2 Filtration über einen Trommelfilter (TiHo Fische)

Aufgrund von Schwierigkeiten im Betrieb der Ultrafiltrationseinheit, wurde ein weiterer, umfangreicher Versuch mit einem Trommelfilter, der eine Porengröße von 13 µm aufwies, durchgeführt. Für den Versuch wurden erneut die beiden Kreisläufe mit jeweils vier 100 Liter fassenden Rundstrombecken verwendet. Der Versuch wurde mit Regenbogenforellensetzlingen durchgeführt. Dies wurde entschieden, da sich in den Versuchen mit der Ultrafiltrationsanlage der Einsatz von Forellen in Setzlingsgröße als am geeignetsten herausgestellt hatte. Die Haltung größerer Forellen über einen Zeitraum von 14 Tagen in den Becken erwies sich hinsichtlich des Platzangebots, der Schwimmmöglichkeiten und insbesondere der Sauerstoffversorgung als schwierig. Bei der Verwendung von Brütlingen dagegen war die Auswertung aufgrund der geringen Fischgröße weniger aussagekräftig.

Für den Versuch wurden insgesamt 400 Regenbogenforellensetzlinge mit einer durchschnittlichen Länge von 5,5-9,4 cm und einem Gewicht von 2,15-8,43 g eingesetzt. Die Fische wurden gleichmäßig auf die acht Becken der beiden Kreisläufe verteilt, so dass pro Kreislauf (Kontrolle und Filtration) vier Becken (jeweils 100 Liter Wasservolumen) mit jeweils 50 Fischen besetzt waren. Nach einer Akklimatisierungszeit von 2 Tagen wurden die Setzlinge mit im Laborzyklus produzierten Theronten von *I. multifiliis* in einer Konzentration von 350 Theronten pro Fisch in einem Becken mit 30 Liter Wasser, das stark belüftet wurde, über einen Zeitraum von 2 Stunden infiziert. Die Fische wurden bei Wassertemperaturen von 18°C über einen Zeitraum von 14 Tagen in den Rundstrombecken gehalten. Bei 10 Fischen pro Becken wurde 4 Tage nach Start des Versuchs eine Infektionskontrolle durchgeführt. Neun Tage nach der Infektion wurden je ein komplettes Becken aus der Kontrollgruppe und ein komplettes Becken aus der filtrierte Gruppe beprobt. Die Fische wurden per Nackenschnitt getötet. Anschließend wurde die komplette linke Körperhälfte abgestrichen und mikroskopisch der Parasitenbefall ausgezählt. Der Abstrich der gesamten rechten Körperseite wurde gesammelt und mittels PCR auf den Parasitengehalt überprüft. In gleicher Weise wurde mit den Kiemen verfahren. Das komplette Kiemengewebe der linken Körperhälfte wurde entnommen und mikroskopisch ausgezählt, während das Kiemengewebe der rechten Körperhälfte für PCR Untersuchungen entnommen wurde. Die Beprobung je eines weiteren Beckens aus Kontroll- und Behandlungsgruppe folgte in gleicher Weise 10 Tage nach Infektion. Der Versuch wurde mit der Beprobung der verbleibenden vier Becken 17 Tage nach Infektion abgeschlossen. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.1.4 Transmissionsunterbrechung (KuL, IFI)

Die für die Versuche benötigten Parasiten konnten über Zucht- und Handelsbetriebe erhalten werden. Sowohl von Schlachttieren als auch in Hälterungen war das Sammeln auch größerer Mengen von vom infizierten Fisch abgehenden Trophonten (Protomonten) möglich, welche sich in Inkubationsbehältern nach Wasserwechsel bei 21°C zu Tomonten und Tomiten entwickelten. Nach ca. 10 h standen so Theronten für Versuche zur Verfügung. Zusätzlich konnte ab 2017 auf die zeitweise bestehenden Parasitenzyklen der Projektpartner zurückgegriffen werden. Bei Bedarf oder zu starkem Bakterienwachstum erfolgte mittels 0,22 µm Filtereinheiten (Millipore, Nylon Membran) ein Medienwechsel der Theronten-Lösungen. Für Versuche wurden nur < 5 h alte Theronten verwendet, in Einzelfällen und je nach Fragestellung jedoch auch bis zu 2 Tage alte Isolate.

3.1.4.1 Herstellung von Testsubstraten (KuL)

a) Fischsubstrate

Mukushomogenat

Von Schlachttieren (Regenbogenforelle, Bachsaibling und Karpfen) wurde Oberflächen-Mucus, durch leichtes Schaben und mehrmaliges Verdünnen mit entionisiertem Wasser (VE), entnommen. Der so gewonnene Mucus wurde mittels Ultra Turrax homogenisiert und abzentrifugiert, wodurch ein Überstand mit gelösten Bestandteilen erhalten wurde. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Bei -20°C war das Mukushomogenat für ca. zwei Monate lagerfähig.

Muskelhomogenat

Aus definierten Mengen von enthäuteten Filetstücken von Regenbogenforellen und entionisiertem Wasser wurde mit einem Dispergiergerät eine homogenisierte Masse erzeugt. Nach Abzentrifugieren konnte ein suspendierter Überstand abgenommen werden, welcher als Testsubstrat diente.

Fischmehlextrakt

Aus Rohsubstratproben direkt vom Importeur wurden je 5 g peruanisches und marokkanisches Fischmehl in 20 ml Wasser suspendiert und nach 10 min Homogenisierung per Ultra Turrax für 15 min abzentrifugiert. Der milchige Überstand konnte als Testsubstrat verwendet werden.

Serum

Die Entnahme von Fischblut zur Serumherstellung erfolgte von frisch geschlachteten Tieren. Nach zwei h Agglutination auf Eis wurde das Blut 10 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert, so dass sich Erythrozyten und Gewebeteile absetzen konnten. Der Serum-Überstand wurde abgenommen, gepoolt, erneut 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Einige Aliquots wurden vorab durch Erhitzen für 20 min auf 50°C inaktiviert.

b) Andere Substrate

Trägermatrices

Als Matrices zur Untersuchung der Festhefte- und Penetrationsreaktionen der Theronten mussten Substanzen in Trägermaterialien auf- oder eingebracht werden. Hierzu wurden verschiedene Biogele unterschiedlicher Herkunft, chemischer Zusammensetzung und Viskositätseigenschaften (Biogel 1-4), sowie alternative anorganische Stoffe wie Hydrogel (Poly-Acrylamid) verwendet. Alle Trägermatrices wurden gemäß ihrer jeweiligen Zubereitungsanweisung angesetzt und bezüglich Herstellung und Behandlung für vergleichende Versuchsansätze normiert.

Biogeleextrakt

Von einem Biogel wurden zur Herstellung eines hydrophilen Extrakts 2 g hydratisiertes Festsubstrat mit 30 ml VE für 5 min per Ultra Turrax resuspendiert und homogenisiert und die feste Phase für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 ml VE verdünnt und mit einer Sonotrode (Cycle 50 %, Output 5) 5 min behandelt. Durch erneutes Abzentrifugieren wurde ein gelöster Überstand gewonnen.

Propolis

Zur Herstellung eines Extraktes dieses potentiell wirksamen natürlichen Biozids wurde 1 g frisches Propolis mit 10 ml Ethanol (99 %) und 0,5 ml VE vermischt und 2 h auf einem Magnetrührer bei 800 U/min verrührt. Das Extrakt wurde dann für 12 h geschlossen inkubiert und erneut 1 h verrührt. Nach Zentrifugation bei 1700 U/min wurde der Überstand entnommen und mit Druckluft das Lösungsmittel verblasen wodurch ein trockener Extrakt entstand. Dieser wurde zum Gebrauch mit auf 45°C erwärmtem Testsubstrat vermischt und zu einer milchigen Suspension gevortext.

Reinsubstanzen

Insbesondere zur Auslösung des Nahrungsverhaltens der Theronten wurde als Testsubstrat auf eine Vielzahl von organochemischen Verbindungen aber auch auf Mischsubstrate aus dem Lebensmittelbereich zurückgegriffen, deren Inhaltsstoffe nachgewiesenermaßen auch im

Fischgewebe vorkommen. Letztere waren insofern ein wichtiger Bestandteil der Versuchsansätze, um die Chance auf Zulassung zur Wasserbehandlung und die Unbedenklichkeit in der Anwendung zu gewährleisten.

c) Fraktionierung

Testsubstrate wurden zur Feststellung des Molekülgrößen-Bereichs der wirksamen Komponenten per Molekularfiltration (Centricon, Centriprep, Amicon/Millipore) mit einem cut-off von 3 kDa fraktioniert. Zur Filtration wurden die Filtereinheiten je nach Menge in einer Kühlzentrifuge bei 5000-7000 U/min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verwendet wie gewonnen, das Retentat wurde ggf. vor Verwendung mit VE gewaschen.

3.1.4.2 Allgemeine Methoden (KuL)

Im Rahmen der Experimente wurde die Anzahl an vorhandenen Theronten durch Formalinfixierung, Sedimentation und Einkonzentrieren auf 500-1500 μ l ermittelt. Die mikroskopische Auszählung wurde anhand von 3-6 15 μ l-Proben vorgenommen. Die Anzahl an festgehefteten Theronten an Festkörpern (Pellets, beschichteten Objektträgern oder Petrischalen) erfolgte nach Trocknung bei 45°C und Färbung mittels Methylgrün (1:50 gesättigte wässrige Methylgrünlösung). Theronten mussten in einigen Experimenten nach Formalinfixierung (Zugabe von 1-5 % vol. von 4,5 % HF) mikroskopisch nach ihrem Habitus in tot und lebendig eingeteilt werden. Die vor der Fixierung bereits toten Theronten zeigen dabei eine abgerundete Körperform und haben mind. 1/3 bis zur Hälfte ihres Zellvolumens verloren (Abbildung 7). Vitale Theronten behalten nach Formalinfixierung ihr charakteristisches längliches/birnenförmiges Aussehen und sind deutlich größer. Nach dem Absterben sedimentieren sie langsam zum Boden. Daher war es teils nötig, noch schwimmende (Überstand) und abgestorbene (sedimentierter Rückstand) Individuen getrennt zu analysieren. Testsubstrate wurden falls nötig mittel Tris-Puffer (5-15 mM) auf den gleichen pH-Wert gepuffert um deren Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Wann immer möglich wurden alle Versuche als doppelte Blindversuche durchgeführt, Auswertungen fixierter Proben waren stets verblindet. Alle Versuche fanden, falls nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur zwischen 18 und 22°C statt. Alle Zählungen und Testansätze erfolgten mindestens als Triplikate oder in bis zu 10 Replikaten.

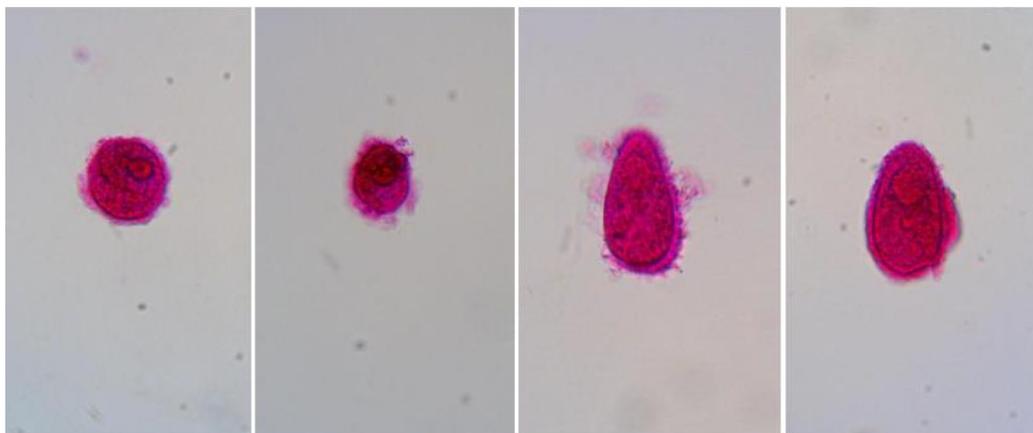


Abbildung 7: Abgestorbene (links) und vitale (rechts) formalinfixierte *I. multifiliis* Theronten (gefärbt mit Bengalrosa).

3.1.4.3 Auslösung Mucocystensekretion (KuL)

Ein geeigneter Ansatzpunkt zur Inaktivierung von Theronten wäre das Auslösen der Sekretion der Mucocysten. Das dabei ausgeschiedene klebrige Sekret verankert die Theronten am Wirt und enthält enzymatisch wirksame Stoffe zur Ruptur der Epidermis um die Penetration ins Gewebe zu erleichtern. Das Signal hierfür ist bislang unbekannt. Verwendung für den Feldeinsatz fände diese Inaktivierungsmethode in Abfang-Ansätzen mit Zugabe von auslösenden Stoffen ins Hälterungswasser oder in Parasitenfallen. Zum Screening möglicher Substrate wurden als Bioassay Objektträger (OT) beschichtet mit 300 µl weichen BG 3. Diese Beschichtung diente einerseits zum Immobilisieren und auch als Stimulus für Attachment und Penetration der Theronten, welche evtl. zuvor ausgelöst werden müssen. Als Positivkontrolle diente Alcianblau, ein Polysaccharidfärbemittel, welches niedrig dosiert die Mucocystenreaktion artifiziell auslöst. Die Auswertung erfolgte 15 min nach Zugabe von Theronten und Substrat auf den beschichteten OT, wobei erst nach 5 min Inkubation ein Deckglas aufgelegt wurde. In weiteren Tests konnten mit dieser Methode Substrate wie Fischserum (auch inaktiviert oder molekularfiltrierte Fraktionen) und Reinsubstanzen getestet werden.

3.1.4.4 Auslösung Nahsuchverhalten (KuL)

Theronten zeigen ein ausgeprägtes Nahsuchverhalten mit einer Vielzahl spezifischer Schwimm- und Suchreaktionen („burst, wobbling, increase of speed“, Hofmann 1995, Kerschensteiner 1997, Ketzer 1997, Haas et al. 1998, 1999). Diese Verhaltensweisen könnten helfen, die Verbreitungsstadien wirksam zu bekämpfen, indem man die für Theronten attraktiven Substanzen in geeigneter Form anbietet und sich die energieaufwändigen Reaktionen der Theronten zunutze macht. Zur Detektion wirksamer Substanzen erfolgte in diversen Testreihen ein Screening potentieller Wirkstoffe. Vorab konnte ausgeschlossen werden, dass die Auslösung im Experiment kein Resultat von pH- oder Osmolalitätsänderungen des angebotenen Substrats darstellen.

Die Verwendung einer Wahlkammer (2-Wege-Kammer) mit lateral hinzugefügten Testlösungen erwies sich dabei als nicht praktikabel um quantitative Aussagen zu erhalten. Daher wurden die Experimente in 6-Well-Platten durchgeführt, wobei die Zugabe kleiner Mengen an Substratlösungen (50-100 µl) jeweils zu 5 ml Theronten-Lösung erfolgte. Reinsubstanz-Komponenten wurden in noch kleineren Zugabemengen (2-5 µl) von 50 mg/ml Stammlösungen appliziert. Zur Ermittlung der geringsten wirksamen Konzentration wurden Verdünnungsreihen in gleicher Weise getestet, wobei zur Erhöhung simultaner Vergleichsreplikate auch 24-Well-Platten verwendet wurden, die mit je 1 ml Theronten-Lösung bestückt waren. Hier erfolgte die Zugabe der Substrate als 1/20 des Volumens.

3.1.4.5 Wirtsreaktion Theronten – Attachment & Verbleiben (KuL)

a) Attachment-Substrate

Um Theronten quantitativ zu akkumulieren ist es notwendig, ihnen eine attraktive Oberfläche anzubieten, welche sie zum Festheften und Verbleiben veranlasst (Attachment). Die Aktivierung dieses Verhaltens wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch chemische Wirtssignale vermittelt. Zuerst wurde anorganisches Hydrogel als Trägerstoff für Festhefte-Stimuli getestet. Aufgrund seiner enormen Quell- und Speichereigenschaften erschien es aussichtsreich, um es mit Wirkstofflösungen zu hydratisieren. Auf diese Weise konnten Mukushomogenisat und Serumisolate direkt Theronten-Lösungen angeboten

werden. Des Weiteren wurden verschiedene Biogele (BG = Biogel 1-4, siehe „Trägermatrices“) auf deren Eignung hin getestet. Im Zuge dessen wurden für die experimentellen Ansätze auch diverse Bioassays entwickelt. Die BG konnten mit Hilfe abgeschnittener Pipettenspitzen zu kleinen Pellets geformt (Volumen 15 µl) oder auf beliebige Trägermaterialien aufgebracht werden. Hinzu kamen Tests zu deren physikalischen Eigenschaften v.a. hinsichtlich der Viskosität und Stabilität.

b) Attachment-Bioassays

Neben dem direkten Anbieten dieser Pellets in verschiedenen Volumina z.B. in 24-Well Zellkulturplatten wurde ein Bioassay zur Ermittlung einer etwaigen Bevorzugung entwickelt. Bei diesem Ansatz wurden pro Well zwei Pellets (z.B. Kontrolle und Test) angeboten, welche sich zur Unterscheidung und besseren Handhabung auf markierten Insektennadeln aus rostfreiem Stahl befanden (Doppelpellet-Assay). Diese zeigten bei Verwendung gleicher Substrate im Mittel eine völlige Gleichverteilung, wodurch Zufallsergebnisse bei Verwendung der Pellet-Methode (Pellet-Assay) ausgeschlossen werden konnten. Pellets mit hydrophilem Testsubstrat wurden vorab kurz in LW gewaschen um oberflächlich anhaftendes, schnell lösliches Testsubstrat zu entfernen. Ebenso konnten OT oder Zellkultur-Wells (24 Well-Platten, Sarstedt) mit kleinen Mengen (10-12 µl) BG beschichtet und im Experiment den Theronten angeboten werden. Inkubiert wurde je nach Fragestellung von 15 min bis über mehrere Stunden. Die Auswertung der Zahlen angehefteter Theronten erfolgte je nach Ansatz teils absolut, teils prozentual nach Fixierung der Theronten mittels HF, nach Herstellung von Quetschpräparaten, nach Trocknen und Färben der Schichten auf OT oder BG-Pellets (Abbildung 8). Nicht adhärirte Theronten im Überstand wurden nach Fixierung, Sedimentation und Equilibrieren auf 300-1000 µl in Aliquots repliziert ausgezählt. Aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen Versuchsansätze zur Untersuchung der Festheftreaktion der Theronten können an dieser Stelle nicht für alle durchgeführten Assays detaillierte Angaben zur Methodik dargelegt werden. Alterierende Versuchsdesigns und wichtige Eckdaten zur Durchführung werden falls nötig beim jeweiligen Ergebnis mit aufgeführt.

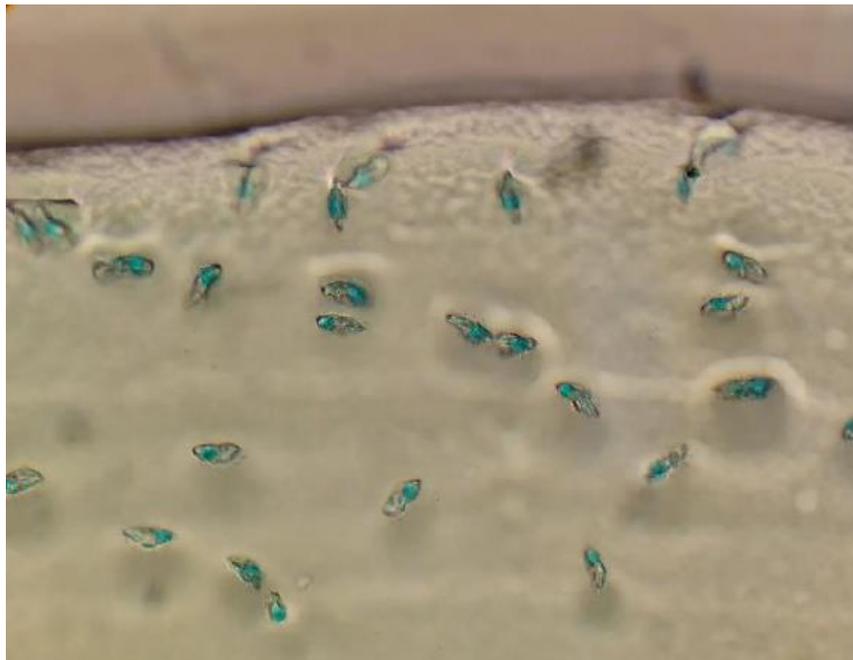


Abbildung 8: An BG festgeheftete Theronten nach Trocknung und Färbung mit Methylgrün.

3.1.4.6 Attachment-Stimuli Identifikation (KuL)

Zur molekularen Identifikation der Stimuli für das Festheften und Verbleiben, wurde mit Hilfe der zuvor beschriebenen Assays nach dem Ausschluss-Verfahren vorgegangen. Zunächst erfolgten Vergleiche des Theronten-Verhaltens beim Anbieten der verschiedenen BG als Trägersubstrate, woraufhin Fischsubstrate und Reinsubstanzen in unterschiedlicher Konzentration eingebracht wurden. Diese wurden bereits beim Anmischen des BG in gelöster Form zugegeben. Verwendet wurde auch Fischringer, um eine evtl. Wirksamkeit der anorganischen Elektrolyte des Fischgewebes bzw. der osmotischen Verhältnisse an der Fiscoberfläche abzuklären. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit der Zumischung von Substanzen getestet, welche das Nahrungsverhalten auslösen konnten. Nach erfolgreichem Erreichen hoher Festhefte- und Verbleiberaten wurde zudem versucht, durch Zugabe evtl. geeigneter Substanzen die Attraktivität und die Dauer der Wirksamkeit der Substrate noch weiter zu erhöhen. Die Identifikation von für das Festheften und Verbleiben der Theronten verantwortlichen Stimuli konnte durch Beimengung der entsprechenden Reinsubstanzen (Endkonzentration 1 mg/ml) zu unwirksamen BG-Substraten erreicht werden.

3.1.4.7 Abfangversuche *in vitro* (KuL)

Die Weiterführung der Attachment-Versuche bestand aus Experimenten zur Abfangeffizienz mit vorab als wirksam identifizierter BG-Substratoberflächen. Ziel war es, mit geeigneten Substraten eine möglichst hohe Zahl Theronten, durch deren Festheften zu entfernen. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgten Identifizierung der Attachment-Stimuli wurde mit den bis dahin bekannten wirksamen Substraten gearbeitet. Im Rahmen dieser Testreihen fanden auch erste Versuche mit Bioziden statt, welche die Theronten nach dem Festheften abtöten sollten. Hierzu wurden mehrere Kandidaten-Substanzen mit bioziden Eigenschaften in Screenings getestet und bei potentieller Wirksamkeit auf deren Eignung hin weiter untersucht. Ausgangspunkt war der bereits beschriebene Pellet-Assay unter Verwendung von 6-Well-Zellkulturplatten. Tests in größeren Volumina wurden in Ansätzen mit 100-250 ml Bechergläsern oder PP-Schälchen aus dem Lebensmittelbedarf durchgeführt (Abbildung 9).



Abbildung 9: Abfangversuche in mittleren Volumina von 80-120 ml in PP-Schälchen.

Ein spezieller Assay diente der besseren vergleichenden Auswertung der prozentualen Rate an toten Theronten besonders in Biozid-Versuchen bei größeren Wasservolumina. Hierfür wurden kleine

Petrischälchen (Matek glass bottom culture dishes, Ø 35 mm) in 70 ml Bechergläsern (Bottom-Well-Assay, BWA, siehe Abbildung 10) mit Theronten inkubiert. Diese Schälchen besaßen mittig eine runde, flache Ausparung (MicroWell) zur Aufnahme von ca. 10-20 µl BG-Substrat. Bei Inkubation konnten die Theronten an dieser Oberfläche anheften und verblieben bei Biozid-Kontakt auf dieser Substratoberfläche bzw. am Boden der kleinen Schale. Nach der Inkubation konnte der Überstand rund um das Schälchen abgenommen, die Flüssigkeit innerhalb dessen blieb darin. So konnten der Überstand im Becherglas (schwimmende, vitale Theronten) und die in dem Schälchen verbliebenen (mehrheitlich am Substrat angeheftete/tote Theronten) getrennt ausgewertet werden.

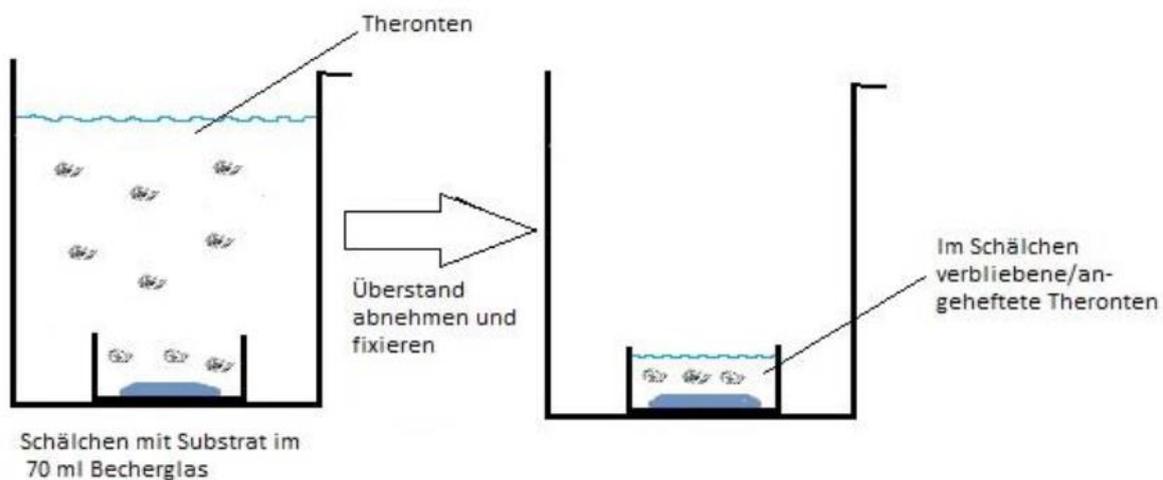


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Bottom-Well-Assays (BWA).

3.1.4.8 Tests zur Überlebensrate von Theronten (KuL)

Die Auslösung des Nahrungsverhaltens und der Festhefte- und Verbleibereaktion durch unsere Substrate zog die Frage nach sich, wie lange Theronten nach der Aktivierung der schnellen Schwimmreaktionen und dem Verbleiben an attraktiven Substraten im Vergleich zu nicht aktivierten (Ruheschwimmen = langsames Gleiten) vital und damit infektiös bleiben. Zur Ermittlung der Überlebensraten wurden neben Versuchen in Well-Platten auch Inkubationsversuche teils in größeren Volumina von bis zu 70 ml durchgeführt. Theronten wurden nach Aktivierung mit wirksamem Substrat über verschiedene Zeitspannen inkubiert. Zusätzliche Kontrollsubstrate und Additiva (Mannitol, PenStrep, Endkonzentration 1,5 mg/ml) sollten Osmolaritätseffekte und den Einfluss von, durch die Zugabe von Wirkstoffen, erhöhtem Bakterienwachstum ausschließen. Die inkubierten Theronten wurden, neben der visuellen Erfassung der Vitalität per Stereomikroskop, fixiert, und die Zahl toter und lebendiger Stadien im Überstand und Bodensatz (sedimentierte tote) wie unter „Allgemeine Methoden“ beschrieben ausgezählt. Die jeweils verwendeten Versuchsbedingungen sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle wiedergegeben.

3.1.4.9 Wirtsreaktion Theronten – Penetration (KuL)

Ein möglicher Weg um Theronten kontinuierlich aus dem Wasserkörper zu entfernen wäre, diese nicht nur an attraktiven Oberflächen zum Festheften zu bewegen, sondern auch deren Penetration in eine

vorhandene Lockmatrix auszulösen. Dies stellt i.d.R. eine irreversible Reaktion dar, wodurch der Einsatz von Bioziden in Abfangkonstruktionen überflüssig wäre. Es galt daher, wirksame Substanzen zur Stimulierung der Penetration der Theronten in verschiedene Matrices zu finden, zu testen und die Methodik ggf. zu optimieren. Zunächst wurden hierfür Fischsubstrate in BG 1 eingebracht und dieses in verschiedener Viskosität angesetzt. Testoberflächen waren hier sowohl Pellets (Doppelpelletversuch) als auch in 48-Well Platten eingegossene Schichten um ein Eindringen exponierter Theronten beobachten zu können. Um jedoch klare und auch quantifizierbare Aussagen treffen zu können, musste ein Assay entwickelt werden, der es erlaubt, eingedrungene Theronten klar zu identifizieren. Hierzu wurde eine horizontal aufstellbare Glasküvette entwickelt, die einen Spalt von 1,5 mm besaß (Abbildung 11). In den Spalt konnte BG eingebracht und zusätzlich mit in BG eingebrachten Testsubstraten zur Penetrationsstimulierung überschichtet werden. Die Reaktionen an der Oberfläche konnten mittels eines horizontal schwenkbaren Stereomikroskops visuell erfasst werden. Nachdem Bohrbewegungen der Theronten beobachtet werden konnten, aber noch kein Eindringen erfolgte, wurde die Dichte der BG-Matrix soweit hinabgesetzt, bis die Theronten eindringen konnten. Die Zugabe von Fischringer erhöhte die Lebensdauer der Theronten und ermöglichte die Beobachtung auch längere Zeit nach dem Eindringen.

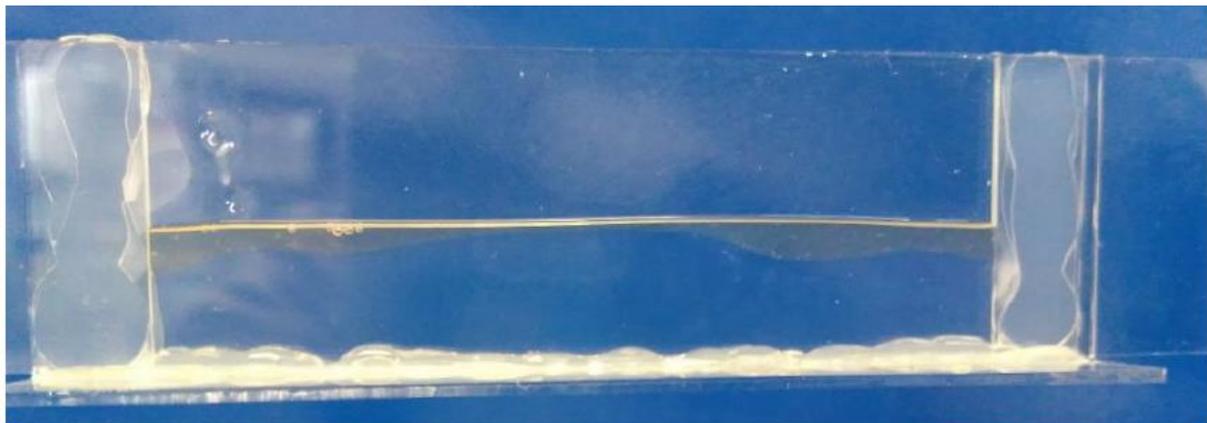


Abbildung 11: Penetrations-Assay: Glasküvette mit Spalt zum Einbringen von Biogel-Schichten zur horizontalen Erfassung eindringender Theronten.

3.1.4.10 Versuche zur Fallenentwicklung - Parasite traps (KuL)

Basierend auf den Resultaten zum Festheften und Verbleiben der Theronten sollten die wirksamen Substrate in Form einer effektiven Abfangmatrix zunächst mit dem Ziel eines „proof of concept“ zur Entwicklung von Theronten-Fallen getestet werden. Als attraktives Substrat zur Verwendung in Fallenkonstruktionen wurde BG 3 gewählt, welches sich in zuvor durchgeführten Testreihen als hochattraktives Substrat zeigte. In zahlreichen Testreihen wurden Theronten in Volumina von bis zu 15 Liter verschiedenen BG-Locksichten exponiert. Die Evaluierung erfolgte dabei durch Einkonzentration des gesamten mittels HF fixierten Wasservolumens in Sedimentationsgefäßen und anschließendem mikroskopischem Auszählen der im Wasserkörper verbliebenen Theronten nach Färbung mit Bengalrosa. Auch konnte eine Unterscheidung in tote und vitale Theronten bei Versuchsende erfolgen. Hierbei wurde, wie im Text weiter unten beschrieben, zum Zwecke des letalen Abfangens das Biozid Niclosamid (Endkonzentration im Substrat 0,05 mg/ml) eingesetzt. Durch die durchgeführten Testreihen konnten als bislang geeignetste Methode zur Aufbringung der

Abfangmatrix geschliffene Kunststoffplatten (11 x 4 x 0,2 cm), die mit BG beschichtet waren (Abbildung 12), ermittelt werden. Diese konnten durch Befestigung an Schwimmkörper in mittlerer Höhe z.B. in Aquarien eingebracht werden. Die Reaktionsdynamik der Theronten wurde dabei in kleineren Volumina bis 250 ml anhand von Miniaturausführungen (4,5 x 2 x 0,2 cm) der Fallen-Prototypen mittels Stereomikroskopie parallel zum Versuch beobachtet. Zum Nachweis, dass die Abtötung der Theronten nur bei direktem Kontakt mit der Matrixoberfläche und nicht durch ins Wasser diffundierte Substanzen erfolgt, wurden Theronten dem Wasser aus den Ansätzen die vorher mit Fallen inkubiert waren, exponiert. Weitere Testreihen sollten insbesondere die optimale Matrixdichte, sowie die Wirksamkeitsdauer und deren potentielle Verlängerung durch zusätzliches Einbringen von Attraktantien aufzeigen.

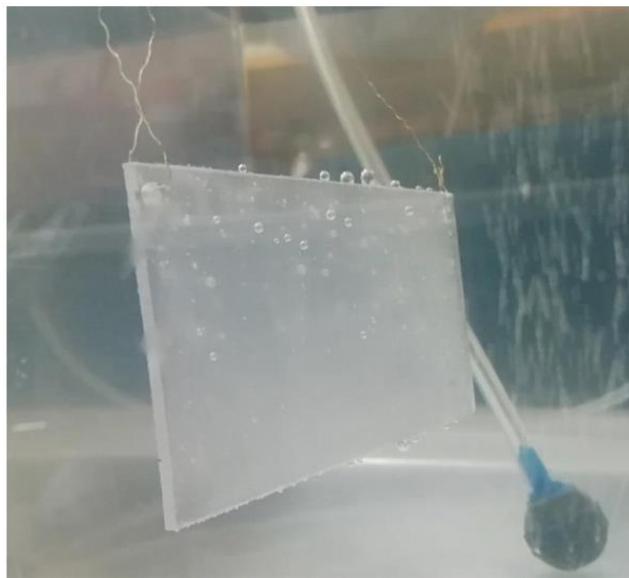


Abbildung 12: Prototyp einer beschichteten Theronten-Falle („parasite trap“) mit attraktivem Biogel und Biozid beschichtete Kunststoffplatte als Abfangvorrichtung.

3.1.4.11 Trophonten-Abfangtests (KuL)

Neben dem Verhindern der Wirtsfindung der Theronten wurde auch getestet, ob sich die vom Fisch abgehenden Trophonten effektiv aus dem Wasser entfernen lassen. Diese suchen in kurzer Zeit nach dem Ablösen ein geeignetes Substrat meist in Bodennähe, um sich festzuheften und zu enzystieren. Daraufhin werden durch Teilungen große Mengen an Theronten produziert. Um dies zu unterbinden sollten sich Trophonten an Material anheften, welches daraufhin vor der Entwicklung zu Theronten entfernt wird. Das Substrat sollte dabei von den Trophonten gut angenommen werden und die irreversible Festheftereaktion sollte nach Möglichkeit bevorzugt auf diesem Material stattfinden.

