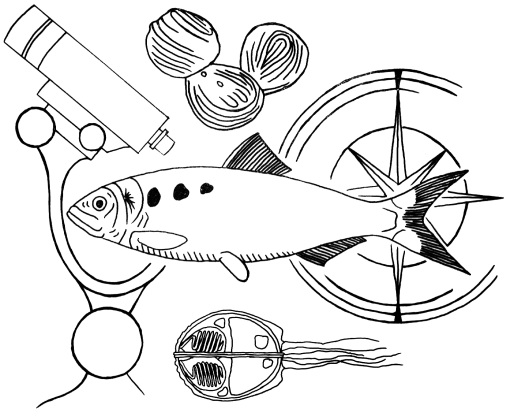
Hannah Wünnemann

Diagnostik von Infektionserregern und Beschreibung einer neuen Parasitenart (*Hoferellus alosae* species nova) als Beitrag zum Artenschutz von Maifischen im Rahmen des EU-Life+ Projekts *„Alosa alosa“*



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Michael Lierz

DIAGNOSTIK VON INFEKTIONSERREGERN UND BESCHREIBUNG EINER NEUEN PARASITENART (*HOFERELLUS ALOSAE* SPECIES NOVA) ALS BEITRAG ZUM ARTENSCHUTZ VON MAIFISCHEN IM RAHMEN DES EU-LIFE+ PROJEKTS „*ALOSA ALOSA*“

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Hannah Wünnemann

Tierärztin aus Dortmund

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Lierz

Prof. Dr. C. Hermosilla

Tag der Disputation: 24. August 2018

Meiner Familie und Florian

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht:

WÜNNEMANN H., BERGMANN S. M., ESKENS U., SCHARBERT A., HUNDT M., LIERZ M. (2016): First report of a cystic malformation on the upper jaw of hatchery-reared allis shad *Alosa alosa.* Journal of Fish Diseases 40(1), 1-10 (DOI:10.1111/jfd.1248)

WÜNNEMANN H., HOLZER A. S., PECKOVÁ H., BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ P., ESKENS U., LIERZ M. (2016): Repatriation of an old fish host as an opportunity for myxozoan parasite diversity: The example of the Allis shad in the Rhine. Parasites and Vectors 9.1: 505 (DOI: 10.1186/s13071-016-1760-6)

WÜNNEMANN H., ESKENS U., PRENGER-BERNINGHOFF E., EWERS C., EISENBERG T., LIERZ M. (2018): *Lactococcus lactis,* causative agent of an endocarditis valvularis and parietalis thromboticans in allis shad. Journal of Fish Diseases 41(8), 1207-1215 (DOI: 10.1111/jfd.12813)

WÜNNEMANN H., ESKENS U., PRENGER-BERNINGHOFF E., EWERS C., EISENBERG T., BERGMANN S. M., HOLZER A., TAUBERT A., HERMOSILLA C., LIERZ M. (2018): Infectious diseases as potential threats for the conservation program of endangered allis shad from the Gironde-Garonne-Dordogne-system and the Rhine. In Vorbereitung.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Vortrag präsentiert beziehungsweise in Tagungsbänden von Fachkongressen veröffentlicht:

WÜNNEMANN H., ESKENS U., BERGMANN S. M., PRENGER-BERNINGHOFF E., EWERS C., EISENBERG T., HOLZER A. S., THINES M., TAUBERT A., SCHARBERT A., NILZ J., LIERZ M. (2014): Diagnostik von Infektionserregern als Beitrag zum Artenschutz von Maifischen im Rahmen des EU-LIFE+ Projekts „*Alosa alosa*“. Vortrag* auf der XV. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP), Starnberg, 9. Oktober 2014
***Ausgezeichnet mit dem Wilhelm-Schäperclaus-Förderpreis**

WÜNNEMANN H., ESKENS U., BERGMANN S. M., PRENGER-BERNINGHOFF E., EWERS C., EISENBERG T., HOLZER A. S., THINES M., TAUBERT A., SCHARBERT A., NILZ J., LIERZ M. (2015): Identification of infectious diseases and their relevance for the conservation of Allis shads within the EU-LIFE+ project "*Alosa alosa*". Vortrag im Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, 2. Juli 2015.

WÜNNEMANN H., ESKENS U., BERGMANN S. M., PRENGER-BERNINGHOFF E., EWERS C., EISENBERG T., HOLZER A. S., THINES M., TAUBERT A., SCHARBERT A., NILZ J., LIERZ M. (2016): Diagnostik von Infektionserregern als Beitrag zum Artenschutz von Maifischen im Rahmen des EU-LIFE+ Projekts „*Alosa alosa*“. Vortrag auf dem Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Fischgesundheits- und Fischseuchenbekämpfungsdienste, Gießen, 9. Mai 2016.

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 3

2.1 Der Maifisch 3
2.1.1 Systematik 3
2.1.2 Biologie 3
2.1.3 Lebenszyklus 4
2.1.4 Ursprüngliches Verbreitungsgebiet, Bestandsentwicklung und Gefährdungsstatus 6
2.2 Die LIFE-Projekte 8
2.3 Die Bedeutung von Infektionserregern in Wiederansiedlungsprojekten 13
2.4 Infektionserreger bei Maifischen und verwandten Arten 16
2.4.1 Bakterielle Infektionserreger 16
2.4.2 Mykotische Infektionserreger 20
2.4.3 Virale Infektionserreger 23
2.4.4 Parasitäre Infektionserreger 29
2.5 Der Einfluss der Wasserqualität auf die Fischgesundheit 35
2.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung 36

3 Material und Methoden 38

3.1 Material 38
3.1.1 Maifische 38
3.1.2 Wasserproben 44
3.1.3 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte 44
3.2 Methoden 45
3.2.1 Sektionsgang und pathologisch-anatomische Untersuchung 45
3.2.2 Berechnung des gonadosomatischen Index 48
3.2.3 Histologische Untersuchung 48

3.2.4 Bakteriologische Untersuchung 49
3.2.5 Mykologische Untersuchung 53
3.2.6 Virologische Untersuchung 53
3.2.7 Parasitologische Untersuchung 61
3.2.8 Untersuchung von Wasserparametern 65

4 Ergebnisse 66

4.1 Mortalität 66
4.1.1 Maifischprojektanlage, Wildpopulation, Bruch, Frankreich 66
4.1.2 Maifischzuchtanlage, Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland 67
4.2 Befunde der pathologisch-anatomischen Untersuchung 68
4.2.1 Geschlecht, Länge und Körpermasse untersuchter Maifische 68
4.2.2 Gonadosomatischer Index 70
4.2.3 Sektion 71
4.3 Befunde der histologischen Untersuchung 75
4.3.1 *Endocarditis valvularis et parietalis thromboticans* 76
4.3.2 Granulomatöse Entzündung 80
4.3.3 Pathologische Veränderungen durch mittellange Stäbchenbakterien ohne granulomatöse Reaktion 82
4.3.4 Meningitiden und Enzephalitiden 83
4.3.5 Epitheliocystis 85
4.3.6 Mykose 86
4.3.7 Parasitär-bedingte Branchitis 88
4.3.8 Parasitär-bedingte, pathologische Veränderungen der inneren Organe 90
4.3.9 Gonaden adulter Maifische 95
4.3.10 Malformationen bei Maifischen der Zuchtpopulation 95
4.4 Befunde der bakteriologischen Untersuchung 97
4.5 Befunde der mykologischen Untersuchung 103

4.6 Befunde der virologischen Untersuchung 106
4.6.1 Anzucht 107
4.6.2 Molekularbiologische Untersuchungen (PCR) 107
4.6.3 Blutausstriche 107
4.7 Befunde der parasitologischen Untersuchung 108
4.7.1 Ektoparasiten 108
4.7.2 Endoparasiten in der Leibeshöhle 111
4.7.3 Endoparasiten des Gastrointestinaltrakts 113
4.7.4 Neue *Myxozoa*-Spezies 116
4.7.5 Blutausstriche 119
4.8 Wasserparameter 120
4.8.1 Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich 120
4.8.2 Maifischzuchtanlage in Aßlar, Deutschland 121

5 Diskussion 122

5.1 Geschlecht, Länge und Körpermasse untersuchter Maifische 122
5.2 Prävalenzen, Pathogenität und mögliche Infektionsquellen nachgewiesener Infektionserreger 124
5.3 Bedeutung der nachgewiesenen Infektionserreger für das Wiederansiedlungsprojekt 151
5.4 Malformationen bei Maifischen der Zuchtpopulation 160

6 Schlussfolgerung 161

7 Zusammenfassung 164

8 Summary 166

9 Literaturverzeichnis 168

10 Anhang 212

Anhang I: Literaturverzeichnis über Infektionserreger bei Maifischen 212

Anhang II: Koordinaten der Fangorte der verwendeten Maifische 217

Anhang III: Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte 218

III. I Reagenzien und Verbrauchsmaterialien 218

III.II Nähr- und Selektivmedien.....227

III.III Liste der bei den Untersuchungen verwendeten Geräte 229

III.IV Software.....232

Anhang IV: Färbeprotokolle 233

Anhang V: Verwendete Zelllinien 234

Danksagung 236

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Maifisch (*Alosa alosa*) 4
Abbildung 2: Schematischer Lebenszyklus des Maifisches 5
Abbildung 3: Ursprüngliches Verbreitungsgebiet des Maifisches 7
Abbildung 4: LIFE-Maifischprojektgebiet, Frankreich 9
Abbildung 5: Schemazeichnung der Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich 10
Abbildung 6: LIFE-Maifischprojektgebiet, Deutschland 11
Abbildung 7: Schemazeichnung der Maifischprojektanlage in Aßlar, Deutschland 12
Abbildung 8: Durchschnittliche Körpermasse juveniler Maifische, 2010-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland 68
Abbildung 9: Durchschnittliche Standardlängen juveniler Maifische, 2010-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland 69
Abbildung 10: Durchschnittliche Körpermasse adulter Maifische, 2012-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland 69
Abbildung 11: Gonadosomatischer Index, Weibchen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich 71
Abbildung 12: Im September 2014 im Rhein gefangener juveniler Maifisch, Rhein, Deutschland 72
Abbildung 13: Im Mai 2012 verstorbener adulter Maifisch, GGD-System, Frankreich 72
Abbildung 14: Adulter Maifisch mit Panophthalmitis, 2013, GGD-System, Frankreich 73
Abbildung 15: Geringgradig ausgeprägte, akute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, GGD-System 78
Abbildung 16: Hochgradig ausgeprägte, akute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, 2012, GGD-System, Frankreich 78
Abbildung 17: Akute, ulzerative *Endocarditis parietalis* bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich 79