Da hierzu bislang keinerlei Informationen existieren, musste bezüglich des Materials ein ausgiebiges Screening verschiedenster Stoffe erfolgen. Verwendet wurden Kunststoffe (Folien, Netze, Gaze und Hartstoffe aus PE, PP, PPP und PVC), Gummi, Pflanzenmaterialien (Holz, Schilf, Blätter), Sand, Kies, Keramik, Metalle sowie Stoffe verschiedener Zusammensetzung (Baumwolle, Kunststoff). Die Festhefte-Testsubstrate wurden in 6-Well Zellkulturschalen oder 8 cm-Petrischalen zum einen bodendeckend (Test: Festheften ja/nein) und zum anderen nur den halben Well-Boden bedeckend (Bevorzugung Material gegenüber Well-Boden) verbracht. Den Ansätzen wurden pro Well 5-10, pro

Petrischale 10 noch schwimmende Trophonten zugegeben und diese bis zum Festheften aller Individuen (1-3 h) in den Platten bei 23°C inkubiert.

Aus diesen Tests ermittelte aussichtsreiche Substrate wurden daraufhin einem weiteren Bevorzugungs-Assay unterzogen. Hierfür wurden eckige PP-Schalen (14 x 10 cm, 2,5 cm Höhe) mit einer 3 mm Schicht autoklaviertem und gewaschenem Teichboden befüllt, um so annähernd natürliche Bedingungen herzustellen. Exakt die Hälfte dieser Fläche wurde mit 5 entsprechend zugeschnittenen rechteckigen Stücken Testsubstrat ausgelegt, die andere Hälfte frei gelassen. Nach Inkubation mit Trophonten konnten die Teststücke in Fixierungslösung verbracht und die Anzahl darauf vorhandener Tomonten ermittelt und so eine Bevorzugung festgestellt werden.

3.1.4.12 Infektionsexperimente zur Transmissionsunterbrechung unter Laborbedingungen (IFI, TiHo, KuL)

Die Ergebnisse aus den Laborstudien zur Transmissionsunterbrechung wurden in Folge gemäß der Vorhabensbeschreibung auf möglichst praxistaugliche *in vivo*-Testverfahren übertragen. Hierbei wurden stets Fische repliziert in gleichen Verhältnissen Theronten ausgesetzt. Mittels Ethanol-Fixierung der Individuen und anschließender visueller Auswertung (verblindet) konnten die Infektionsraten und somit der Erfolg der Transmissionsblockierung beurteilt werden.

a) Dispersion von Stimuli

Die vielversprechenden Ergebnisse aus den Tests zur Auslösung des Nahrungssuchverhaltens unter Verwendung von natürlichen Stoffen wurden in einfach handzuhabende Strategien zur Transmissionsblockierung umgesetzt. Dabei sollten die Stoffe sowohl eine stark erhöhte Schwimmaktivität auslösen, als auch die Wirtserkennung der Theronten effektiv erschweren. Verwendet zur Auslösung des Effekts wurde zunächst das Zusatzstoffgemisch MX, welches in Screenings gute Aktivierungsraten erzielte.

Ein erstes Challenge-Experiment erfolgte mit juvenilen naiven Forellen (4-5 cm) und direkter Dispersion von Substanzen, die das Suchverhalten der Theronten aktivieren. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 Fische entweder in Kontroll-/Vorinkubations- oder in Theronten-Lösungen (3,5 L) bei 16°C exponiert (330 Theronten/Fisch) und nach 5 h in 15 Liter Aquarien überführt. Die Wirkstoffzugabe erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen. Zum einen wurden gleichzeitig Wirkstofflösung und Fische zu parasitenhaltigen Infektionsbehältern gegeben, im zweiten Ansatz wurde die Fischzugabe erst nach siebenstündiger Vorinkubation der Theronten mit Wirkstoff vorgenommen. Die Beimischung des Wirkstoffs bei beiden Ansätzen erfolgte schrittweise in drei Stufen. Die Entwicklungsphase der Trophonten wurde nach 7 Tagen beendet und die Befallsraten pro Individuum ermittelt.

Ein weiterer Test sollte die Wirksamkeit bei Verwendung von Reinsubstanzen bestätigen. Dies war nötig, um Verunreinigungen des Wassers durch Dauerzugaben möglichst gering zu halten und so wenig unnötige Stoffe wie möglich zuzuführen. Hierzu wurden in je eine Versuchseinheit (150 L) je 10 Fische (6-8 cm) verbracht und mit einer Dosis von 500 Theronten pro Fisch inkubiert. Nach Zugabe der Theronten, aber vor Zusetzen der Fische wurde eine Versuchseinheit mit einer Kombination aus den zwei Reinsubstanz-Wirkstoffen K5 und K6 vorinkubiert.

b) Parasite Traps

Die Übertragung des erfolgreichen *in-vitro*-Tests des Theronten-Fallen-Prototyps erfolgte ebenfalls vorerst in Aquarien mit derselben Beschichtung (BG + MX + Niclosamid) wie im Laborversuch. Ein Test

mit lediglich je vier exponierten Fischen pro 12 L Becken diente als Machbarkeits-Ansatz zur Wahrung des Tierwohlaspektes, bevor die replizierten Challenge-Versuche beginnen konnten. Ein erster Durchgang erfolgte mit Brütlingen in je 3 15 L Einheiten pro Gruppe mit 10 Fischen pro Becken bei einer Dosis von 1600 Theronten pro Fisch.

Der gleiche Ansatz sollte dann in 150 L Versuchseinheiten unter Verwendung derselben Kunststoffplatten (50 x 4 x 0,02 cm) als Fallen durchgeführt werden, um praxisähnlichere Bedingungen hinsichtlich der Volumenverhältnisse zu schaffen. Die Becken wurden mit Theronten bestückt und gleichzeitig mit und ohne Fallen je nach Versuch für einige Stunden inkubiert bevor die Zugabe von Forellen (Setzlinge) erfolgte. Die Tiere verblieben in den Versuchseinheiten für den Entwicklungszeitraum der Trophonten bis nach visueller Detektion in Abstrichen der Versuch beendet wurde. Nach 6-8 Tagen wurden die Fische euthanasiert und für die spätere Auswertung des Befalls mit *I. multifiliis* in Ethanol fixiert. Im ersten Durchgang wurden in zwei der Versuchseinheiten beschichtete und in ebenfalls zwei als Kontrollgruppe dienenden Einheiten unbeschichtete Kunststoffplatten eingebracht. Gleichzeitig wurden allen Einheiten 60.000 Theronten zugegeben und eine Kontrolllösung mit Theronten angesetzt. Vier Stunden später wurden 17 Regenbogenforellen pro Einheit zugesetzt. Bei der Überprüfung der Kontrolllösung zu diesem Zeitpunkt erwies sich ein Großteil der Theronten als noch lebend. Nach weiteren 20 Stunden wurden die Kunststoffplatten aus den Einheiten entfernt. Der zweite Durchgang erfolgte nach demselben Schema. Allerdings wurden diesmal vier Versuchs- mit vier Kontrollgruppen verglichen, nur 10.000 Theronten pro Gruppe zugeben und je 10 Regenbogenforellen gesetzt.

Derselbe Versuchsaufbau wurde für den dritten Durchgang mit je drei Versuchs- und Kontrollgruppen genutzt. Hierbei wurden 16.000 Theronten pro Gruppe und je 10 Regenbogenforellen verwendet. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Versuchseinheiten zweimal täglich auf den Zustand der Fische und die Belüftung überprüft. Der Sauerstoffgehalt und die Temperatur der Einheiten wurde täglich gemessen, die Wasserparameter Ammonium, Nitrit und Nitrat wurden zweimal wöchentlich bestimmt. Die Fütterung der Fische (1 % des Körpergewichts) erfolgte einmal täglich.

3.1.4.13 Infektionsexperimente zur Transmissionsunterbrechung unter Semi-field-Bedingungen (IFI, KuL)

Für die Semi-field-Versuche wurden sechs rechteckige Hälterrinnen (280 x 60 x 60 x 60 cm, Abbildung 13) verwendet, je drei behandelte und drei unbehandelte Kontrollansätze. Die Versuchseinheiten (Produktionsvolumen: 0,5 m³) wurden als Durchflusssystem (2 l/min) bei 10-13°C betrieben. Alle Aufzuchteinheiten wurden während der Experimente kontinuierlich belüftet und die Wasserqualität entsprach den physiologischen Anforderungen der Forellen-Setzlinge. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Versuchseinheiten zweimal täglich auf den Zustand der Fische, den Wasserzufluss und die Belüftung überprüft. Der Sauerstoffgehalt und die Temperatur der Einheiten wurde täglich gemessen, die Wasserparameter Ammonium, Nitrit und Nitrat wurden zweimal wöchentlich bestimmt. Die Fütterung der Fische (1 % des Körpergewichts) erfolgte einmal täglich.



Abbildung 13: Hälterrinnen mit Durchflusssystem in abgeschlossenem Quarantäne-Bereich für Challenge-Experimente.

a) Substratdispersion

Der erste Versuch zur Substratdispersion wurde in 6 der beschriebenen Versuchseinheiten durchgeführt. Hierbei wurden drei dieser Einheiten (1-3) für die Substratzugabe genutzt, die anderen drei (4-6) dienten als Kontrolleinheiten. Zu Versuchsbeginn wurden die Wasserzuflüsse unterbrochen und im stationären Betrieb sämtlichen Versuchseinheiten je 18.000 Theronten zugegeben. In die Einheiten 1-3 wurden zusätzlich die zu prüfenden Wirkstoffe eingebracht. Daraufhin wurden jeweils 15 Regenbogenforellen pro Einheit gesetzt und die Wasserzuflüsse mit 2 l/min wieder eingeschaltet. Nach 23 Tagen wurden je 10 Fische euthanasiert und nach Versuchseinheit sortiert in Ethanol fixiert. Der zweite Versuch wurde in 6 angepassten Versuchseinheiten durchgeführt, womit die Anzahl der benötigten Versuchsfische und Theronten deutlich gesenkt werden konnte. Der Versuchsaufbau entsprach dem ersten Versuch, allerdings wurden diesmal nur 11.500 Theronten und 6 Regenbogenforellen pro Versuchseinheit zugegeben. Am Versuchsende nach 22 Tagen wurden je 6 Fische euthanasiert und nach Versuchseinheit sortiert in Ethanol fixiert.

b) Parasite traps

Parallel zu den Tests der Fallen-Prototypen in Aquarien erfolgten bereits erste Versuche zur Anwendung der Fallenmatrix in Hälterrinnen. Zunächst wurde die Idee verfolgt, eine möglichst große Oberfläche durch Aufbringung des BG auf Bürstenköpfen zu erzeugen. Hierzu wurden handelsübliche Toilettenbürsten per Tauchverfahren beschichtet. Pro Rinne (3 behandelt, 3 unbehandelt, Zugabe von unbeschichteten Bürstenköpfen) wurden je zwei Bürstenköpfe eingehängt, so dass der Bürstenkopf sich etwa in der Mitte des Wasserkörpers befand. Zu Versuchsbeginn wurden die Wasserzuflüsse unterbrochen und im stationären Betrieb sämtlichen Versuchseinheiten je 350.000 Theronten zugegeben. Des Weiteren wurde eine Kontrolllösung mit Theronten angesetzt. Eine Überprüfung nach fünf Stunden auf überlebende Theronten verlief wie gewünscht positiv. Daraufhin wurden jeweils 25 Regenbogenforellen pro Versuchseinheit besetzt. 24 Stunden nach dem Setzen der Fische wurden die Wasserzuflüsse mit 2 l/min wieder eingeschaltet. Nach 10 Tagen erfolgte eine einmalige Infektionsüberprüfung von jeweils fünf Fischen pro Einheit mittels Abstrichen, die unterhalb der Rückenflosse genommen und mikroskopiert wurden. Hierbei wurde nur zwischen infiziert und nicht infiziert unterschieden. Dabei konnte in den Abstrichen aller beprobter Fische *I. multifiliis* nachgewiesen werden. Nach 15 Tagen wurden 20 Fische pro Einheit euthanasiert und in Ethanol fixiert. Nach Abschluss des Fixierungsvorganges wurde die linke Seite der Schwanzflosse der Fische unter einem Binokular begutachtet und die darauf befindlichen Trophonten gezählt.

Im nachfolgenden Versuch wurde die Konstruktion mit Kunststoffplatten aufgegriffen, in gleicher Weise beschichtet und mit Schwimmkörpern in die mit Theronten bestückten Rinnen eingehängt. Zu

Versuchsbeginn wurden die Wasserzuflüsse unterbrochen und im stationären Betrieb sämtlichen Versuchseinheiten je 350.000 Theronten zugegeben. In die Einheiten 1-3 wurden zusätzlich die zu prüfenden Fallen, in die Einheiten 4-6 wurden unbeschichtete Attrappen eingebracht. 20 h nach Zugabe der Theronten und der Kunststoffplatten wurden diese wieder aus den Versuchseinheiten entfernt und jeweils 10 Regenbogenforellen pro Versuchseinheit besetzt. Weitere 5 h später wurden die Wasserzuflüsse mit 2 l/min wieder eingeschaltet. Nach 10 Tagen erfolgte eine einmalige Infektionsüberprüfung von jeweils fünf Fischen pro Einheit mittels Abstrichen, die unterhalb der Rückenflosse genommen und mikroskopiert wurden. Dabei konnte nur in den Abstrichen einer Einheit mit beschichteten Kunststoffplatten eine Infektion mit *I. multifiliis* nachgewiesen werden. Am Versuchsende nach 15 Tagen wurden die Fische euthanasiert und nach Versuchseinheit sortiert in Ethanol fixiert.

c) Trophonten-Abfangtest

Die Erkenntnisse zu geeigneten Festhefte-Substraten für Trophonten wurden direkt in die Semi-Field Applikation in praxisüblichen Hälterungsrinnen übertragen. Der Abfangstoff wurde hierzu in Bahnen auf 50 x 100 cm Metallgitter-Gerüsten befestigt. Diese wurden bemessen, um ca. 80 % des Rinnenbodens abzudecken. In diesem Versuch wurden 6 Versuchseinheiten mit jeweils 50 Regenbogenforellen besetzt. Drei dieser Einheiten (1-3) wurden für den Abfangtest genutzt, die anderen drei (4-6) dienten als Kontrolleinheiten. 7 Tage nach dem Zusetzen von je 5 mittelgradig infizierten Fischen wurden erstmals Bodenstrukturen zum Abfangen der Theronten in die Versuchseinheiten 1-3 eingebracht. Diese Bodenstrukturen wurden zweimal täglich gewechselt und die jeweils aus den Einheiten entnommenen zum Trocknen aufgestellt. Es erfolgten regelmäßige Infektionsüberprüfungen von jeweils 5 Fischen pro Einheit mittels Abstrichen, die unterhalb der Rückenflosse genommen und mikroskopiert wurden. Nach 23 Tagen wurden jeweils 10 Fische pro Versuchseinheit euthanasiert, Abstriche der kompletten linken Körperseite genommen und diese auf Objektträger verbracht. Ausgezählt wurden diejenigen Trophonten, die sich unterhalb eines Deckglases (20 x 20 mm), welches mittig auf die Abstriche aufgebracht wurde, befanden. Hierbei wurde zur Bestimmung des erfolgten Reinfektionsgrades zwischen den drei Größenklassen klein, mittel und groß unterschieden.

3.1.5 Impfungen (TiHo Fische)

Für die Herstellung der Impfstoffe wurde *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. verwendet. Bei *Tetrahymena* sp. handelt es sich um eine Gattung eukaryotischer Einzeller, die ebenso wie *I. multifiliis* dem Stamm der Ciliophora angehört und eine vergleichbare Zelloberfläche wie *I. multifiliis* ausweist. Da Kreuzimmunitäten zwischen *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. beschrieben sind, sollte überprüft werden, ob die i-Antigene dieses Einzellers auch zu einer Immunität von Fische gegen *I. multifiliis* führen können. Um bei einer Impfung über das Wasser die Aufnahme des Impfstoffes über die Haut und über die Kiemen zu verbessern, wurde vor Applikation der Impfstoffe Ultraschallbäder und das Setzen von sehr feinen Hautläsionen getestet. Alle Impfansätze wurden zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt, um mögliche Einflüsse durch äußere Bedingungen, insbesondere der Temperatur, ausschließen zu können. Auch die zur Impfung und für die Kontrolle herangezogenen Regenbogenforellen (6,3-10,3 cm bei 3,98-13,25 g) entstammen alle dem gleichen Ursprung. Um möglichst alle Gruppen in gemeinsamem Wasser halten zu können, wurden für die Haltung vier Becken, die je 400 Liter Wasser fassen können, verwendet. In jedes Becken wurden Netzkäfige

eingesetzt, um pro Becken verschiedene Impfgruppen im gleichen Wasser halten zu können. Nach der Impfung wurden die Fische auf diese Netzkäfige in den vier Becken aufgeteilt, so dass in jedem Becken pro Impfansatz (mit ungeimpfter Kontrolle insgesamt 14 Ansätze, s. Tabelle 6) jeweils eine Teilgruppe gehalten wurde.

3.1.5.1 Herstellung der Vakzinen (TiHo Fische)

Es wurden sowohl lebende als auch mittels Formalin inaktivierte Theronten von *I. multifiliis* als Impfstoffe eingesetzt. Die dafür benötigten Parasitenstadien wurden von in der Diagnostikprechstunde vorgestellten Fischen gewonnen und im Labor zu Theronten herangezogen. Die lebenden Theronten wurden frisch gewonnen und verimpft, während die formalininaktivierten Theronten nach der Fixierung bei -80°C eingefroren gelagert wurden. Zur Formalinfixierung wurden die abgesammelten Theronten in 0,4 %iges gepuffertes Formalin überführt. Die Isolierung der i-Antigene von *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. wurde in der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Dafür wurde Triton-X-100/high salt-Lösung (THS-Lösung) benutzt, die aus 50 ml einer THS-Stammlösung (55,92 mg KCl, 50 ml 10 % Triton-X-100, 179 mg EDTA, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 500 ml), 88 μl β -Mercaptoethanol und 25 μl Leupeptin Stammlösung (100 mg Leupeptin in 10 ml kaltem Wasser) bestand. Zusätzlich wurde eine THS-EGTA Lösung angesetzt bestehend aus 88 μl β -Mercaptoethanol, 25 μl Leupeptin-Stammlösung und 50 ml einer THS-EGTA-Stammlösung (55,92 mg KCl, 50 ml 10 % Triton-X-100, 190 mg EGTA, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 500 ml). Als dritte Lösung wurden 88 μl β -Mercaptoethanol zu 50 ml einer PBS Lösung mit Chelatoren (4 mg NaCl, 0,1 mg KCl, 0,1 mg KH_2PO_4 , 0,57 mg Na_2HPO_4 , 179 mg EDTA, 190 mg EGTA, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 500 ml) gegeben. Es wurden jeweils für eine Isolierung bis zu 2×10^7 Einzeller (*I. multifiliis* bzw. *Tetrahymena* sp.) verwendet. Die Einzeller wurden bei Zimmertemperatur mit 10 mM Tris-Salzsäure (pH 7,4) gewaschen und anschließend in Zentrifugenröhrchen pelletiert. Zu den Zellpellets wurden 40 ml der kalten THS-EDTA Lösung gegeben und anschließend gemixt. Nach der Überführung in ein 50 ml Zentrifugegefäß wurden die Präparationen für 20 Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 ml THS-EGTA wurden zugegeben. Nach dem Mischen für einige Minuten wurden die Präparationen erneut für 15 Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wurde in 5 ml PBS-Lösung aufgenommen, in ein 125 ml fassendes Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Die so gewonnenen i-Antigene wurden bis zur Nutzung bei -20°C gelagert.

3.1.5.2 Durchführung der Impfungen (TiHo Fische)

a) Impfung mit lebenden Theronten von *I. multifiliis* durch Applikation in die Leibeshöhle

Lebende Theronten von *I. multifiliis*, die im Laborzyklus gewonnen wurden, wurden Regenbogenforellensetzlingen ($n=40$) intraperitoneal verabreicht. Dafür wurden die Fische mittels des Narkosemittels MS222 (Pharmaq, UK) in einer Konzentration von 100 mg pro Liter Wasser in einem 1 Liter fassenden Aquarium anästhesiert und es wurden mit einer Kanüle pro Fisch 0,1 ml einer Suspension mit ca. 600 Theronten i.p. appliziert. Die Fische wurden zum Aufwachen aus der Narkose in ein 30 Liter fassendes Aquarium mit Frischwasser gesetzt und, nachdem sie das Bewusstsein

widererlangt hatten, auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

b) Impfung mit Formalin-inaktivierten Theronten von *I. multifiliis* durch Applikation in die Leibeshöhle

Formalin-inaktivierten Theronten von *I. multifiliis*, die im Laborzyklus gewonnen wurden, wurden Regenbogenforellensetzlingen (n=40) intraperitoneal verabreicht. Dafür wurden die Fische mittels des Narkosemittels MS222 (Pharmaq, UK) in einer Konzentration von 100 mg pro Liter Wasser in einem 1 Liter fassenden Aquarium anästhesiert und es wurden mit einer Kanüle pro Fisch 0,1 ml einer Suspension mit ca. 600 Theronten i.p. appliziert. Die Fische wurden zum Aufwachen aus der Narkose in ein 30 Liter fassendes Aquarium mit Frischwasser gesetzt und, nachdem sie das Bewusstsein widererlangt hatten, auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

c) Impfung mit i-Antigenen von *I. multifiliis* durch Applikation in die Leibeshöhle

I-Antigene von *I. multifiliis*, wurden Regenbogenforellensetzlingen (n=40) in einer Konzentration von 10 µg pro Fisch intraperitoneal verabreicht. Dafür wurden die Fische mittels des Narkosemittels MS222 (Pharmaq, UK) in einer Konzentration von 100 mg pro Liter Wasser in einem 1 Liter fassenden Aquarium anästhesiert und es wurden mit einer Kanüle pro Fisch 0,1 ml der Lösung (enthielt 10 µg i-Antigene) i.p. appliziert. Die Fische wurden zum Aufwachen aus der Narkose in ein 30 Liter fassendes Aquarium mit Frischwasser gesetzt und, nachdem sie das Bewusstsein widererlangt hatten, auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

d) Impfung mit formalin-inaktivierten Theronten von *I. multifiliis* über ein Tauchbad

Lebende Theronten von *I. multifiliis*, die im Laborzyklus gewonnen wurden, wurden wie oben beschrieben in Formalin inaktiviert und bei -80°C gelagert. Die Lösung mit den inaktivierten Theronten wurde aufgetaut und in drei Becken mit 10 Liter Wasser gegeben, so dass pro Becken 200.000 Theronten vorhanden waren. Regenbogenforellensetzlingen (N = 120) wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde ohne weitere Vorbehandlung in die Impflösung eingesetzt und für 20 Minuten in der Lösung belassen. Die Impfdosis betrug pro Fisch 5000 Theronten. Anschließend wurden die Fische auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren. Die zweite Gruppe wurde vor der Impfung in ein Ultraschallbad gesetzt, um die Durchlässigkeit von Haut und Kieme zu erhöhen und so die Aufnahme des Impfstoffes über diese Organe zu verbessern (Abbildung 14). Die Einstellungen des Ultraschallbades wurden nach Angaben aus der Literatur ausgewählt, da ähnliche Einstellungen und Parameter bei Versuchen zur Impfung von bakteriellen Vakzinen mit Erfolg eingesetzt wurden (Cobo Labarca et al. 2015). Es wurde mit niedrigen Frequenzen (ca. 37 kHz) und einer Intensität von ca. 60 mW/cm² gearbeitet. Die Beschallungsdauer betrug fünf Minuten und erfolgte in fünf Impulsen von je 30 Sekunden, indem das Gerät jeweils nach 30 Sekunden aus- bzw. wieder angeschaltet wurde. Insgesamt ergab sich demnach eine Netto-Beschallung von 2,5 Minuten. Im Anschluss wurden die Fische sofort in die Impflösung eingesetzt und für 20 Minuten in der Lösung belassen. Die Impfdosis betrug pro Fisch ebenfalls 5000 Theronten. Anschließend wurden die Fische auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren. Der dritten Gruppe Fische (n=40) wurden vor der Impfung Mikroläsionen der Haut mittels eines Dermarollers zugefügt. Der Dermaroller

verfügt über eine sehr große Anzahl sehr feiner Nadeln und wurde von vorne, beginnend hinter dem Kiemendeckel, bis zur Schwanzflosse von einer Seite über jeden Fisch gerollt. Im Anschluss wurden die Fische sofort in die Impflösung eingesetzt und für 20 Minuten in der Lösung belassen. Die Impfdosis betrug pro Fisch ebenfalls 5000 Theronten. Anschließend wurden auch diese Fische auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.



Abbildung 14: Ultraschallbad zur Vorbehandlung der Fische vor der Impfung über eine Tauchbadvaccine.

e) Impfung mit i-Antigenen von *I. multifiliis* über ein Tauchbad

Die gewonnenen i-Antigene von *I. multifiliis*, wurden in einer Konzentration von 2000 µg pro 10 Liter über ein Tauchbad verimpft. Insgesamt wurden 120 Regenbogenforellen mit der Impfpräparation aus i-Antigenen geimpft. Dafür wurden die Fische in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde vor der Impfung nicht vorbehandelt, die zweite Gruppe wurde wie oben beschrieben mittels eines Ultraschallbades vorbehandelt und die dritte Gruppe wurde, ebenfalls wie oben beschrieben, mittels eines Dermarollers vorbehandelt. Die Lösung aus i-Antigenen wurde aufgetaut und in ein Becken mit 10 Liter Wasser gegeben. Die Regenbogenforellensetzlinge wurden in die Lösung eingesetzt und für 20 Minuten in der Lösung belassen. Die Impfdosis betrug pro Fisch 50 µg i-Antigen-Präparation. Anschließend wurden die Fische auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

f) Impfung mit i-Antigenen von *Tetrahymena* sp. durch Applikation in die Leibeshöhle

I-Antigene von *Tetrahymena* sp. wurden Regenbogenforellensetzlingen ($N = 40$) in einer Konzentration von 10 µg pro Fisch intraperitoneal verabreicht. Dafür wurden die Fische mittels des Narkosemittels

MS222 (Pharmaq, UK) in einer Konzentration von 100 mg pro Liter Wasser in einem 1 Liter fassenden Aquarium anästhesiert und es wurden mit einer Kanüle pro Fisch 0,1 ml der Lösung (enthielt 10 µg i-Antigene) i.p. appliziert. Die Fische wurden zum Aufwachen aus der Narkose in ein 30 Liter fassendes Aquarium mit Frischwasser gesetzt und, nachdem sie das Bewusstsein widererlangt hatten, auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

g) Impfung mit i-Antigenen von *Tetrahymena* sp.

Die gewonnenen i-Antigene von *Tetrahymena* sp., wurden in einer Konzentration von 2000 µg pro 10 Liter über ein Tauchbad verimpft. Insgesamt wurden 120 Regenbogenforellen (Größe, Gewicht) mit der Impfpräparation aus i-Antigenen geimpft. Dafür wurden die Fische in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde vor der Impfung nicht vorbehandelt, die zweite Gruppe wurde wie oben beschrieben mittels eines Ultraschallbades vorbehandelt und die dritte Gruppe wurde, ebenfalls wie oben beschrieben, mittels eines Dermarollers vorbehandelt. Die Lösung aus i-Antigenen wurde aufgetaut und in ein Becken mit 10 Liter Wasser gegeben. Die Regenbogenforellensetzlinge wurden in die Lösung eingesetzt und für 20 Minuten in der Lösung belassen. Die Impfdosis betrug pro Fisch 50 µg i-Antigen-Präparation. Anschließend wurden die Fische auf vier Netzeinsätze (a 10 Regenbogenforellen) aufgeteilt, die in den 400 Liter fassenden Becken befestigt waren.

Tabelle 6: Getestete Impfstrategien

Impfgruppe	Applikationsform	Impfpräparation	Vorbehandlung
1	i.p. Injektion	<i>I. multifiliis</i> , lebend	-
2	i.p. Injektion	<i>I. multifiliis</i> , formalininaktiviert	-
3	i.p. Injektion	<i>I. multifiliis</i> , i-Antigene	-
4	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , formalininaktiviert	-
5	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , formalininaktiviert	Ultraschallbad
6	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , formalininaktiviert	Dermaroller
7	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , i-Antigene	-
8	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , i-Antigene	Ultraschallbad
9	Tauchbad	<i>I. multifiliis</i> , i-Antigene	Dermaroller
10	i.p. Injektion	<i>Tetrahymena</i> sp., i-Antigene	-
11	Tauchbad	<i>Tetrahymena</i> sp., i-Antigene	-
12	Tauchbad	<i>Tetrahymena</i> sp., i-Antigene	Ultraschallbad
13	Tauchbad	<i>Tetrahymena</i> sp., i-Antigene	Dermaroller
14 (Kontrolle)	-	-	-

3.1.5.3 Infektion der geimpften Fische und Kontrolle der Effektivität der Impfstrategien (TiHo Fische)

Die geimpften Fische wurden nach der Impfung für 20 Tage bei 18°C in den 400 Liter fassenden Becken gehalten und täglich gefüttert. Nach 20 Tagen erfolgte eine Infektion der Fische mit Theronten, die im Laborzyklus produziert worden waren. Die Infektion wurde getrennt für die einzelnen Impfgruppen in Becken mit 1 Liter Wasser, die stark belüftet wurden und in die insgesamt ca. 20.000 Theronten

zugegeben wurden, vorgenommen. Die Fische verblieben jeweils über einen Zeitraum von 2 Stunden in dem Becken und wurden anschließend in ihre Netzkäfige zurückgesetzt. Die Auswertung des Impferfolges erfolgte eine Woche nach Infektion. Alle Fische wurden mittels MS222 in einer Konzentration von 500 mg pro Liter Wasser euthanasiert. Anschließend wurde der Schleim der kompletten linken Körperhälfte abgestrichen und mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung der Parasitenbefall ausgezählt. Der Abstrich der gesamten rechten Körperseite wurde gesammelt und mittels PCR auf den Parasitengehalt überprüft. In gleicher Weise wurde mit den Kiemen verfahren. Das komplette Kiemengewebe der linken Körperhälfte wurde entnommen und mikroskopisch ausgezählt, während das Kiemengewebe der rechten Körperhälfte für PCR Untersuchungen entnommen wurde. Die Proben für die PCR wurden bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2 Phase 2: Versuche unter Praxisbedingungen

Nach Abschluss der Laborarbeiten und der Versuche unter kontrollierten Bedingungen, wurden die erprobten und für aussichtsreich erachteten Methoden und Verfahren in Praxisbetrieben getestet. Dabei wurden zum einen Materialien zum Abfangen von Parasitenstadien eingesetzt und zum anderen die vielversprechendsten Impfstrategien überprüft.

3.2.1 Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung unter Praxisbedingungen (KuL, IFI)

Die unter Labor- und Semi-Feld-Bedingungen am vielversprechendsten wirksamen Ansätze zur Transmissionsunterbrechung wurden in Teichwirtschaften, in denen ein Ausbruch einer Infektion mit *I. multifiliis* auftrat, getestet. Dabei wurde die Wirksamkeit der Methode zum einen über die Höhe der Mortalitäten ermittelt und zum anderen wurden Daten von klinischen Untersuchungen, die aus der Bestandsbetreuung der Teichwirtschaften verfügbar waren, soweit diese vorlagen, ausgewertet. Bei den in den Betrieben verwendeten Aktivierungskomponenten handelte es sich um zwei ubiquitäre Stoffe, die in kommerziell erhältlichen Futtermitteln für Speisefische enthalten sind. Negative Auswirkungen auf die Fische waren aufgrund der Ergebnisse der Labor- und semi-field Versuche nicht zu erwarten.

3.2.1.1 Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung in Teichwirtschaft A

Zum Test der entwickelten Ansätze unter Praxisbedingungen in einer Teichwirtschaft konnte eine Kombination aus quantitativer Entfernung von Trophonten und Auslösung des Nahrungsverhaltens der Theronten in einer Salmoniden-Teichwirtschaft angewendet werden. In dem Betrieb waren Speisefischanwärter und Setzlinge mittel- bis hochgradig mit *I. multifiliis* befallen, was bereits in den Vorjahren zu massiver Mortalität von bis zu 80 % des Besatzes führte. Die im Labor und im Semi-Field Versuch gewonnenen Erkenntnisse zur Präferenz der reifen Trophonten (Protomonten bzw. der sich daraus entwickelnden Tomonten) hinsichtlich ihrer Anheftung an Oberflächenstrukturen wurde im Fließkanal in Form größerer Trophonten-Fallen angewandt. Zusätzlich wurden Aktivierungskomponenten (AK, Substratdispersion von Reinsubstanzen), die das Nahrungverhalten bei

Theronten auslösen, im Fließkanal zugesetzt. Außerdem wurde in einem mit befallenen Fischen besetzten Aufzuchtteich die Gabe von AK angewandt.

Die befallenen Tiere waren verteilt auf zwei Fließkanäle (12 x 1,5 x 0,8 m, 14,4 m³, 300 Tiere pro Rinne). Von diesen blieb einer unbehandelt (= Kontrolle, Fließkanal 1), der zweite wurde behandelt mit Trophonten-Fallen und Zugabe von AK (= Test, Fließkanal 2). Der Durchfluss betrug circa 160 ml/sec (14400 L/Tag), wodurch rechnerisch pro Tag ein kompletter Wasserwechsel stattfand. Außerdem waren zwei Teiche mit 6 x 6 x 0,8 m (= 28,8 m³) frisch besetzt mit infizierten Fischen (500 pro Teich), von welchen ebenfalls einer als Kontrolle unbehandelt blieb. Die Größe der Fische betrug 11 - 12,5 cm, das Gewicht lag bei ca. 14 g. Das Behandlungsregime für den Fließkanal bestand darin, täglich über 2 Wochen die Trophonten-Fallen einzubringen und durch neue auszuwechseln sowie 4 x täglich Dosen von AK als Reinsubstanzen gleichmäßig im Fließkanal (früh, mittags, nachmittags und abends) zu verteilen. Dem Teich wurde 4 x täglich AK zugegeben, ebenfalls früh, mittags, nachmittags und abends über eine Woche. Die Konzentrationen der AK (K5 & K6 1:1 Gemisch) für den Fließkanal waren je 1 g/m³, d.h. je 8 g, für den Fließkanal demnach gesamt 16 g/Einzeldosis. Somit erfolgte die Zugabe von gesamt 64 g/Tag. Für den Teich betrug die Menge 24 g/Einzelportion (= 96 g/Tag). Die Trophonten-Falle war eine vergrößerte Version des im Semi-Field Versuch verwendeten Textilgewebe, welches auf ein 1 x 2 m Estrichgitter mit Kabelbindern fixiert wurde. Somit konnte ein Satz von fünf Stück den Fließkanalboden zu ca. 75 % bedecken (Abbildung 15). Diese Fallen wurden zweimal täglich entnommen, getrocknet und sofort durch neue ersetzt. Für den täglichen Wechsel stand ein zweiter Satz zur Verfügung. Die zusätzliche Betreuung der Tiere oblag dem Anlagenbetreiber.



Abbildung 15: Teichwirtschaft A. Oben links: Fließkanal mit befallenen Regenbogenforellen. Oben rechts: In Fließkanal eingebrachtes Trophonten-Fallenelement aus Textilgewebe auf Metallgitter.

Unten: Kleinteich mit befallenen Forellen-Setzlingen zur Behandlung mit Aktivierungskomponenten (AK).

3.2.1.2 Anwendungstests zur Transmissionsunterbrechung in Teichwirtschaft B

In dieser Salmoniden-Teichwirtschaft wurde mittels Substratdispersion sowie Abfangen von Trophonten versucht, die Parasitenlast der Fische zu reduzieren. Die Fische wurden dabei in einem Naturteich mit ca. 40 m³ (ca. 10 x 4 x 1 m) gehalten (Abbildung 16). Der Durchfluss in diesem Teich betrug 18,5 l/min, womit theoretisch ein eineinhalbtäglicher Wasseraustausch stattfand. Ein weiterer Teich, der als Kontrollteich hätte dienen können, stand in dieser Teichwirtschaft nicht zur Verfügung. Die Betreuung der Fische oblag dem Betriebsinhaber. Bisherige Besatzmaßnahmen des Betriebes führten zu *I. multifiliis*-bedingten Mortalitäten zwischen 80-95 %, unabhängig von der Größe der gesetzten Fische. Die Wassertemperaturen bei diesen Besatzmaßnahmen lagen zwischen 17 und 20°C. Gespeist wird die Anlage mit Bachwasser mit mehreren Oberliegern, wodurch eine Eradikation des Erregers als unmöglich anzusehen ist.

a) Substratdispersion

In den Teich, der mit 200 parasitenfreien Regenbogenforellensetzlingen besetzt wurde und in dem sich noch ein gering- bis mittelgradig an *I. multifiliis* befallener Restbestand von 44 Elsässer Saiblings-Setzlingen befand, wurde die Substratsuspension gegeben. Hierfür wurde ein Dispenser verwendet, welcher einmal täglich mit 16 g AK (K5 & K6) in 10 L Wasser gelösten Wirkstoffen befüllt und derart eingestellt wurde, dass die Abgabe dieser Menge über 24 h verteilt in das Zulaufwasser des Teiches erfolgte. Diese Behandlung des Wassers wurde über vier Wochen durchgeführt.

b) Trophonten-Abfangtest

Zu den infizierten Regenbogenforellen- und Elsässer Saiblings-Setzlingen wurden weitere 300 Regenbogenforellen durch den Tierhalter als reguläre Besatzmaßnahme in den Teich gesetzt. Um eine Infektion dieser Fische nach Möglichkeit zu vermeiden, wurden über drei Wochen Trophonten-Fallen in den Teich eingebracht. Diese bestanden aus einem 1 x 2 m großen Metallgitter, auf dem der am besten geeignete Textilstoff fixiert wurde. Mit jeweils fünf dieser Fallen konnte der Teichboden zu ca. 25 % bedeckt werden. Die Fallen wurden zweimal täglich entnommen, getrocknet und umgehend durch neue ersetzt. Für diese Wechsel wurde ein zweiter Fallen-Satz verwendet.



Abbildung 16: Teichwirtschaft B: Naturteich mit befallenen Elsässer Saiblings-Setzlingen zur Durchführung der Substratdispersion und des Trophonten-Abfangtests.

3.2.2 Impfungen unter Praxisbedingungen (TiHo Fische)

In einer Forellenteichwirtschaft mit einer Rinnenanlage mit in Reihe geschalteten Haltungskompartimenten, in der erfahrungsgemäß natürliche Infektion mit *I. multifiliis* auftreten, werden regelmäßig Kompartimente neu besetzt. Typischerweise haben die Setzlinge, die für den Besatz verwendet werden, ein Körpergewicht zwischen 5 g und 20 g und sind damit immunkompetent.

Vor dem Besatz wurden 100 Regenbogenforellensetzlinge einer Gruppe per Injektion in die Leibeshöhle mit inaktivierten Theronten von *I. multifiliis* immunisiert. Jedem dieser Fische wurde unter Narkose 0,1 ml einer Suspension mit ca. 600 Theronten (formalininaktivierte Theronten-Lösung mit 15 µg/ml Protein, bestimmt nach Bradford) intraperitoneal injiziert. Im Anschluss wurden die Fische in einem gut belüfteten Aufwachbecken zwischengehärtet, um eine bessere Tierkontrolle nach der Narkose zu gewährleisten. Anschließend wurden sie in ein Becken, das neben der eigentlichen Haltungsrinne aufgebaut wurde, umgesetzt. Eine weitere Gruppe von ebenfalls 100 Fischen wurde zunächst mittels Ultraschallbad wie oben beschrieben behandelt und anschließend mittels Badimmersion mit formalininaktivierten Theronten von *I. multifiliis* immunisiert. Im Anschluss wurden die 100 Fische für ca. 20 Minuten in das gut belüftete Impf-/Immersionsbad umgesetzt. In dieses Immersionsbad von ca. 10 Liter wurden pro Fisch ca. 5100 formalininaktivierte Theronten eingebracht (~85 ml inaktivierte Theronten-Lösung mit 15 µg/ml Protein, bestimmt nach Bradford). Eine weitere Gruppe von 100 Regenbogenforellen diente als ungeimpfte Kontrolle. Alle drei Fischgruppen wurden nach der jeweiligen Behandlung in 2000 Liter fassende Becken gesetzt, die neben der eigentlichen Haltungsrinne aufgebaut waren. Das Wasser aus der Haltungsrinne wurde separat in jedes der drei Becken geleitet, um einen stetigen Wasseraustausch zu gewährleisten. Das ablaufende Wasser aus den Becken wurde verworfen. Alle weiteren Maßnahmen an den Fischen des Versuchs wurden unter Narkose mittels MS222 durchgeführt.

In gleicher Weise wurde die Immunisierung in einem weiteren Ansatz mit Speisefischanwärttern erprobt. Auch hier wurden wie oben beschrieben jeweils 100 Fische per Injektion in die Leibeshöhle mit inaktivierten Theronten von *I. multifiliis* immunisiert. Ebenfalls wie oben ausgeführt wurden 100 weitere Regenbogenforellen nach Vorbehandlung in einem Ultraschallbad immunisiert und schließlich wurde auch in diesem Ansatz eine Kontrollgruppe von 100 Tieren beobachtet.

Neben einer initialen Beprobung erfolgten sowohl im Ansatz mit Setzlingen als auch im Ansatz mit Speisefischanwärttern mehrere Kontrolluntersuchungen im Abstand von 5 - 7 Tagen. Bei jeweils drei dieser Untersuchungen wurden Fische mittels MS222 in einer Konzentration von 500 mg pro Liter Wasser euthanasiert. Anschließend wurde der Schleim der kompletten linken Körperhälfte abgestrichen und mikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung der Parasitenbefall ausgezählt. Es wurden jeweils bei zwei dieser Kontrolluntersuchungen zusätzlich Proben für eine anschließende Untersuchung mittels PCR entnommen und bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Abgesehen von der Beprobung wurden die Fische wie in einem einfachen Durchgang in der Teichwirtschaft ohne Versuch gehalten. Das bedeutete unter anderem tägliche Tierkontrollen durch den Teichwirt, sowie Fütterung und bei zwei Gelegenheiten im Rahmen der Bestandsbetreuung zwei weitere Überprüfungen des Parasitenstatus auch der Versuchsgruppen. Über den gesamten Versuchslauf sind also 600 Fische durch den Versuch betroffen, von denen 200 Fische der Kontrollgruppe und je 200 Fische den beiden unterschiedlichen Behandlungsgruppen zuzuordnen sind.

3.3 Methodenentwicklung & Optimierung (KuL)

Insbesondere für die Versuche zur Transmissionsunterbrechung zeigte sich, dass die verwendeten Methoden im Verlaufe des Projektes teilweise angepasst und optimiert werden mussten. In diesem Abschnitt sollen daher einige ausgewählte Schritte zur Etablierung der Verfahren und einige Tests beschrieben werden, die nötig waren, um die geeignetsten Methoden zu bestimmen und die Praxistauglichkeit sowie evtl. Schwachstellen unserer Ansätze zu überprüfen.

a) Substratstabilität

Da sich zeigte, dass das Festhefteverhalten nach gewisser Zeit nachlässt und i.d.R. nur wenige Theronten länger als 4 h an der attraktiven Oberfläche des BG verbleiben, wurde getestet, ob dies auf (bakteriellen) Abbau der Oberflächenmoleküle zurückzuführen ist. Indizien hierfür waren die schnelle Abnahme der Wirksamkeit nach Vorinkubation in stark mit Bakterien besiedeltem Aquarienwasser und die Bildung eines Belags auf der Oberfläche des BG. Der Grad des Verlusts an Effizienz nach Inkubation in LW nach 45 min und über Nacht sollte vorab mittels BWA und Pellet-Assay untersucht werden. Die Anwendung von Konservierungsmitteln sollte die mikrobielle Aktivität verhindern und so die Wirksamkeit des Substrates im Wasser länger erhalten. Angewandt zur Konservierung wurden verschiedene Substanzen bei verschiedenen Inkubationsperioden konzentriert nach Hersteller- und Literaturvorgaben im Pellet-Assay. Parallel wurde die Akzeptanz hinsichtlich eines möglichen Repellent-Effekts der Konservierungsstoffe in Form von Pellets oder als auf OT aufgebrauchte Tropfen von 20 µl getestet. Ein möglicher Effekt des pH-Wertes der BG-Substrate auf die Attachmentrate musste ebenfalls abgeklärt werden. Hierzu wurden verschieden gepufferte BG-Pellets hergestellt, im Quadruplikat Theronten-Lösungen zugegeben und die Zahl jeweils angehefteter Theronten nach 45 min wie oben beschrieben ausgezählt. Weitere Nebenversuche dienten dazu, die Stabilität der Substrate und Stimuli unter Praxisbedingungen besser einschätzen zu können.

b) Tests von Bioziden

Die einfachste Methode, das Festheften an die attraktive Oberfläche zur Transmissionsunterbrechung zu nutzen, ist das Abtöten der Theronten bei Kontakt. Hierzu sollten möglichst unbedenklich anwendbare Biozide zum Einsatz kommen, die auch in der Praxis Anwendung finden könnten. Zumindest sollte jedoch eine Substanz identifiziert werden, welche die Anforderung an einen schnellen letalen Effekt ohne Repellent-Wirkung erfüllt.

c) Screening Biozide

Begonnen wurde hierzu mit einem Screening verschiedener Kandidaten-Substanzen auch unter Einbeziehung der Toxizität und Wasserlöslichkeit und voraussichtlich nicht in der Praxis verwendbarer Agenzien. Diese konnten aber als Vergleichssubstrate zur Kontrolle einer hohen Effizienz im Experiment dienen. Neben dem direkten Einbringen der Biozide in BG-Substrate wurde auch versucht mittels Um- und Überschichtung der evtl. abschreckend wirkenden Biozid-haltigen Schicht beim BWA, mit Biozid-freien Lockschichten zu arbeiten.

d) Propolis

Neben den kommerziell erhältlichen Bioziden wurde auch selbst gewonnenes Propolis, ein breitenwirksames natürliches Biozidgemisch der Honigbiene getestet. Dieses wurde nach Standardverfahren per alkoholischer Extraktion aufgereinigt und zu lösemittelfreiem Extrakt

verarbeitet, welches durch Erwärmen und hydrophile Suspension in die BG-Matrix eingearbeitet werden konnte.

e) Chinin

Ausgiebige Tests erfolgten im Rahmen der Suche nach einem ökologisch unbedenklichen bioziden Wirkstoff mit dem pflanzlichen Bitterstoff Chinin, dessen Wirkung auf *I. multifiliis* bereits bekannt war, bisher jedoch nur als Futteradditiv für Fische getestet wurde (Schumacher et al. 2011). Chinin wäre aufgrund seiner Wirkungsweise und des pflanzlichen Ursprungs ein aussichtsreicher Kandidat zur Bekämpfung der Schwärmerstadien. Es ist temperaturstabil und besitzt bereits bekannte Wirksamkeit auf *I. multifiliis*, ist dabei aber leicht in Wasser löslich. Dessen Zulassung als Lebensmittelzusatzstoff bot ebenfalls gute Voraussetzungen für eine unbedenkliche Anwendung in Abfangvorrichtungen bzw. parasite traps. Unsere Vorabversuche konnten die Wirkung auch auf Theronten bestätigen. Die Evaluierung wurde zunächst in mehreren Testserien mittels unserer etablierten Standard-Bioassays bei einfacher Zumischung in verschiedenen Konzentrationen vorgenommen. Zielgröße war die Abfangeffizienz, evaluiert als verringerte Theronten-Abundanz im Überstand, oder als Anteil an toten Theronten, jeweils unter bestimmten Zeitregimes. Zur Maskierung des auftretenden Repellent-Effekts wurde zusätzlich MX in unterschiedlicher Dosierung beigemischt. Zur Feststellung der Lösungsdynamik aus dem BG erfolgte ein Diffusionstest mit Substrat unterschiedlicher Dichte. Stets erfolgte parallel die Beobachtung der Theronten-Reaktionen nach Zugabe der Stimuli, zur Bestimmung der zeitlichen Reaktionsverläufe sowie der generellen Festhefte- und Verbleiberate.

f) Niclosamid

Um für die methodischen Tests brauchbare Resultate zu erlangen, war ein gut wirksames Biozid vonnöten, welches gleichzeitig nur eine geringe Wasserlöslichkeit besitzt, keine Repellent-Wirkung auf Theronten aufweist und bei Kontakt schnell letal auf die Theronten wirkt. Hierfür wurde aufgrund diverser erfolgreicher Tests das Molluskizid und Antihelminthikum Niclosamid (Salicylanilid, z.B. Yomesan, Bayluscid) gewählt. Zudem hat Niclosamid in Wasser eine begrenzte Stabilität und verliert seine Wirksamkeit nach wenigen Tagen. Zur Wirkung im Bioassay und für die Eignung zur Anwendung in Semi-field Tests erfolgten Versuchsreihen analog zu den anderen beschriebenen Bioziden in diesem Abschnitt.

3.4 Statistik (TiHo-Fische, KuL, IFI)

Die Daten, die in den Filtrationsversuchen und den Impfversuchen durch die TiHo gewonnen wurde, wurden mittels des Programms SigmaPlot 12.0 (Systat Software) ausgewertet. Dabei wurden die Daten zunächst mittels des Shapiro Wilk Test auf Normalverteilung untersucht. Waren die Daten normalverteilt, wurde ein T-Test durchgeführt. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummentest analysiert. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der p -Wert kleiner als 0,05 war. Die Daten aus den Versuchen der Transmissionsunterbrechung wurden durch das Studienbüro Kallert & Loy analysiert. Alle Angaben von absoluten oder relativen (%) Theronten-Reaktionen und Zählungen in Text oder Grafik sind Mittelwerte aus mehreren Replikationen \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Deskriptive und explorative statistische Analysen der Datensätze wurden mit den Softwareanwendungen WinStat (R. Fitch), Real Statistics (C. Zaiontz) und Astatsa (N. Vasavada) durchgeführt. Ausreißer wurden identifiziert indem $n \cdot$ Abstand von Sigma (SD, Abstand vom Mittelwert) berechnet wurde, um

erforderlichenfalls eine Analyse von korrigierten Datensätzen einzubeziehen. Die Daten wurden durch Kolmogorov-Smirnoff- und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Die Varianzhomogenität wurde via Bartlett-Test analysiert. Normal verteilte, unabhängige Stichprobengruppen-Daten wurden per One-way-ANOVA auf Gruppenunterschiede untersucht, und ggf. per Gruppenvergleich mittels des Tukey HSD-Multiple-t-Tests (falls erforderlich einschließlich Bonferroni-Korrektur) auf Unterschiede hin überprüft. Für Datensätze, welche die Kriterien Normalverteilung und homogener Gruppen nicht erfüllten, wurden Kruskal-Wallis-Post-hoc-Mehrfachvergleiche nach den Methoden von Conover und Dunn verwendet. Bei Rangkonflikten wurde die Korrekturprozedur nach Benjamini-Hochberg vorgenommen. Paarvergleiche nicht normalverteilter Daten wurden mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney durchgeführt.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Phase 1: Versuche unter kontrollierten Bedingungen

4.1.1 Entwicklung von Laborzyklen von *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp. (TiHo Fische)

4.1.1.1 Laborzyklus von *I. multifiliis* auf einer permanenten Zelllinie

Mikroskopisch konnten in allen 18 Versuchsansätzen (Tabelle 1) direkt nach dem Beimpfen der EPC-Zellen in Zellkulturflaschen und in Makrotiterplatten lebende Trophonten bzw. Theronten im Medium auf den Zellkulturen nachgewiesen werden. Da bereits nach wenigen Stunden in den Versuchsansätzen 1, 2, 5 und 6 in einigen Zellkulturflaschen und in einigen Vertiefungen der Makrotiterplatten Verpilzungen des Zellrasens auftraten und aus diesem Grund eine weitere Kultur in diesen Ansätzen nicht möglich war, wurde bei den Ansätzen 3, 4, 7 und 8 Amphotericin B zur Reduktion des Pilzwachstums zum Zellkulturmedium zugesetzt. Nach wenigen Stunden waren zwar die Zellen noch intakt, jedoch schwellen die Trophonten von *I. multifiliis* stark an und platzten nach kurzer Zeit. Für die weiteren Versuchsansätze wurde daher auf den Zusatz von Amphotericin B trotz des Risikos der Verpilzung der Zellkulturen verzichtet. In den Ansätzen 1, 2, 5 und 6 sowie 9-12, in denen die Zellkulturen mit frisch abgesammelten Trophonten beimpft wurden, konnte in wiederholten Ansätzen im Verlauf von 24-48 Stunden zunächst eine Entwicklung zu Tomonten und in diesen über die Entwicklung von Tomiten schließlich auch eine Entwicklung bis hin zu Theronten beobachtet werden. Dabei blieben alle Stadien frei im Zellkulturmedium. Es zeigte sich allerdings, dass bei parallel hierzu laufenden Ansätzen ohne permanente Zelllinie (siehe unten) deutlich mehr Parasiten den Entwicklungszyklus erfolgreich durchliefen. Während in den Zellkulturansätzen nur einzelne Parasiten zu Theronten heranreiften und in der überwiegenden Mehrheit der Ansätze gar keine Entwicklung stattfand, konnte sich in Ansätzen ohne permanente Zelllinie eine Mehrzahl der Parasiten bis zum Theronten entwickeln. Die Beimpfung mit Trophonten wurde dem entsprechend zu Gunsten der direkten Beimpfung mit Theronten verworfen.

Bei der Beimpfung mit Theronten, sei es indirekt über Trophonten die sich entwickelten oder der direkten Zugabe (Ansätze 13-18), zeigten diese anfänglich rege Bewegungsaktivität. Über einen Zeitraum von i.d.R. drei Tagen nahm die Bewegungsaktivität stetig ab bzw. kam schließlich ganz zum Erliegen. Ein Teil der Theronten wurde rund und kugelförmig, während ein weiterer, meist größerer Teil, zerfiel. Auch bei fortgeführter Bebrütung fanden im Anschluss keine weiteren Entwicklungen der Parasitenstadien statt. Mit zunehmendem Kulturalter nahm die Vitalität der EPC-Zellen hingegen sichtbar ab und immer wieder konnte vermehrtes Bakterienwachstum beobachtet werden.

Bei den ersten Versuchen zum Einsatz von Mukus starben die bedeckten Zellen vergleichsweise schnell ab, so dass schon nach 24 Stunden deutliche Löcher im Zellrasen beobachtet werden konnten. Auch die schließlich für die Zellkulturen verträgliche Mukusmenge von ca. 300 µl auf eine Makrowell-Vertiefung erbrachte keine Fortschritte bezüglich der Parasitenentwicklung. Ebenso wenig war der Einsatz von Agar Agar von Erfolg gekrönt. Hier konnten keine Unterschiede zur Standardzellkultur beobachtet werden. Die unterschiedliche Bebrütungstemperatur hatte allerdings einen Einfluss auf die Überlebensdauer der Parasitenstadien. Während bei 20°C Bebrütungstemperatur durchaus auch über den dritten Kulturtag hinaus Parasitenbewegung beobachtet werden konnte, war dies bei 25°C Bebrütungstemperatur in keinem der Ansätze der Fall. Auch die Zugabe von Regenbogenforellenserum zu dem Zellkulturmedium hatte lediglich die Konsequenz, dass die Beweglichkeit der Parasiten im Vergleich zu Zellkulturansätzen ohne Zusatz schneller abnahm. Eine vermehrte Aktivität durch

Serumzugabe konnte nicht beobachtet werden und auch auf die Parasitenentwicklung hatte der Zusatz von Serum keinen feststellbaren Einfluss. Bis zum Ende der Projektlaufzeit konnte eine dauerhafte Haltung und Vermehrung von *I. multifiliis* auf EPC-Zellen nicht realisiert werden.

4.1.1.2 Laborzyklus von *I. multifiliis* ohne permanenten Zelllinie

Bei 25°C entwickeln sich die von den Fischen abgewanderten Trophonten innerhalb von Stunden (1-12) zu Tomonten. Innerhalb dieser bildeten sich im Verlauf von ca. einem Tag Tomiten welche schließlich als Theronten auswandern und frei umherschwimmen. Nach dem ersten Absammeln wurde das jeweilige Wasser durch frisches gut belüftetes Wasser ersetzt, so dass nach weiteren 12 – 24 Stunden ein weiteres Absammeln von Theronten möglich war. Teilweise bildeten sich aus den Tomonten mehrere größere Stadien (15-25 µm), die sich aus diesem Stadium nicht mehr weiter entwickelten. Über die Bebrütungstemperatur ließ sich die Entwicklungsgeschwindigkeit bis zum Theronten beeinflussen. So konnte über den Einsatz von mehreren unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen die Verfügbarkeit von frischen Theronten über einen längeren Zeitraum gestreckt werden. Auch das verwendete Wasser hatte einen Einfluss auf die Erbrütungserfolge. Während wir anfänglich mit Leitungswasser gute Ergebnisse erzielten, zeigte sich, dass durch standortbedingte Änderungen im Leitungswasser (nach Baumaßnahmen am Wasserleitungssystem und sich ändernde Wassereinzugsgebiete) deutlich schlechtere Ergebnisse erreicht wurden. Der Einsatz von zuvor gefiltertem Aquarienwasser war hier ein erster Ansatz, der zumindest teilweise Abhilfe schaffen konnte. Schlussendlich erwies sich abgefülltes Mineralwasser mit relativ gleichbleibenden Eigenschaften als stabilste und zuverlässigste Variante. Eine Ursache für die geringere Eignung des Leitungswassers konnten wir, nach Prüfung naheliegender Störfaktoren, wie z.B. einer Kupferbelastung, nicht identifizieren.

Insgesamt war der Labor-Entwicklungszyklus reproduzierbar und es konnten zuverlässig jeweils ca. 24-48 h nach dem Abwandern der Parasitenstadien von den Fischen ein bis zweimal Theronten aus den mit Wasser gefüllten Zellkulturflaschen gewonnen werden. Die Theronten wurden unter dem Mikroskop auf ihr makroskopisches Erscheinungsbild und ihr Verhalten untersucht. Dabei fiel auf, dass sie trotz identischer Erbrütungsbedingungen eine stark unterschiedliche Vitalität aufwiesen. In den späteren Infektionsversuchen zeigte sich auch, dass die Theronten aus den unterschiedlichen Durchgängen eine unterschiedliche Infektiösität aufwiesen. Da die geplante Produktion größerer Mengen schwer kalkulierbar war, wurden Theronten zeitweise auch bei kühleren Temperaturen (ca. 8°C) gelagert. Bei langsamer Angleichung konnte der Zeitraum bis zum Verlust der Beweglichkeit der Theronten verlängert werden. Auch wenn durch solche Maßnahmen die Überlebensdauer verlängert werden kann, ist davon auszugehen, dass die Vitalität und auch die Infektiösität potentiell abnehmen.

4.1.1.3 Laborzyklus von *Tetrahymena* sp.

Der Laborzyklus von *Tetrahymena* sp. stellt sich im Vergleich zu *I. multifiliis* als unproblematisch dar. Bei der Entnahme aus der Kultur wurden die Ziliaten bei 500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Durch Entfernen des Überstands und Auffüllen mit Leitungswasser bzw. Volvic-Wasser, was ggf. mehrfach wiederholt wurde, konnten *Tetrahymena* sp. relativ sauber gewonnen werden. Wie bei den Kulturen von *I. multifiliis* konnte die Entwicklungsgeschwindigkeit durch Variation der Bebrütungstemperatur (18°C bis 25°C) beeinflusst werden. I.d.R. wurden nach frühestens 72 Stunden Ziliaten aus den Kulturen

geerntet. Da bereits aus ca. 1ml Altkultur eine neue Kultur gestartet werden konnte, war eine planbare Vermehrung leicht möglich.

4.1.2 Etablierung einer PCR zum Nachweis von *I. multifiliis*-DNA im Wasser und auf Haut und Kiemen von Fischen (TiHo Fische)

4.1.2.1 Allgemeine Überprüfung der PCR

Mittels der etablierten PCR konnte sicher *I. multifiliis* in Proben von Haut und Kiemen der Fische nachgewiesen werden. Dabei konnten DNA-Gehalte von 10 Kopien noch detektiert werden. Eine quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes ist mit der Methode möglich (Abbildungen 17-19).

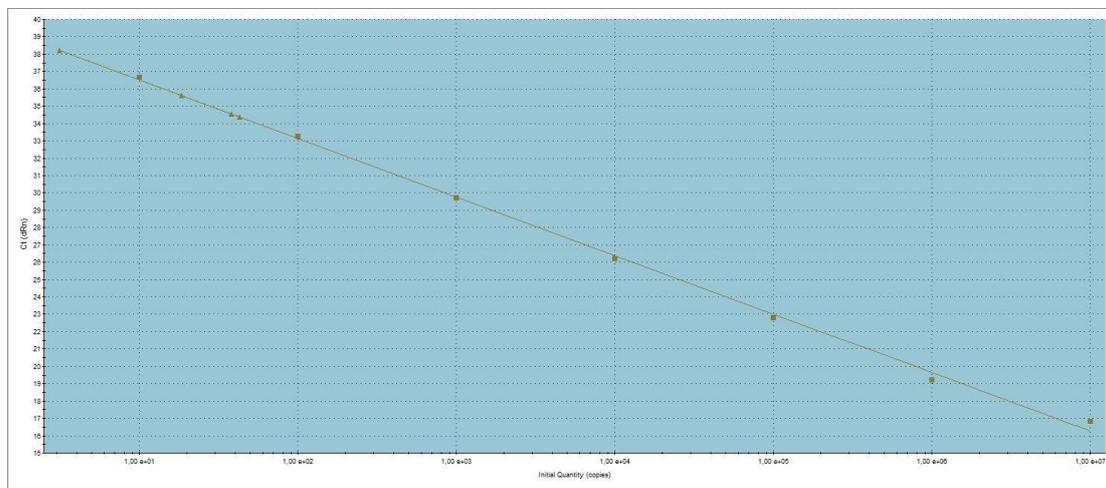


Abbildung 17: Standardkurve von Verdünnungen einer Probe mit *I. multifiliis* DNA.

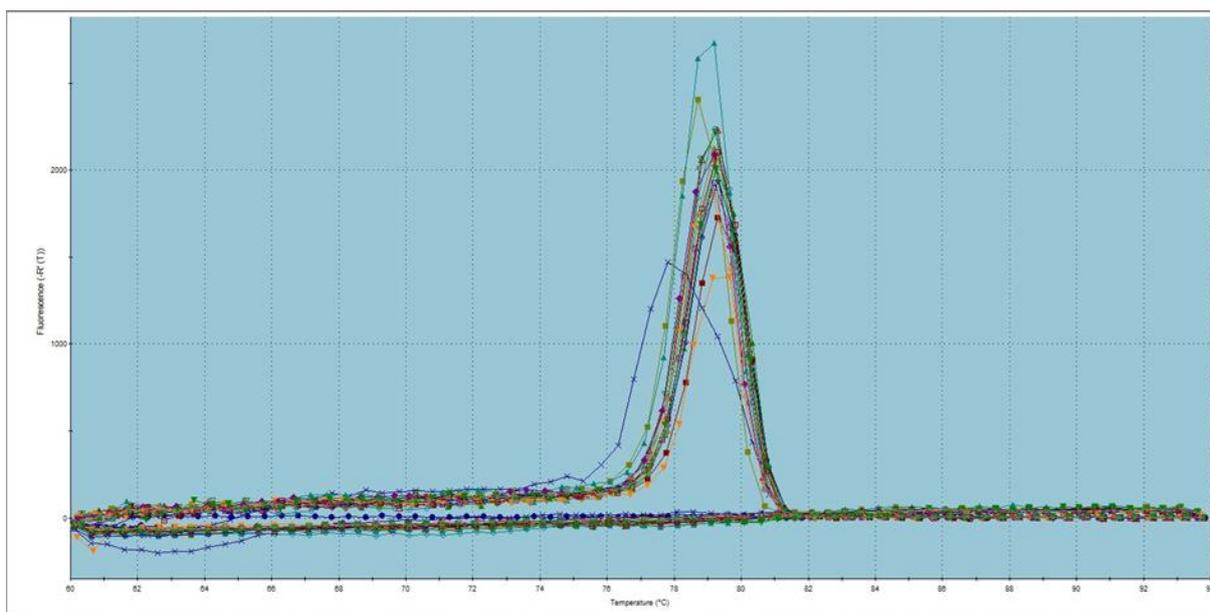


Abbildung 18: Schmelzkurven einer Verdünnungsreihe einer Probe zum Nachweis von *I. multifiliis*.

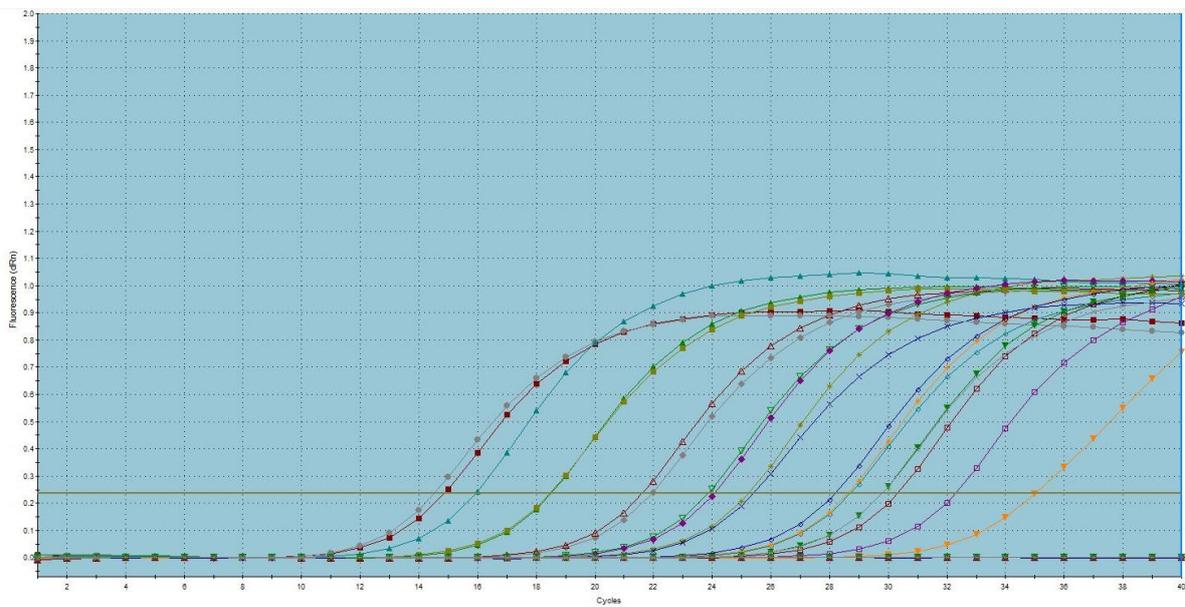


Abbildung 19: Amplifikationskurven der Messungen von Proben mit unterschiedlichen DNA-Gehalten von *I. multifiliis*.

4.1.2.2 Etablierung des Nachweises von *I. multifiliis* DNA per qPCR-in Teichwasserproben

Der Nachweis von DNA von *I. multifiliis* aus Teichwasserproben konnte mittels der getesteten qPCR erbracht werden. Dabei korrelierten die zuvor mikroskopisch semiquantitativ bestimmten Gehalte von *I. multifiliis* auf der Haut von Fischen mit den mittels PCR bestimmten Gehalten der DNA des Erregers aus dem Wasser (Abbildung 20). bei Nachweis ab $\times 10^4$ DNA-Kopien von *I. multifiliis* eine ggr.-mgr. Infektion der Fische vorliegt. Die Methode konnte daraufhin in den Versuchen eingesetzt werden.

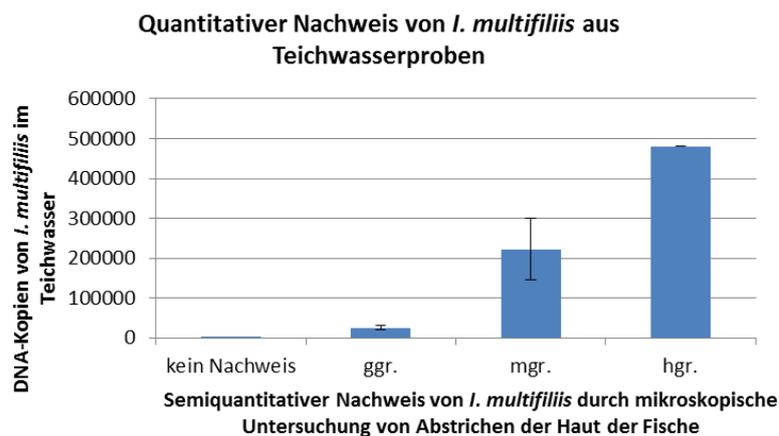


Abbildung 20: Quantitativer Nachweis von *I. multifiliis* DNA aus Teichwasserproben.

4.1.3 Filtration von Entwicklungsstadien von *I. multifiliis* aus dem Haltungswasser von Fischen (TiHo Fische, IFI)

4.1.3.1 Ultrafiltration (Porengröße 0,03-0,1 μ m) (TiHo Fische, IFI)

a) Versuche mit Brütlingen (TiHo Fische):

Während des gesamten Versuchszeitraums nahm sowohl bei den Fischen aus den Becken, an die die Ultrafiltrationsanlage angeschlossen war, als auch bei den Fischen aus der Kontrollgruppe, die Anzahl an *I. multifiliis* kontinuierlich ab. Die Reduktion der Parasiten war insgesamt in der Fischgruppe, deren Wasser durch die Ultrafiltrationsanlage geleitet wurde, etwas schneller und sieben Tage nach Versuchsstart wiesen diese Fische einen signifikant niedrigeren Befall mit *I. multifiliis* im Vergleich zu den Fischen aus der Kontrollgruppe auf. Ab Tag 11 nach Versuchsstart konnten keine Stadien von *I. multifiliis* mehr auf den Fischen der Filtrationsgruppe nachgewiesen werden und ab Tag 13 konnten auch keine Parasitenstadien mehr auf den Fischen der Kontrollgruppe gefunden werden (Abbildung 21).

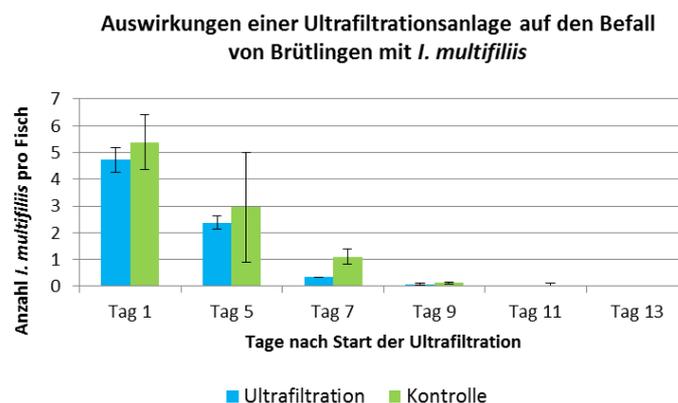


Abbildung 21: Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Brütlingen mit *I. multifiliis*.

b) Versuche mit Setzlingen (TiHo Fische):

Während des gesamten Versuchszeitraums nahm, ähnlich wie im Versuch mit Brütlingen, sowohl bei den Fischen aus den Becken, an die die Ultrafiltrationsanlage angeschlossen war, als auch bei den Fischen aus der Kontrollgruppe, die Anzahl an *I. multifiliis* kontinuierlich ab. Die Reduktion der Parasiten war tendenziell in der Kontrollgruppe, deren Wasser nicht durch die Ultrafiltrationsanlage geleitet wurde, schneller. Aufgrund der starken Schwankungen der Befallsintensitäten der individuellen Tiere zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Der achte Tag nach Versuchsstart war der letzte Zeitpunkt, zu dem noch Stadien von *I. multifiliis* auf den Fischen beider Gruppen nachgewiesen werden konnten. Zu den Zeitpunkten der weiteren Probenahmen wurden keine Parasiten mehr gefunden (Abbildung 22).