Abbildung 18: Subakute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich 79
Abbildung 19: Pylorusanhang eines adulten Maifisches mit zahlreichen Granulomen, 2013, GGD-System, Frankreich 80
Abbildung 20: Säurefeste Stäbchen im hämatopoetischen Gewebe der Niere eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich 82
Abbildung 21: Infiltration der Meningen von adulten Maifischen durch EGZs, 2013, GGD-System, Frankreich 83
Abbildung 22: Meningitiden bei adulten Maifischen, 2012, GGD-System, Frankreich 84
Abbildung 23: Enzephalitiden bei adulten Maifischen, 2013, GGD-System, Frankreich 85
Abbildung 24: Epitheliocystis bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich 86
Abbildung 25: Mykose der Kieme bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich 87
Abbildung 26: Hochgradige Amöbiasis bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich 89
Abbildung 27: Parasitärer Organismus im Kiemengewebe eines adulten Maifisches, HE-Färbung, GGD-System, 2013, Frankreich 89
Abbildung 28: Parasitärer Organismus im Kiemengewebe eines adulten Maifisches, 2013, Giemsa-Färbung, GGD-System, Frankreich.... 90
Abbildung 29: Abgekapselte Anisakidae (N) in der *Tunica muscularis* (M) des Magens eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich 91
Abbildung 30: Nematodenlarve der Familie Anisakidae in der Leber eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich..... 92
Abbildung 31: *Myxozoa* in den Tubuluslumina der Nieren eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich 93
Abbildung 32: *Myxozoa* in den Nierentubuli eines adulten Maifisches,2012, GGD-System, Frankreich 94

Abbildung 33: Myxozoa im Niereninterstitium eines adulten Maifisches, 2014, GGD-System, Frankreich 94
Abbildung 34: Zystische Malformation bei einem zwei Monate alten Maifisch, 2012, Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland 96
Abbildung 35: Saprolegniasis des Auges bei einem adulten Maifisch, 2012, GGD-System, Frankreich 104
Abbildung 36: Großflächiges Hautulkus mit Saprolegniasis bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich 105
Abbildung 37: Anisakidae in der Leibeshöhle eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich 111
Abbildung 38: Nematodeneier (Lichtmikroskopie) bei adulten Maifischen, GGD-System, Frankreich 112
Abbildung 39: Nematoden im Magenlumen eines adulten Maifisches, 2014, GGD-System, Frankreich 114
Abbildung 40: Hemiuridae bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich 114
Abbildung 41: *Pronoprymna* sp. bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich 115
Abbildung 42: Zwei Parasitenstadien aus dem Darm eines adulten Maifisches, 2013, GGD-System, Frankreich 116
Abbildung 43: Schemazeichnung von *Hoferellus alosae* sp. nov. 117
Abbildung 44: Morphologie von *Hoferellus alosae* sp. nov. 118
Abbildung 45: Sauerstoffkonzentrationen in der Maifischprojektanlage 2012-2014, Bruch, Frankreich 120

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtübersicht der verwendeten Maifische aus Deutschland und Frankreich, 2010-2014 38
Tabelle 2: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, juvenile Maifische, 2011-2014, GGD-System, Frankreich 39
Tabelle 3: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, adulte Maifische, 2012-2014, GGD-System, Bruch, Frankreich 41
Tabelle 4: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, juvenile Maifische, 2010-2014, Rhein, Deutschland 42
Tabelle 5: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, adulte Maifische, 2013 und 2014, Rhein, Deutschland 43
Tabelle 6: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, Zuchtpopulation, 2012-2014, Aßlar, Deutschland 44
Tabelle 7: Für die Studie verwendete Mastercycler-Programme 58
Tabelle 8: Mortalität während der Reproduktionsphase in der Maifischprojektanlage in Bruch, 2012-2014, Frankreich 67
Tabelle 9: Bei adulten Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesene Bakterienspezies, 2012-2014, Frankreich 98
Tabelle 10: Bei adulten Maifischen aus dem Rhein nachgewiesene Bakterienspezies, 2014, Deutschland 101
Tabelle 11: Bei der Zuchtpopulation in Aßlar nachgewiesene Bakterienspezies, 2012-2014, Deutschland 102
Tabelle 12: Saprolegniasis bei adulten Maifischen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich 103
Tabelle 13: Gesamtübersicht Probenmaterial und Untersuchungsmethoden für die Virologie, 2012-2014 106
Tabelle 14: Gesamtübersicht Probenmaterial und Untersuchungsmethoden für die Parasitologie, 2012-2014 109
Tabelle 15: Ektoparasiten bei adulten Maifischen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich 110
Tabelle 16: Parasitosen des Gastrointestinaltrakts, 2012-2014, Wildpopulation, Deutschland und Frankreich 113

Tabelle 17: Evaluation der Bedeutung nachgewiesener Infektionserreger 162
Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen 212
Tabelle 19: Koordinaten der Fangorte in der Studie verwendeter Maifische . 217
Tabelle 20: Übersicht der in der Studie verwendeten Zelllinien 234
Tabelle 21: Handling der in der Studie verwendeten Zelllinien 235

IV. Abkürzungsverzeichnis

A.	*Alosa*
Ae.	*Aeromonas*
An.	*Anisakis*
Aph.	*Aphanomyces*
API	Analytical Profile Index (Schnellbestimmungssystem zur Identifizierung von Bakterien)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASK	Atlantic Salmon Kidney (Niere vom Atlantischen Lachs)
BB	Brown Bullhead (Braune Katzenwels)
BF-2	Bluegill Sunfish Fibroblasts (Fibroblasten vom blauen Sonnenbarsch)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (grundlegendes Suchwerkzeug für lokale Alignments)
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	*Clavellisa*
CCB	Common Carp Brain (Karpfengehirn)
CHSE/F	Chinook Salmon Embryo (Königslachsembryo)
cm	Zentimeter
CPE	Cytopathogen Effect (zytopathogener Effekt)
CVUAS	Chemisches Veterinär- und Untersuchungsamt Stuttgart
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotide Triphosphates (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
E.	*Eubothrium*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EGZ	Eosinophil Granulierte Zellen
EK-1	Eel Kidney (Aalniere)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (immunologisches Nachweisverfahren)

ENV	Erythrocytic Necrosis Virus (Virus der Erythrozyten-Nekrose)
EPC	*Epithelioma Papulosum Cyprini* (papulöses Epitheliom der Karpfenfischartigen)
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
EUS	Epizootisches Ulzeratives Syndrom
FHM	Fathead Minnow (Goldelritze)
g	Gramm
GGD	Gironde-Garonne-Dordogne
GH	Gesamthärte
GL	Gesamtlänge
°C	Grad Celsius
GSI	gonadosomatischer Index
h	Stunden
H.	*Hoferellus*
Hy.	*Hysterothylacium*
He.	*Hemiurus*
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCL	Salzsäure
IHN	Infectious Haematopoietic Necrosis (Infektiöse Hämatopoetische Nekrose)
IHNV	Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (Virus der Infektiösen Hämatopoetischen Nekrose)
IPN	Infectious Pancreatic Necrosis (Infektiöse Pankreas Nekrose)
IPNV	Infectious Pancreatic Necrosis Virus (Virus der Infektiösen Pankreas-Nekrose)
ISA	Infectious Salmon Anaemia (Infektiöse Anämie der Lachse)
ISAV	Infectious Salmon Anaemia Virus (Virus der Infektiösen Anämie der Lachse)
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUCN	International Union for Conservation of Nature (Internationale Union zur Bewahrung der Natur und natürlicher Ressourcen)
JLU	Justus-Liebig-Universität
kg	Kilogramm

KH	Karbonathärte
KHV	Koi-Herpes-Virus
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
L	Liter
L.	*Lactococcus*
LCD	Lymphocystis Disease (Lymphocystis-Erkrankung)
LCDV	Lymphocystis Disease Virus (Virus der Lymphocystis-Erkrankung)
LIFE	L'Instrument Financier pour l'Environnement (Artenschutz-projekt der EU)
M.	*Mycobacterium*
Ma.	*Mazocraes*
max.	maximal
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
mL	Milliliter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation)
NH_4^+	Ammonium
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
O.	*Ortholinea*
O_2	Sauerstoff
o. J.	ohne Jahr
OIE	Office International des Epizooties (Weltorganisation für Tiergesundheit)
P.	*Pronoprymna*
Ps.	*Pseudomonas*
PAS	Periodic acid-Schiff (Perjodsäure-Schiff-Reagenz)

PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	*potentia Hydrogenii* (lat. potentia = Kraft; lat. Hydrogenium = Wasserstoff): negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleic Acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
R.	*Rhadinorhynchus*
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpoB Gen	Rifampicin-Resistenz Gen (RNA-Polymerase-3β-Untereinheit)
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RT/F	Falsche RTG-2 Zelllinie
RTG-2	Rainbow Trout Gonad (Gonaden der Regenbogenforelle)
s	Sekunde
S.	*Saprolegnia*
Sc.	*Streptococcus*
SAF-1	*Sparus Aurata* Fin (Goldbrassenflosse)
SL	Standardlänge
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
sp.	species (Spezies, Singular)
sp. nov.	species nova (neue Art)
spp.	species (Spezies, Plural)
subsp.	subspecies (Unterart, Singular)
SSU rDNA	Small Subunit Ribosomal Desoxyribonucleic Acid (kleine Untereinheit der ribosomalen Desoxyribonukleinsäure)
syn.	Synonym
T.	*Tenacibaculum*
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
tgl.	täglich
TierSeuchAnzV	Verordnung über anzeigepflichte Tierseuchen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Unit (Internationale Einheit; Messgröße basierend auf biologischer Aktivität eines Stoffes)
$Umin^{-1}$	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
VHS	Viral Hemorrhagic Septicaemia (Virale Hämorrhagische Septikämie)
VHSV	Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus (Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZN	Ziehl-Neelsen