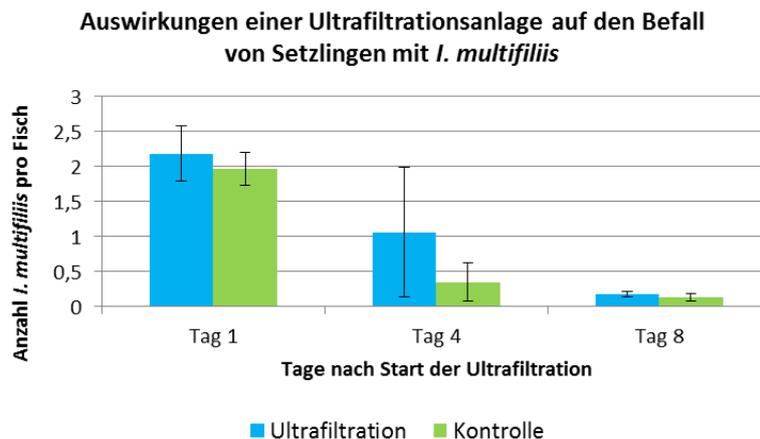


Abbildung 22: Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Setzlingen mit *I. multifiliis*.

c) Versuche mit Speisefischanwärttern (TiHo Fische, gemeinsam mit IFI):

Versuch am IFI: Die erste Auswertung des ersten Versuchs am IFI ergab, dass alle beprobten Fische mit *I. multifiliis* infiziert waren. Aufgrund der stark abnehmenden Filtrationsleistung der Ultrafiltrationsanlage wurde der Versuch bereits nach einem Tag vorzeitig beendet. Aufgrund dieser kurzen Laufzeit der Ultrafiltrations-Versuchsanlage war keine sinnvolle Auswertung der Reinfektion der Fische möglich. Um den Versuchsfischen unnötigen Stress zu ersparen, wurde daher auf ein Auszählen von *I. multifiliis* auf den Fischen verzichtet.

Versuch an der TiHo: Während des gesamten Versuchszeitraums nahm, ähnlich wie in den beiden vorausgegangenen Versuchen, sowohl bei den Fischen aus den Becken, an die die Ultrafiltrationsanlage angeschlossen war, als auch bei den Fischen aus der Kontrollgruppe, die Anzahl an *I. multifiliis* kontinuierlich ab. Es zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 23).

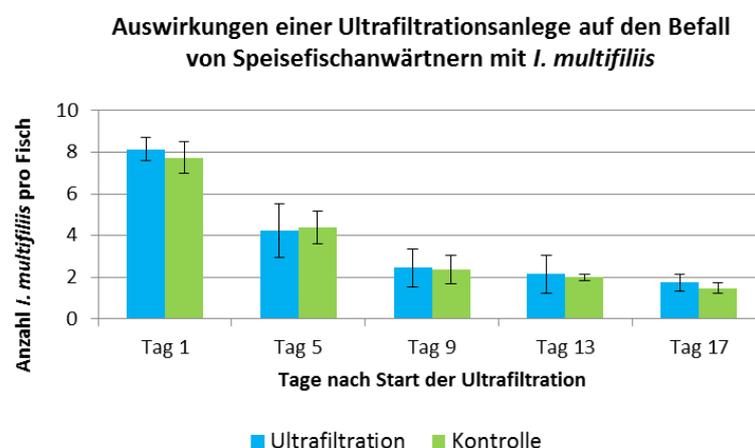


Abbildung 23: Auswirkungen einer Ultrafiltrationsanlage auf den Befall von Speisefischanwärttern mit *I. multifiliis*.

4.1.3.2 Filtration über einen Trommelfilter (TiHo Fische)

Neun Tage nach Versuchsstart waren nur bei vereinzelt untersuchten Fischen Entwicklungsstadien von *I. multifiliis* in der Haut nachzuweisen. Ein Unterschied in der Befallsintensität der Fische, deren Wasser über den Trommelfilter filtriert wurde, und den Fischen der Kontrollgruppe bestand nach Auswertung der Daten der mikroskopischen Zählungen weder für den Befall der Haut noch für den Befall der Kiemen. Siebzehn Tage nach Versuchsstart waren insgesamt in beiden Gruppen und auf Haut und Kiemen deutlich höhere Befallsintensitäten von *I. multifiliis* mikroskopisch zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt waren mikroskopisch auf der Haut der Fische, an deren Becken der Trommelfilter angeschlossen war, signifikant mehr Stadien von *I. multifiliis* nachzuweisen. Die Befallsstärke der Kiemenproben unterschied sich dagegen nicht zwischen den beiden Gruppen nach mikroskopischer Beurteilung. Die PCR-Untersuchungen zeigten vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 25).

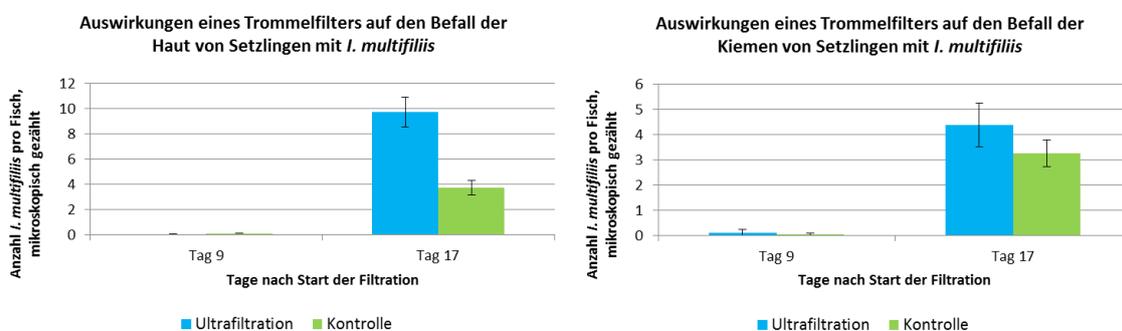


Abbildung 24: Auswirkungen eines Trommelfilters auf den Befall der Haut (links) und der Kiemen (rechts) von Setzlingen mit *I. multifiliis*.

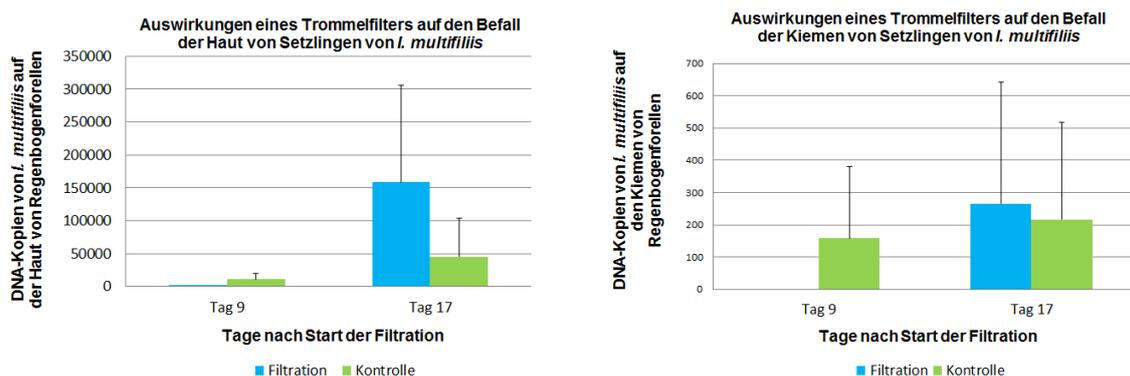


Abbildung 25: Auswirkungen eines Trommelfilters auf den Befall der Haut (links) und der Kiemen (rechts) von Setzlingen mit *I. multifiliis*. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen.

4.1.4 Versuche zur Transmissionsunterbrechung (KuL, IFI)

4.1.4.1 Auslösung Mucocystensekretion (KuL)

Ein erstes Screening möglicher Stimuli für die Entleerung der Mucocysten konnte erst nach Entwicklung eines speziellen Bioassays durchgeführt werden. Neben der Exposition und Inkubation

von Theronten mit Substanzen direkt in wässrigen Lösungen wurden parallel OT verwendet, die mit BG 3 beschichtet waren, um den Theronten zusätzlich ein Festheftesignal zu geben. Nach Zugabe von Substrat und 15 min Inkubation wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop je mindestens 10 beliebig ausgewählte Theronten auf sichtbare Extrusion von Mucocystensekret hin ausgewertet. Dabei konnte klar zwischen durch hypoosmotisches Medium austretendem Zellinhalt und dem Abgeben des Sekrets unterschieden werden (Abbildung 26).

Als neben Alcianblau hochwirksames Substrat bei Applikation in Wasser erwies sich Karpfenserum (Tabelle. 7). Für die Wirkung war augenscheinlich kein zusätzlich vorhandener Festheftestimulus nötig. Die Wirksamkeit durch echte Stimulation konnte auch durch Überprüfung mit Fischringer und einer isoosmotischen Mannitol-Lösung bestätigt werden, welche keine Reaktionen auslösten. Hinzu zeigte sich eine Auslösung durch Karpfenmucus, jedoch nur in Kombination mit BG. Ein darauf folgender Test von verschieden behandeltem Karpfenserum belegte zudem, dass die Wirkung durch Hitzeinaktivierung weitgehend verloren geht. Volle Wirksamkeit brachte die Serumzugabe nur als unverdünntes Substrat. Bei stärkerer Verdünnung waren deutlich weniger Reaktionen zu beobachten. Die Aktivität war klar auf die großmolekulare Fraktion beschränkt, da Serum < 3 kDa gegenüber gleichbehandeltem, nicht fraktioniertem Isolat keinerlei Effekt zeigte. Somit zeichnen sich für die Aktivierung der Mucocystenentleerung weder die das Nahsuchverhalten auslösenden Substanzen im Gemisch MX, noch Gewebekomponenten verantwortlich, sondern höhermolekulare (Glyko-)Peptide oder Proteinstrukturen aus Serum und Mucus, wobei letztere das Vorhandensein von Festheftesignalen benötigen (welche in Serum vermutlich mit enthalten sind).

Tabelle 7: Anzahl an Theronten mit sichtbarer Entleerung der Mucocysten (+) und nicht reagierender Individuen (-) nach Inkubation mit Testsubstraten auf OT

Substrat	Wasser		BG	
	+	-	+	-
Muskelhomogenisat	1	10	1	10
MX 20 mg/ml < 3 kDa	0	10	1	10
MX 10 mg/ml	0	10	0	10
Fischmehlextrakt 50 mg/ml	0	10	0	10
Fischöl 10 µl/ml VE	0	10	7	5
Karpfenserum	10	0	9	1
Inosin-Arginin	0	10	5	5
L-Arginin 1 mg/ml	0	10	3	8
Karpfen-Mucushomogenisat	0	10	10	3
Saibling-Mucushomogenisat	0	10	2	9
Niclosamid 0,1 mg/ml	2	9	0	10
Alcianblau	7	3	6	4
Kontrolle (Wasser)	0	10	0	10

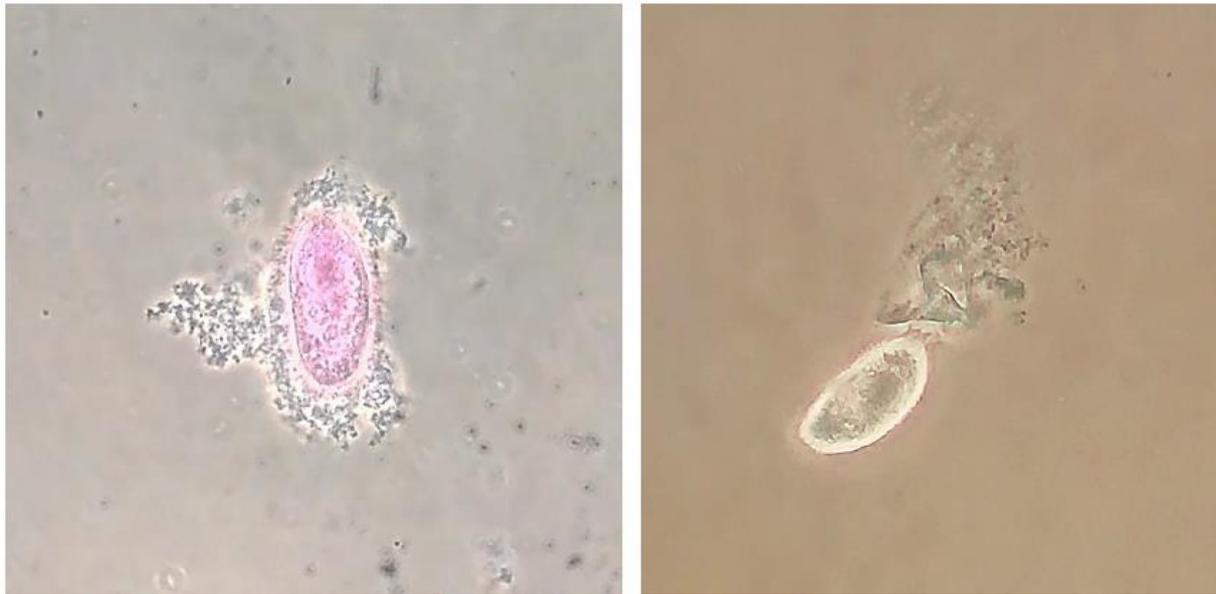


Abbildung 26: Phasenkontrast-Aufnahmen von Theronten nach hyperosmotischer Desintegration (links) und nach aktiver Entleerung der Mucocysten (rechts).

4.1.4.2 Auslösung Nahsuchverhalten (KuL)

Nach einem Screening von über 20 Substraten um das Nahsuchverhalten der Theronten auszulösen, konnte schließlich ein aus mehreren Komponenten bestehender Nahrungsmittel-Zusatzstoff natürlichen Ursprungs (Substrat MX) identifiziert werden. Dieses Gemisch ist leicht wasserlöslich und konnte schon bei Zugabe geringer Mengen sofort langanhaltendes burst-, schnelles vorwärts- und wobbling-Schwimmen (siehe Haas et al. 1999) auslösen. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass BG 3-Extrakt (wenn hoch genug konzentriert) und ein weiteres Nahrungsmittelzusatzgemisch (MY) eine ähnlich starke Nahsuch-Aktivierung auslöst wie MX. Somit war klar, dass sich das Nahsuchverhalten mit einfachen Mitteln unter Anwendung natürlicher Agenzien auslösen lässt. Durch Fraktionierung konnte schnell belegt werden, dass die kleinmolekulare Fraktion < 3 kDa die aktivierende Wirkung enthielt. Getestet wurden daraufhin in mehreren Testserien u.a. 30 verschiedene in MX enthaltene niedermolekulare Komponenten (Reinsubstanzen, K) mit einer ordinalen Aktivitätsbewertung (score) von 0-3 (0 = keine Aktivierung, 3 = > 90 % aktiviert). Diese wurden stets im Vergleich mit bekanntermaßen wirksamen Substraten angeboten. Dabei konnten die Moleküle K5 und K6 als die stimulierenden Substanzen identifiziert werden (Abbildung. 27).

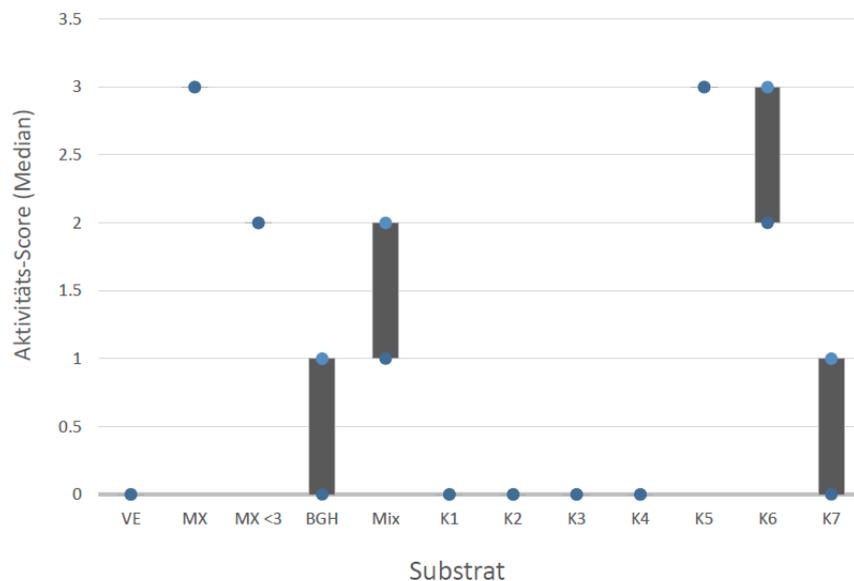


Abbildung 27: Box-Whisker-Auftragung des visuellen Aktivitäts-Scoring (Median) von Theronten in einer Testserie ($N = 3$ pro Ansatz) nach Zugabe von Substanzen zur Auslösung des Nahrungsverhaltens. VE = Kontrolle (Wasser), MX = aktivierendes Substratgemisch, BGH = Biogel-Homogenisat, Mix = Gemisch aus Reinsubstanzen (K1-30), K1-7 = verschiedene Reinsubstanzen. Scores: 0 = keine Aktivierung, 3 = > 90 % aktiviert.

Zur besseren Einschätzung der benötigten Stoffkonzentrationen wurden ausgehend von 1 mg/ml Verdünnungsreihen der Stoffe K5 und K6 in 24 Well-Platten getestet (1,0 ml Theronten-Lösung, Zugabevolumen 50 μ l). Bei unverdünnter Gabe gingen die Theronten zu großen Teilen vom freien Schwimmen in Festhefte- und Kriechverhalten an den Wellrändern und -böden über. K5 war wirksam bis zu einer Verdünnung von 1:80, K6 konnte dagegen nur bis 1:40 verdünnt werden ohne an Wirksamkeit zu verlieren. Im größeren Volumen (6 Well-Platte, 10 ml Th-Lösung + 450 μ l Testlösung) waren die noch wirksamen Konzentrationen geringer und es kam zu einem verzögerten Einsetzen der Aktivierung. Eine weiterer, replizierter Ansatz sollte die Aktivierung von K5 und K6 bis zu einer Verdünnung von 1:100 (ausgehend von 1 mg/ml im Testsubstrat) auch in Kombination beider Substanzen näher beleuchten (Zugabe 1/20 vol.). Hierbei zeigte sich abermals, dass K6 bereits bei einer verdünnten Gabe von 1:10 deutlich an Wirksamkeit einbüßte, während K5 bis 1:100 hochwirksam blieb (Abbildung 28). Beide Substanzen 1:1 gemischt waren bis zu einer Verdünnung von 1:50 wirksam, ein Kombinationseffekt konnte demnach nicht beobachtet werden. Dies bedeutet, dass eine Menge von 1 g von K5 und K6 zu gleichen Teilen für 1000 L Wasser zur Aktivierung des Nahrungsverhaltens von Theronten ausreichend ist. Die Reaktionen nach 1 h Inkubation verdeutlichten, dass die Aktivierung nach dieser Zeit zwar abnimmt, aber selbst bei einer Verdünnung von 1:100 noch deutlich detektierbar ist (Abbildung 28).

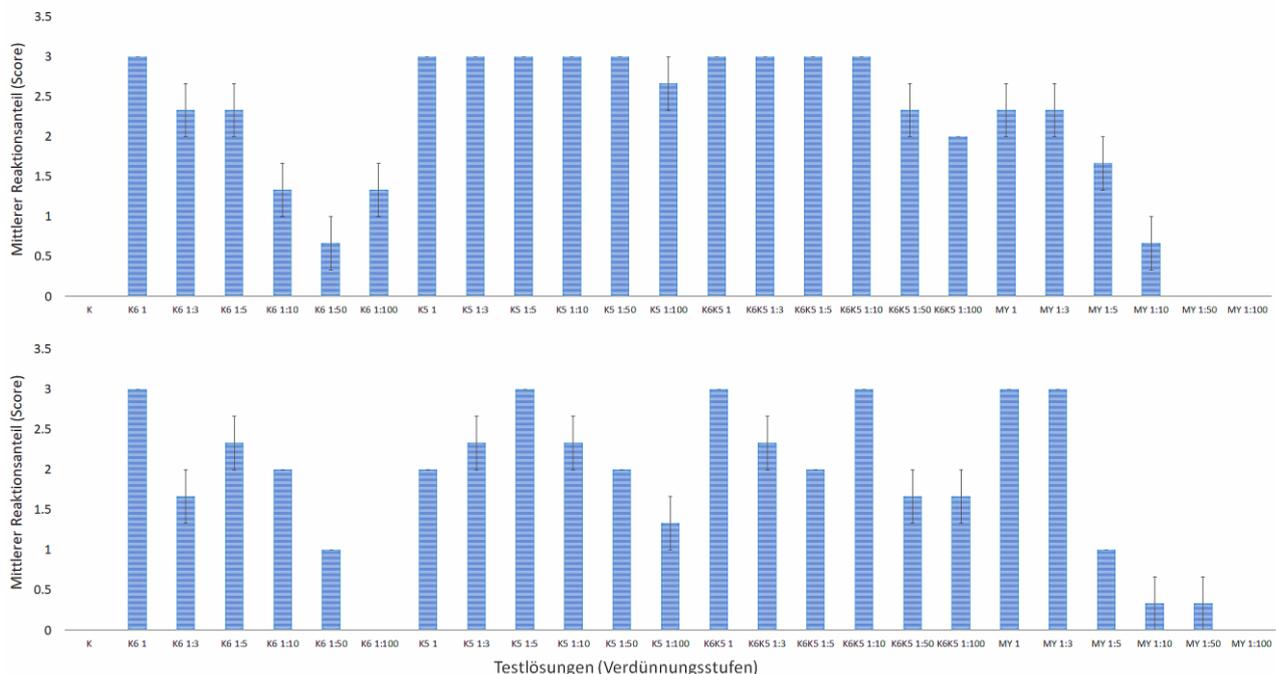


Abbildung 28: Auftragung der mittleren Aktivierungs-Scores von Reinsubstanzen-Verdünnungen nach Zugabe von 50 µl Testlösung zu 1 ml Theronten-Lösung unmittelbar nach Zugabe (oben) und nach 1 h Inkubation (unten) ($N = 3$ pro Ansatz). K = Kontrolle (Wasser), MY = aktivierendes Substratgemisch, K5,6 = Reinsubstanzen. Scores: 0 = keine Aktivierung, 3 = > 90 % aktiviert.

4.1.4.3 Wirtsreaktion Theronten – Attachment & Verbleiben (Kul)

a) Attachment-Substrate

Das Festheften (Attachment) ist die erste Reaktion der Theronten um mit einem Wirt Kontakt herzustellen, woraufhin diese nicht wieder ins freie Schwimmen übergehen, sondern verbleiben. Vermittelt wird dies vermutlich durch chemische und physikalische Reize. Diese Reaktion ist angesichts des fehlenden Suchschwimmverhaltens die einzige Möglichkeit, um die Schwärmer zu akkumulieren, was wiederum zur Transmissionsunterbrechung nutzbar wäre. Um eine geeignete Matrix bzw. Oberfläche für die Theronten-Anheftung zu finden, welche für diese einen potentiellen Wirtsfisch nachahmt, wurden verschiedene Substrate getestet, die es erlauben, in diese chemische Substanzen einzubringen und die den Anforderungen einer Mukus- bzw. Epidermis-ähnlichen Oberfläche erfüllt. Das zuerst getestete anorganische Hydrogel zeigte nach Quellen in diversen Testsubstraten (u.a. Serum, Mukus, Fischmehlextrakt) und anschließende Exposition in Wasser eine sehr schnelle Abgabe der zuvor aufgenommenen Lösungen. Die Oberfläche war für Theronten augenscheinlich nicht attraktiv, zudem nahm dessen gequollene Größe nach Inkubation in Wasser schnell ab. Je höher der osmotische Wert der zugesetzten Lösung, desto schneller wurde sie abgegeben und das Hydrogel-Partikel schrumpfte stark zusammen und begann sich aufzulösen. Damit war es weder als slow releasing-Matrix noch als Substrat zur Untersuchung der Attachment-Reaktion geeignet. Zum Test der BG-Substrate wurden zur direkten Quantifizierung der Theronten an Oberflächen (Test vs. Kontrolle) den Medien je zwei Standard BG-Pellets (15 µl vol., zylindrisch) pro Well (24 Well-Platten) zugegeben (Doppelpellet-Assay). Teils wurde zur Herstellung möglichst gewebeähnlicher Verhältnisse Fischringer als Grundmedium verwendet. Versuche mit BG 1, mit und ohne Zugabe von Testsubstraten,

zeigten bei fehlendem Festheften und Verbleiben nach Fixierung der Pellets im Mittel bei 5-7 Replikationen stets eine Gleichverteilung einiger spontan angehefteter Theronten. Als unattraktive Testsubstrate erwiesen sich Fischöl, Fischmehlextrakt und unerwarteter Weise alle Fischmukushomogenisate. Letztere zeigten, wie auch Fischmehlextrakt, sogar einen Repellent-Effekt auf die Theronten, da geringere Attachmentraten als an den Kontrollpellets ermittelt wurden. Als attraktives Fischsubstrat, eingebracht in BG 1, erwies sich einzig inaktiviertes Karpfenserum mit etwas erhöhten Festhefteraten. Bei einer Testserie von weiteren Biogelen (BG 3 und BG 4) zeigte sich überraschend eine enorme Wirksamkeit von BG 3 ohne jegliche Zusätze (Abbildung 29). In 6 Replikationen im Doppelpellet-Versuch waren an BG 3 in Summe 1784 Theronten angeheftet und verblieben, an BG 1 lediglich 32 ($P < 0,00001$). Daher erfolgten Tests mit weiteren Biogelen (BG 2 und BG 5) in Reinform, wobei nur BG 2 im Pellet-Assay eine signifikante Attachment-Attraktivität aufwies (P BG 2 vs. BG 1/ BG 4/BG 6 $< 0,05$; Abbildung 30). BG 3 erzeugte auch hierbei eine signifikant höhere Attachmentrate als alle anderen BG-Substrate ($P < 0,05$).

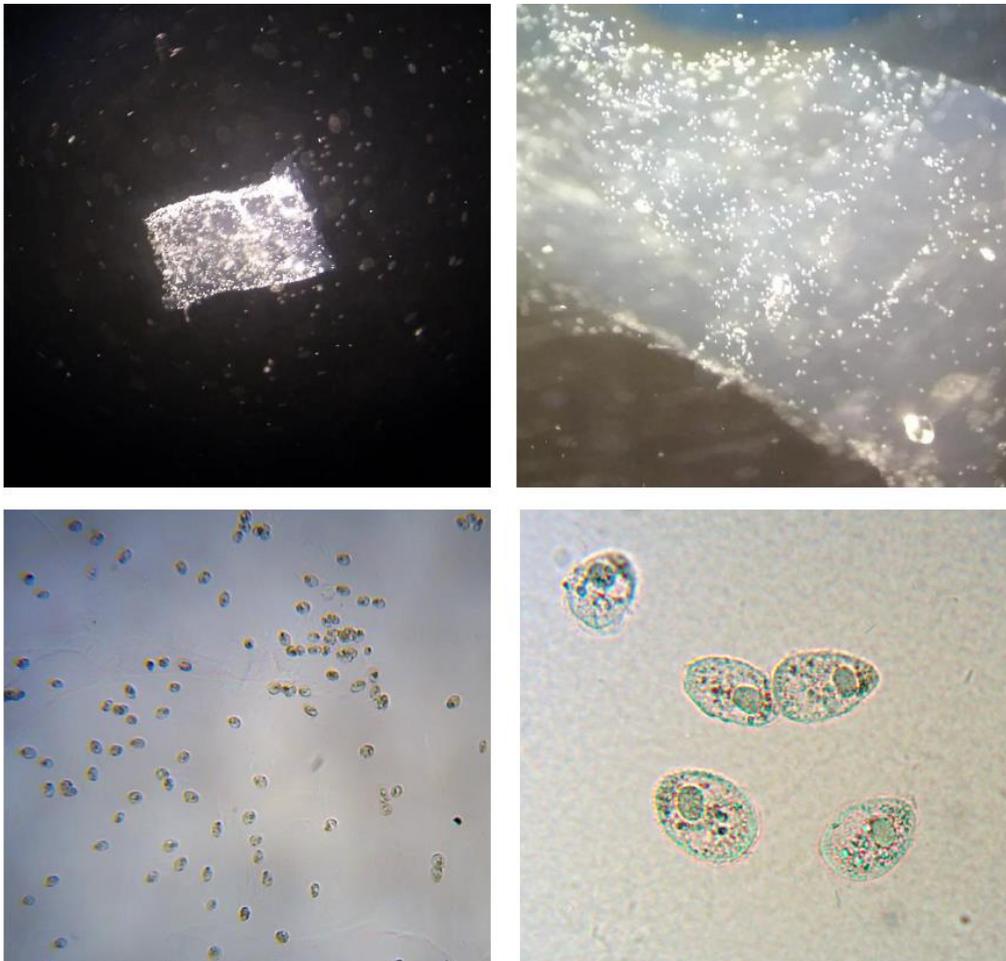


Abbildung 29: Zahlreiche an BG 3-Pellet angeheftete Theronten (oben) sowie in einer mikroskopischen Auswertung der Pellets (unten).

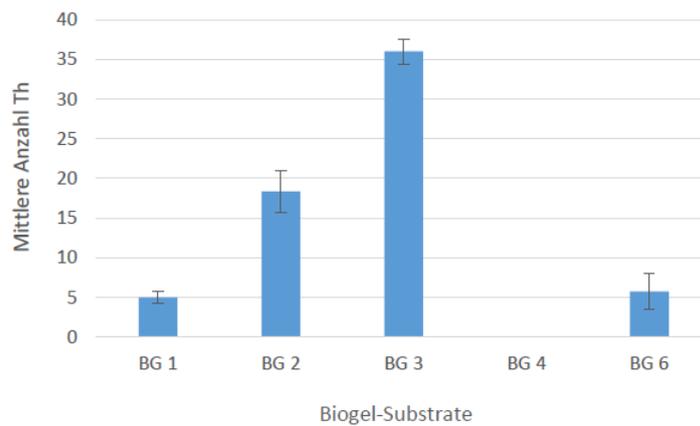


Abbildung 30: Anzahl festgehefteter Theronten an Pellets aus verschiedenen BG-Substraten ($N = 6$).

Da beobachtet werden konnte, dass die Theronten nach unterschiedlicher Zeit das attraktive BG 3-Substrat wieder verlassen, wurde durch gestaffelte Entnahme von Pellets die zeitliche Dynamik der Attachmentreaktion gezielter beleuchtet. Ein über 22 h laufender Ansatz bei 15°C machte deutlich, dass nach einem Anstieg bis zu 2 h nach BG-Zugabe, die Menge adhärierter Theronten bis 7 h p.e. abfällt und bis über 22 h konstant niedrig bleibt (Abbildung 31). Zum Vergleich wurde in einem weiteren Ansatz bei 21°C ein kleinerer Zeitraum mit kürzer aufeinanderfolgender Beprobung gewählt. Zudem wurde als Vergleichssubstrat BG 1 verwendet, um die Rate an spontanen Festheftern besser einschätzen zu können. Bei diesem Ansatz stieg der prozentuelle Anteil der Theronten am Pellet bis 40 min p.e., um nach 180 min auf das Niveau des Kontrollsubstrats abzufallen (Abbildung 32).

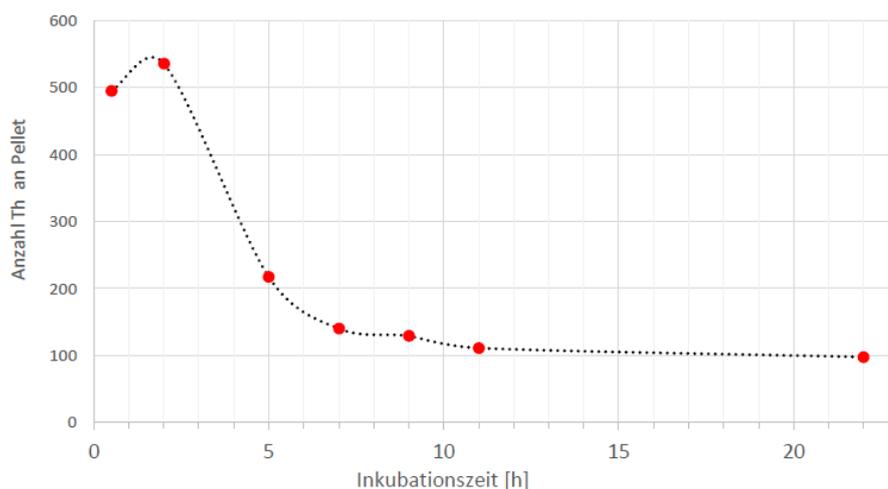


Abbildung 31: Anzahl von Theronten an BG 3-Pellets nach verschiedenen Inkubationszeiten p.e. (600 Theronten/Well).

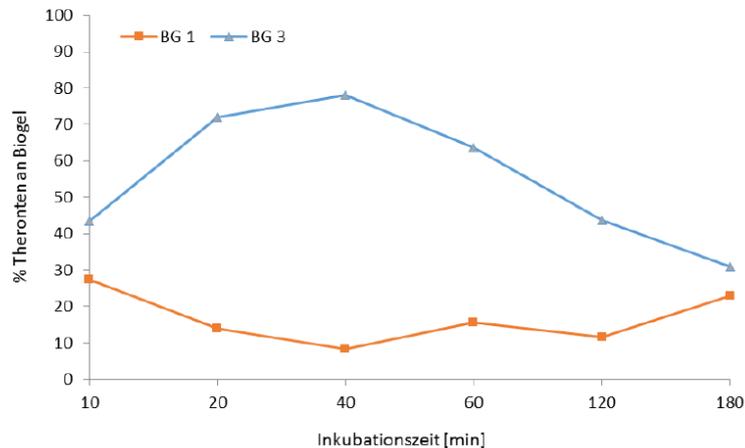


Abbildung 32: Anteil (%) von Theronten an BG 1 und BG 3-Pellets nach verschiedenen Inkubationszeiten p.e. (300 Theronten/Well).

Weitere Ergebnisse zu Eigenschaften und Verwendung von BG, insbesondere BG 3, werden ohne zusätzliche Angabe zur genauen Versuchsdurchführung im Folgenden kurz geschildert. Die Versuche zeigten, dass nur ganz bestimmte BG-Substrate attraktiv waren. Dies ist bemerkenswert, zumal es sich teils um nahezu dieselben Substanzen aus denselben Rohstoffen handelt. Die wirksamen BG konnten (in Wells) auch als Schichten aufgetragen werden, was nach 45 min Attachmentraten von über 90 % erbrachte. Inkubiert über Nacht waren ca. 80 % der Theronten vital, jedoch keine mehr am BG. Das Verlassen des attraktiven BG-Substrats geschah nach unterschiedlichen Zeiträumen zwischen 1 und 8 h. In diesem Zusammenhang wurden aufwändige Testreihen durchgeführt, um den nach einiger Zeit eintretenden Wirksamkeitsverlust zu verstehen.

Die Vorinkubation des wirksamen BG 3 für 2 h in Wasser senkte die Attraktivität für Verbleiben der Theronten ab auf ca. 20 % verglichen mit nicht vorinkubiertem Substrat. Dies deutet darauf hin, dass die Oberflächenstimuli hydrophiler Natur sind. Angesetzt mit isoosmotischem Medium war die Attraktivität, auch wenn nicht in Wasser vorinkubiert, signifikant geringer als bei Ansatz mit VE-Medium. Angeboten in zuvor mit Fischen besetztem filtriertem Wasser zeigen die Theronten deutlich geringere Attachmentraten im Vergleich zu sauberem Leitungswasser. Die Optimierung der BG-Viskosität zur Standardisierung der Ansätze zur Fallenentwicklung erfolgte durch einige volumetrische Konzentrationsreihen und Tests mit Theronten. Somit stand für die weiteren Untersuchungen in Form von BG 3 ein bereits per se hochwirksames Festheftesubstrat zur Verfügung.

b) Attachment-Stimuli

Im Folgenden wurde ermittelt, welcher Natur der Festhefte-Stimulus in BG ist und ob die Wirksamkeit noch weiter erhöht bzw. deren Dauer verlängert werden kann. Per Pellet-Assay wurde getestet, welche Substrate, insbesondere solche von Fischen, in der Lage sind die Attraktivität von BG 3 in Form der Attachment- bzw. Verbleiberate noch zu steigern. Zwei replizierte Ansätze (je $N = 3$, 6794 Individuen ausgewertet) zeigten erneut eine klare Repellent-Wirkung beim Anbieten von Forellenumukushomogenat. Widersprüchliche Resultate ergaben sich beim Hinzufügen von Fischserum (Forelle, Karpfen) zu BG 3, welches die Attraktivität entweder steigerte oder verminderte. Daher wurde ein weiterer vergleichender Versuch u.a. mit frisch gewonnenem Serum von Regenbogenforellen (inaktiviert) durchgeführt. BG mit Mukus war wiederholt repellent, die Zugaben von Serum und MX

konnten im Mittel eine leichte Anhebung der Attachmentrate bewirken (Abbildung 33). Bis auf BG 3 mit Mukus waren alle Substrate signifikant von BG 1 verschieden ($P < 0,05$). Weitere Testreihen ergaben ebenfalls keine oder nur geringe Erhöhung der Attachmentraten durch Fischserum.

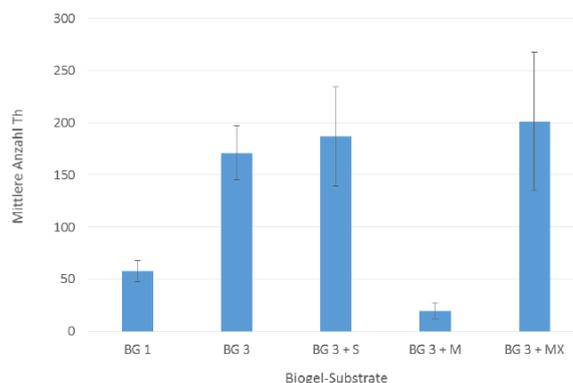


Abbildung 33: Festgeheftete Theronten an verschiedenen BG-Substraten unter Zugabe von Substraten zur Attraktivitätssteigerung ($N = 4$). S = Serum (Forelle), M = Mukushomogenisat, MX = aktivierendes Substratgemisch.

Das Zusetzen des Nahsuchaktivator-Substrates MX zeigte tendenziell eine steigernde Wirkung und wurde im Folgenden für eine Wirksamkeitssteigerung getestet. Dies konnte in mehreren Ansätzen bestätigt werden (Beispiel Abbildung 34). Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass bei einigen Tests in kleineren Volumina, die MX-Zugabe, durch dessen Diffusion aus dem BG, kurz nach Zusetzen zu den Theronten, deutlich niedrigere Attachmentraten erzeugte (Abbildung 34), und das Anheften zudem verzögerte. Dies geschah augenscheinlich, da nun um die Matrix das sichtbar einsetzende Nahsuchverhalten die Theronten teils nicht mehr auf der BG-Oberfläche verbleiben ließ. Hinzupipettiertes MX senkte die Attachmentrate an BG 3 deutlich. Dies deutet auf geringere Attraktivität von Stimuli tragenden Oberflächen hin, sobald die Konzentration der Stimuli im Medium zunimmt. Dieser Effekt spielt bei der direkten Anwendung von Aktivierungskomponenten im Wasser (Substratdispersion) sicher eine entscheidende Rolle.

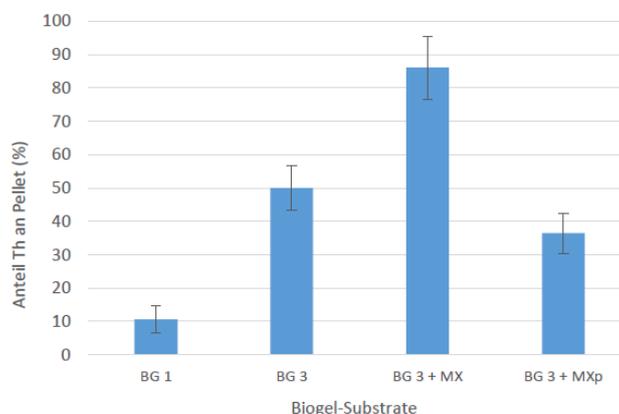


Abbildung 34: Anteil festgehefteter Theronten (%) an verschiedenen BG-Substraten unter Zugabe von Substraten zur Attraktivitätssteigerung ($N = 4$). MX = aktivierendes Substratgemisch, BG 3 + MX: zum Substrat gemischt, BG 3 + MX p = zu Theronten hinzu pipettiert.

Zudem erfolgten Versuche (Pellet-Assay) zur Erhöhung der Wirksamkeitsdauer von BG durch zusätzliche MX-Zugabe, wodurch die Zeit des Ausdiffundierens der attraktiven Komponenten durch längere Inkubation in Wasser kompensiert werden sollte. Hier dargestellt sind zwei Versuche, welche als Vorstufe für die Anwendung als Theronten-Fallen zu betrachten sind. Mit der OT-Methode wurde zunächst mit erhöhter Festigkeit angesetztes BG 3, aufgebracht als linsenförmige Schicht (20 µl), getestet. Nach Zugabe der Theronten Lösung wurden die Objektträger, teils nach Vorinkubation in filtriertem Aquarienwasser mit unterschiedlicher Dauer, schräg in 100 ml Bechergläser eingestellt. Hier zeigte sich, dass die Zugabe von MX (10 mg/ml) im Vergleich zu in Wasser vorinkubierten Ansätzen, sowohl nach 4,5 als auch nach 6,5 h eine Erhöhung der Wirksamkeit erzeugte, wenngleich diese nach 6,5 h im Mittel nur vergleichsweise gering ausfiel (Abbildung 35).

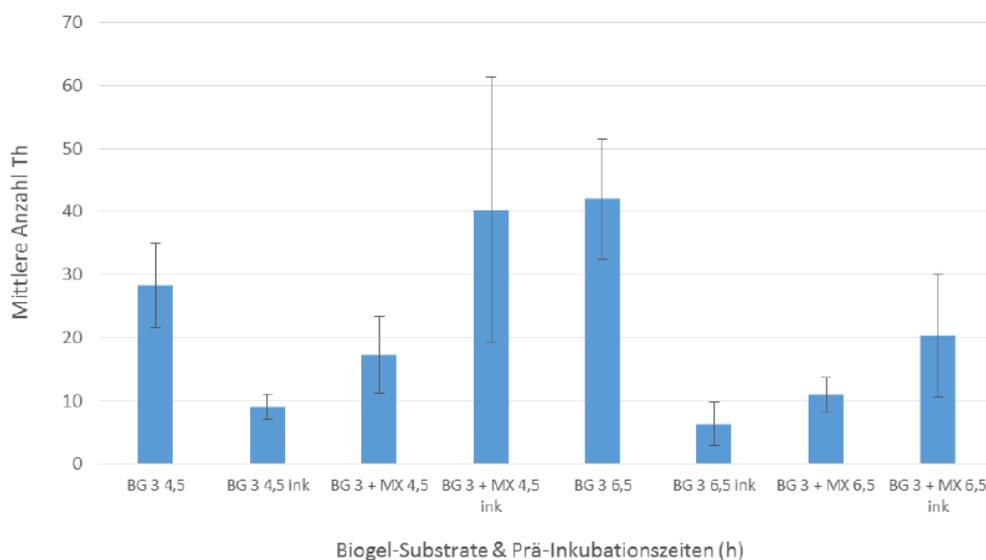


Abbildung 35: Anzahl festgehefteter Theronten an BG 3-Substrat auf OT nach unterschiedlicher Expositionsdauer, teils nach Vorinkubation und unter Zugabe von Substrat zur Attraktivitäts-Verlängerung ($N = 3-5$). MX = aktivierendes Substratgemisch, ink = vorinkubiert in Wasser.

In einem weiteren Pellet-Assay in 6-Well-Platten wurden Pellets ebenso in filtriertem Aquarienwasser über verschiedene Zeiträume vorinkubiert. Die Pellets wurden daraufhin in 1,5 ml neues Medium in 24 Well-Platten überführt und gleiche Mengen an Theronten für jeden Vorinkubations-Zeitpunkt hinzugegeben. Es konnte beobachtet werden, dass BG 2 in diesem Versuch zum Zeitpunkt 0 sogar höhere Attachmentraten erzielte als BG 3 (Abbildung 36). MX-Zugabe brachte zu Beginn keine Erhöhung der Attachmentrate im Vergleich zu nicht inkubierten BG 3-Pellets. Diese wurde jedoch nach 2 h Vorinkubation deutlich ($P = 0,09$) sichtbar und nach 6,5 h signifikant höher ($P = 0,03$). Auch nach Vorinkubation über Nacht waren die Anhefteraten an BG 3 und BG 2 mit MX-Zugabe um ein vielfaches höher als an den vorinkubierten Pellets ohne MX-Zugabe ($P = 0,06$ & $0,01$).

In Folge wurden Tests zur Identifikation des gesuchten Stimulus durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob MX neben dem Nahrungverhalten auch das Festheften und Verbleiben an unwirksamen Substraten auslösen kann. Hierzu wurde zunächst per Pellet-Assay MX direkt in Lösung (45 µl, 250 mg/ml) zu Wells mit BG 1- und BG 3-Pellets zugefügt. Allein hierdurch hefteten sich signifikant mehr

Theronten an BG 1 fest ($P < 0,05$), ein ebenso hoher Anteil der zugegebenen Theronten wie an BG 3 (Abbildung 37).

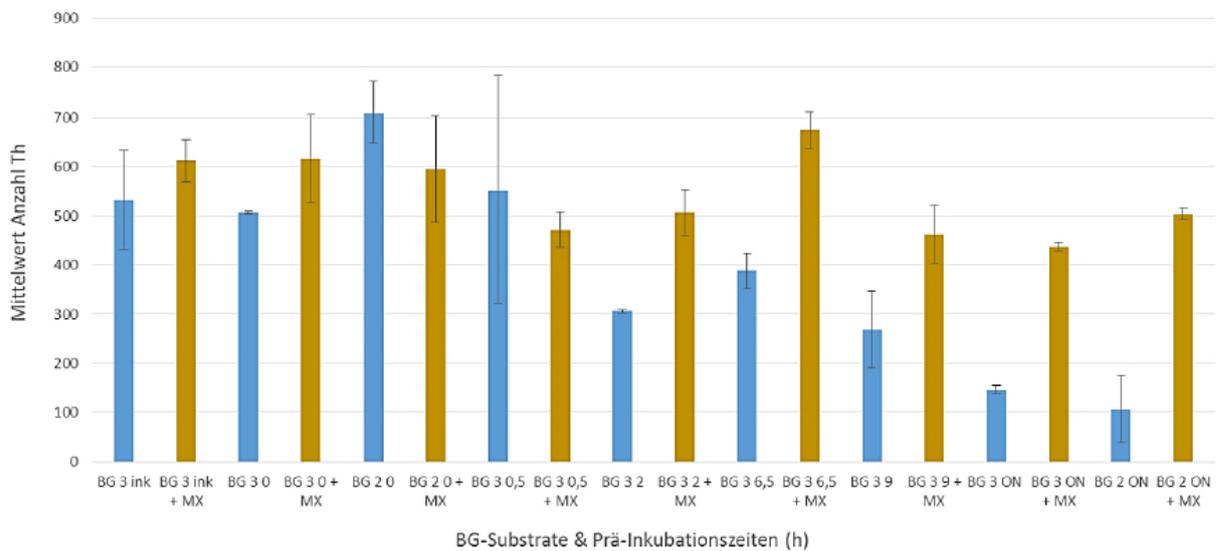


Abbildung 36: Anzahl festgehefter Theronten an zwei verschiedenen BG-Substraten nach 30 min Exposition, teils nach Vorinkubation und teils unter Zugabe von Substrat zur Attraktivitätsverlängerung ($N = 3-5$). MX = aktivierendes Substratgemisch, ink = vorinkubiert in Wasser, ON = über Nacht inkubiert.

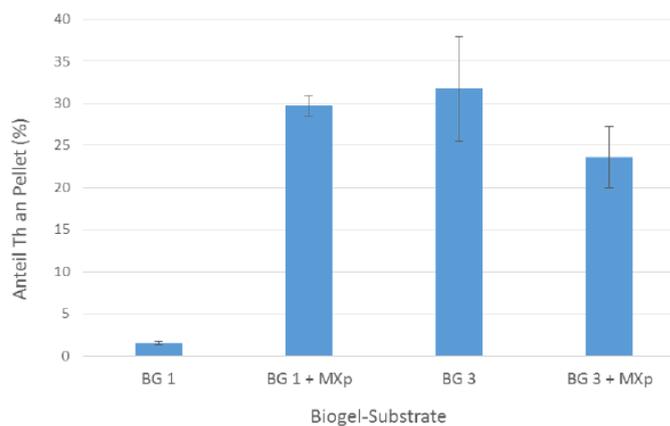


Abbildung 37: Anteil zugegebener Theronten an verschiedenen BG-Substrat-Pellets mit direkter Zugabe von MX-Lösung ($N = 4$). MX = aktivierendes Substratgemisch, p = zum Well hinzu pipettierte Lösung.

Ein weiterer Ansatz (Pellet-Assay) zeigte ebenfalls, dass BG 1 nach Zugabe von MX nach 20 min Inkubation ebenso viele Theronten (ca. 50 % von 250 Theronten pro Well) zum Festheften brachte wie BG 3. Die Zugabe von MX zum per se unwirksamen BG 1 und BG 4 erbrachte in einem weiteren Vergleichsversuch Attachmentraten von > 90 % der zugesetzten Theronten für bis zu 7 h. Die Zugabe

zweier zusätzlich eingebrachter Komponenten, die in BG 4 gegenüber BG 3 in denaturierter Form vorliegen, zeigte keine Attraktivität. Um dies zu bestätigen, wurde der Vergleich wirksamer und unwirksamer BG mit und ohne Zugabe von MX unter Verwendung einer längeren Inkubationszeit von 2 h wiederholt (Abbildung 38). Die Untersuchungen bestätigten, dass das Substanzgemisch MX, welches das Nahrungverhalten auslöst, ebenfalls den oder die Stimuli für die Attachmentreaktion enthält.

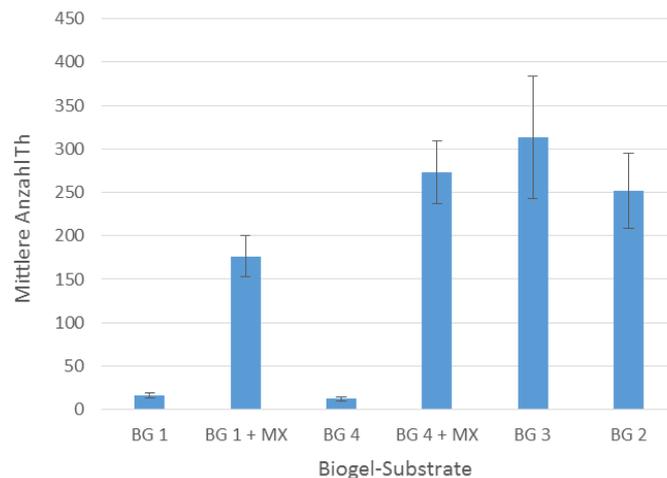


Abbildung 38: Anzahl Theronten an verschiedenen BG-Substrat-Pellets mit Zugabe von MX nach 2 h Inkubation ($N = 3$). MX = aktivierendes Substratgemisch.

Die Frage, ob die beteiligten Stimuli für Attachment und Nahrung-Aktivierung dieselben Substanzen sind, konnte nach Identifikation der wirksamen Substanzen für das Nahrungverhalten, K5 und K6, bearbeitet werden. Ein Mix beider Substanzen, eingebracht in BG 1, zeigte sich bereits im Vorversuch, dass es sich um dieselben Stimuli handelt. Ein Ansatz unter Verwendung des gänzlich unwirksamen BG 4-Substrates konnte dies bestätigen (Abbildung 39, P BG 4 + K6 vs. BG 4 $< 0,005$). Da die Attachmentrate an Pellets mit beiden Substanzen wesentlich niedriger ist als an BG 3, lässt dies vermuten, dass es in BG 3 weitere Stimuli gibt. Eine zusätzlich eingebrachte Komponente aus der gleichen Molekülgruppe wie K5 und K6 (K1) konnte dagegen keine Wirksamkeit erzeugen (P BG 4 + K1 vs. BG 4 + K6 $< 0,03$).

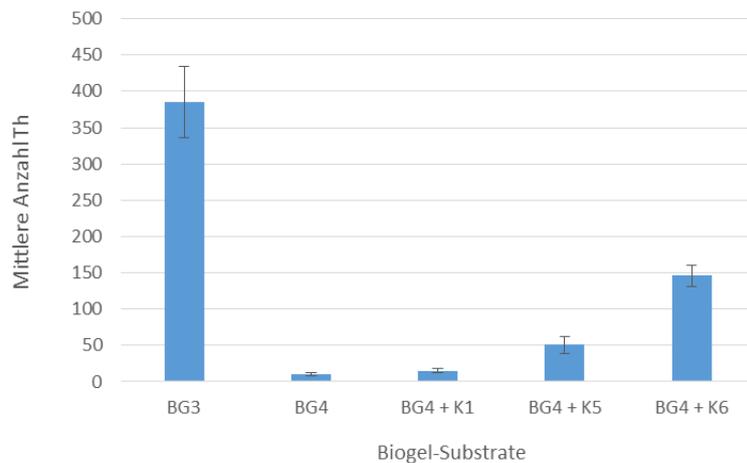


Abbildung 39: Anzahl Theronten an BG 3 und BG 4 -Pellets mit Zugabe von Reinsubstanz-Komponenten ($N = 6$).

4.1.4.4 Tests zur Überlebensrate von Theronten (KuL)

Die Auslösung des Nahrungsverhaltens durch Dispersion von Attraktantien sollte genutzt werden, um einerseits die Wirtserkennung der Theronten zu erschweren, andererseits durch die starke Motilitätsaktivierung die Lebensdauer der Schwärmer signifikant zu verringern. Hierzu wurden Expositionsversuche durchgeführt, die ein früheres Absterben der Theronten nach Zugabe der Wirkstoffe belegen sollten. Die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Theronten kann nach Formalinfixierung leicht anhand des Habitus erfolgen (siehe Material und Methoden). In einem Volumen von 5 ml wurden hierfür Theronten mit Lösungen aus MX (25 mg/ml) und Kontrollsubstraten inkubiert (je 150 μ l). Nach Inkubation wurde der Überstand fixiert und zur Auswertung eingeengt. Die Gabe von MX resultierte bei 20°C bereits nach 10 h in einer signifikant geringeren Überlebensrate ($P < 0,05$ vs. Kontrolle/Mannitol, Abbildung 40). Nach 22 h war diese signifikant ($P < 0,05$) geringer als in allen anderen Ansätzen. Innerhalb der Kontrollsubstrate (u.a. Mannitol und Arginin als Kontrollen mit erhöhter bzw. gleicher Osmolarität) war hinsichtlich der Zahl überlebender Theronten kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Theronten festzustellen.

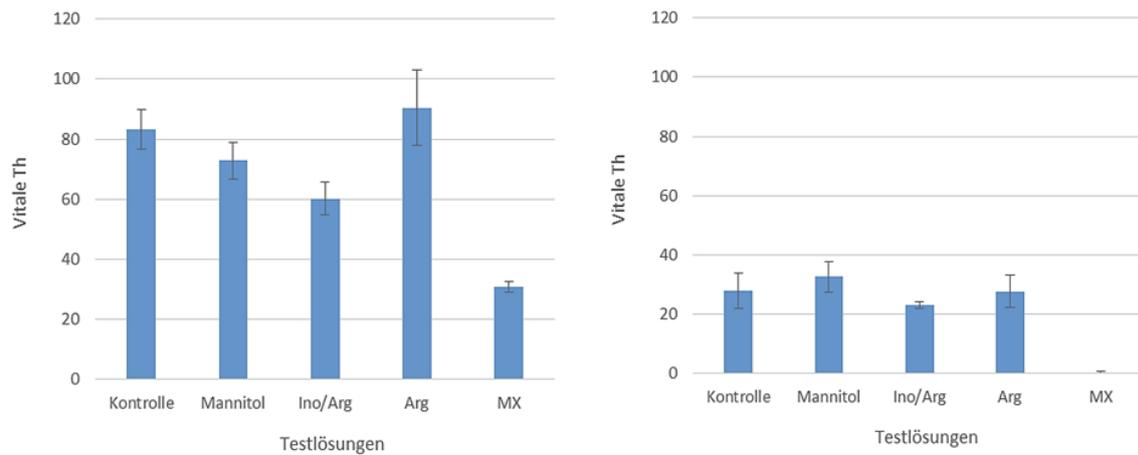


Abbildung 40: Anzahl lebender Theronten in 5 ml Volumen nach Inkubation über 10 (links) und 22 (rechts) h. Mannitol = 13 mosmol, Ino/Arg = Inosin-Arginin Salz 2 mg/ml, L-Arg = Arginin 1 mg/ml, MX = aktivierendes Substratgemisch.

Um das schnellere Absterben von aktivierten Theronten auch bei geringeren Temperaturen zu belegen wurde ein weiterer Versuch bei 12°C durchgeführt. Verwendet wurde hierbei ein Wasservolumen von 30 ml (gefiltertes Aquarienwasser) zu welchem je noch 25 ml Theronten-Medium gegeben wurden. Dazu erfolgte die Zugabe von 800 µl PenStrep (100x) in alle Ansätze, um Bakterienwachstum zu unterbinden. Zur Aktivierung wurden bei Versuchsstart 350 µl MX (25 mg/ml) hinzupipettiert. Nach 18 h waren im fixierten Überstand (60 ml) wie auch im abgesetzten 15 ml Bodenvolumen (ausgeschwenkt) bei Zugabe vom MX eine signifikant ($P < 0,05$) höhere Anzahl toter Theronten detektierbar (Abbildung 41).

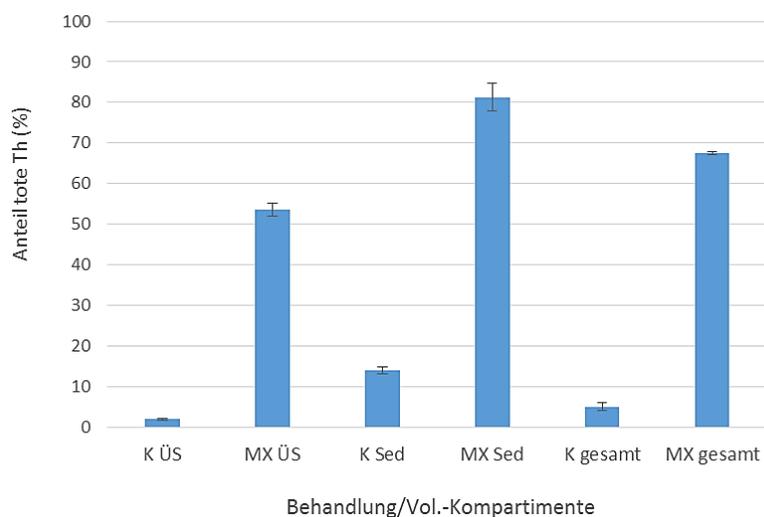


Abbildung 41: Anteil toter Theronten (%) nach Inkubation mit MX über 18 h bei 12°C in 75 ml Einheiten ($N = 3$). K = Kontrolle (keine Zugabe), ÜS = Überstand, Sed = Bodenvolumen, MX = aktivierendes Substratgemisch.

Ein weiterer Ansatz erfolgte unter gestaffelter MX-Zugabe, bei auf ein Drittel verringerter Gesamtdosis, in 6-Well Platten mit zu Expositionsbeginn bereits 1,5 Tage alten Theronten. Auch hierdurch konnte die Rate abgestorbener Theronten nach 7 h um 66 % signifikant ($P < 0,05$) erhöht werden. Ebenso unter 7-fach gestaffelter Zugabe während des Inkubationszeitraums wurde in 6-Well Platten (10 ml) zum Vergleich mit MX (10 mg/ml) die Reinsubstanzkomponente K6 (1 mg/ml) ebenfalls nach diesem Schema getestet. MX hatte in diesem kleineren Volumen bereits nach 9 h Exposition einen letalen Effekt auf nahezu alle Theronten (Abbildung 42). K6 konnte dagegen nur eine geringe Erhöhung des Anteils toter Theronten auslösen. Weitere K6-Applikationen in den Versuchsansätzen am Folgetag betätigten eine gute Aktivierungsrate, die ca. 40 min anhält.

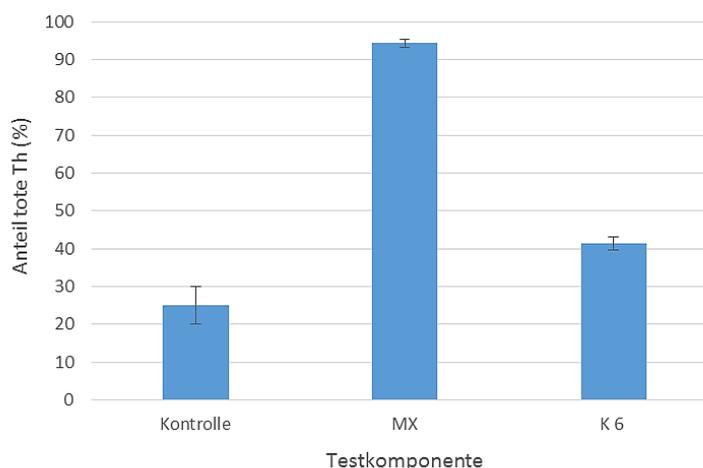


Abbildung 42: Absterberate von Theronten (%) nach Inkubation mit MX und K6 nach 9,5 (MX) bzw. 26 (Kontrolle/K6) h in 10 ml (6 Well Platten) bei RT nach gestaffelter Zugabe von Stimuli.

Daneben galt es zu überprüfen, ob die Exposition mit BG 3 den Theronten durch evtl. Aufnahme des Substrates einen Vorteil in Form einer längeren Überlebensrate verschafft. Nach insgesamt 3 Tagen bei 12°C in 10 ml Volumen zeigten Theronten, die zuvor in Leitungswasser überführt waren, in Präsenz von BG eine um ca. 34 % höhere mittlere Überlebensrate ($N = 3$, n. sign.), bei Hälterung in filtriertem Aquarienwasser jedoch eine um ca. 13 % geringere Zahl vitaler Individuen ($P < 0,05$).

4.1.4.5 Wirtsreaktion Theronten – Penetration (KuL)

Nach dem Festheften und Verbleiben der Theronten an attraktiven Substraten (BG 3) waren in vielen Fällen auch Rotations- bzw. Bohrbewegungen zu beobachten, die darauf hindeuteten, dass die Stimulierung der Penetration bereits gegeben war. Augenscheinlich standen dem die mechanischen Verhältnisse an der Oberfläche der Testmatrix entgegen. Testreihen mit Fischsubstraten und verschieden viskosem BG ließen erkennen, dass es keiner zusätzlichen Stimulierung bedarf, sondern die Viskosität entscheidend ist. Von anderen aquatischen Parasiten verwendete Fettsäuren konnten keine Penetrationsreaktionen auslösen. Allenfalls Karpfenmukushomogenat erzielte nach den Beobachtungen leicht höhere Zahlen an Penetrationsversuchen. Mit den bis dato verwendeten Bioassays war jedoch eine erfolgte Penetration der Theronten in BG nicht explizit nachweisbar.

Es war daher nötig, die Quantifizierung mittels der eigens entwickelten Glasküvette, mit der Möglichkeit die Theronten von der Seite zu beobachten, vorzunehmen. Nach Vorversuchen konnte der

Viskositätsbereich, in dem Penetration in BG 3 stattfand, (Kontrolle BG 1) eingegrenzt werden. So konnten in mit einer BG 3-Schicht überzogene BG 1-Matrix insgesamt 216 penetrierte Theronten gezählt werden, wohingegen in reine BG 1 nur 30 Theronten eingedrungen waren. In reinem BG 3 konnte in einem weiteren Ansatz erst nach ca. 45 min eine quantifizierbare Menge an penetrierten Theronten nachgewiesen werden (Abbildung 43). Ab 90 min war gegenüber dem mit höherer Dichte angesetztem BG 3-Substrat eine signifikant höhere ($P = 0,001$) Zahl an Theronten eingedrungen (Abbildung 43). Die penetrierten Theronten bleiben dabei auch nach längerer Inkubation im Substrat. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Theronten nach Perzeption des natürlichen Festhefte-Stimulus ohne einen weiteren Reiz zur Penetration übergehen. Dies erfolgt allerdings nur in Substrate, in welche sie aufgrund der physikalischen Gegebenheiten eindringen können.

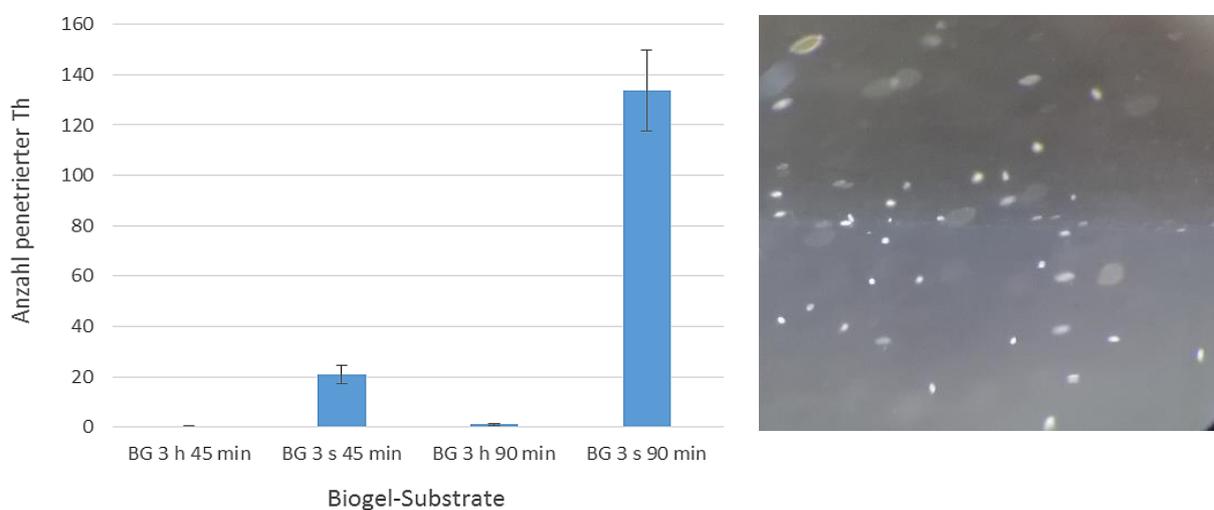


Abbildung 43: Anzahl penetrierter Theronten in BG 3-Matrix im Glasküvetten-Versuch (links). In BG 3 penetrierte Theronten (rechts); h = härter angesetztes BG, s = viskoser angesetztes BG.

4.1.4.6 Versuche zur Fallenentwicklung („Parasite traps“) (KuL)

Bei der Entwicklung von Vorrichtungen, um Theronten quantitativ aus dem Wasserkörper abzufangen, sollte sich zunächst das Festheften und Verbleiben an BG 3 zunutze gemacht werden, um die Möglichkeiten für einen Praxiseinsatz prinzipiell zu analysieren. Das BG sollte hierfür auf Oberflächen aufgetragen und so angeboten werden, dass Theronten diese finden, sich aufgrund Präsenz der benötigten Stimuli anheften und dort verbleiben. Da die Theronten aber laut vorangegangener Resultate nach bestimmter Zeit die attraktive Oberfläche wieder verlassen, waren grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Entfernung denkbar. Zum einen könnten die Theronten durch Anheftung an die Lockmatrix manuell entfernt werden, zum anderen könnte die Lockwirkung genutzt werden, um die Theronten durch Beimischung eines Biozids abzutöten. Die Penetrationsreaktion konnte aufgrund der benötigten Weichheit der Matrix nicht zusätzlich angestrebt werden. Dennoch wurde zunächst ein Test zur Bestimmung der verwendbaren Härtegrade durchgeführt. Dies auch vor dem Hintergrund, eingebrachte Stimuli möglichst lange an der Oberfläche festzuhalten. Testreihen in größeren Volumina bis hin zu Aquarien mit verschiedenen Materialien und Ausführungen zum Auftragen des BG wurden getestet. Bereits bei Verwendung von Fliegengitter-Gaze (10 x 5 cm) beschichtet mit BG 3 konnte nur durch Herausheben die Zahl der Theronten im Wasser (10 L Aquarien) nach 9 h um 37 % gesenkt

werden (Kontrolle BG 1). Diese Effizienz kann in größeren Volumina voraussichtlich nicht erreicht werden. Daher wurde auf die Ergebnisse der unter Methodenentwicklung und Analysen beschriebenen Tests von Bioziden zurückgegriffen um die Abfangeffizienz noch deutlich zu steigern.

Weiter verfahren wurde mit einem Test zur Optimierung der Zusammensetzung der Lockschicht für den Theronten-Fallen-Prototyp. Der BWA bot hier den Vorteil niedrigerer Inkubationszeiten, dadurch die Möglichkeit zur Durchführung vieler replizierter Ansätze parallel, visuell erfassbarer Reaktionsdynamik und der Auswertung aller enthaltenen Theronten, sowohl der vitalen wie auch der abgetöteten. So konnte simultan eine Inkubations-Zeitreihe mit BG (+ Niclosamid) verschiedener Viskosität und mit/ohne MX-Zugabe getestet werden. Die vorinkubierten Ansätze ohne MX zeigten dabei sowohl weich als auch hart formuliert einen deutlichen Wirksamkeitsverlust bereits nach 4 h (Abbildung 44). MX-Zugabe konnte die Abfang-Effizienz nach 4 h um ca. 20 % steigern. Nach 8 h Vorinkubation war jedoch auch in diesen Ansätzen nur noch eine geringe Abfangrate zu verzeichnen.

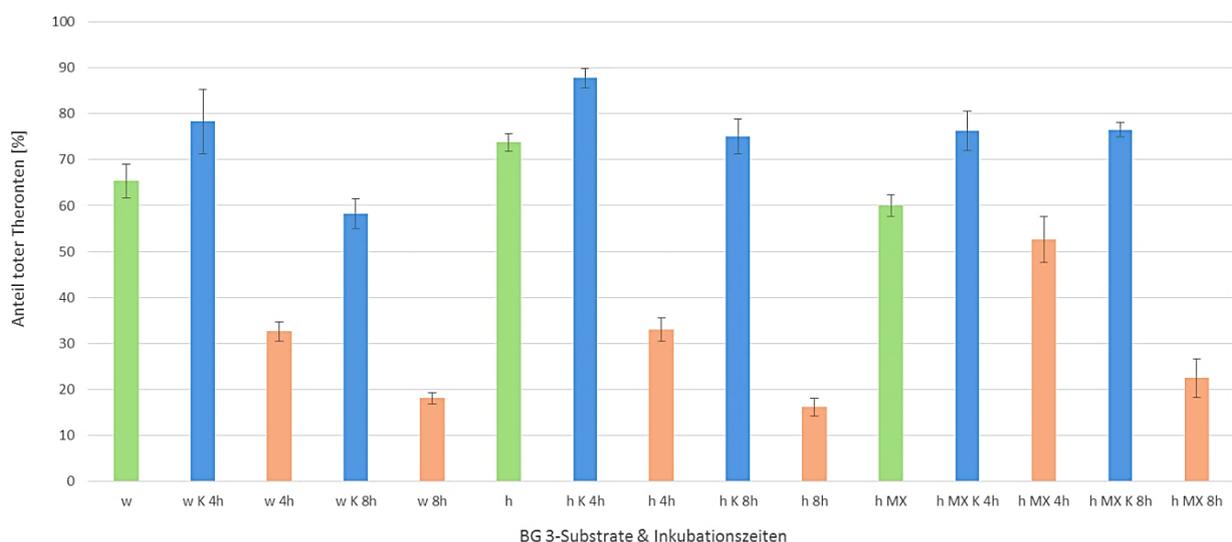


Abbildung 44: Abtötung von Theronten nach 30 min Inkubation im Bottom Well Assay mit unterschiedlich vorinkubierten BG; je 45 µl BG 3-Spot + Niclosamid (0,1 %) in 50 ml Volumen; w = weiches BG, h = hartes BG, K = Kontrolle (frisch exponiert), MX = Zugabe aktivierendes Substratgemisch. Grün = Zeitpunkt 0, blau = am jew. Zeitpunkt verwendetes nicht vorinkubiertes BG, orange = vorinkubiertes BG.