1 EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution haben zahlreiche Fischspezies einen spezialisierten Lebenszyklus entwickelt, bei denen das Heranwachsen bis zur Geschlechtsreife und die Fortpflanzung räumlich getrennt stattfinden. Einige dieser Wanderfischarten, auch diadrome Arten genannt, wandern dabei zur Vervollständigung ihres Lebenszyklus zwischen dem Süß- und Salzwasser (MYERS 1949). Zu den diadromen Spezies zählen unter anderem die anadromen Wanderfische, welche einen Großteil ihres Lebens im Meer verbringen und bei der Laichwanderung in das Süßwasser der Flüsse aufsteigen (ACOLAS und LAMBERT 2016). Weltweit sind von 34.156 (Stand 2016) bekannten Fischspezies (ESCHMEYER und FONG 2016) nur lediglich 174 (Stand 2004) Arten anadrom (RIEDE 2004). Im Nordost-Atlantik wurde in den letzten Jahren ein deutlicher Rückgang der Bestände anadromer Fischarten festgestellt (LIMBURG und WALDMAN 2009). Zu diesen zählen neben den Stören und den Salmoniden auch die Gattung *Alosa* aus der Familie der Heringe (Clupeidae) (FREYHOF und BROOKS 2011). Im Hinblick auf europäische Süßwasserfische besteht bei keiner Gruppe ein höheres relatives Risiko von Populationsrückgängen bis hin zum Aussterben als bei anadromen Arten (JONSSON et al. 1999, REYNOLDS et al. 2005). In Europa werden 5 von 13 der vorkommenden *Alosa* spp. als gefährdet eingestuft (FREYHOF und BROOKS 2011).

In der Gattung *Alosa* war der Maifisch (*Alosa alosa*) als sogenannter Brotfisch bis ins 20. Jahrhundert hinein die ökonomisch wichtigste Fischart in Deutschland (BARTL und TROSCHEL 1997, POSCHLOD 2015). In seinem ursprünglichen Verbreitungsgebiet an den westeuropäischen Atlantikküsten von Nordeuropa bis nach Marokko wurde sein Bestand vermutlich aufgrund von Errichtung von Migrationshindernissen, Überfischung und Wasserverschmutzung drastisch reduziert (QUIGNARD und DOUCHEMENT 1991). Daraufhin erfolgte eine Aufnahme in die Rote Liste Deutschlands als „vom Aussterben bedroht“ (HAUPT et al. 2009). Zum Schutz der biologischen Vielfalt wurde im Jahr 2007 ein LIFE-Projekt der europäischen Union (EU) zur Wiederansiedlung des Maifisches im Rhein begonnen und im Jahr 2011 verlängert (KLINGER 2011). Hierfür wurden Maifischlarven einer französischen Spenderpopulation nach Deutschland

überführt und sowohl im Rhein ausgesetzt als auch zum Aufbau einer *ex situ* Zuchtpopulation verwendet.

Der mögliche Einfluss von Infektionserregern auf die Bestandsentwicklung der Maifische wurde bislang nicht untersucht. Die Relevanz von Infektionserregern als Ursache von Populationsrückgängen bis hin zum Aussterben verschiedener Tierarten ist jedoch in der Literatur belegt (DASZAK und CUNNINGHAM 1999, DASZAK et al. 2003, MARTY et al. 2010, SKERRATT et al. 2007, THOMAS und COLE 1996, THORNE und WILLIAMS 1988). Weiterhin können Infektionserreger für den Erfolg von Wiederansiedlungsprojekten eine bedeutende Rolle spielen (BALLOU 1993, KOCK et al. 2010, SCHMIDT-POSTHAUS et al. 2002, VIGGERS et al. 1993, WOODFORD und ROSSITER 1994). Daher wird empfohlen, im Rahmen derartiger Projekte das Vorkommen von Infektionserregern zu untersuchen und ihre Bedeutung für den Bestand sowie für den Erfolg des Wiederansiedlungsprojekts zu evaluieren (IUCN/SSC 2013, OIE und IUCN 2014). In Bezug auf das Krankheitsspektrum bei Maifischen ist jedoch bislang nur begrenzt Literatur zu Parasitosen verfügbar (NIKOLIC et al. 2011), zu anderen Infektionserregern fehlt Literatur hingegen gänzlich.

Die zentrale Aufgabenstellung dieses Forschungsvorhabens umfasste daher die Untersuchung von Infektionserregern beim Maifisch und die Evaluation ihrer Bedeutung für die Maifischpopulation sowie für das Wiederansiedlungsprojekt. Hierfür sollten Maifische der Wild- und Zuchtfischpopulation aus Frankreich und Deutschland unter Verwendung von bakteriologischen, mykologischen, virologischen, parasitologischen und histologischen Methoden untersucht werden. In einem Untersuchungszeitraum von drei Jahren sollten durch jährliche Beprobungen zeitliche Veränderungen im Erregerspektrum abgebildet werden. Eine parallel durchgeführte Basis-Wasseranalyse sollte eine genauere Bewertung der Untersuchungsergebnisse ermöglichen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Der Maifisch

2.1.1 Systematik

Der Maifisch (*Alosa alosa,* Linnaeus, 1758) wird wie folgt systematisch in den Stamm Chordatiere (Bateson, 1885) eingeordnet:

Phylum: Chordata (Bateson, 1885)
Subphylum: Vertebrata (Cuvier, 1812)
Classis: Actinopterygii (Cope, 1871)
Ordo: Clupeiformes (Goodrich, 1909)
Subordo: Clupeoides (Bleeker, 1859)
Familia: Clupeidae (Cuvier, 1817)
Subfamilia: Alosinae (Svetovidov, 1953)
Genus: *Alosa* (Linnaeus, 1758)
Spezies: *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758)

2.1.2 Biologie

Der Maifisch (Abbildung 1) gehört zu der Familie Clupeidae, den Heringen. Äußerlich ist er charakterisiert durch einen seitlich abgeflachten Körper sowie 1-3 schwarze Flecken hinter dem Kiemendeckel. Maifische erreichen ein maximales Alter von 7-8 Jahren. Milchner werden mit 2-4 Jahren, Rogner mit 3-5 Jahren geschlechtsreif. Durchschnittlich erreichen Maifische eine Gesamtlänge von 550 mm und eine Körpermasse von 1,8 kg (BAGLINIÈRE et al. 2003). Im Gironde-Garonne-Dordogne-System (GGD-System), Frankreich können sie eine Maximallänge von 700 mm und Maximalmasse von 4 kg erreichen (TAVERNY 1991). In Europa kommen Maifische häufig zusammen mit der nahe verwandten Finte (*Alosa fallax*) vor. Zwischen beiden Arten kommt es dabei immer wieder zur Hybridisierung, wobei die Hybriden fertil sind (JOLLY et al. 2011). Beide Arten sind sich äußerlich sehr ähnlich und lassen sich nur anhand der Anzahl der

Kiemenreusendornen auf dem ersten Kiemenbogen (Maifisch: 80-155, Finte: 35-60) sicher unterscheiden (APRAHAMIAN et al. 2003).



Abbildung 1: Der Maifisch (*Alosa alosa*)

2.1.3 Lebenszyklus

Bei den meisten Maifischpopulationen handelt es sich um anadrome Wanderfische (BAGLINIÈRE et al. 2003). Lediglich wenige Populationen kommen ausschließlich in Binnengewässern vor, wie zum Beispiel in landumschlossenen Gewässern des Mondego und Tejo in Portugal (APRAHAMIAN et al. 2003). Den Großteil ihres Lebens bis zur Geschlechtsreife verbringen Maifische pelagisch in Küstennähe. Dabei ernähren sie sich von Zooplankton (Mysida, Decapoden, Copepoden), welches sie mit ihren Kiemenreusendornen aus dem Wasser filtrieren sowie kleinen pelagischen Fischen (LOCHET et al. 2008). Bei den Wanderfischen beginnt bei Erreichen der Geschlechtsreife im Frühjahr die Laichwanderung in die Oberläufe der großen europäischen Atlantikzuflüsse (Abbildung 2). Obwohl für Maifische ein hohes Maß an Philopatrie (Geburtsorttreue) beschrieben wurde, identifizierte eine aktuelle Studie bis zu 23 % Streuner mit geringer Prägung auf ihr Herkunftsgewässer (MARTIN et al. 2015). Der Zeitpunkt der Wanderung ist dabei von zahlreichen Faktoren abhängig, wobei Wassertemperaturen von 12-20 °C eine essenzielle Voraussetzung darstellen (BAGLINIÈRE et al. 2003). Der deutsche Name „Maifisch“ geht auf den Monat Mai zurück, in dem die Fische alljährlich in den Flüssen beobachtet werden (BEECK 2003). Während der Laichwanderung wird die Futteraufnahme vollständig eingestellt (BAGLINIÈRE und ÉLIE 2000, SABATIÉ 1993, TAVERNY 1991). Bei den Rückkehrern im GGD-

System ist das Geschlechterverhältnis im Ästuar (TAVERNY 1991) und an den Laichgründen (CASSOU-LEINS und CASSOU-LEINS 1981) insgesamt ausgeglichen. Je jünger die Maifische jedoch geschlechtsreif werden und ihre Laichwanderung beginnen, desto höher ist der Anteil der männlichen Tiere (LAMBERT et al. 2001). Die bevorzugten Laichplätze sind Übergangsbereiche zwischen tiefen, langsam fließenden zu flacheren, rasch fließenden Bereichen mit kiesigem Grund. Das Ablaichen findet nachts bei Wassertemperaturen von 16-18 °C statt. Dabei schwimmen die Maifische in Kreisen unterhalb der Wasseroberfläche und schlagen heftig mit ihren Schwanzflossen auf das Wasser (APRAHAMIAN et al. 2003).