Die als Prototyp verwendeten beschichteten Kunststoffplatten konnten in 15 L-Becken (2700 Theronten/L, $N = 3$) die Anzahl der im Überstand enthaltenen Theronten nach 6 h Inkubation signifikant ($P = 0,012$) um 57 % reduzieren. Um nachzuweisen, ob ins Wasser diffundiertes Niclosamid, und nicht der Kontakt mit der BG-Oberfläche, die Reduktion verursacht, wurden Theronten über einen Medienwechsel mittels Thincert Filtereinsätzen (Greiner BioOne, Porenweite 8 µm) dem im Versuch gebrauchten Wasser ausgesetzt. Hier war gegenüber unbehandelten Ansätzen keinerlei Beeinträchtigung der Zahl vitaler Theronten festzustellen. Daneben wurden zusätzlich Kontrollen mit kleinen Platten in Bechergläsern angesetzt, welche eine Beobachtung erlaubten. Dabei waren abgetötete Theronten, analog zum BWA-Versuch, nur auf der BG-Oberfläche erkennbar, schwimmende Theronten blieben unbeeinflusst.

4.1.4.7 Trophonten-Abfangtests (KuL)

Die Experimente zur Präferenz von Trophonten für ein praxistaugliches Festheftmaterial zeigten recht schnell, dass nur wenige Materialien geeignet sind und von den Trophonten hinreichend gut angenommen werden. Zahlreiche Materialien konnten bei Tests in 6-Well Platten (Abbildung 45) nur eine Gleichverteilung adherierter Individuen erzeugen (Bsp. Abbildung 45), was lediglich bedeutete, dass das jeweilige Material nicht schlechter angenommen wird als der Boden der Kunststoffwells. Generell encystierten sich an Textilstoffen (Baumwolle/Kunststoff) bei weitem die meisten Trophonten (19-21 von 30 bei 3 Stoffen) im Gegensatz zu Materialien wie Folie, Holz, Sand, Kokosfaser oder Kunststoffgaze (2-9 von 30). Die Zeit bis sich Trophonten festgeheftet hatten schwankte dabei zwischen 10 min und 3 h. Unter den verwendeten Textilstoffen konnte anhand weiterer Tests ein Gewebe am besten überzeugen, da sich an diesem beinahe alle Trophonten festhefteten und encystierten (93 % vs. 40 % am Vergleichsstoff im Präferenz-Assay). Weitere daraufhin getestete Textilgewebe dieser Art ließen das bevorzugt zu verwendende optimale Rohmaterial für die Abfangvorrichtungen bestimmen.



Abbildung 45: Tests von Materialien zum Festheften und Encystieren der Trophonten.

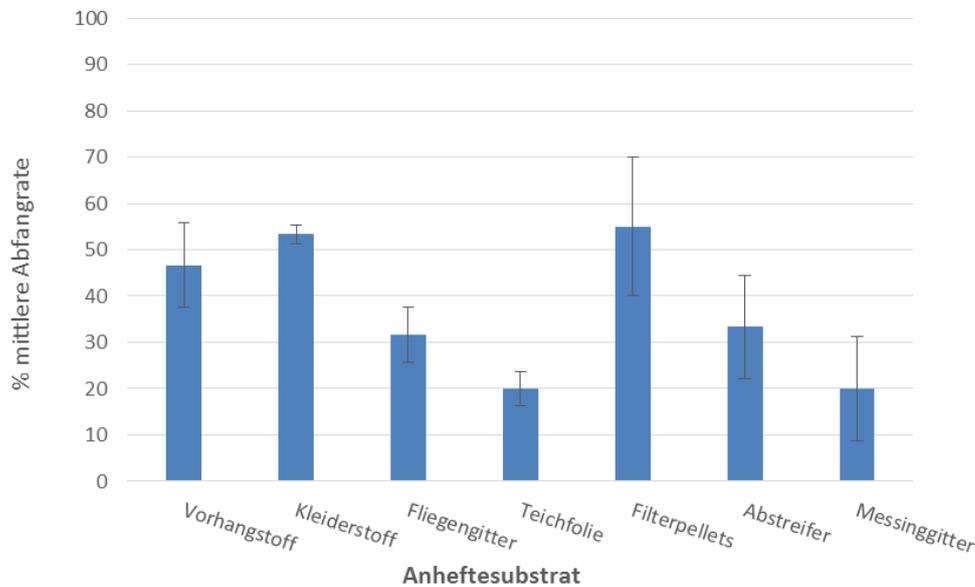


Abbildung 46: Festhefterate von Trophonten an verschiedenen Materialien in halb bedeckten Wells von 6-Well Platten.

4.1.4.8 Challenge-Experimente unter Laborbedingungen: Dispersion von Stimuli (KuL, IFI)

Grundlage für die Versuche war die Identifizierung von natürlichen Substraten, die das einzigartige Bewegungsmuster der Wirtssuche in vitalen Theronten aktivieren. Dieses schnell rotierende Schwimmaktivierungs- und Wirtserkennungsverhalten sollte die Transmission des Parasiten entweder durch einen Abfangeffekt, Verhinderung der Wirtserkennung oder durch den stark erhöhten Energieverbrauch aufgrund der Motilität und anschließendem früherem Vitalitätsverlust stören. Die einfache Applikation von Stimuli ins Wasser zeigte vielversprechende Resultate und wurde auf Challenge-Versuche mit exponierten Fischen in Aquarien übertragen. Die Zählung der Befallsraten nach einer Woche zeigte eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) Reduktion der epidermalen trophischen Stadien auf einen Bruchteil im Vergleich zur unbehandelten Gruppe nach 7 h Vorinkubation von Theronten mit Wirkstoffverabreichung (Abbildung 47). Die Kontroll-Theronten, die den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen inkubierten, blieben vital und lösten einen hohen Befall mit *Ichthyophthirius*-Trophonten aus. Die gleichzeitige Zugabe von Versuchsfischen und Wirkstoff, bei wiederholter Verabreichung bis auf eine Endkonzentration von 24 mg MX pro Becken (~ 7 mg/l), führte zu einer signifikanten ($P = 0,03$) Reduktion der Infektionsrate um mehr als 50 %. Es schien jedoch eine kritische Konzentrationsschwelle zu geben, da niedrigere Endkonzentrationen von 8 mg MX die mittlere Befallsrate eher ansteigen ließ, wenn gleichzeitig Fische und Parasiten hinzugefügt wurden.

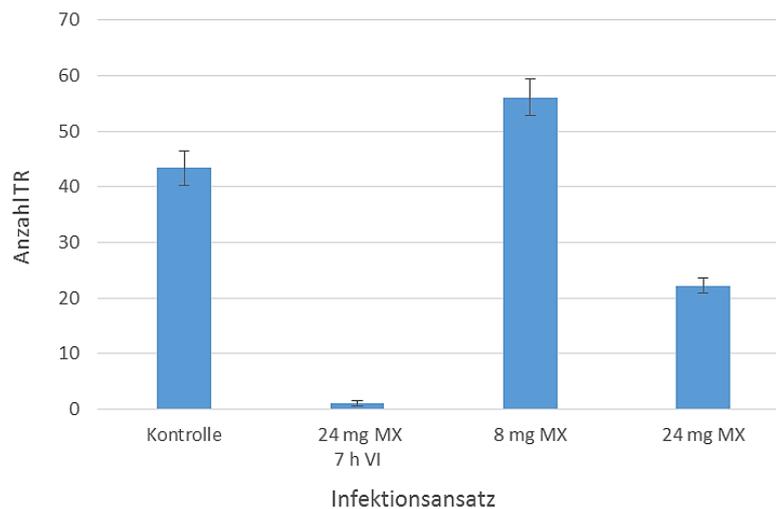


Abbildung 47: Anzahl von Trophonten auf einer Körperseite (inkl. Flossen) von Regenbogenforellen nach 7 d Inkubation p.e bei 16°C. Die Fische ($N = 30$) wurden unter wiederholter kumulativer Zugabe von MX (8 oder 24 mg Endkonzentration pro Becken), oder nach Vorinkubation der Theronten mit MX, einer Dosis von 330 Theronten/Fisch exponiert. 7 h VI = 7 h vorinkubiert.

Daraufhin wurden die wirksamen Reinsubstanzen K5 und K6 ebenfalls auf ihre infektionsmindernde Wirkung hin getestet. Dies galt nur als Vorversuch für die Semi-field Ansätze mit je einer 100 L Versuchseinheit mit je 10 Forellen (6-8 cm), welche einer Gesamtdosis von 5000 Theronten exponiert wurden. Ein Ansatz war vorab behandelt mit 1 g einer Kombination aus K5 und K6 zu gleichen Teilen. Ausgezählt wurde jeweils die komplette Außenfläche der Fische. Nach Abschluss des Fixierungsvorganges wurde die gesamte Außenfläche der Fische unter einem Stereomikroskop begutachtet und die darauf befindlichen Trophonten bestimmt. Die behandelte Gruppe zeigte einen signifikant geringeren Befall von nur noch 26 % der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$). Die Wasserwerte befanden sich während des gesamten Versuchszeitraums im physiologischen Toleranzbereich für Regenbogenforellen.

4.1.4.9 Challenge-Experimente unter Laborbedingungen: Parasite Traps (KuL, IFI)

Bezüglich der Entwicklung von Theronten-Fallen (parasite traps) konnte aufgrund positiver Resultate aus dem Ansatz mit BG 3-Lockschicht und Biozid beschichteten Kunststoffplatten im Challenge-Versuchsteil weitergearbeitet werden. Im Sinne des Tierwohls wurde zur Überprüfung der Methodik zunächst ein Vorabtest mit nur drei 12 L Aquarien mit je 4 Regenbogenforellen-Brütlingen durchgeführt. Ein Becken wurde mit der auch im Laborversuch verwendeten Theronten-Falle mit BG/Niclosamid bestückt, ein weiterer Ansatz hatte zusätzlich MX in der Lockschicht. Ein Becken diente als Kontrolle. In den Ansätzen wurden die Theronten (Dosis 2000/Fisch) mit der Theronten-Falle bzw. Kontrolle (ohne Falle) über 7,5 h vor Zugabe der Fische inkubiert. Die Auswertung nach 7 Tagen konnte eine Reduktion des Befalls von 79 % (mit MX) und 89 % (ohne MX) bewirken ($P < 0,01$). Der Ansatz mit MX war demnach nicht effektiver als ohne MX. Dementsprechend wurde der Challenge-Versuch mit Forellen-Brütlingen (Dosis 1600 Theronten/Fisch) mit 10 Fischen pro Becken ($N = 3$) wiederholt. Hierbei konnte wieder eine signifikante ($P = 0,002$) Reduktion der mittleren Befallsrate um 48 % erzielt werden (Abbildung 48).

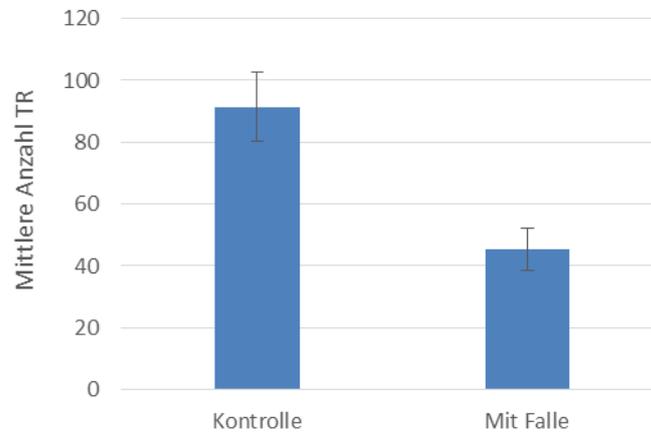


Abbildung 48: Mittlere Trophontenzahlen auf der Körperoberfläche von Regenbogenforellen nach 7 d Inkubation nach vorheriger Exposition mit gleichen Mengen *I. multifiliis* Theronten.

Wie geplant wurden weitere Challenge-Versuche in größeren Becken durchgeführt. Die positiven Resultate mit den Prototypen in kleineren Volumina dienten als Grundlage zur Durchführung der Expositionsversuche in größeren Volumina in je 2 Einheiten von 100 L (3500 Theronten/Fisch). Dabei traten technische Schwierigkeiten v.a. hinsichtlich der erzielten Infektionen in den Kontrollansätzen auf. Nach Abschluss des Fixierungsvorganges im ersten Versuch wurde die gesamte Außenfläche von je 17 Fischen unter einem Stereomikroskop begutachtet und visuell die Anzahl der darauf befindlichen Trophonten bestimmt. Zwar befanden sich mit im Mittel 74,14 (+/- 13,48) gegenüber 97,4 (+/- 19,5) weniger Trophonten auf den Tieren aus den Einheiten mit Theronten-Fallen, jedoch war dieser Unterschied aufgrund hoher Varianz zwischen den Ansätzen einer Gruppe nicht signifikant. Im zweiten und dritten Durchgang wurde genauso verfahren, wobei der Unterschied im Befall trotz Verwendung von jeweils 4 und 3 100 L-Einheiten pro Gruppe noch geringer ausfiel. Ein messbarer Abfang-Effekt durch die Theronten-Fallen Prototypen in Form einer signifikanten Befallsreduktion konnte demnach nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4.1.4.10 Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Trophonten-Abfangtest (KuL, IFI)

Das Abfangen der vom Fisch abgehenden Trophonten, und die damit bestehende Möglichkeit einer Entfernung vor Entwicklung zu infektiösen Theronten, wurde direkt auf die Volumenverhältnisse von Hälterungsrinnen übertragen. Ausgezählt wurden jeweils Trophonten auf der linken Außenfläche von 10 Fischen pro Ansatz ($N = 3$). Nach Versuchsende befanden sich signifikant weniger als klein- ($P < 0,02$) und mittelgroß ($P < 0,03$) klassifizierte Trophonten auf den Fischen aus Einheiten mit Applikation der Trophonten-Fallen (Tabelle 8). Damit konnte trotz sehr geringer Infektionsrate eine durch die Abfangvorrichtungen erzeugte, signifikant geringere Reinfektionsrate nachgewiesen werden. Im Gegenzug war die Zahl der als groß klassifizierten Trophonten signifikant ($P < 0,005$) höher auf den Tieren aus Einheiten mit Trophonten-Fallen.

Tabelle 8: Mittlere Anzahl an Trophonten auf mit Trophonten-Fallen behandelten Einheiten nach Größenklassen. K = Kontrolle.

No. Trophonten	klein	klein K	mittel	mittel K	groß	groß K
Mittelwert	1.44	3.12	3.24	4.84	2.76	0.80
SEM	0.23	0.50	0.55	0.53	0.80	0.28
Varianz	1.34	6.19	7.69	6.97	15.94	2.00
Std.Abweichung	1.16	2.49	2.77	2.64	3.99	1.41

4.1.4.11 Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Substratdispersion (KuL, IFI)

Im großvolumigen Challenge-Versuch in Hälterungsrinnen konnte das Ergebnis des kleinmaßstäblichen Vorinkubationsversuchs mit Reinsubstanzen bestätigt werden, da die Anzahl der Trophonten an Fischen, die in der Gruppe mit vorheriger Wirkstoffverteilung exponiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden konnte. Individuen aus behandelten Tanks hatten mehr als viermal weniger Trophonten auf ihrer Körperoberfläche ($P < 0,0001$; 18 Individuen pro Gruppe).

4.1.4.12 Challenge-Experimente unter Semi field-Bedingungen: Parasite traps (KuL, IFI)

In den Semi-field Versuchen mit Bürstenköpfen und beschichteten Kunststoffplatten als Theronten-Fallen wurde nach Fixierung der Tiere die linke Außenfläche der Schwanzflosse und im letzteren Fall die komplette Außenfläche der Fische per Stereomikroskop begutachtet und die darauf befindlichen Trophonten ermittelt. Analog der Resultate aus den 100 L-Einheiten konnte in beiden Ansätzen keine Reduktion der Befallsrate ermittelt werden.

4.1.5 Impfungen (TiHo-Fische)

Alle Impfstoffe sowie die Vorbehandlungen mittels eines Ultraschallbades und eines Dermarollers wurden von den Fischen gut vertragen und es traten aufgrund der Impfung nur vereinzelte Verluste in den per i.p. Injektion geimpften Fischen auf. Die ungeimpften Fische wiesen 7 Tage nach Infektion im Durchschnitt zwei Trophonten auf der Haut auf. Alle Fische, die mit Präparationen von *Tetrahymena* sp. geimpft worden waren, wiesen im Durchschnitt etwa 1,5 Trophonten auf der Haut auf. Dies war aufgrund der großen individuellen Unterschiede zwischen den Fischen nicht statistisch signifikant weniger als in der Kontrollgruppe. Impfansätze mit *I. multifiliis* unterschieden sich in ihrer Protektivität für die Fische. Die i.p. Injektion lebender und formalin inaktivierter Entwicklungsstadien des Erregers (Ansatz 1 und 2, s. Tabelle 6) führte zu einer signifikant niedrigeren Befallsintensität der Fische 7 Tage nach Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls führte die Impfung über ein Tauchbad mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Vorbehandlung der Fische mittels Ultraschall (Ansatz 8, s. Tabelle 6) zu einer signifikanten Reduktion des Parasiten auf der Haut. Alle anderen getesteten Impfstrategien führten nicht zu verminderten Parasitenzahlen auf der Haut der Fische im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 49). Der Vergleich der mikroskopisch ausgezählten Parasitenzahlen mit den Ergebnissen der PCR ergab ein vergleichbares Bild (Abbildung 50). Die Ergebnisse der Hautproben erschienen ähnlich den mikroskopisch ermittelten Zahlen. Auch die Ergebnisse der Untersuchungen

der Kiemenproben ergaben tendenziell ein vergleichbares Bild, jedoch waren größere Unterschiede zwischen den individuellen Fischen zu erkennen.

Anzahl Trophonten von *I. multifiliis* auf der Haut nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen

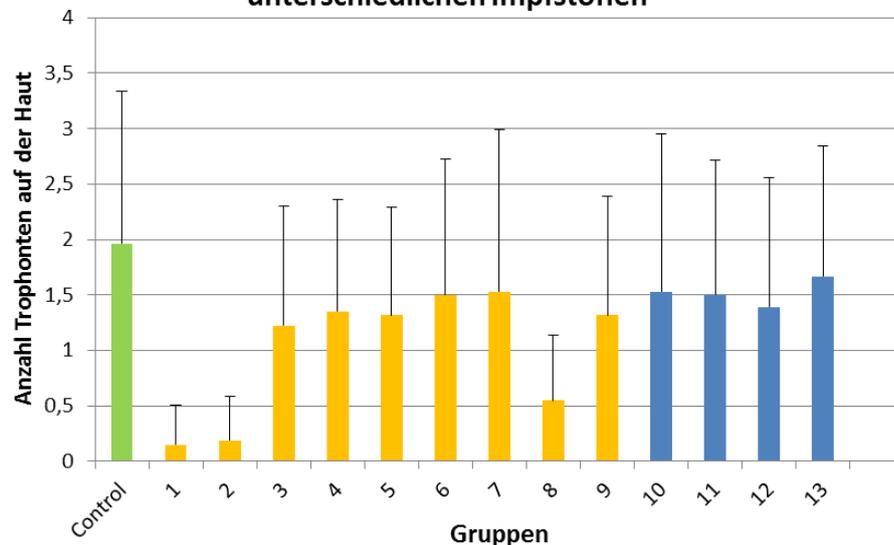


Abbildung 49: Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 27 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Gruppe 1-13 und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6) und 7 Tage nach Infektion mit *I. multifiliis*.

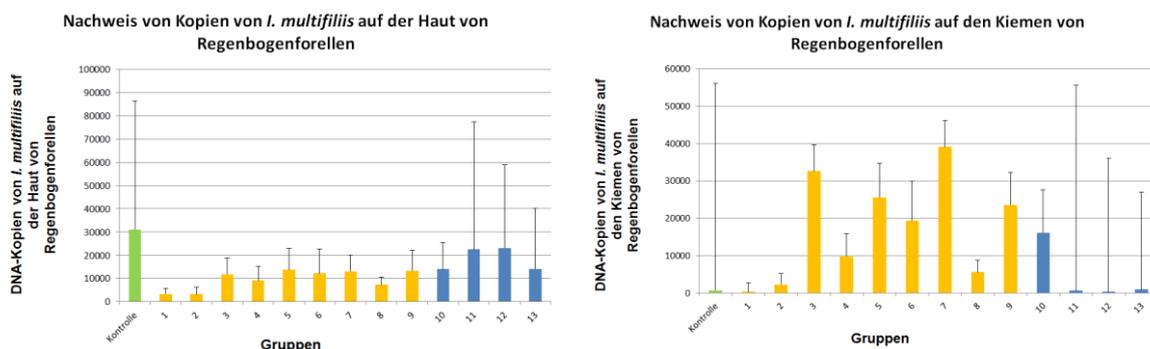


Abbildung 50: Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 27 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Gruppe 1-13 und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6) und 7 Tage nach Infektion mit *I. multifiliis*. Mittels PCR erhobene Befunde.

4.2 Phase 2: Untersuchungen unter Praxisbedingungen

4.2.1 Untersuchungen zur Transmissionsunterbrechung (IFI, KuL)

4.2.1.1 Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Fließkanäle

Der Forellenbestand der Teichwirtschaft A war mit *I. multifiliis* infiziert und es mussten entsprechend Maßnahmen zur Abmilderung der Infektion ergriffen werden. Als eine Maßnahme wurden Trophonten-Fallen eingebracht. Der Befall der Fische lag vor Beginn der Behandlung im Mittel bei 39,4 (+/- 13,1) Trophonten pro Fischseite und zeigte eine sehr hohe individuelle Varianz (ermittelt durch den betreuenden Tierarzt). Probleme mit den Trophonten-Fallenkonstruktionen waren bedingt durch die Bodenstruktur, da sich Luftblasen unter dem Stoff bilden konnten. Eine tierärztliche Nachkontrolle fand eine Woche später bei jeweils 10 Fischen aus den Fließkanälen statt. In beiden Gruppen hatte demnach die Anzahl der Trophonten auf der Haut abgenommen. Die mittlere Befallsrate (Anzahl Trophonten pro Fischseite) in beiden Fließkanälen lag beinahe gleich bei 24,0 % (+/- 3,5, unbehandelt) und 24,89 % (+/- 5,6, behandelt).

Im Nachhinein wurde festgestellt, dass der Teichwirt fälschlicherweise ausschließlich den unbehandelten Fließkanal mit technischem Sauerstoff versorgt hatte. Der Sauerstoffgehalt ergab bei einer Kontrollmessung zwischen dem behandelten (3-6 mg/L) und dem unbehandelten (9-10 mg/L) Fließkanal einen deutlichen Unterschied. Dies bewirkte eine unverhältnismäßige Schwächung der Aussagekraft des Tests zur Möglichkeit einer Transmissionsunterbrechung im Fließkanal.

Tabelle 9: Gemessene Wasserparameter während der Testbehandlung in Teichwirtschaft A.

Zeitpunkt	Temperatur in °C				Ammonium-N in mg/L				pH-Wert				O2 in mg/l	
	Fließkanal 1 unbehandelt	Fließkanal 2 behandelt	Teich 1 unbehandelt	Teich 2 behandelt	Fließkanal 1 unbehandelt	Fließkanal 2 behandelt	Teich 1 unbehandelt	Teich 2 behandelt	Fließkanal 1 unbehandelt	Fließkanal 2 behandelt	Teich 1 unbehandelt	Teich 2 behandelt	Fließkanal 1 unbehandelt	Fließkanal 2 behandelt
Start	Einlauf: 13 Auslauf: 14		19											
1 Woche	13,5	13,5	18,2	18,3	Einlauf: 0,1 Auslauf: 0,15	Einlauf: 0,05-0,1 Auslauf: 0,1	0,05-0,1	0,2	6,5 – 7,0	7,0 – 7,5	7,0	7,5		
2 Wochen	13,4	13,4			0,2	0,2			7,0	7,5			9-10	3-6

4.2.1.2 Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Hälterungsteiche

Die Forellen in den Hälterungsteichen waren mit *I. multifiliis* infiziert und es mussten Maßnahmen zur Abmilderung der Infektion ergriffen werden. Als eine Maßnahme wurden Trophonten-Fallen eingebracht. Eine tierärztliche Kontrolluntersuchung sechs Tage nach Beginn der AK-Zugabe ergab einen nur sehr geringgradigen Befall der Fische mit *I. multifiliis*, allerdings war die Zahl an Trophonten auf den Tieren aus dem unbehandelten Teich noch signifikant ($P = 0,04$, $N = 15$) höher (1,0 +/- 0,38) als

die auf den Fischen, deren Wasser mittels AK behandelt wurde (0,14 +/- 1,0). Somit war im Rundteich mit Weichbodensubstrat durch AK-Zugabe tendenziell eine erfolgreiche Reduktion der Befallsrate feststellbar. Eine tierärztliche Kontrolluntersuchung eine Woche später ergab, dass auf keinem der untersuchten Fische aus beiden Teichen *I. multifiliis* gefunden werden. Demnach hatten sich die Tiere entweder erfolgreich immunisiert, oder der Zyklus kam in den Teichen von selbst zum Erliegen.

4.2.1.3 Ergebnisse aus Teichwirtschaft A: Änderungen am Behandlungsregime

Aufgrund der Erkenntnisse in der praktischen Anwendung in Teichwirtschaft A mussten Änderungen in der Behandlungsmethodik vorgenommen werden. Die Trophonten-Falle muss immer mit der Stoffseite nach unten eingebracht werden. So verhindert das darüber liegende Metallgitter, dass sich durch Luftblasen Hohlräume bilden. Gleichmäßiges Zutropfen der AK am Einlauf der Rinne bzw. in den Teich über den ganzen Tag sollte im Gegensatz zu portionsweisem Einbringen eine Akkumulation der AK verhindern. Dazu brachten erste Versuche vielversprechende Ergebnisse. Ein 25 L Kanister mit Auslaufhahn wurde mit 25 L AK-Lösung befüllt und 2 bzw. 10 Tage dem Sonnenlicht ausgesetzt. Dazu wurden 2,5 % AK in 2 L Leitungswasser mit 0,15 % oder 0,075 % Konservierungsstoff und 1,25 % AK in 2 L Leitungswasser + 0,075 % Konservierungsstoff gelöst. Die Wirksamkeit der AK blieb trotz Sonneneinstrahlung und Hitze, auch ohne Zusatz von Konservierungsstoffen, erhalten. Nach 2 und auch nach 10 Tagen Sonneneinstrahlung war die AK-Lösung noch immer wirksam, die Theronten reagierten auf alle vier Lösungen mit Nahbereichs-Chemokinese. Die Zugabemethode der AK-Lösung mittels eines gut einstellbaren Dispenser-Systems zum Aufbau einer gleichmäßigen Konzentration im Wasser konnte damit statt der Pulverzugabe im zweiten geplanten Praxistest angewandt werden.

4.2.1.4 Ergebnisse aus Teichwirtschaft B: Substratdispersion

Die Auswertung der Ergebnisse aus Teichwirtschaft B erfolgte nicht durch Auszählung des Befalls sondern, wie tiermedizinisch üblich, anhand des Befallsgrades. Hierbei wurde zwischen vereinzelt, gering, mittel-, hoch- und höchstgradig unterschieden. Eine tierärztliche Kontrolluntersuchung von 10 Regenbogenforellen nach 7 Tagen zeigte bei 4 Fischen einen vereinzelt, bei 6 Fischen einen geringgradigen Befall mit *I. multifiliis*. Somit konnte eine generelle Infektion mit dem Parasiten nachgewiesen werden. Nach Ablauf von weiteren 21 Tagen wurde die Testbehandlung beendet und wiederum 10 Regenbogenforellen einer tierärztlichen Kontrolluntersuchung unterzogen. Auch bei diesen Fischen war ein maximal geringgradiger Befall mit *I. multifiliis* festzustellen (5-mal vereinzelt, 5-mal geringgradig). Über die gesamten 28 Tage war durch den Anlagenbetreiber keine parasitenbedingte Mortalität beobachtet worden. Die Wassertemperaturen lagen während des Versuchszeitraumes zwischen 13 und 14°C, der Sauerstoffgehalt durchgehend über 9 mg/L.

4.2.1.5 Ergebnisse aus Teichwirtschaft B: Trophonten-Abfangtest

Eine tierärztliche Kontrolluntersuchung nach 21 Tagen ergab bei 7 Fischen einen mittel-, bei 3 Fischen einen geringgradigen Befall mit *I. multifiliis*. Es kam es zu keinerlei Mortalitäten. Die Wassertemperatur nahm im Laufe des Versuches von 13°C auf 4,6°C ab, der Sauerstoffgehalt lag durchgehend über 9 mg/L.

4.2.2 Impfungen unter Praxisbedingungen (TiHo-Fische)

4.2.2.1 Ergebnisse aus Impfversuch 1 (Setzlinge)

In der Gruppe der Regenbogenforellensetzlinge, die für die Praxisversuche verwendet wurden, konnte eine subklinische Infektion mit *I. multifiliis* festgestellt werden. Das Fangen, Impfen und Aufteilen in die drei Versuchsgruppen erfolgte ohne Komplikationen. Lediglich in der Gruppe, die per Injektion in die Bauchhöhle vakziniert wurde, wurde im Verlauf der ersten 24 Stunden nach Impfung der Verlust von zwei Fischen registriert. In der Gruppe, aus der die Fische zur Impfung entnommen wurden, entwickelte sich in den folgenden drei Tagen eine klinische Infektion und hier wurde damit begonnen, diese durch Maßnahmen zur Umgebungsdesinfektion zu bekämpfen. Auch die drei Versuchsgruppen, deren Wasserzulauf parallel geschaltet durch das Ablaufwasser ihrer Ursprungsgruppe erfolgte, zeigten steigende Infektionsraten. Neben der Infektion mit *I. multifiliis* entwickelte sich ein stetig wachsender Befall mit *Apiosoma* sp.. Über die Zeit der Beobachtung traten in allen Versuchsgruppen stetig steigende Verluste auf. Bei Beendigung des Versuchs waren in der Kontrollgruppe von möglichen 80 überlebenden Fischen 73 Setzlinge verstorben oder aufgrund von Abbruchkriterien euthanasiert worden. In der Gruppe, der vor der Impfung mit Ultraschall behandelten Regenbogenforellen waren von 80 möglichen Überlebenden 64 Fische verstorben oder euthanasiert worden und in der Gruppe der per Injektion in die Bauchhöhle geimpften Fische waren 74 Fische verstorben oder euthanasiert worden. Bei der mikroskopischen Auswertung der Befallsstärke der Regenbogenforellensetzlinge ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 51).

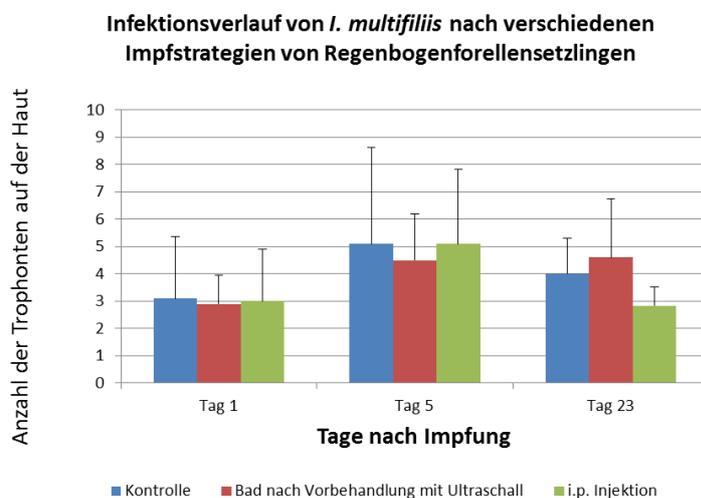


Abbildung 51: Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 5 und 23 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvakzine mit formalin inaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalin inaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mikroskopisch erhobene Befunde.

Im Gegensatz hierzu kann bei der Betrachtung der Ergebnisse der PCR Untersuchungen der Setzlinge besonders zum Ende des Versuchs der Eindruck entstehen, dass hier geringere Infektionsraten in der Gruppe der vor Impfung mit Ultraschall vorbehandelten Fische und noch ausgeprägter in der Gruppe der per Injektion geimpften Fische vorlagen (Abbildung 52). Aufgrund der großen individuellen

Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen ist allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festzustellen.

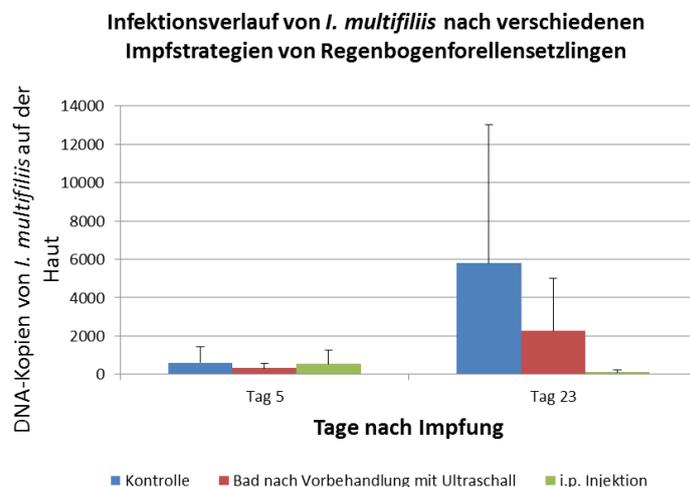


Abbildung 52: Anzahl Trophonten auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen 5 und 23 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvaccine mit formalin inaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalin inaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mittels PCR erhobene Befunde.

4.2.2.2 Ergebnisse aus Impfversuch 2 (Speisefischanwärter)

Bei der Impfung und dem Handhabung der Speisefischanwärter traten keine Verluste auf. Da diese Fische in die gleichen Becken eingesetzt wurden, die auch in dem Ansatz mit den Setzlingen verwendet wurden und die Versorgung mit Zulaufwasser in gleicher Weise erfolgte, wurden auch diese Fische sehr schnell mit *I. multifiliis* belastet. Die Infektionsrate der Fische nahm über den Verlauf der Haltung zu und auch hier zeigten sich bei der mikroskopischen Auswertung große individuelle Unterschiede auch innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen (Abbildung 53). Auch bei diesen Fischen stellte sich eine Infektion mit *Apiosoma* sp. ein. Über die gesamte Haltungsdauer traten kaum Verluste auf. In der Kontrollgruppe und der vor Impfung mit Ultraschall behandelten Versuchsgruppe verstarben jeweils vier Fische bzw. mussten euthanasiert werden. In der per Injektion immunisierten Gruppe starben 2 Fische. Auch in diesem Versuch zeigt die Auswertung der mittels PCR untersuchten Proben Unterschiede insbesondere im Vergleich von per Injektion geimpfter Fischgruppe zur Kontrolle (Abbildung 54), doch auch hier ist durch die starke individuelle Streuung auch innerhalb der Versuchsgruppen keine statistische Signifikanz festzustellen.