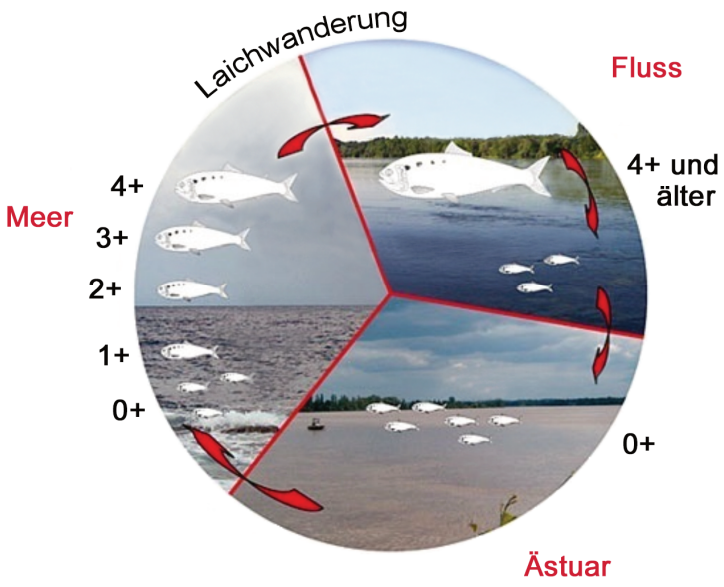


Abbildung 2: Schematischer Lebenszyklus des Maifisches Modifizierte Abbildung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westfalen (LANUV). Die Angabe des Alters der Maifische erfolgt bezogen auf die Generation. Die Generation 0+ umfasst beispielsweise Fische, die weniger als ein Jahr alt sind.

Maifische haben in der Regel einen semelparen Lebenszyklus (BAGLINIÈRE et al. 2003, QUIGNARD und DOUCHEMENT 1991). Ein semelparer Lebenszyklus ist durch die einmalige Fortpflanzung im Leben gekennzeichnet. TAVERNY (1991) hingegen beschreibt bei Maifischen im GGD-System einen Anteil von 17,9 % weiblichen und 9,1 % männlichen Maifischen mit wiederholter Laichwanderung.

In Bezug auf die gesamte atlantische Maifischpopulation wurde lediglich ein Anteil von nicht mehr als 5-6 % mit einer wiederholten Laichwanderung beschrieben (MENNESSON-BOISNEAU et al. 2000b). Die natürliche Mortalität der Laichfische ist durch eine Immunsuppression durch den osmotischen Stress und die Einstellung der Futteraufnahme während der Laichwanderung bedingt, welche zu einem signifikanten Verlust von 59 % der Körpermasse führt (MENNESSON-BOISNEAU et al. 2000a).

Das Reproduktionsvermögen weiblicher Maifische liegt dabei insgesamt bei 50.000 bis 636.000 Eiern pro Fisch (APRAHAMIAN et al. 2003). Die befruchteten Eier sinken zu Boden und werden mit der Strömung verteilt. Temperaturabhängig schlüpfen die Larven 65-240 h nach der Befruchtung mit 7-12 mm Länge (APRAHAMIAN et al. 2003). Während ihrer juvenilen Phase (0+) halten sie sich von Mai bis September in den Flüssen in Bereichen mit langsamer Strömung auf und wandern im Spätsommer und Herbst in die Ästuare. Nach einigen Wochen zieht ein Großteil noch während ihres ersten Lebensjahres von dort ins Meer und tritt in die präadulte Phase ein. Wenige verbleiben über Winter im Ästuar, bevor sie im nächsten Jahr ins Meer ziehen. In der nachfolgenden adulten Phase halten sie sich küstennah in Schwärmen in Wassertiefen von 70-300 m auf (QUIGNARD und DOUCHEMENT 1991, TAVERNY und ELIE 2001, TRANCART et al. 2014).

2.1.4 Ursprüngliches Verbreitungsgebiet, Bestandsentwicklung und Gefährdungsstatus

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet des Maifisches erstreckte sich im Norden von Island über Skandinavien, die östlichen Nordsee- und die westeuropäischen Atlantikküsten bis in den Süden nach Marokko und ins Mittelmeer. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts beherbergte der Rhein die größte vorkommende Maifisch-population, wobei der Maifisch als ökonomisch wichtigste *Alosa* sp. ein wichtiger Speisefisch für die ortsansässige Bevölkerung war (DE GROOT 1990). Im Wesentlichen wurden Maifische im Rhein während ihrer Laichwanderung mit Zugnetzen gefangen. Während in den Jahren vor 1890 noch jährlich 150.000 bis 270.000 Maifische im niederländischen Rhein gefangen wurden, lag die Zahl gemeldeter

gefangener Maifische im Jahr 1920 nur noch bei 1.257 (BARTL und TROSCHEL 1997). Im Jahr 1933 wurde kein einziger Maifisch mehr gefangen. Dieser innerhalb von nur 30 Jahren erfolgte Zusammenbruch der niederländischen Maifischfänge steht in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit einem signifikanten Einbruch der Maifischpopulation auch in anderen großen Teilen des europäischen Verbreitungsgebietes. Als ursächlich wurden hierfür der Bau von Staudämmen und Wehren als Migrationshindernisse, gewässertechnische Eingriffe, Überfischung sowie eine zunehmende Gewässerverschmutzung angenommen (APRAHAMIAN et al. 2003, BAGLINIÈRE et al. 2003, BARTL und TROSCHEL 1997).

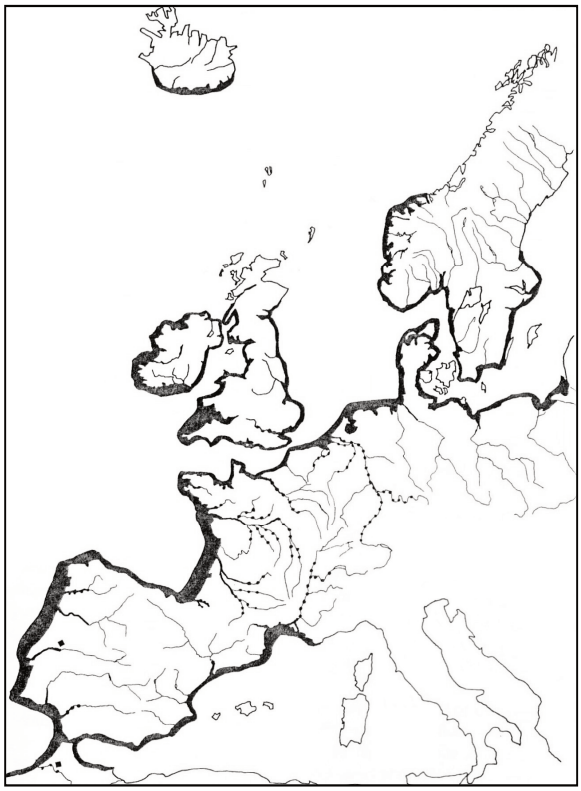


Abbildung 3: Ursprüngliches Verbreitungsgebiet des Maifisches
Abbildung aus QUINARD und DOUCHEMENT (1991)

Es erfolgte die Aufnahme des Maifisches in den Anhang III der Berner Konvention sowie als prioritäre Art in die Anhänge II und IV der Flora-Fauna-Habitat-Richtlinie der EU. Auf der Roten Liste der Internationalen Union zur Bewahrung der Natur und natürlicher Ressourcen (IUCN) wurde der Maifisch als „gefährdet" eingestuft (FREYHOF 2002), während er in der Roten Liste Deutschlands als „vom Aussterben bedroht" gelistet wurde (HAUPT et al. 2009). Obwohl seit 1987 wieder Einzelexemplare des Maifisches im Rhein nachgewiesen wurden, liegen keine Hinweise auf eine sich selbst reproduzierende Population vor (BEECK 2004, NEUDECKER und DAMM 2005). Bei den beobachteten Einzelexemplaren handelt es sich vermutlich um Streuner aus den französischen Populationen (FREYHOF 2002). Lediglich im GGD-System, in der Loire in Frankreich sowie in Binnen-

gewässern in Marokko und Portugal gab es noch stabile Populationen. In den Jahren 1978 bis 1998 wurden europaweit noch insgesamt 355-1.198 Tonnen Maifische gefangen, wobei 94 % aus Frankreich und 89 % aus dem GGD-System stammten. Aufgrund einer Stabilisierung der europäischen, insbesondere der französischen Maifischpopulation auf sehr niedrigem Niveau wurde der Maifisch dementsprechend von der IUCN im Jahr 2008 als „nicht gefährdet“ eingestuft (FREYHOF und KOTTELAT 2008). In Deutschland wurde die Klassifizierung als „extrem selten“ und „vom Aussterben bedroht“ beibehalten (HAUPT et al. 2009). Während des ersten Jahrzehnts des 21. Jahrhunderts wurde jedoch ein starker Rückgang der Maifischpopulation im GGD-System beobachtet, der auch durch ein Moratorium der französischen Behörden, welches den Fang und die Vermarktung von Maifischen verbietet, nicht aufgehalten werden konnte (ROUGIER et al. 2012). Als mögliche Ursachen für diesen Bestandsrückgang wurden Umweltveränderungen, der Fischfang sowie ein demographischer Allee Effekt in Betracht gezogen. Der Allee Effekt beschreibt im Kontext der Populationsdynamik eine Korrelation von Populationsgröße und der durchschnittlichen individuellen Fitness einer Population oder Spezies (ROUGIER et al. 2012). Die zukünftige Entwicklung der Maifischbestände ist dementsprechend ungewiss.