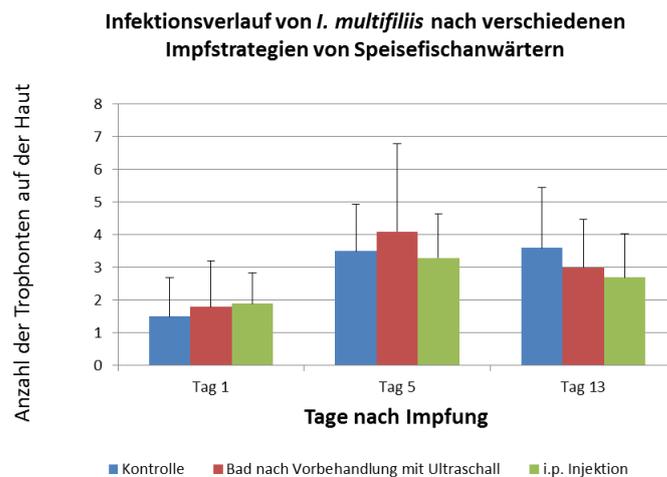


Abbildung 53: Anzahl Trophonten auf der Haut von Speisefischanwärttern von Regenbogenforellen 5 und 13 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvaccine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mikroskopisch erhobene Befunde.

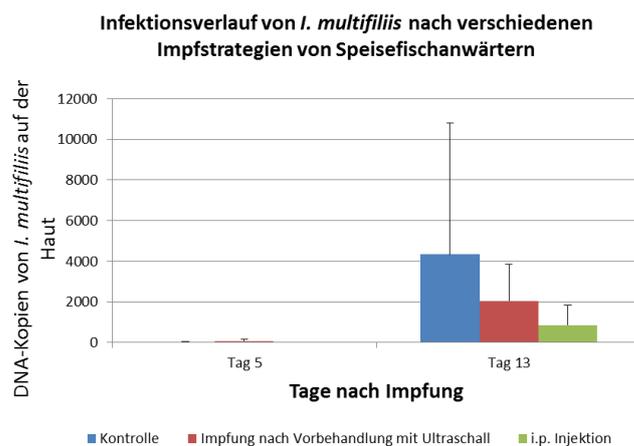


Abbildung 54: Anzahl Trophonten auf der Haut von Speisefischanwärttern von Regenbogenforellen 5 und 13 Tage nach Impfung mit unterschiedlichen Impfstoffen (Tauchbadvaccine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Ultraschallbad, i.p. Injektion von formalininaktivierten *I. multifiliis* und ungeimpfte Kontrolle, s. Tabelle 6). Mittels PCR erhobene Befunde.

5 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen des Kooperationsprojektes AbiAqua sollten alternative, ökologisch unbedenkliche Maßnahmen zur Reduktion von *I. multifiliis* in Fischhaltungen und insbesondere in Forellenhaltungen getestet und auf ihren praktischen Nutzen überprüft werden. Zu den drei schwerpunktmäßig bearbeiteten Ansätzen zur Parasitenreduktion (Filtration, Abfangmethoden zur Entfernung des Erregers, Impfung) wurden verschiedene weitere Versuche als Grundlagen für die zu testenden Methoden durchgeführt. Die Etablierung eines Laborzyklus von *I. multifiliis* stand dabei zunächst im Vordergrund. Dieser Laborzyklus war für das Projekt von entscheidender Bedeutung, da zum einen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen definierte Mengen an Theronten für Infektionen benötigt wurden und zum anderen für die Herstellung von Impfstoffen ebenfalls große Mengen des Parasiten nötig waren. Bei *I. multifiliis* handelt es sich um einen obligaten Parasiten, der einen Wirt benötigt, um sich zu vermehren. Dies stellte für die Entwicklung eines Laborzyklus eine enorme Herausforderung dar. Durch die Verwendung einer Karpfenzellkultur, die zum Teil mit Fischmucus beschichtet wurde, sollte der Wirt des Erregers so gut wie möglich nachgestellt werden. Bei *I. multifiliis* handelt es sich nicht um einen Ekto- sondern um einen Endoparasiten, der in der Haut und im Epithel der Kiemen parasitiert. Aus diesem Grund wurde eine Zelllinie zur Reproduktion des Erregers gewählt. Trotz diverser unterschiedlicher Versuchsansätze, unter anderem auch mit Fischserum, gelang es im Rahmen dieses Projektes nicht, einen vollständigen Zyklus von *I. multifiliis* auf einer Zelllinie zu etablieren. Der Erreger starb i.d.R. innerhalb der ersten 24-48 Stunden ab und war nicht zu rekultivieren. Ein Ansatz, der in weiteren Versuchen getestet werden könnte, wäre die Verwendung einer primären Zellkultur zum Beispiel aus Flossen von Fischen. Dies würde den natürlichen Wirt des Erregers deutlich besser imitieren und könnte somit zu einer Reproduktion beitragen. Der Nachteil wäre der Umstand, dass immer wieder Material von lebenden Fischen benötigt werden würde und somit nicht auf lebende Tiere zur Vermehrung des Erregers verzichtet werden könnte. Durch den Einsatz lebender Fische besteht, abhängig von deren Infektionsstatus, auch immer ein Restrisiko der Verschleppung anderer Krankheitserreger.

Laborzyklus von *I. multifiliis* und *Tetrahymena* sp.. Neben den zellbasierten Ansätzen wurden auch Ansätze ohne eine permanente Zelllinie verfolgt. Auch in diesen Ansätzen gelang es nicht, einen vollständigen Zyklus von *I. multifiliis* über Trophonten, Tomiten, Theronten und wieder Trophonten zu etablieren. Allerdings gelang es reproduzierbar und zuverlässig, von Fischen abgewanderte Trophonten so lange in Wasser zu halten, bis sich diese zu Tomiten mit Tomiten entwickelten und schließlich Theronten ins Wasser entließen. Diese Theronten konnten gewonnen und quantifiziert werden, so dass für alle Versuche und auch für die Produktion der Impfstoffe ausreichend Parasiten zur Verfügung standen. Der Nachteil dieser Methode war, dass regelmäßig natürlich infizierte Fische benötigt wurden, um Parasiten in ausreichender Menge zu gewinnen. Die Fische, von denen die Parasiten gewonnen wurden, stammten aus der Diagnostikprechstunde der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Bestandsbetreuung. Da in der Sprechstunde zumindest in der wärmeren Jahreszeit regelmäßig mit *I. multifiliis* infizierte Fische im Rahmen der Bestandsbetreuungen vorgestellt werden und da diese Fische für die Untersuchungen auf virologische Infektionserreger in der Regel euthanasiert werden müssen, mussten keine zusätzlichen Fische für die Vermehrung der Parasiten infiziert und euthanasiert werden. Für die kommerzielle Herstellung von Impfstoffen würde die Menge an natürlich infizierten Fischen aber nicht ausreichen, so dass die weitere Arbeit an einem funktionierenden kompletten Laborzyklus sehr sinnvoll wäre.

Untersuchungen zur Filtration des Wassers. Die Filtration des Erregers aus dem Wasser erwies sich als wenig praktikabel und insgesamt als nicht ausreichend effektiv. Die Auswertung der Versuche zur Filtration ergab, dass es bei Nutzung einer Ultrafiltrationsanlage mit einer Porengröße von 0,03-0,1 µm zu einer schnelleren Eliminierung von *I. multifiliis* aus dem Haltungswasser kommen kann. Dies setzte allerdings die einwandfreie Funktion der Anlage voraus, die mit der hier verwendeten Membran auch mit sehr hohem Aufwand nur bedingt zu erreichen war. Unter Laborbedingungen musste sowohl die Ultrafiltrationsanlage in Starnberg, als auch die Ultrafiltrationsanlage in Hannover mehr oder weniger kontinuierlich betreut werden. Bereits nach wenigen Stunden nahm die Filtration rapide ab (s. Tabellen 4 und 5) und die Membranen mussten freigespült werden. Die Membranen der Anlagen setzten sich nach sehr kurzer Zeit zu und die Anlagen boten im Dauerbetrieb keine Möglichkeiten der Freispülung der Membran. Ein kontinuierlicher Betrieb der Anlagen war daher nicht möglich. Diesem Problem konnte zwar mit Rückspülen der Membran begegnet werden, wobei dafür die Filtration gestoppt werden musste. Reichte die Rückspülung nicht aus, so musste die Membran mit chemischen Substanzen gereinigt werden, was ebenfalls eine Unterbrechung der Filtration zur Folge hatte. Schließlich trat deutliche Rostbildung in der Anlage auf und ein Loch im Sammeltank der Anlage in Hannover zeigte sich. Im Anschluss waren keine Versuche mit der Anlage mehr möglich. Dies schloss den Einsatz einer solchen Anlage in Teichwirtschaften aus. Die Betreiber der Aquakulturbetriebe benötigen verlässliche, wartungsarme Gerätschaften, um einen Nutzen zu erzielen. Eine Filtrationsanlage muss mindestens über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer ausreichenden Filtrationsleistung betrieben werden, um eine effektive Reduktion der Parasitenlast auf den Fischen erreichen zu können. Aufgrund der auftretenden Schwierigkeiten mit einer dauerhaften Filtration sowie der Rostbildung an der Anlage und schließlich dem Loch im Sammelbehälter, mussten die Versuche in Hannover abgebrochen werden. Auch in Starnberg wurden aufgrund der nicht kontinuierlich möglichen Filtration die Versuche abgebrochen. Zusätzlich stellte sich die Aufrechterhaltung der Wassertemperatur als schwierig heraus. Durch die Ultrafiltrationsanlage wurde das Haltungswasser deutlich erwärmt. Nur durch regelmäßige Wasserwechsel konnte eine Wassertemperatur, die für die Fische noch verträglich war, aufrechterhalten werden. Aus diesem Grund konnten die Filtrationsversuche nicht, wie ursprünglich geplant, auch bei niedrigen Wassertemperaturen durchgeführt werden. Insgesamt nahm die Befallsintensität der Fische aller Gruppen in allen Ultrafiltrationsversuchen im Zeitverlauf ab. Dies geschah trotz hoher Besatzdichten in den Becken. Aus Teichwirtschaften oder anderen Fischhaltungen ist ein solches Phänomen nicht bekannt. In den Versuchen wurden die Fische bei so optimalen Umweltbedingungen wie nur möglich gehalten, um Einflüsse von außen auf den Infektionsverlauf so weit wie möglich zu minimieren und alle Versuche unter vergleichbaren Bedingungen durchzuführen. Möglicherweise waren die Fische aus diesem Grund so gut konstituiert und konditioniert, dass sie die Infektion nach kurzer Zeit eliminieren konnten. Diese Eliminierung funktionierte nur bei Brütlingen schneller, wenn die Ultrafiltrationsanlage an ihr Becken angeschlossen wurde. In allen anderen Versuchen konnten keine positiven Effekte der Ultrafiltrationsanlage verzeichnet werden. Aufgrund der nicht überzeugenden Leistung und des enormen Arbeitsaufwandes, den der Betrieb einer solchen Ultrafiltrationsanlage mit sich bringt, erscheint diese Methode für die Praxis nicht geeignet zu sein. Als Alternative wurde aufgrund der Schwierigkeiten eine alternative Filtrationsanlage getestet, die nach dem Prinzip eines Trommelfilters funktionierte. Das Wasser wurde dabei über einen Filter mit einer Porengröße von 13µm gefiltert, was die größeren Entwicklungsstadien von *I. multifiliis* zurückhalten sollte. Nach Auswertung des Versuchs zeigte sich jedoch, dass in der Gruppe, deren Becken an den Trommelfilter angeschlossen war, deutlich mehr Parasiten auf der Haut nachzuweisen waren und der Trommelfilter eher einen negativen Effekt

auf die Parasitelast hatte. Dies könnte an der zu großen Porengröße der Membran liegen, die Parasiten möglicherweise nicht herausfiltern konnte. Die Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass die Parasitenlast durch den Trommelfilter erhöht wurde. Dies kann eventuelle auf eine Anreicherung der Parasitenstadien und ein gleichzeitiges Freisetzen einer großen Anzahl von Parasiten aus dem Filter zurückgeführt werden. Insgesamt schien die Filtration über einen Trommelfilter keine geeignete Möglichkeit zu sein, um den Befall mit *I. multifiliis* der Fische zu reduzieren. Aufgrund aller Ergebnisse der Filtrationsversuche wurde der Ansatz „Filtration“ in den Versuchen unter praxisnahen Bedingungen nicht weiter verfolgt.

Untersuchungen zur Transmissionsunterbrechung. Im Rahmen der vorliegenden Studie ist es gelungen, entscheidende Resultate zu bislang unbekanntem Transmissionsmechanismen zu erarbeiten. Diese waren insbesondere die Identifizierung von natürlichen Wirtskomponenten, welche den Schwärmerstadien als Erkennungs- und Invasionsstimuli dienen. Hiermit gelang ein international signifikanter wissenschaftlicher Durchbruch im Verständnis der Transmissionsbiologie von *I. multifiliis*. Die hervorragenden Möglichkeiten der Nutzung dieser Verhaltensweisen zur Transmissionsunterbrechung liegen auf der Hand. Insgesamt konnten drei Ansätze zur Transmissionsunterbrechung bis hin zur Durchführung von Challenge- und Semi-field-Tests verfolgt werden. Diese waren die Substratdispersion (Auslösen des Nahrungssuchverhaltens), das Abfangen an parasite trap-Prototypen (Festheftereaktion) und das Abfangen von abgehenden Trophonten mit Strukturen zum Festheften. Des Weiteren konnte eine Vielzahl an wertvollen, praxisrelevanten Erkenntnissen zur Thematik gewonnen werden.

Dementgegen war die Entwicklung und praktische Durchführung der Arbeiten mitunter schwierig und zahlreiche Ansätze mussten verworfen werden. Die Organisation und Etablierung einer routinemäßigen Trophonten-Beschaffung und die Optimierung der Anzuchtbedingungen ermöglichte zumeist ein stetiges Arbeiten mit den Parasiten. Ein Problem stellten dabei aber häufig Entwicklungsprobleme von encystierten Tomonten zu Tomiten und Theronten dar. Die Ursache für den Entwicklungs-Stopp zu gewissen Zeitpunkten nach mehrfacher Teilung bei vielen der Bodenstadien konnte nicht ermittelt werden. Zu beobachten war dabei meist eine Desintegration der Cystenwand, was z.B. durch bakterielle Zersetzung verursacht sein könnte. Aber auch bereits geschädigte Trophonten, welche sich nicht mehr festheften und encystieren konnten, wurden regelmäßig beobachtet. Hier kann eine Schädigung durch Komponenten im Wasser oder physiologische Beeinträchtigung bereits am Fisch nicht ausgeschlossen werden.

Versuchsbedingungen: Die verschiedenen Tests im Labor wurden in sehr kleinen wie auch in größeren Volumina bis hin zu Aquariengröße (15 L) durchgeführt. In Semi-field Ansätzen konnten Einheiten von 150 L bis hin zu der Größe von praxisüblichen Hälterungsrinnen genutzt werden. Der pH-Wert des verwendeten Wassers bei Laborversuchen lag zwischen 7,4 und 8,1, die Leitfähigkeit lag zwischen 755 und 820 μS . Theronten zeigten häufig begrenzte Vitalität in sehr sauberem Wasser, wohingegen verschmutztes bzw. stark belebtes Wasser (Aquarienwasser, Wasser mit hoher Dichte an Pro- und Eukaryoten) mitunter die natürlichen Reaktionen der Stadien unterband. Zu verwendende Theronten-Isolate mussten daher vorab im Medium inkubiert werden, um die Versuchsbedingungen optimal zu gestalten und evtl. auftretenden Vitalitätsverlust zu erkennen. Auffällig war im Zuge experimenteller Infektionen die stets sehr hohe Varianz der individuellen Befallsrate der Fische trotz angestrebter Gleichverteilung der Theronten.

Reaktionen der Theronten: In den Versuchsansätzen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass das Medium in dem sich die Theronten befinden entscheidend für die Chemoperzeption ist. Im Falle des Vorhandenseins von Stimuli (Fischhälterungswasser) war die Attachmentreaktion an attraktiven Substraten zugunsten eines gesteigerten Nahrungsverhaltens bzw. höherer Schwimmaktivität verringert. Generell konnte festgestellt werden, dass Theronten in Medium aus mit Fischen besetzten Aquarien geringere Attachmentraten zeigten als in völlig sauberem Wasser. Theronten reagierten nach Medienwechsel in weit größerer Zahl an der attraktiven Oberfläche und zeigten längere Verbleibperioden. Dies deutet darauf hin, dass die Wirtssignale von Theronten in Form eines perzipierbaren Konzentrationsunterschiedes zum umgebenden Medium als attraktiv wahrgenommen werden. Je mehr Fisch-Signale im Wasser sind, desto weniger gut können Theronten diese Gradienten detektieren. Dabei setzt nach gewisser Zeit ein Adaptationseffekt ein, woraufhin die Theronten in das gleichmäßig langsame Gleiten (Wartebewegung) übergehen. Höhere Konzentrationen an organischen Substanzen und Bakterienwachstum verhinderten die normalen Reaktionen auf Stimuli fast gänzlich. Damit existiert ein Zwiespalt in der Praxis zwischen der Erhöhung der Durchflussrate zum Abschwemmen der Schwärmer und der andererseits dadurch verbesserten Fähigkeit der Theronten in sauberem Wasser einen Wirt zu erkennen und sich an diesen festzuheften. Für eine erfolgreiche Transmission sind damit generell höhere Stimuli-Konzentrationen vonnöten, wenn hohe Besatzdichten bei geringer Durchflussrate für viel gelöste Wirtssignale im Wasser sorgen. Die Wahrscheinlichkeit einen Wirt zu finden steigt daneben aber mit höherer Besatzdichte durch die räumliche Komponente. In den Versuchen verließen die Theronten die attraktive BG-Oberfläche nach gewisser Zeit trotz Vorhandenseins des benötigten Penetrationsstimulus, was bedeutet, dass Verbleiben und Penetrationsversuche (Bohr- und Drehbewegungen) keine irreversiblen Reaktionen darstellen und diese Stimuli nicht hinreichend für das Entleeren der Mucocysten sind. Dabei hängt das Ablassen der Theronten augenscheinlich mit dem Verlust der wirksamen Stimuli am Substrat zusammen, da an frischem BG-Substrat sofort wieder zumindest ähnlich hohe Attachmentraten feststellbar sind und vorinkubiertes BG mit zunehmender Zeit unwirksam wird. Der Zusatz von MX zu BG verringert die Anhefterate in kleinen Volumina, da sich augenscheinlich mehr Nahrungstimuli im Wasser befinden und die BG-Oberfläche so in Relation unattraktiver wird. Hintergrund dabei ist nach unseren Erkenntnissen, dass es sich letztlich um dieselben Stimuli handelt. Der dennoch nicht unerhebliche Unterschied in der Attachmentrate bei Zugabe von K5 und K6 zu per se unwirksamen BG-Substraten im Vergleich zur hohen Attraktivität von BG 3 (und Beimengung von MX) impliziert jedoch das Vorhandensein weiterer Faktoren, welche die Attraktivität für das Festheften bedingen. Diese bleiben bis dato noch unbekannt.

Abfangen der Theronten: Dispersion von Stimuli: Unsere Ergebnisse aus den Laborversuchen bis hin zu den Behandlungstests in der Praxis zeigen, dass wir nur durch die Aktivierung des natürlichen Verhaltens der Theronten die Transmission in erheblichem Maß unterbinden können. Dabei werden die Schwärmer quasi „wirtsblind“ gemacht und ihrer Energiereserven beraubt. Die artifizielle Auslösung des Nahrungsverhaltens sorgt demnach dafür, dass die infektiösen Theronten-Stadien zur Ausübung sehr schneller Schwimmbewegungen aktiviert werden. Der fehlende Gradient zur Wirtsoberfläche bedingt, dass das gesamte die Parasiten umgebende Medium „zum Wirt“ wird. Hierdurch kommt es zu einer wesentlichen Verringerung erfolgreicher Invasionen der Wirtsoberfläche. Dies bietet den Fischen die Möglichkeit, durch die reduzierte Anzahl von Parasiten in dieser kritischen

Phase, nach einem gewissen Zeitraum einen stabilen Immunitätsstatus zu erlangen. Die Anwendbarkeit in der Praxis konnte im Verlauf der Studie erstmalig getestet und bestätigt werden. Durch Zugabe der aktivierenden Substratgemische MX und MY gelang die Validierung der Methodik. Die Identifizierung der wirksamen Stimuli machte die Anwendung der Reinsubstanzen K5 und K6 als Aktivierungskomponenten auch in der Praxis in Fischzuchtanlagen möglich. Theronten sind jedoch in der Lage, Nährstoffe aufzunehmen. Ekless und Matthews (1993) zeigten, dass Theronten in Eagles minimal essential medium (EMEM) bis zu fünf Tage überleben können. Hinsichtlich des Überlebens der Theronten musste getestet werden, ob diese evtl. durch Aufnahme der Substanzen eine längere Lebensspanne, und in diesem Fall eine verlängerte Infektiosität erreichen. Diese war jedoch laut der Ergebnisse mehrerer Testreihen nicht länger bei Zugabe der wirksamen Einzelkomponenten K5 und K6 als ohne diese.

Im Praxistest in Teichwirtschaft 1 konnte aufgrund des nicht optimierten Verfahrens noch kein verwertbares Resultat erzielt werden. Eine Tendenz der schnelleren Abnahme des Befalls in Hälterungsteichen war jedoch registriert worden. Daher galt es die Applikationsmethodik in Form einer per Dispenser zugetropften Lösung zu verbessern um Nebeneffekte wie zu starkes Wachstum von Bakterien zu unterbinden und einen effektiven Wirkstoffspiegel im System aufzubauen. Eine exakte Bemessung der AK-Zugabe basierend auf dem jeweiligen Zu- und Abfluss und der Abmessung des jeweiligen Systems ist dabei unerlässlich. In Teichwirtschaft 2 konnte so ein auch für den Betreiber sehr zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Es bedarf aber noch zusätzlicher Versuchsreihen in verschiedenen Systemen und mit Vorrichtungen zur einfacheren Dosierung und Applikation. Anzumerken ist an dieser Stelle auch die Sicherheit der Anwendung von AK, da es sich um ubiquitär vorhandene organische Moleküle handelt, die nicht nur völlig unschädlich, sondern auch schnell biologisch abbaubar sind. Die Anwendung kann voraussichtlich nach Bestätigung durch weitere Testreihen zur praktischen Validierung in zukünftigen Management- und Kontrollmaßnahmen solitär oder in Kombination auch in größeren Aquakultur-Systemen genutzt werden um die Reinfektionsrate langanhaltend und kontinuierlich signifikant zu reduzieren.

Abfangen der Theronten: Parasite traps: Fallenvorrichtungen zum Abfangen von Theronten in der Teichwirtschafts-Praxis konnten im Projekt noch nicht entwickelt werden. Die Entwicklung von Prototypen, die in kleineren Systemen effektiv waren ist jedoch geglückt. Dabei ist es gelungen, ein Substrat zu finden, an welchem sich Theronten in großer Zahl akkumulieren, und welches mittels Biozid-Zugabe in kurzer Zeit Theronten quantitativ abtöten kann. Neben der erfolgreichen Entfernung von Theronten in Volumina bis 250 ml durch Theronten-Fallen-Applikation konnte dies sowohl in Kleinaquarien und auch in Challenge-Versuchen mit Fischen fundiert nachvollzogen werden. Erst in größeren Volumina konnten die Fallen die Befallsraten nicht mehr reduzieren. Begründet wird dies dadurch, dass Theronten keine aktive Wirtssuche vollziehen, sondern mit nur sehr langsamen Schwimmbewegungen Energie sparen und sich somit nicht über längere Strecken akkumulieren lassen. Ein Problem der Fallen-Prototypen war auch, dass die Abfangschicht bei Inkubation in Wasser nach 4-6 h bereits unwirksam wurde und dadurch das Attachment nach Kontakt zunehmend ausbleibt. Die Zumischung von K5 machte die BG-Lockschicht dabei nicht attraktiver, es verlängert zudem auch die Wirksamkeitsdauer nicht. Daher waren die verwendeten Konstruktionen aus länglichen beschichteten Kunststoffplatten selbst bei Umwälzung des Wassers durch Belüftung letztlich ungeeignet für die Anwendung in größeren Volumina. Um dieses Problem zu lösen, müsste ein Prototyp entworfen werden, der durch langsames Ansaugen von Wasser die Theronten gezielt an Abfangoberflächen vorbeiführt. So kann prinzipiell eine große Wassermenge auch von vereinzelt Theronten in relativ

kurzer Zeit befreit werden. Im Rahmen des Vorhabens konnte dieser Prototyp aus Zeitmangel leider nicht mehr getestet werden.

Daneben sind für funktionierende Theronten-Fallen weitere Entwicklungsschritte notwendig. Ein Punkt, den es zu bearbeiten gilt, ist die Suche nach geeigneten bioziden Substanzen für die Anwendung der Fallen. Der Einsatz von Niclosamid bei Tieren die zur Nahrungsmittelerzeugung genutzt werden, ist in der EU verboten. Ob dies auch für die Wasserbehandlung bzw. den Einsatz in Parasitenfallen gilt ist derzeit unklar und bedarf weiterer Klärung. Es gilt nichtsdestotrotz, ein alternatives Biozid für diesen Ansatz zu finden. Wenngleich beide Substanzen im Grunde Potential zur Verwendung in Theronten-Fallen haben, ist die Anwendbarkeit von Chinin und Propolis derzeit noch nicht möglich. Hier gilt es, weiterführende Ansätze zur Verhinderung des Repellent-Effekts durch Maskierung zu entwickeln und entsprechende experimentelle Arbeiten auszuführen. Ebenfalls wichtig wäre, die BG 3-Locksicht für den Praxiseinsatz durch eine Oberfläche mit kovalent gebundenen oder nicht löslichen Attraktantien (gebundene Derivate von K5 und K6) zu versehen um die schwer handhabbare BG-Oberfläche zu ersetzen. Ziel muss dabei sein, dass Wirkstoffe nicht mehr ins Wasser abdiffundieren können. Somit sollte die Oberfläche mit den Wirkstoffen über einen längeren Zeitraum haltbar bleiben.

Gedacht ist dieser äußerst vielversprechende Ansatz v.a. für den Einsatz bei starkem Befall in kleineren Hälterungsbecken und Betonrinnen, wo ein stetiges Umsetzen der Fische nicht möglich ist. Hier kann das hohe Aufkommen an Theronten durch derartige Fallen effektiv verringert werden, bei der die Substratdispersion u.U. an ihre Grenzen bez. der Besatzdichte und Materialeinsatz stößt. In Kombination mit der hier beschriebenen Methode zum Abfangen der Trophonten wäre dies ein guter Management-Ansatz für intensivere Haltungssysteme, in denen auch die periodische Desinfektion durch Formalin oder oxidierenden Bioziden nur beschränkt eingesetzt werden kann. Dies wäre explizit im Sinne des Tierwohls und trüge zu einer ökologischeren Erzeugung bei.

Abfangen der Trophonten: Basis für das Abfangen vom Fisch abgehender Trophonten (= Protomont) ist deren Suche nach einer geeigneten Oberfläche zum Festheften und Cystenbildung, woraufhin die Teilung zu Tomiten stattfindet. Die entwickelten Matten mit dem von Trophonten bevorzugten Stoffmaterial, sollten dazu den Boden von Hälterungseinheiten möglichst flächig bedecken um einen guten Abfangeffekt zu erzielen. Die tägliche Entnahme und Trocknung sicherte das Abtöten der darauf festgehefteten Trophonten-Stadien. Die Tests der Vorrichtung im Semi-field Ansatz in Rinnen zeigten eine signifikante Abnahme an durch Reinfektion während des Behandlungszeitraums auf die Fische übergegangenen Parasitenstadien (Trophonten). Weitere Versuchsreihen mit allgemein höheren Befallsraten und zur weiteren Validierung wären angezeigt. In diesem Versuch befanden sich nach dem Behandlungszeitraum auf unbehandelten Fischen zwar signifikant mehr kleine Trophonten aus Reinfektion, jedoch im Mittel mehr große Trophonten. Dabei könnte die höhere Reinfektionsrate in den unbehandelten Einheiten eine schnellere Immunisierung und vorzeitiges Ablösen der reifen Trophonten bedingt haben. Bei infizierten Karpfen hatte sich gezeigt, dass sich die Parasiten innerhalb einer kurzen Zeitspanne von wenigen Stunden vorzeitig vom immunisierten Fisch ablösen (Cross & Matthews, 1992). Wenn dies auch bei Regenbogenforellen der Fall ist, dann könnte dies das vorliegende Ergebnis erklären.

Der Praxistest in Teichwirtschaft B war im Ergebnis sehr vielversprechend. Im befallenen Teich zeigte sich, dass durch die Anwendung der Vorrichtungen (Substratdispersion, Abfangmatten), die in der Anlage herrschende, durch starken Befall mit *I. multifiliis* hervorgerufene, hohe Mortalität unterbunden werden konnte. Die Tiere zeigten nach Anwendung lediglich einen leichten bis vereinzelt

auch mittleren Befall, was durchaus im Sinne einer effektiven Immunisierung ist. Hier bedeckten die Trophonten-Fallen jedoch nur einen vergleichsweise kleinen Teil des Teichbodens. Die Methodik könnte, neben Aufzucht- und Hälterungsbecken mit geringer Fläche (z.B. Rundbecken, Fließkanäle) auch in Aufzuchtteichen als akzessorische Maßnahme zur Transmissionsunterbrechung angewandt werden, was im Rahmen dieses Projektes leider nicht getestet werden konnte. In größeren Erdteichen ist die Anwendung dagegen wenig praktikabel. Zur Methodik fehlen letztlich noch weitere Studien.

Praktisch nicht verwertbare Resultate: Nach dem Festheften der Theronten am Wirt erfolgt die schnelle Sekretion eines klebrigen Inhalts aus den Mucocysten des Ciliaten. Diese Sekretionsreaktion konnte experimentell als notwendig für eine erfolgreiche Wirtsinvasion (Migration zur Basallamina) eingestuft werden (Erwing & Kocan 1992). Die Sezernierung dient vermutlich dazu, die Ziliaten am Wirt zu verankern und das Eindringen in die Epidermis durch proteolytische Prozesse zu erleichtern. Die Mucocystenreaktion war in der Studie als eine veritable Möglichkeit zur Transmissionsunterbrechung vorgesehen.

In den hierzu durchgeführten Versuchen stellte sich heraus, dass höhermolekulare Serumkomponenten die Mucocystenreaktion auslösen. Dies geschieht unabhängig von vorab perzipierten Signalen zum Festheften oder zur Penetration. Derartige Signale effektiv zu nutzen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht praktikabel, da es sich um komplexere Biomoleküle handelt, deren Herstellung vermutlich nicht möglich, oder mit hohen Kosten verbunden ist. Dies kann jedoch erst nach weiterem Forschungsaufwand festgestellt und bewertet werden. Da die Reaktion auch ohne Anheftung der Theronten an attraktiven Oberflächen ausgelöst wird, besteht die Möglichkeit einer Nutzung dieses Resultats. Die Möglichkeit der Kombination der Mucocystenreaktion und Festheften oder Penetration an Fallenoberflächen mit geeigneter Viskosität bzw. Strukturierung erscheint jedoch ebenso erfolgversprechend zur Reduktion der Parasiten und bliebe zu erforschen. Hierzu wären eingehende Tests nach Weiterentwicklung der Abfang-Locksicht durchzuführen.

Die Nutzung der Penetration der Theronten im Rahmen der Fallenentwicklung erwies sich trotz erstmaligem Nachweis der benötigten Stimuli ebenfalls als wenig praktikabel, da die Ciliaten nur in sehr viskoses Substrat eindringen konnten. Festere Oberflächen ließen mikroskopisch zwar andauernde Kriech-, Dreh- und Bohrbewegungen der Theronten erkennen, eine Penetration war jedoch nur oberflächlich oder an Rissen und Spalten im Substrat möglich. *I. multifiliis* Theronten nutzen u.a. die epidermalen Öffnungen (Mucusdrüsen) der Fische zum Eindringen in die Haut. Sie dringen auch in den Raum zwischen den Epithelzellen ein und verursachen die Ruptur der Zellen am Ort der Invasion (Erwing et al., 1985, 2007). Dies macht die Nutzung der Reaktion an BG-Oberflächen schwierig. Erste Versuche wurden begonnen diese entsprechend zu strukturieren, d.h. mit feinen Spalten zu versehen. Mikroskopisch betrachtet hatte dies in der Tat guten Erfolg, der positive Effekt konnte jedoch technisch bedingt noch nicht quantifiziert werden.

Weitere Nebenerkenntnisse: Als eine wissenschaftlich bedeutende Erkenntnis muss die Reaktion der Theronten nach Exposition mit Festheftesignalen an einer BG-Oberfläche unter gleichzeitiger Zugabe von verdünntem Fischserum betrachtet werden. Die Inkubation führte innerhalb von weniger als 30 min zur Transformation zu Trophonten (Abb. 55). Klare Indikatoren hierfür waren, neben der völligen Abrundung, die einsetzende typische permanente Rotation sowie eine schnelle Größenzunahme. Offenbar waren in diesem Experiment alle *in vivo* für die Transformation benötigten Wirtssignale präsent. Es ist anzunehmen, dass den Theronten nach Perzeption der Wirtsstimuli zum Anheften, Verbleiben, Penetrieren sowie Auslösung der Mucocystenreaktion durch das Serum die Lokalisation

im Fischgewebe signalisiert wird, wodurch diese Umstellung ausgelöst wird und die Theronten in das Nähr- und Wachstumsstadium ihres Zyklus übergehen.



Abbildung 55: Durch Inkubation im Experiment von Theronten zu Trophonten transformierte Stadien von *I. multifiliis*.

In ihrer Studie konstatierten Wei et al. (2013): „*One day when a medium formula is established which enables the theronts to develop to mature trophonts would be the day when in vitro culture succeeds*“. Dieser Entwicklungsschritt bildet die Basis für die Entwicklung zur Haltung von *I. multifiliis* in Kultur ohne Verwendung von Wirtsfischen oder Zellkulturen. Die Vermeidung von Fischinfektionen für Experimente wäre ein enormer Schritt für das Tierwohl und würde das Ausmaß der stattfindenden Forschung an dem Parasiten vermutlich stark vorantreiben. Die Entwicklung vom Theronten zum Trophonten gelang bisher nur Nielsen und Buchmann (2000) unter Verwendung von Zellkulturmedien, Serum und epithelialen Fischzellkulturen. In deren Studie dauerte die Transformation zum Trophonten jedoch zwei Tage bevor Abrundung und Wachstum einsetzte, was im vorliegenden Fall weniger als eine Stunde in Anspruch nahm. Dies ist vermutlich auf das Vorhandensein der natürlichen Festhefte- und Verbleibesignale, sowie der Stimulierung der Mucocystenreaktion in unseren Ansätzen zurückzuführen. Das wirksame BG 3 würde sich als artifizielles Medium gut eignen um die Verwendung von Zellkulturen zu umgehen, und könnte das Encystieren von Tomonten und Bildung von Tomiten ermöglichen. Im Rahmen des Vorhabens konnte dies jedoch nicht weiter untersucht werden. Der Ansatz sollte jedoch unbedingt weiter verfolgt werden, v.a. zur Identifikation der beteiligten Stimuli, Wachstum und Reifung der Stadien auf BG und der Entwicklung geeigneter Nährlösungen für die *in vitro* Produktion des Erregers nach vollständiger Reifung der Trophonten.

Für die Verwendung zur Bekämpfung erscheint der Ablauf der Reaktion auch aufgrund der beteiligten komplexen Stimuli aus heutiger Sicht nicht ad hoc verwertbar. Beim Wissen um die komplette Kaskade der nötigen Wirtssignale könnte dies dennoch ein vielversprechender Ansatz sein. In diesem Zusammenhang könnte sich die Entdeckung als wertvoll erweisen, da durch die artifizielle Auslösung der Transformation der Einsatz jeglicher Biozide in Parasitenfallen unnötig würde. Die Schwärmerstadien beginnen sich nach dem Festheften zu Trophonten zu entwickeln, und wären somit nicht mehr für Fische infektiös. Sie können sich aber in dem artifiziellem Umfeld nur kurz am Leben

halten. Voraussetzung hierfür wäre die Entwicklung einer geeigneten Penetrationsmatrix und das Wissen, welche Stimuluskombination aus dem natürlichen Substrat die Transformation hervorruft.