2.2 Die LIFE-Projekte

In den letzten Jahrzenten wurden in Deutschland mit dem Bau von Fischtreppen, einer Verbesserung der Wasserqualität und dem Verbot des Maifischfangs die Ursachen, welche als wesentlich für das Verschwinden des Maifisches angesehen wurden, beseitigt. Zusätzlich wurden Vorstudien zur Beurteilung möglicher Laichgründe sowie der Auswirkung des Schiffverkehrs auf juvenile Maifische durchgeführt (BEECK 2003, 2004). Aufgrund des positiven Verlaufs der Studien war die Möglichkeit einer Wiederansiedlung des Maifisches im Rhein gegeben. Im Jahr 2007 wurde daraufhin das LIFE (L’Instrument Financier pour l’Environnement)-Projekt „Die Wiederansiedlung des Maifisches (*Alosa alosa*) im Rheinsystem“ (LIFE 06 NAT/D//000005) der EU als Kooperation verschiedener französischer, niederländischer und deutscher Institutionen begonnen

(KLINGER 2011). Die LIFE-Projekte stellen seit 1992 die Schwerpunkte der EU-Umweltförderung dar. Das allgemeine Ziel der LIFE-Projekte besteht darin, die Implementierung, Aktualisierung und Entwicklung der EU Umwelt- und Klima-Politik sowie der Gesetzgebung über Co-Finanzierung von Projekten zu fördern.

Im Rahmen des LIFE-Maifisch-projekts wurden beginnend im Mai 2010 jährlich adulte, zum Laichen aufsteigende Maifische in der Garonne oder der Dordogne gefangen und in die eigens eingerichtete Maifischprojektanlage in Bruch verbracht (Abbildung 4 und Abbildung 5). Diese Elternfische wurden zur Synchronisierung des Ablaichens einmalig mit einem GnRH-Analogon ([des-Gly10, D-Trp6]-LH-RH ethylamide, Sigma-Aldrich, Inc.; bzw. Decapeptyl SR. 3 mg, Ipsen Ltd) behandelt. In Bruch wurden die Elternfische in zwei 10 m^3 Becken für jeweils 23 bis 42 Tage zur Reproduktion gehältert. Die Kunststoffbecken wurden im Durchflusssystem mit Wasser aus dem Canal latéral à la Garonne mit einer Austauschrate von 10 m^3h^{-1} versorgt. Es erfolgte eine Aufbereitung des Wassers durch einen mechanischen Filter mit einer Porengröße von 200 µm. Als Freiwasserlaicher gaben die Maifische in den Morgenstunden zeitgleich Milch und Rogen ins Beckenwasser. Der befruchtete Laich gelangte über das Ablaufwasser in ein eigens angefertigtes, feinmaschiges Netz in einem Sammelbecken. Aus diesem wurde der Laich entnommen und bis zum Schlupf der Maifischlarven in Zugergläsern inkubiert. Nach Markierung der Larven mit Tetrazyklin am Tag fünf wurden die Maifischlarven im Alter von unter einem Monat zum Besatz im Rhein nach Deutschland

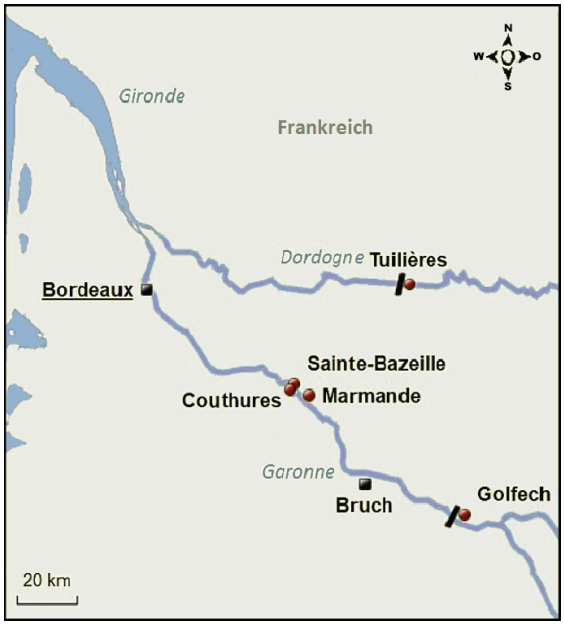


Abbildung 4: LIFE-Maifischprojekt-gebiet, Frankreich
Städte mit rotem Punkt: Fangorte adulter Maifische, schwarze Balken: Dämme

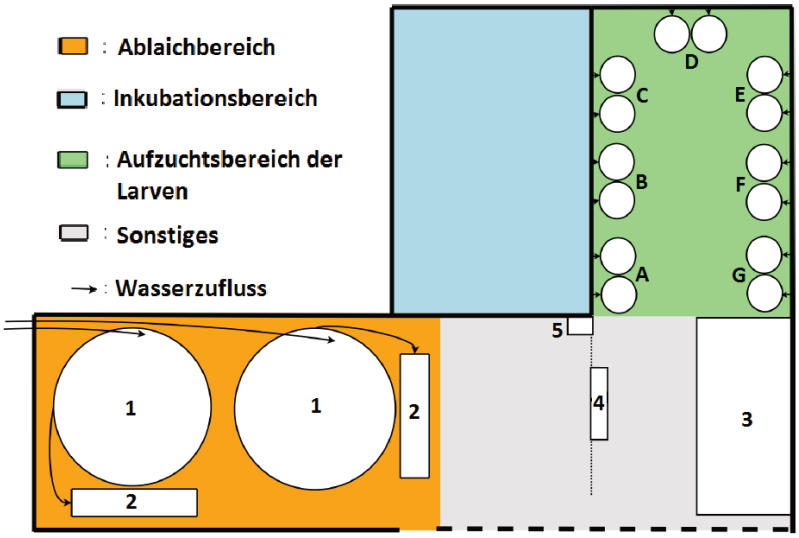


Abbildung 5: Schemazeichnung der Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich
1: Ablaichbecken, 2: Sammelbecken für abgelaichte Eier, 3: *Artemia*-Produktionsbereich, 4: Desinfektionswanne, 5: Waschbecken. A-G: Rundbecken zur Larvenaufzucht. Wasserzufluss vom Canal latéral à la Garonne. Abbildung modifiziert aus KLINGER (2011)

transportiert (Abbildung 6). Am Ende der Reproduktionsphase wurden alle verbleibenden Maifische mit einem Kopfschlag betäubt, mittels Blutentzug und nachfolgendem Genickschnitt euthanasiert und für wissenschaftliche Untersuchungen des LIFE-Projekts verwendet. Nach Ablauf des ersten Maifischprojekts wurde zur Fortführung der Besatzmaßnahmen Anfang des Jahres 2011 das LIFE+ Projekt „*Alosa alosa* – Schutz und Wiederherstellung der Bestände des Maifisches in den Einzugsgebieten des Rheins und der Gironde“ (LIFE09 NAT/DE/000008) begonnen. Dieses LIFE+ Projekt hatte neben der Fortführung und Weiterentwicklung der Wiederansiedlungsmaßnahmen im Rheingebiet den Schutz der Girondepopulation der Maifische zum Ziel (LANUV 2016). Ursächlich für diese Maßnahme ist der signifikante Bestandseinbruch während des ersten Jahrzehnts des 21. Jahrhunderts (ROUGIER et al. 2012). Seit dem Jahr 2015 werden in Bruch daher Maifischlarven sowohl für Besatzmaßnahmen im Rhein, als auch im GGD-System produziert Zusätzlich sollten Techniken zur dauerhaften Elterbtierhaltung in Deutschland etabliert werden, wodurch mittelfristig eine

Entnahme von adulten Maifischen aus dem GGD-System überflüssig würde. Als Elterntiere sollten hierbei zur Geschlechtsreife herangezogene französische Maifischlarven dienen. Mit diesem Zuchtprojekt befasste sich die Maifischzuchtanlage in Aßlar, Hessen. Sie verfügt über zwei verschiedene Kreislaufsysteme (Abbildung 7). In der Maifischzuchtanlage in Aßlar wurden die Larven nach dem Transport nach Deutschland zunächst im kleinen Kreislauf gehalten. Dieser umfasste 3,8 m^3 bestehend aus vier Fischbecken und einer Filteranlage mit mechanischer und biologischer Filterung, Belüftung sowie einer UV-Bestrahlung. Die automatisierte Fütterung erfolgte je nach Fischgröße mit *Artemia* nauplii (Micro Artemia cysts, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgien) und/oder kommerziellem Trockenfutter (Perla Larva Proactive 6.0, Skretting, Stavanger, Norwegen). In regelmäßigen Abständen erfolgte ein Wasserwechsel von 30 %. Nach einigen Monaten wurde mit dem Aufsalzen des Wassers auf eine Salinität von 6-8 % begonnen, um die Migration ins Brackwasser zu simulieren. Eine Aufsalzung bis auf Meerwasserniveau wurde jedoch nicht durchgeführt, da eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration zu einer Beeinträchtigung der Nitrifikation führte. Weiterhin stellten sich die verwendeten Materialen der großen Kreislaufanlage als ungeeignet für Meerwasser dar. In einem Alter von ungefähr einem halben Jahr wurden die Maifische in den großen Kreislauf umgesetzt. Der

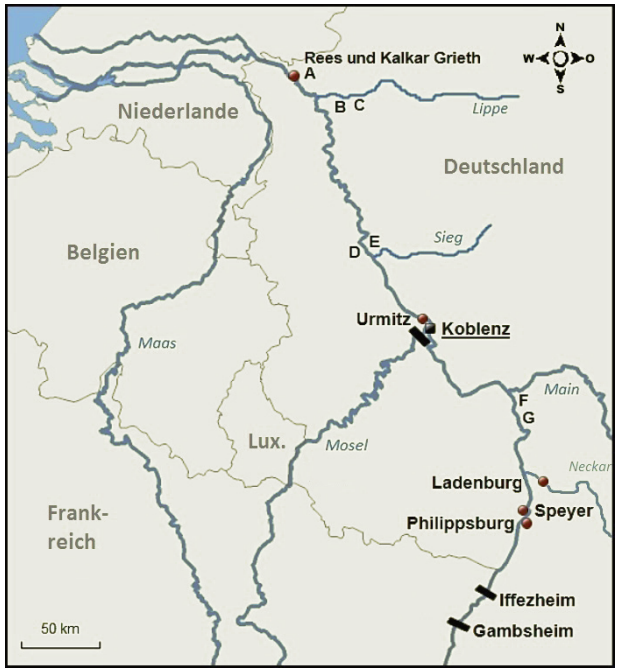


Abbildung 6: LIFE-Maifischprojektgebiet, Deutschland
Städte mit rotem Punkt: Fangorte adulter Maifische; schwarze Balken: Dämme, Fangort von adulten Maifischen; A-G: Besatz mit französischen Maifischlarven, für weiterführende Informationen siehe HUNDT et al. (2015)