Impfungen gegen *I. multifiliis*. Es wurden unterschiedliche Impfstrategien getestet. Dabei kamen sowohl Vakzinen, die aus Bestandteilen von *I. multifiliis* als auch Vakzinen, die aus Bestandteilen von *Tetrahymena* sp. bestanden, zum Einsatz. Entgegen der Angaben in der Literatur führen die Impfpräparationen mit *Tetrahymena* sp. zu keiner Immunität der Fische gegen *I. multifiliis*. Es sollten in Zukunft noch einmal Untersuchungen mit formalinfixierten und lebenden Stadien von *Tetrahymena* sp. durchgeführt werden, um dieses Ergebnis abzusichern. Auch keiner der Ansätze, in denen i-Antigene von *I. multifiliis* verwendet wurden, führte zur Ausbildung einer Immunität bei den geimpften Fischen. Drei Impfansätze mit *I. multifiliis* erwiesen sich als sehr vielversprechend und führten unter kontrollierten Bedingungen zur Ausbildung einer Immunität bei den geimpften Fischen. Die Ansätze waren zum einen die i.p. Injektion von lebenden *I. multifiliis*, zum anderen die i.p. Applikation von formalininaktivierten *I. multifiliis* und zum dritten die Tauchbadimpfung in formalininaktivierten *I. multifiliis*. Die Tauchbadimpfung führte dabei nur zur Ausbildung einer Immunität, wenn die Fische zuvor in einem Ultraschallbad vorbehandelt wurden. Weder die Tauchbadimpfung ohne Vorbehandlung noch die Vorbehandlung der Fische mittels eines Dermarollers führte zur Ausbildung einer Immunität. Wir führen dieses Ergebnis darauf zurück, dass bei der Behandlung im Ultraschallbad nicht nur die Haut der Tiere, wie es bei der Behandlung mittels eines Dermarollers der Fall ist, beeinflusst wird, sondern ebenso die Kiemen. Dies deutet darauf hin, dass die Kiemen und nicht die Haut das entscheidende Organ zur Aufnahme des Impfstoffes darstellen und dass eine Vorbereitung der Kiemen auf die Impfstoffaufnahme der entscheidende Faktor bei den Tauchbadvakzinen ist. Dieses Ergebnis ist nicht nur bedeutend für die Impfung gegen *I. multifiliis*, sondern kann auch Optimierungsmöglichkeiten für die Aufnahme anderer Tauchbadvakzinen bieten.

Die Impfung lebender *I. multifiliis* per i.p. Injektion erwies sich unter Laborbedingungen zwar als wirksam, ist unter Praxisbedingungen aber kaum einsetzbar. Das Infektionsrisiko der Fische durch die Verwendung lebender Parasiten ist hoch und sollte nicht zwischen jedem Fisch die Kanüle gewechselt werden, kann es zu unbeabsichtigten Infektionen der Tiere führen. Aus diesem Grund wurde diese Impfstrategie im Praxisbetrieb nicht angewendet. Die Applikation formalininaktivierter *I. multifiliis* führte sowohl unter Laborbedingungen als auch unter Praxisbedingungen ebenfalls zur Ausbildung einer Immunität. Die Applikationsform ist allerdings deutlich aufwändiger und die Belastung für das einzelne Tier ist größer, als wenn über ein Tauchbad geimpft wird. In den Praxisversuchen stellte sich allerdings die i.p. Injektion als etwas wirksamer heraus. Dieses Ergebnis ist kritisch zu hinterfragen und sollte noch einmal mit einer größeren Stichprobe von Fischen überprüft werden, da zu berücksichtigen ist, dass in allen Versuchsgruppen im Praxisversuch mit Setzlingen über die Zeit sehr hohe Verluste auftraten. Somit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Daten durch diesen Umstand beeinflusst wurden.

In den Praxisversuchen war zu beobachten, dass alle Fische bereits relativ frühzeitig nach der Impfung, also auch vor vollständiger Ausbildung einer belastbaren Immunität mit *I. multifiliis* in Kontakt kamen und eine Infektion entwickelten. Um das volle Schutzpotential einer Impfung auszunutzen sollte darauf geachtet werden, dass nach einer Impfung genug Zeit vergeht, in der sich eine Immunität entwickeln kann, bevor die Fische dem Risiko einer Infektion ausgesetzt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Laborversuchen deuten darauf hin, dass hierfür ca. 350 Tagesgrade ausreichend sind.

Im Verlauf des Projektes stellte sich zudem heraus, dass nicht nur die eigentliche Bekämpfung von *I. multifiliis*, sondern auch schon die rasche und korrekte Diagnosestellung in Praxis nicht immer optimal gegeben ist. Ein Ansatz zur Verbesserung dieser Situation könnte durch die Versuche zur PCR abgeleitet werden. So zeigte sich, dass molekularbiologische Untersuchungen von Wasserproben aus Haltungseinrichtungen in denen *I. multifiliis* potentiell zu Problemen führen könnte, ein geeignetes Hilfsmittel sein könnten. *I. multifiliis* kann auch in geringen Mengen sicher nachgewiesen und, bei der von uns verwendeten Methode, auch quantifiziert werden. Dies könnte eine fischunabhängige rasche Diagnostik ermöglichen. Unseren Ergebnissen zufolge ist davon auszugehen, dass bei Nachweis ab $\times 10^4$ DNA-Kopien von *I. multifiliis* eine ggr.-migr. Infektion vorliegt. In so einem Fall sollten Gegenmaßnahmen ergriffen werden, um eine Ausbreitung der Ichthyophthiriose zu vermeiden und das Fortschreiten der Infektion einzudämmen und damit auch die gesundheitliche Belastung der Fische zu minimieren. Da in den Teichwirtschaften sehr viele Einflussfaktoren insbesondere auch bei den Krankheitsverläufen der Ichthyophthiriose zu bedenken sind, sollten hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Methodik abzusichern. Diese Methode sollte außerdem die Diagnostik am Fisch nicht ersetzen, könnte aber ergänzend zu einer Verbesserung beitragen.

Insgesamt wurden im Projekt AbiAqua äußerst vielversprechende Ergebnisse erzielt, die die Bekämpfungsmöglichkeiten von *I. multifiliis* in Teichwirtschaften deutlich verbessern können. Die entwickelten neuartigen Ansätze bieten klare Vorteile gegenüber dem direkten Einsatz von Bioziden, Desinfektionsmitteln und Therapeutika in der Speisefischproduktion. Sie sind ökologisch unbedenklich, äußerst ökonomisch für den Teichwirt und einfach in der Handhabung. Somit konnte ein wertvoller Beitrag zum Ausbau der ökologischen Produktion in Deutschland und zu einer Stärkung des Tierwohls in der Fischzucht geleistet werden.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Wir konnten zeigen, dass eine Kontrolle der Infektion mittels Transmissionsunterbrechung möglich ist. Hierfür wurde eine solide Basis aus weitreichenden experimentellen Daten geschaffen. Praktischer Nutzen und Anwendbarkeit zweier Ansätze (Substratdispersion, Trophonten-Fallen) sind durch Entwicklung bis zu ersten erfolgreichen Praxiseinsätzen erwiesen. Daneben sind weitere Methoden zur Transmissionsunterbrechung entwickelt worden, deren praktische Nutzbarkeit derzeit jedoch noch von einer Weiterentwicklung der erhaltenen Resultate in praxistaugliche Techniken abhängt.

Die vollständige Entfernung des Parasiten gilt in der Praxis als unmöglich. Ein ständiger Neueintrag stellt zudem ein Problem dar, ebenso wie die ständig ablaufende Neuproduktion infektiöser Stadien. Daher sind Ansätze, die lediglich darauf abzielen, möglichst umfassend zu einem bestimmten Zeitpunkt freilebende Parasitenstadien abzutöten in der Regel nicht hilfreich und letztlich unwirksam. Von größter Wichtigkeit ist es, im Sinne des Tierwohls die Fische im Bestand vor zu starker physiologischer Beeinträchtigung zu bewahren. Behandlungen bei einem ansteigenden Befall in unnatürlich eng besetzten Systemen sollten das Ziel haben, den Tieren die Entwicklung eigener Schutzmechanismen zu ermöglichen, wie das in der freien Natur geschieht. Dieser stellt den einzig wirksamen Schutz für das Überleben und ein gesundes Wachstum der Speisefische in gefährdeten Betrieben dar. Derartig ausgerichtete Ansätze sind nun erstmalig in praktisch verwertbarer Form entwickelt worden.

Während dem Verlauf des vorliegenden Projektes wurden Ergebnisse aus dem EU-Projekt ParaFishControl (634429) bezüglich in dessen Verlauf entwickelter Bekämpfungsansätze gegen Ichthyophthiriose veröffentlicht. Neben einem Vakzinierungsansatz wurde hierbei ein Saponin-ähnliches Lipopeptid bakteriellen Ursprungs (Al-Jubury et al. 2018) zur Bekämpfung der freilebenden Stadien patentiert und soll in rekombinant produzierter Form, oder *in vivo* durch direktes Einbringen von *Pseudomonas* sp. zukünftig praktische Anwendung finden. Der praktische Nutzen und die Effektivität der in diesem vorliegenden Projekt erhaltenen Bekämpfungsansätze können demgegenüber als bedeutend höher eingeschätzt werden, insbesondere wegen der ökonomischen und ökologischen Aspekte. Der immense Vorteil unserer Ansätze ist indes, anders als beim periodischen Einsatz toxischer Substanzen (Biozide, Desinfektionsmittel, Extrakte) durch Zugabe ins Wasser oder Badbehandlung der befallenen Fische, die Möglichkeit zur kontinuierlichen Reduktion infektiöser Stadien. Dies ist ein Schlüsselergebnis für die praktische Anwendung aufgrund der viel höheren, langfristigen Effektivität zur Reduktion des Befalls. Das in Folge ermöglicht eine anhaltende Autoimmunisierung der Fische unter geringster Mortalität bei unbedenklichem Einsatz in der Praxis. Die Kombination mit weiteren Maßnahmen zur Bekämpfung bietet sich an.

Die entwickelten Bekämpfungsmethoden können in Teilen als Folge der Studie nach einer rechtlichen Prüfung durch Fachbehörden direkt angewandt werden. Eine Zuordnung gemäß Biozidverordnung (EU) Nr. 528/2012, insbesondere die Klassifizierung für Repellents und Lockstoffe (Produktart 19), findet nach unserer Recherche keine Anwendung, da die Anwendung der chemischen Substanzen den gesetzlichen Regelungen für Lebensmittelzusatzstoffe und Futtermittel unterliegt. Dies muss jedoch im Rahmen der Zulassung noch eingehend geprüft werden. Die internationale Patentierung der entwickelten Methoden sowie deren Verwertung befindet sich derzeit in der fachlichen Prüfung.

Die Ergebnisse der Impfversuche sind ebenfalls sehr vielversprechend. Eine Impfung von Regenbogenforellensetzlingen gegen *I. multifiliis* ist mit relativ einfachen Mitteln möglich und reduziert signifikant die Befallsintensität der Fische. Aufgrund der möglichen Unterschiede im Serotyp

des Erregers wäre eine bestandsspezifische Impfung von Fischen eines Bestandes mit dem aus dem Bestand isolierten Erreger am sinnvollsten. Es besteht sowohl die Möglichkeit, den Fischen formalininaktivierte Erreger per intraperitonealer Injektion zu applizieren als auch ein Tauchbad in einer Lösung aus formalininaktivierten *I. multifiliis* durchzuführen. Für die Impfung über das Tauchbad ist die Vorbehandlung mittels Ultraschall notwendig, um eine optimale Aufnahme des Antigens zu erzielen. Beide Impfstrategien bieten in der Praxis Vor- und Nachteile. Zum einen müssen die Parasiten in beiden Fällen von infizierten Fischen gewonnen werden, da ein kompletter Laborzyklus bisher nicht aufrechterhalten werden konnte. Dafür sind natürlich infizierte Fische des Bestands notwendig, die nach Euthanasie als Spendertiere für den Erreger herangezogen werden können. Der formalininaktivierte Impfstoff kann jedoch über einen längeren Zeitraum gelagert werden, so dass nicht zwangsläufig direkt vor der erforderlichen Impfung Erreger gewonnen werden müssten. Sollen die Fische mit dem formalininaktivierten Impfstoff über eine i.p. Injektion geimpft werden, so erfordert das einen erhöhten Aufwand bei der Applikation des Impfstoffes. Jeder Fisch muss einzeln nach Sedierung geimpft werden. Da dies nicht vom Tierhalter selbst durchgeführt werden kann, müssen auf Fischimpfungen spezialisierte Personen hinzugezogen werden. Ein Tauchbad kann nach Einweisung durch den Tierarzt auch vom Tierhalter selbstständig durchgeführt werden, so dass diese Impfstrategie an sich einfach zu handhaben ist. Auch das Verwenden des Ultraschallbades ist vom technischen Aufwand her einfach, jedoch müsste ein solches Gerät zur Verfügung stehen. Für den praktischen Einsatz würde das bedeuten, dass entweder der Fischhalter selbst ein Gerät anschafft, dass bei jeder Impfung genutzt werden könnte, oder dass die Person, die die Impfungen durchführt, in der Regel sicherlich der betreuende Tierarzt, ein Ultraschallgerät mitbringt. Dies würde eine gründliche Reinigung und Desinfektion des Gerätes unabdingbar machen, da ansonsten die Gefahr der Übertragung von Infektionserregern zwischen den Teichwirtschaften bestehen würde.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

In der Bearbeitungszeit des Projektes AbiAqua konnten so gut wie alle geplanten Laborarbeiten und Versuchsreihen hinreichend bearbeitet und weitestgehend erprobt werden. Alle drei beantragten Projektphasen wurden gemäß dem Arbeitsplan unter Anpassung der Zeiträume durchgeführt. Im Projektteil Filterung wurden wie geplant Versuche mit der Ultrafiltrationsanlage durchgeführt. Da die Filtration beider Anlagen jedoch nach kurzen Zeiträumen bereits so gering war, dass kaum noch Wasser durch filtriert wurde und die Anlage aus Hannover schließlich durch Rostbildung ein Loch im Sammelbehälter aufwies, mussten die Versuche umdisponiert werden. Es wurde daher ein weiterer Versuch mit einem Trommelfilter, der eine größere Porengröße als die Ultrafiltrationsanlage aufwies, durchgeführt. Im Projektteil Transmissionsunterbrechung wurde im Gegensatz zum ursprünglich beantragten Arbeitsweg über die präparative Auftrennung und Analyse von Fischsubstraten nach der unerwarteten Entdeckung der Wirksamkeit von BG und Lebensmittelzusätzen die Ausrichtung der Arbeiten entsprechend angepasst. Die beantragten Teilaufgaben zum Projektteil Transmissionsunterbrechung wurden nach Umstellung der Strategie aufgrund der neuen Erkenntnisse in Gänze bearbeitet und positiv bewertete Ansätze konnten aufgrund der genehmigten Projektverlängerung in der Praxis erprobt werden. Im Projektteil Impfungen wurden alle Ansätze wie geplant durchgeführt und erfolgreich abgeschlossen.

Die Überführung der Laborergebnisse in praxisrelevante Methodenansätze konnte soweit möglich für das Gesamtprojekt durchgeführt werden. Somit konnten die geplanten Ziele weitgehend erreicht werden.

Folgende konkrete Fragestellungen sollten im Kooperationsprojekt AbiAqua laut Antragstellung beantwortet werden:

1. Kann durch alternative Bekämpfungsstrategien eine effektive Bekämpfung von *I. multifiliis* in der Fischproduktion erzielt werden?
2. Kann die Menge freischwimmender Verbreitungsstadien von *I. multifiliis* durch Ausnutzung der chemischen Wirtssignale in Kombination mit mechanischer Entfernung effektiv reduziert werden?
3. Kann eine gut verträgliche Vakzine mit Antigen-Aufnahme über die Haut bei Jungfischen wirksam gegen Infektionen mit *I. multifiliis* eingesetzt werden?
4. Welche Maßnahmen und kombinierte Methoden sind für ein innovatives, ökologisch orientiertes Behandlungsschema effektiv, das weder die Umwelt belastet, noch das Tierwohl gefährdet?

Die erste Frage kann mit einem ja beantwortet werden. Drei verschiedenen Impfstrategien führten nach einer induzierten Infektion erwiesenermaßen zu einer reduzierten Befallsintensität mit *I. multifiliis* auf der Haut von Regenbogenforellensetzlingen im Vergleich zum Befall von ungeimpften Kontrollfischen. Zudem erwiesen sich Ansätze der Transmissionsunterbrechung als sehr erfolgversprechend. Frage zwei kann aufgrund der erzielten Ergebnisse ebenfalls mit ja beantwortet werden. Die dritte Frage kann ebenfalls eingeschränkt mit ja beantwortet werden. Eine für Setzlinge

von Regenbogenforellen gut verträgliche Vakzine, die nach Vorbehandlung mittels Ultraschall zu einer Antigen-Aufnahme führte, konnte im Rahmen des Projektes entwickelt werden. Ob die Aufnahme des Antigens dabei in erster Linie über die Haut oder eher über die Kiemen, die durch das Ultraschallbad ebenfalls beeinflusst werden, stattfindet, konnte im Rahmen des Projektes nicht eindeutig geklärt werden, ist aber auch irrelevant für das Ergebnis. Zu Frage 4 kann zusammengefasst werden, dass sowohl die Impfung als auch die Transmissionsunterbrechung als praxisrelevante Methoden nach weiteren Untersuchungen in Frage kommen können. Eine Kombination der Verfahren könnte die Effektivität der Bekämpfung des Parasiten zudem erhöhen.

Zum Bereich Transmissionsunterbrechung existieren aber noch weiterführende Fragestellungen und Bearbeitungsschritte zu einzelnen Bereichen, wie im Text bereits näher erläutert. Diese bedürfen einer weiteren Bearbeitung und sollen im Folgenden stichpunktartig aufgegriffen werden:

- Identifikation der zusätzlich in BG 3 stimulierenden Komponenten durch Laborexperimente
- Identifikation der im Serum enthaltenen Stimuli zur Transformation von Theronten zu Trophonten
- Weitere Feldexperimente in Praxisbetrieben um die etablierten Methoden zu optimieren und marktfähig zu machen
- Versuchsreihen zur AK-Dispersion in verschiedenen Systemen und Bau von Vorrichtungen zur einfacheren Dosierung und Applikation je nach Durchflussrate; Erstellung eines praktisch ausgerichteten Dosierungsschemas
- Weiterentwicklung der Theronten-Fallen: Ersatz für BG-Locksicht (Entwicklung eines alternativen Attachmentsubstrats für den Praxiseinsatz), Screening auf wirksame Reinsubstanz-Analoga, chemische Bindung der Stimuli an Fallenoberfläche, Test neuer Prototypen mit Ansaugvorrichtung, Validierung der Effizienz in Semi-field und Praxis-Systemen
- Screening nach ökologisch vertretbaren und zulassungskonformen Bioziden für den Praxiseinsatz in Theronten-Fallen (z.B. Pflanzenextrakte)
- Optimierung der Konstruktion der Trophonten-Fallen und Replikation von Tests in weiteren Hälterungssystemen in der Praxis

Bevor die Impfung von Fischen gegen *I. multifiliis* in größerem Maßstab durchgeführt werden kann, sollten noch weitere Fragestellungen geklärt werden. Auf Dauer wäre eine Produktion des Impfstoffes ohne die Notwendigkeit auf natürlich infizierte Fische als Lieferanten des Erregers zurückzugreifen, optimal. Dies würde eine weitere Bearbeitung und Optimierung eines Laborzyklus voraussetzen. Nur wenn es gelingt, über einen Laborzyklus *I. multifiliis* einfach und schnell in großen Mengen zu produzieren, käme zum Beispiel eine kommerzielle Herstellung der Vakzine in Frage. Es ist allerdings fraglich, ob dieser obligate Parasit ohne den lebenden Wirt überhaupt über einen längeren Zeitraum in der Kultur vermehrt werden kann. Weitere Fragestellungen sind die Dauer des Impfschutzes und in diesem Zusammenhang das Impfregime. Es sollte geklärt werden, wann der beste Zeitpunkt der Erstimmunisierung von Fischen in belasteten Teichwirtschaften ist. Möglich wäre hier zum Beispiel eine Impfung der Fische, sobald sie aus dem Bruthaus hinaus in die Teiche gesetzt werden. Die Dauer der Immunität bestimmt die mögliche Notwendigkeit einer Reimmunisierung. Auch hier müsste überprüft werden, ob und nach welchem Zeitraum die Fische erneut geimpft werden müssten, um nach Möglichkeit über die gesamte Mastperiode einen Impfschutz aufrecht zu erhalten.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projekts AbiAqua ist es gelungen, mehrere neue alternative Strategien zur Bekämpfung der Ichthyophthiriose v.a. in der Salmonidenaufzucht zu entwickeln. Zum einen wurden Methoden der Transmissionsunterbrechung erfolgreich durchgeführt, zum anderen erwiesen sich zwei Impfstrategien als sehr vielversprechend.

Das Ziel der neuen Ansätze der Transmissionsunterbrechung ist eine effektive Verringerung der Parasitenlast um Mortalität im Bestand zu vermeiden und den Populationen die Möglichkeit zur langfristigen Immunisierung zu geben. Grundlage hierfür bildete die erstmalige Identifizierung der chemischen Stimuli, welche die infektiösen *Ichthyophthirius multifiliis* Theronten zur Wirtsfindung und Wirtserkennung nutzen. Die spezifischen Reaktionen ließen sich dazu nutzen, die Schwärmer mittels natürlicher Substanzen zu ungerichtetem Wirtsfindeverhalten zu stimulieren und sie über deren Erkennungsreaktionen in Wirtsnähe auch an Oberflächen abzufangen. Daneben konnte mittels andauernder Aktivierung und dem damit erhöhten Energieverbrauch der Erregerstadien, das Zeitfenster in dem diese einen neuen Wirt aufgesucht haben müssen, entscheidend verkürzt und die Wirtsinvasion quantitativ minimiert werden. *I. multifiliis* Schwärmer zeigten nach Zugabe von Aktivierungskomponenten ins Wasser eine verminderte Fähigkeit zur Wirtserkennung. Eine signifikant erhöhte Mortalität der Transmissionsstadien konnte dabei sowohl durch Zugabe von Reinsubstanzen als auch durch Abfangen auf speziellen Fallen-Prototypen erzielt werden. Vom Fisch abgehende Stadien konnten zudem durch eigens entwickelte Abfangmatten wirkungsvoll entfernt werden. Tests unserer im Labor entwickelten Methoden zeigten die Anwendbarkeit in Hälterungseinheiten unter kontrollierten experimentellen Bedingungen, wie auch im Praxisbetrieb.

Die Impfung über eine Tauchbadvaccine mit formalininaktivierten *I. multifiliis* nach Vorbehandlung der Fische in einem Ultraschallbad und die Impfung durch eine intraperitoneale Injektion formalininaktivierter *I. multifiliis* erwiesen sich als wirksam. Es konnte demnach ein System entwickelt werden, das die Aufnahme des Impfstoffes über die Haut verbessert und so zu signifikant besseren Impferfolgen führt.

Die im Rahmen dieses Projektes entwickelten neuartigen Ansätze bieten klare Vorteile gegenüber dem direkten Einsatz von Bioziden, Desinfektionsmitteln und Therapeutika in der Speisefischproduktion. Sie sind ökologisch unbedenklich, äußerst ökonomisch für den Teichwirt und einfach in der Handhabung. Somit konnte durch die Entwicklung neuer Ansätze zur Eindämmung der wichtigsten Parasitose in der Aquakultur ein wertvoller Beitrag zum Ausbau der ökologischen Produktion in Deutschland und zu einer Stärkung des Tierwohls in der Fischzucht geleistet werden.

9 Literaturverzeichnis

- Alishahi M, Buchmann K (2006) Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms* 72:269-273
- Al-Jubury, A., Lu, C., Kania, P.W., Jørgensen, L. v. G., Liu, Y., de Bruijn, I., Raaijmakers, J., Buchmann, K. (2018): Impact of Pseudomonas H6 surfactant on all external life cycle stages of the fish parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases* 41: 1147-1152
- Baur WH, Bräuer G, Rapp J (2010) Nutzfische und Krebse - Lebensraum, Erkrankungen und Therapie, Vol. Enke Verlag, Stuttgart
- Buchmann K, Jensen PB, Kruse KD (2003) Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *In vitro* experiments. *N Am J Aquacult* 65:21-24
- Buchmann K, Nielsen ME (1999) Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. *Int J Parasitol* 29:1415-1423
- Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M (2001) Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet Parasitol* 100:105-116
- Cobo Labarca, C., Makhutua, M, Lumsdon, AE, Thompson, KD, Jung, R, Kloas, W, Knopf, K (2015) The adjuvant effect of low frequency ultrasound when applied with an inactivated *Aeromonas salmonicida* vaccine to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 33(11): 1369–1374
- Coyne RS, Hannick L, Shanmugam D, Hostetler JB, Brami D, Joardar VS, Johnson J, Radune D, Singh I, Badger JH, Kumar U, Saier M, Wang YF, Cai H, Gu JY, Mather MW, Vaidya AB, Wilkes DE, Rajagopalan V, Asai DJ, Pearson CG, Findly RC, Dickerson HW, Wu M, Martens C, Van de Peer Y, Roos DS, Cassidy-Hanley DM, Clark TG (2011) Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. *Genome Biol* 12
- Cross M. L., Matthews, R.A. (1992): *Ichthyophthiriasis* in carp, *Cyprinus-carpio* L. - Fate of parasites in immunized fish. *Journal of Fish Diseases* 15: 497-505
- Dickerson HW, Brown J, Dawe DL, Gratzek JB (1984) *Tetrahymena pyriformis* as a protective antigen against *Ichthyophthirius multifiliis* infection: comparisons between isolates and ciliary preparations. *J Fish Biol* 24(5):523–528
- Dickerson HW, Findly RC (2014) Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: A synopsis. *Dev Comp Immunol* 43:290-299
- Ekless, L.M. & Matthews, R.A. (1993): *Ichthyophthirius multifiliis*: axenic isolation and short-term maintenance in selected monophasic media. *Journal of Fish Diseases* 16, 437– 447
- Ewing, M., Kocan, K. & Ewing, S. (2007): *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) Invasion of gill epithelium 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 32: 305 - 310
- Ewing, M.S., Kocan, K. & Ewing, S. (1985): *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium. *Journal of Protozoology* 32: 305–310
- Erwing MS, Kocan KM (1992) Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish. *Parasitology Today* 8:204-208
- Haas W, Haberl B, Hofmann M, Kerschensteiner S, Ketzer U (1998) Theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* find their fish hosts with comple behaviour patterns and in response to different chemical signals. *Tokai J Exp Clin Med* 23:329-331

- Haas W, Haberl B, Hofmann M, Kerschensteiner S, Ketzer U (1999) *Ichthyophthirius multifiliis* invasive stages find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. Eur J Protistol 35:129-135
- Heinecke RD, Buchmann K (2009) Control of *Ichthyophthirius multifiliis* using a combination of water filtration and sodium percarbonate: Dose-response studies. Aquaculture 288:32-35
- Hofmann M (1995) Wirkung von Wirtsfaktoren und physikalischen Reizen auf das Verhalten von Theronten des Fischparasiten *Ichthyophthirius multifiliis*. Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg
- Jørgensen LV (2017): The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* – Host immunology, vaccines and novel treatments. Fish & Shellfish Immunology 67: 586-595
- Jørgensen LV, Heinecke RD, Skjodt K, Rasmussen KJ, Buchmann K (2011) Experimental evidence for direct in situ binding of IgM and IgT to early trophonts of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 34:749-755
- Jørgensen LV, Nemli E, Heinecke RD, Raida MK, Buchmann K (2008) Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*. Diseases of Aquatic Organisms 80:189-197
- Jørgensen, L. v. G., Kania, P.W., Rasmussen, K.J., Mattsson, A. H., Schmidt, J., Al-Jubury, A., Sander, A., Salanti, A., Buchmann, K. (2017): Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response towards a recombinant vaccine targeting the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Journal of Fish Diseases 40:1815-1821
- Kerschensteiner S (1997) Verhalten der Fischparasiten *Ichthyophthirius multifiliis* und *Sanguinicola* sp. am Wirt. Diplomarbeit, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
- Ketzer U (1997) Einfluss des Wirtes auf das Schwimmverhalten bei den Fischparasiten *Ichthyophthirius multifiliis* und *Sanguinicola* sp. Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg
- Labarca CC, Makhutu M, Lumsdon AE, Thompson KD, Jung R, Kloas W, Knopf K (2015) The adjuvant effect of low frequency ultrasound when applied with an inactivated *Aeromonas salmonicida* vaccine to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vaccine 33:1369-1374
- Lom J, Cerkasova (1974) Host-Finding in Invasive Stages of *Ichthyophthirius-Multifiliis*. J Protozool 21:457-457
- Navot N, Sinyakov MS, Avtalion RR (2011) Application of ultrasound in vaccination against goldfish ulcer disease: a pilot study. Vaccine 29:1382-1389
- Nielsen CV, Buchmann K (2000) Prolonged *in vitro* cultivation of *Ichthyophthirius multifiliis* using an EPC cell line as substrate. Diseases of Aquatic Organisms 42:215-219
- Olsen MM, Kania PW, Heinecke RD, Skjoedt K, Rasmussen KJ, Buchmann K (2011) Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: Molecular and immunohistochemical studies. Fish Shellfish Immun 30:859-869
- Plant KP, LaPatra SE (2011) Advances in fish vaccine delivery. Dev Comp Immunol 35:1256-1262
- Schumacher IV, Wedekind H, El-Matbouli M (2011) Efficacy of quinine against ichthyophthiriasis in common carp *Cyprinus carpio*. Diseases of Aquatic Organisms 95:217-224
- Sigh J, Buchmann K (2002) Comparative analysis of cross-reactivity between *Ichthyophthirius* and *Tetrahymena*. Bull Eur Assn Fish P 22:37-44
- Sigh J, Lindenstrom T, Buchmann K (2004a) Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellfish Immun 17:75-86

- Sigh J, Lindenstrom T, Buchmann K (2004b) The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 27:409-417
- von Gerssdorf Jørgensen L, Nemli E, Heinecke RD, Raida MK, Buchmann K (2008) Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*. Diseases of Aquatic Organisms 80:189-197
- Wahli T, Meier W, Schmitt M (1991) Affinity of *Ichthyophthirius-Multifiliis* Trophonts to Light and or Fish. J Appl Ichthyol 7:244-248
- Wang XT, Dickerson HW (2002) Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Clin Diagn Lab Immun 9:176-181
- Wei, J., Li, H. Yu, H. (2013): Ichthyophthiriasis: Emphases on the epizootiology. Letters in Applied Microbiology 57: 91-101
- Wohllebe S, Richter P, Häder D-P (2012) Chlorophyllin for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). Parasitology Research 11102:729-733
- Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA (2009) Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellfish Immun 26:614-618

10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Während der Laufzeit des Projektes wurden Teile der Ergebnisse bereits im Rahmen verschiedener wissenschaftlichen Tagungen und nationalen sowie internationalen Fortbildungsveranstaltungen vorgestellt. Dabei wurden die Ergebnisse entweder in Form eines Vortrags oder in Form eines wissenschaftlichen Posters präsentiert. Zudem wurden zwei Artikel in Zeitschriften veröffentlicht.

Folgende **Artikel** wurden in Zeitschriften veröffentlicht:

- **„Die Ichthyophthiriose - ein Überblick“** (Marcus Zielasko, Gregor Schmidt), 2019, Fischer & Teichwirt, 70(6): 211-212.
- **„Entwicklung alternativer, ökologisch unbedenklicher, effektiver und für Fische gut verträglicher Bekämpfungsstrategien gegen den Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Einsatz von Therapeutika in Forellenhaltungen (AbiAqua)“** (Marcus Zielasko, Gregor Schmidt), 2017, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft Institut für Fischerei, Jahresbericht 2017: 23-24.

Folgende **Vorträge** zu Teilergebnissen des Projektes wurden gehalten:

- **„Aktuelle Forschung zu bekannten und neuen Gefahren für die Forellengesundheit (*I. multifiliis* und andere)“** (Felix Teitge, Franziska Hack, Verena Jung-Schroers, Dieter Steinhagen), Info-Veranstaltung für Fischzüchter in NRW, Albaum-Kirchhundem, 06.03.2018
- **„Alternative Behandlungsmöglichkeiten gegen *Ichthyophthirius multifiliis*“** (Felix Teitge, Franziska Hack, Verena Jung-Schroers, Dieter Steinhagen), Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Fischgesundheits- und Fischseuchenbekämpfungsdienste, Stendal, 15.-16.05.2018
- **„Influence of a Nanofiltration - Reactor on the Bacterial Microflora and on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts in Recirculating Aquaculture Systems“** (Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek, Angela Boley, Julia Bauer, Anna Korshun, Felix Teitge, Franziska Hack, Dieter Steinhagen), 8th International Symposium on Aquatic Animal Health, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, 03.-06.09.2018
- **„Entwicklung alternativer Bekämpfungsstrategien gegen *Ichthyophthirius multifiliis*“** (Felix Teitge, Franziska Hack, Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek, Marcus Zielasko, Gregor Schmidt, Helmut Wedekind, Christina Loy, Dennis Kallert, Dieter Steinhagen), XVII. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektionen der European Association of Fish Pathologists (EAFP), Fribourg Schweiz, 03.-05.10.2018

- **“Projekt AbiAqua (Alternative Behandlungsstrategien Ichthyo)”** (Verena Jung-Schroers, Felix Teitge, Franziska Hack, Dieter Steinhagen), Treffen des Niedersächsischen Fischereiverbands, 29.01.2019
- **„Neue Ansätze zur Bekämpfung der Ichthyophthiriose“**, (Marcus Zielasko), Fortbildung für den Qualifizierten Dienst des Tiergesundheitsdienst Bayern e. V., Abteilung Fischgesundheitsdienst, 09.07.2019
- **„Die Ichthyophthiriose: Ein Resümee über eine der gravierendsten Parasitenerkrankungen in der Teichwirtschaft“** (Marcus Zielasko), Bayerische Tierärztetage, 01.06.2019
- **“Influence of a Nanofiltration - Reactor on the Bacterial Microflora and on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts in Recirculating Aquaculture Systems”** (Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek, Angela Boley, Julia Bauer, Anna Korshun, Felix Teitge, Franziska Hack, Dieter Steinhagen), 19th International EAFP Conference, Porto, Portugal, 09.09-12.09.2019

Folgende **wissenschaftliche Poster** wurden zu Teilergebnissen des Projektes erstellt und präsentiert:

- **“Development of alternative, ecologically safe, effective and Well-tolerated control strategies against *Ichthyophthirius multifiliis*”** (Verena Jung-Schroers, Dennis M. Kallert, Felix Teitge, Marcus Zielasko, Christina Loy, Gregor Schmidt, Helmut Wedekind, Dieter Steinhagen), 19th International EAFP Conference, Porto, Portugal, 09.09-12.09.2019
- **“Transmission interruption of the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* as an alternative, non-therapeutic control method”** (Dennis M. Kallert, Marcus Zielasko, Christina Loy, Felix Teitge, Gregor Schmidt, Verena Jung-Schroers, Dieter Steinhagen, Helmut Wedekind), Aquaculture Europe 19, Berlin, 08.10.-10.10.2019
- **“Fighting the parasitic challenge in modern fish farms: Alternative reduction strategies against *Ichthyophthirius multifiliis*”** (Felix Teitge, Verena Jung-Schroers, Christina Loy, Dennis M. Kallert, Marcus Zielasko, Gregor Schmidt, Helmut Wedekind, Dieter Steinhagen), Aquaculture Europe 19, Berlin, 08.10.-10.10.2019
- **“Influence of a Nanofiltration - Reactor on the Bacterial Microflora and on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts in Recirculating Aquaculture Systems”** (Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek, Angela Boley, Julia Bauer, Anna Korshun, Felix Teitge, Franziska Hack, Dieter Steinhagen), Aquaculture Europe 19, Berlin, 08.10.-10.10.2019