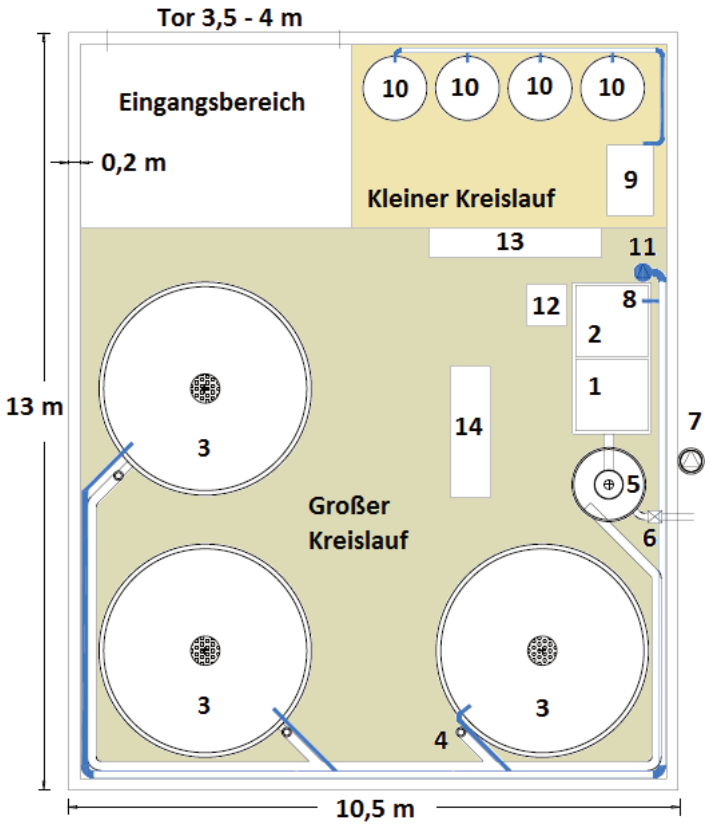


Abbildung 7: Schemazeichnung der Maifischprojektanlage in Aßlar, Deutschland
1: Moving Bed Filter, 2: Belüftungstank, Pumpensumpf, UV-Sterilisation, 3:Fischbecken (9m^3), 4: Teleskop Ausflusskontrolle, 5: Wirbel-Separator, 6: Drainage-Klappe für Bodensatz, 7: Gasringverdichter, 8: Level-Regulation/ Recycling-Klappe, 9: Filtereinheit kleiner Kreislauf, 10: Fischbecken je 0,47 m^3, gesamter Kreislauf 3,8 m^3, 11: Hauptpumpe, 12: Kühlschrank mit Gefrierfach, 13: *Artemia* Produktion, 14: Arbeitsplatz. Abbildung Dr. Andreas Scharbert (modifiziert)

große Kreislauf bestand aus drei parallel geschalteten Becken von je 9 m^3 und einem Filter mit biologischer, mechanischer und physikalischer Reinigungsstufe. Zur Reinigung der Becken waren diese zusätzlich mit Sternhausen (*Acipenser stellatus*), Sterlets (*Acipenser ruthenus*) und einem Waxdick (*Acipenser gueldenstaedtii*) besetzt. Alle Becken wurden mit Netzen abgedeckt, um ein Herausspringen der Fische zu verhindern.

2.3 Die Bedeutung von Infektionserregern in Wiederansiedlungsprojekten

Weltweit werden seit mindestens 100 Jahren Wiederansiedlungsprojekte von Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln, Säugetieren, Invertebraten und Pflanzen auf nationaler sowie internationaler Ebene durchgeführt (ARMSTRONG und SEDDON 2008, FISCHER und LINDENMAYER 2000, SOORAE 2011). Während der 1980er Jahre wurde jedoch deutlich, dass abgesehen von wenigen Ausnahmen die meisten Wiederansiedlungsversuche scheiterten, ohne dass die Ursachen analysiert und daraus Konsequenzen gezogen wurden (LYLES und MAY 1987, SEDDON et al. 2007). Insbesondere die Bedeutung von Infektionserregern für den Erfolg von Wiederansiedlungsprojekten wurde häufig unterschätzt (GAUGHAN 2002, HERSHBERGER et al. 2010, MCCALLUM und DOBSON 1995, SMITH et al. 2006, VIGGERS et al. 1993, WALKER et al. 2008).

Als Reaktion auf diese Problematik wurde daraufhin die Kommission für das Überleben von Arten (Species Survival Commission [SSC]) der IUCN gebildet, welche Richtlinien für Wiederansiedlungsprojekte entwickelte (IUCN/SSC 2013). Die 1984 gegründete Expertenrunde der IUCN für Wildtiergesundheit (Wildlife Health Specialist Group) entwickelte zusätzliche Richtlinien zur Risikoanalyse von Wildtiererkrankungen in Wiederansiedlungsprojekten (OIE und IUCN 2014). Die erarbeiteten Richtlinien der OIE und der IUCN umfassen Maßnahmen sowohl zur Maximierung der Gesundheit umgesiedelter Tiere als auch zur Minimierung des Risikos der Einschleppung neuer Pathogene in ein Gebiet. Dazu sollen in der Planungsphase des Projekts vorkommende Infektionserreger erforscht und in ihrer Bedeutung für den Erfolg der Wiederansiedlung, heimische Tierarten und den Menschen (Zoonosen) evaluiert werden. Nach Anlauf des Wiederansiedlungsprojekts werden kontinuierliche Überwachungsmaßnahmen der Tiergesundheit von Zuchtpopulationen, Gesundheitschecks vor der Auswilderung oder Umsiedlung, Impfungen und Quarantänemaßnahmen empfohlen.

Die Risikoanalyse wurde unter Berücksichtigung hochpathogener Infektionserreger erstellt, die bereits weltweit zu Populationsrückgängen und Aussterben von Arten geführt haben (SMITH et al. 2006). Das bekannteste Beispiel hierfür ist

die Chytridiomykose, eine Erkrankung, verursacht durch den Pilz *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diese Mykose wird für deutliche Populationsrückgänge oder das Aussterben von mehr als 100 Amphibienspezies seit den 1970ern verantwortlich gemacht (SKERRATT et al. 2007). Als mögliche Ursache für die Ausbreitung dieser Mykose wird dabei der internationale Handel und das Verbringen infizierter Amphibienspezies durch den Menschen angesehen (WELDON et al. 2004). Ein Wiederansiedlungsprojekt der gefährdeten amerikanischen Froschart *Lithobates chiricahuensis* scheiterte unter anderem am Vorkommen dieser Mykose (SREDL et al. 2011).

Obwohl das Monitoring von Infektionserregern bei Wiederansiedlungen wiederholt empfohlen wurde (WOODFORD 2001), werden wissenschaftliche Untersuchungen zu Infektionserregern in Artenschutzprogrammen nach wie vor lediglich selten durchgeführt (MATHEWS et al. 2006). In diesen Fällen zeigt sich jedoch der gravierende Einfluss, den Infektionserreger auf Wiederansiedlungsprojekte haben können. Zum Beispiel verursachte in einem Zuchtprogramm zur Nachzucht des vom Aussterben bedrohten Warzenbeißers (*Decticus verrucivorus*), einer Laubheuschrecke, eine Pilzinfektion, bei der es sich vermutlich um *Verticillium* sp. handelte, eine hohe Mortalität bei den Nachzuchten (CUNNINGHAM et al. 1997). Um eine Ausbreitung der Infektion auf die Wildpopulation zu verhindern, wurden regelmäßige pathologische Untersuchungen in das Zuchtprogramm aufgenommen und von der Auswilderung betroffener Tiere abgesehen. Die Bedeutung von Infektionserregern bei wiederausgewilderten Tieren zeigte sich auch im Fall einer Wiederansiedlung des europäischen Bibers (*Castor fiber*) in den Niederlanden. Bei ausgewilderten, verendet aufgefunden Tieren waren Infektionserreger, insbesondere die Yersiniose und die Leptospirose, die wichtigste Todesursache (NOLET et al. 1997). Im Fall der Wiederansiedlungsprojekte von Schwarzfußiltissen (*Mustela nigripes*) in Nordamerika waren Infektionserreger ebenfalls von großer Bedeutung. Im Jahr 1985 führte ein Ausbruch der Staupe, verursacht durch das Canine Staupevirus, zu schwerwiegenden Erkrankungen der Zuchtpopulation und zu einem vollständigen Aussterben der Wildpopulation (THORNE und WILLIAMS 1988). Im Verlauf der Wiederansiedlungsprojekte wurde über Nachzuchten der Bestand wieder aufgebaut (DOBSON und LYLES 2000). Als eins

der Hauptprobleme bei der Bestandssanierung wurde die durch *Yersinia pestis* verursachte Pest identifiziert (LIVIERI 2011). Durch gezielte Maßnahmen wie die Bekämpfung von Flöhen als Überträgern sowie Impfprogrammen konnten die Überlebenschancen der Schwarzfußiltisse deutlich erhöht werden (MATCHETT et al. 2010).

Bei Fischen sind Infektionserreger ebenfalls als eine Ursache von Populationrückgängen bekannt (DULVY et al. 2003, HYATT et al. 1997, MARTY et al. 2010, PEELER et al. 2010, STERUD et al. 2007) und sollten daher in Wiederansiedlungsprojekten berücksichtigt werden. Zur Zeit gibt es zahlreiche Wiederansiedlungsprojekte für Fische, welche sich insbesondere auf diadrome Arten beziehen (GEPHARD und MENEMY 2004, HASSELMAN und LIMBURG 2012, KOCH und QUIST 2010, LEBLANC et al. 2014, MILLER et al. 2010, NMFS et al. 2017, STENCE et al. 2017). Eine umfassende Untersuchung von Infektionserregern bei Fischen speziell in Wiederansiedlungsprojekten wurde jedoch bisher nur bei Aalen (*Anguilla* spp.) von HAENEN et al. (2012) veröffentlicht. Als Gründe für die Bestandseinbrüche bei den Aalen wurden Fischfang, Habitatverluste, Errichtung von Migrationsbarrieren und eine zunehmende Wasserverschmutzung angesehen. Im Rahmen dieser Studie wurden in Aquakulturen in den Niederlanden und Deutschlands das Aal-Herpesvirus-1 (AngHV1) sowie im Vereinigten Königreich *Anguillicoloides crassus* als die wichtigsten Erkrankungen des Aals identifiziert. Zudem wurde die Einführung einer Gesundheitsbewertung von Glasaalen nach kanadischem Vorbild sowie Badeimpfungen gegen AngHV1 und Birnavirus vorgeschlagen. Außerdem empfahlen die Autoren Gesundheitschecks, um relevante Infektionserreger vor der Auswilderung auszuschließen sowie Quarantänemaßnahmen und Gesundheitskontrollen vor dem Import von Aalen aus anderen Gebieten. Darüber hinaus wurde weiterhin ein dringender Forschungsbedarf zu Erkrankungen des Aals festgestellt (HAENEN et al. 2012).

Für LIFE-Projekte gibt es zur Zeit keine Richtlinien bezüglich des Risikomanagements von Infektionserregern (SILVA et al. 2015). In Bezug auf Infektionserreger bei Maifischen ist der Kenntnisstand sehr eingeschränkt (NIKOLIC et al. 2011). Außerdem erfolgte bislang noch keine detaillierte Untersuchung relevanter Infektionserregern mit Evaluation ihrer Bedeutung für das Wiederansiedlungsprojekt.

2.4 Infektionserreger bei Maifischen und verwandten Arten

Unter Berücksichtigung der Richtlinie zur Risikoanalyse von Wildtier-erkrankungen in Wiederansiedlungsprojekten der IUCN wurde im Rahmen dieser Studie zunächst eine Übersicht über bereits bei Maifischen bekannte Infektions-erreger erstellt (Anhang I: Tabelle 18). Dabei wurden bakterielle, mykotische, virale und parasitäre Erkrankungen berücksichtigt. Wenn entsprechende Unter-suchungen zu Maifischen fehlten, wurden in der folgenden Übersicht darüber hinaus Krankheitserreger bei nah verwandten Fischarten der Gattung *Alosa* und der Familie Clupeidae berücksichtigt.

2.4.1 Bakterielle Infektionserreger

In der Literatur sind bislang keine Erkrankungen durch bakterielle Erreger bei Maifischen beschrieben worden, jedoch bei verwandten Fischspezies. Es handelt sich hierbei sowohl um Bakteriennachweise im Süß- als auch im Meerwasser. Im Meerwasser wurden beim Ostsee-Hering (*Clupea harengus* variatio *membras*) *Pseudomonas anguilliseptica* im Zusammenhang mit Hämorrhagien in den Augen, an Flossen und im Kopfbereich sowie mit Cornearupturen und rötlichem Aszites nachgewiesen (LÖNNSTRÖM et al. 1994). Der Nachweis von *Ps. anguilliseptica* erfolgte zunächst über Anzucht auf Trypton-Soja-Agar mit 5 % Rinderblut und 1,5 % NaCl sowie nachfolgender biochemischer und serologi-scher Untersuchungen. Außerdem wiesen CHEN et al. 1995 *Tenacibaculum mari-timus* [früher *Cytophaga marina* und *Flexibacter maritimus* (SUZUKI et al. 2001)] unter anderem bei der zur Familie Clupeidae gehörenden Pazifischen Sardine (*Sardinops sagax*) und der Sardellenart *Engraulis mordax* an der kalifornischen Küste nach. Die betroffenen Sardinen zeigten eine großflächige, bräunliche Pseudomembran, bestehend aus *T. maritimus* auf der Haut. Nach Anzucht auf Hsu-Shotts-Medium erfolgte die biochemische Charakterisierung des Bakteriums unter anderen mit dem API ZYM (CHEN et al. 1995). Da die für dieses Forschungsvorhaben untersuchten Maifische alle im Süßwasser, beziehungsweise

im Ästuar gefangen wurden, werden *Ps. anguilliseptica* und *T. maritimus* nachfolgend nicht detailliert beschrieben. Hingegen wurden Aeromonaden, Mykobakterien und *Streptococcus agalactiae* im Süßwasser oder Ästuar nachgewiesen und werden daher anschließend erläutert.

Aeromonaden

Bei Aeromonaden handelt es sich um Gram-negative, gerade, nichtsporenbildende, Oxidase-positive, fakultativ-anaerobe Stäbchen. Aeromonaden sind weltweit ubiquitär im Süß- und Meerwasser verbreitet und zählen zur physiologischen Flora auf Haut und Kiemen sowie im Gastrointestinaltrakt von Fischen (AUSTIN 2006, AUSTIN und AUSTIN 2012, CAHILL 1990). Infektionen durch Aeromonaden wurden bei Wildfischen und in Aquakulturen als Ursache von Verlusten und Massensterben mit hohen ökonomischen Verlusten beschrieben (AUSTIN und AUSTIN 2012, JANDA und ABBOTT 1998, JANDA und ABBOTT 2010, MONETTE et al. 2006). Es wurden zwei große Gruppen von Aeromonaden als Ursache von Erkrankungen bei Fischen beschrieben: *Aeromonas salmonicida* sensu stricto und die mesophilen Aeromonaden (z. B. *Ae. hydrophila* und *Ae. veronii*) (JANDA und ABBOTT 2010). Insbesondere bei den mesophilen Aeromonaden bestehen große Unterschiede bezüglich ihrer Virulenz (BEAZ-HIDALGO und FIGUERAS 2013). Die verursachte Erkrankung ist charakterisiert durch eine hämorrhagische Septikämie und tritt häufig sekundär auf, wobei sie durch ungünstige Umweltbedingungen oder Immunsuppression z. B. bei der Reproduktion begünstigt wird (JANDA und ABBOTT 2010). Der nicht motile, psychrophile *Ae. salmonicida* verursacht die Furunkulose, während die motilen, mesophilen Aeromonaden ursächlich für die sogenannte „motile Aeromonaden-Septikämie“ sind (BEAZ-HIDALGO und FIGUERAS 2013). Desweiteren verfügen fünf Spezies der Gattung *Aeromonas* über ein zoonotisches Potential für den Menschen, wobei über 85 % der Infektionen durch *Ae. hydrophila, Ae. caviae* sowie *Ae. veronii* bv. *sobria* verursacht werden (JANDA und ABBOTT 1998). Die Infektionen betreffen insbesondere Menschen mit beeinträchtigtem Immunsystem, können jedoch auch bei gesunden Menschen vorkommen (LEHANE und RAWLIN 2000). Eine Infektion

mit Aeromonaden kann zu Wundinfektion, Diarrhöe und Septikämie führen (PARKER und SHAW 2011).

Bei Massensterben von Wildpopulationen des amerikanischen Maifisches (*Alosa sapidissima*) sowie bei den amerikanischen Heringsarten *Dorosoma petenense* und *Dorosoma cepedianum* wurden *Ae. hydrophila* und *Ae. liquefaciens* isoliert (HALEY et al. 1967, ROCK und NELSON 1965, ROTHMANN 1968, TORANZO et al. 1989). Der Nachweis der Aeromonaden erfolgte dabei mittels Anzucht auf verschiedenen Nährböden und nachfolgender Identifikation anhand kultureller, morphologischer und biochemischer Charakteristika (HALEY et al. 1967, ROCK und NELSON 1965, ROTHMANN 1968) sowie mittels verschiedener API-Systeme (TORANZO et al. 1989). Darüber hinaus wurde die bakterielle DNA isoliert und der prozentuale Guanin- und Cytosin-Gehalt bestimmt (ROTHMANN 1968, TORANZO et al. 1989) oder eine serologische Untersuchungen durchgeführt (HALEY et al. 1967). Anhand der beschriebenen Methoden ist die Speziesidentifikation jedoch zum heutigen Zeitpunkt nicht mehr wissenschaftlich belastbar (BORRELL et al. 1997), die Zuordnung zur Gattung *Aeromonas* dagegen schon. Gegenwärtig stellt *Ae. liquefaciens* keine valide Bakterienspezies dar (ITIS 2018). Das Massensterben trat teilweise über Jahre hinweg regelmäßig im Frühjahr auf. Zum Teil zeigten die Fische eine deutliche bakterielle hämorrhagische Septikämie (HALEY et al. 1967, ROTHMANN 1968). In allen Fällen wurden die motilen Aeromonaden nicht als primäre Krankheitsursache angesehen. Als eigentliche Ursache für die Entstehung der Erkrankungen wurde eine starke Wasserverschmutzung beziehungsweise ein Sauerstoffmangel vermutet.

Mykobakterien

Bei Mykobakterien handelt es sich um pleomorphe, Gram-positive, säurefeste, aerobe, nicht-motile, 0,2-0,6 µm x 1-10 µm große Stäbchen. *Mycobacterium* spp. sind im Wasser sowie den damit verbundenen Biofilmen ubiquitär verbreitet (PEDLEY et al. 2013) und werden regelmäßig bei Fischen in Aquakultur, aber auch in Wildfischpopulationen nachgewiesen (GAUTHIER und RHODES 2009). Bei Wildfischpopulationen des amerikanischen Flussbarsches (*Perca flavescens*) (DAOUST et al. 1989) sowie des Felsenbarsches (*Morone saxatilis*) (GAUTHIER et

al. 2008, HECKERT et al. 2001, RHODES et al. 2001, SAKANARI et al. 1983) wurden Mykobakterien als Ursache von Krankheitsausbrüchen nachgewiesen. Als Ursache der piscinen Mykobakteriose gelten die Spezies *M. fortuitum*, *M. marinum* und *M. chelonae,* wobei in den letzten Jahren zahlreiche weitere Mykobakterienspezies im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen bei Fischen beschrieben wurden (DECOSTERE et al. 2004). Die natürliche Infektionsroute ist bislang nicht abschließend geklärt, es wird jedoch eine Übertragung durch die orale Aufnahme kontaminierten Futters oder Wassers angenommen (GAUTHIER und RHODES 2009). Es gibt Hinweise auf eine mögliche Übertragung durch infizierte Vektoren (GAUTHIER und RHODES 2009, SKRIWAN et al. 2002) sowie eine erfolgreiche Infektion nach Badebehandlungen (DAVIS et al. 2002). Weiterhin wird eine vertikale Übertragung vermutet (CHINABUT 2011), während die transovarielle Übertragung bei lebendgebärenden Fischen bereits beschrieben wurde (GAUTHIER und RHODES 2009). Mykobakteriosen sind zumeist chronische Erkrankungen, bei denen das Einzeltier unspezifische Symptome wie Hautveränderungen, Abmagerung und Wirbelsäulendeformationen zeigt, während im Bestand eine erhöhte Mortalität sowie ein Rückgang der Reproduktionsleitung auftreten kann. Das histopathologische Bild ist geprägt durch granulomatöse Veränderungen der inneren Organe (GAUTHIER und RHODES 2009). Bei Fischen gibt es zurzeit keine anerkannte Therapiemöglichkeit (GAUTHIER und RHODES 2009). Verschiedene Mykobakterien, darunter *M. chelonae, M. abscessus* und *M. franklinii,* sind zudem potentielle Zoonoseerreger, die beim Menschen beispielsweise eine granulomatöse Dermatitis verursachen können (DECOSTERE et al. 2004, TORTOLI 2014).

In der Chesapeake Bay (Maryland, USA) und benachbarten Flusssystemen wurden zahlreiche *Mycobacterium* spp. aus inneren Organen unter anderem der kanadischen Alse (*Alosa aestivalis*), *Dorosoma cepedianum* sowie dem zur Familie Clupeidae gehörenden Atlantischen Menhaden (*Brevoortia tyrannus*) nachgewiesen (KANE et al. 2007, STINE et al. 2010). Die isolierten Mykobakterien wiesen dabei weder eine Fluss- noch eine Fischspezifität auf. Der Nachweis der Mykobakterien erfolgte nach Anzucht auf Middlebrook-Agar anhand kultureller

und morphologischer Charakteristika sowie anhand der Analyse der Fettsäuremethylester mittels Gaschromatographie (KANE et al. 2007, STINE et al. 2010).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae ist ein Gram-positives, kokkoides Bakterium, welches die Streptokokkose bei Fischen verursachen kann (AUSTIN und AUSTIN 2012). Bei der Streptokokkose handelt es sich um einen Komplex ähnlicher Erkrankungen, welche vor allem das zentrale Nervensystem betreffen, jedoch durch verschiedener Bakterienspezies der Gattungen *Streptococcus, Lactococcus* und *Enterococcus* verursacht werden. Die Streptokokkose wurde bei Nutz- und Wildfischen weltweit nachgewiesen und zählt zu den bedeutendsten bakteriellen Erkrankungen in der Aquakultur (EVANS et al. 2002, TORANZO et al. 2005). Darüber hinaus ist *Sc. agalactiae* potentiell pathogen für den Menschen und kann schwere Erkrankungen bei Neugeborenen aber auch bei Erwachsenen verursachen (DELANNOY et al. 2013).

An der Nordwestküste des Golfes von Mexiko, USA wurde vor allem beim Menhaden (*Brevoortia patronus*) *Sc. agalactiae* als Ursache von Massensterben bei Fischen in verschiedenen Ästuaren nachgewiesen (PLUMB et al. 1974). Die erkrankten Tiere zeigten unter anderem ein unkontrolliertes Schwimmverhalten, Hämorrhagien in Haut und Flossen, Aszites und Exophthalmie. Die Identifikation von *Sc. agalactiae* erfolgte dabei nach initialer Anzucht auf Gehirn-Herz-Bouillon Agarplatten anhand kultureller, morphologischer und biochemischer Charakteristika sowie mittels nicht näher beschriebener Methoden.

2.4.2 Mykotische Infektionserreger

Zurzeit befasst sich lediglich eine Publikation mit Mykosen bei Maifischen. In der Studie wurde das Wachstum verschiedener aquatischer Pilze, vor allem der Ordnung Saprolegniales, auf dem Laich von Maifischen sowie von fünf weiteren *Alosa* spp. untersucht (CZECZUGA und MUSZYNSKA 1997). Zur Klassifizierung der Pilze wurde in der mikroskopischen Untersuchung die Morphologie des Myzels (Zoospore, Oogonium, Konidien) beurteilt. Die Intensität der Verpilzung und eine

mögliche Auswirkung auf die Eimortalität wurden nicht beschrieben. Im Fall des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) wurde jedoch eine hohe Pathogenität von *Saprolegnia* spp. für die Fischeier nachgewiesen (THOEN et al. 2011).

Saprolegnia spp.

Saprolegnia spp. zählen zu der Familie Saprolegniaceae und dem übergeordneten Taxon der Scheinpilze Peronosporomycetes (früher Oomycota oder Oomycetes). Die Peronosporomycetes werden nach aktueller Taxonomie den Stramenopilen in der Obergruppe Chromalveolata zugeordnet und sind somit näher mit bestimmten Algen verwandt als mit echten Pilzen (ADL et al. 2005). Die Erreger der Familie Saprolegniaceae verursachen die Saprolegniasis, eine Mykose der Fische und des Fischlaiches. Es handelt sich um einige der weltweit bedeutendsten Pathogene von Süßwasserfischen, insbesondere bei Salmoniden (VAN WEST 2006). Saprolegniaceae sind dabei zumeist klassische fakultativ pathogene Opportunisten und Saprophyten. Ihr Lebenszyklus besteht aus einer asexuellen Vermehrung über Zoosporen sowie einer sexuellen Vermehrung mit Oogonien und Antheridien. Bei Fischen führen *Saprolegnia* spp. zumeist bei Immunsuppression oder sekundär nach mechanischen Traumata zu Infektionen (CHOUDHURY et al. 2014). *S. parasitica* und *S. diclina* hingegen gelten als primär pathogen (VAN DEN BERG et al. 2013) und verursachen erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Aquakultur (PHILLIPS et al. 2008, VAN WEST 2006). Außerdem wurden die Erreger im Zusammenhang mit Massensterben bei verschiedenen Fischspezies beschrieben (HATAI und HOSHIAI 1992, HUSSEIN und HATAI 2002, ROBERTS 1993, VAN DEN BERG et al. 2013). Die Infektion ist durch oberflächliche wattebauschartige Pilzbeläge charakterisiert. Die Pilzhyphen dringen in die oberflächlichen Haut- und Muskelschichten, respektive in das Kiemengewebe ein und verursachen eine ulzerative Dermatomykose bzw. Branchitis (COPLAND und WILLOUGHBY 1982). Dabei wurde ein infiltratives Pilzhyphenwachstum bis in das Rückenmark, die Rumpfniere und kaudale Blutgefäße beschrieben (GIESEKER et al. 2006). In der finalen Phase führen eine gestörte Osmoregulation und eine Hämodilution zum Tod (RICHARDS und PICKERING 1979).

Bei einem Massensterben von Rückkehrern des Nordamerikanischen Flussherings (*Alosa pseudoharengus*) in Michigan (USA) wurden Pilze der Gattung *Saprolegnia* visuell auf Hautwunden nachgewiesen (EDWARD und BROWN 1968). Seit den 1940er Jahren waren *Saprolegnia* spp. als ein wesentlicher Teil der Erreger einer regelmäßig im Frühling bei 10-64 % der adulten Australischen Süßwasserheringe (*Nematalosa erebi*) auftretenden Dermatitis beteiligt. Die Identifikation von *Saprolegnia* spp. erfolgte in dieser Studie durch Anzucht auf Chloramphenicol-Maismehl-Agar sowie morphologischer Untersuchung nach Sporenfreisetzung in sterilisiertem Flusswasser und in Einzelfällen mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Als Ursache für das regelmäßige Auftreten der Erkrankung wurde eine stressbedingte Immunschwächung durch Temperaturschwankungen, niedrige Sauerstoffkonzentrationen sowie die Geschlechtsreife angesehen (PUCKRIDGE et al. 1989).

Aphanomyces invadans

Aphanomyces invadans ist bei Süß- und Brackwasserfischen der Erreger des epizootischen ulzerativen Syndroms (EUS), einer ulzerativen und granulomatösen Mykose der Haut, der Muskulatur und weiterer Organe. Das Verbreitungsgebiet bei Wild- und Nutzfischen, ursprüngliche in Asien, Australien und Afrika, erstreckt sich mittlerweile bis nach Amerika. EUS gilt als unheilbar und verursacht zumeist eine hohe Mortalität, weshalb es von der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) als Tierseuche gelistet wird (OIE 2018b).

Beim amerikanischen Maifisch (SOSA et al. 2007), der amerikanischen Heringsart *Alosa mediocris* sowie beim Atlantischen Menhaden (DYKSTRA et al. 1986, NOGA et al. 1991) wurde *Aph. invadans* während der Lebensphase im Ästuar nachgewiesen. Die Identifikation von *Aph. invadans* erfolgte durch den Nachweis von Hyphen in der Histologie oder in Quetschpräparaten von Läsionen (NOGA et al. 1991, SOSA et al. 2007), durch Anzucht auf Maismehl-Agar und einem Sporulationsmedium nach GRIFFIN 1978 (DYKSTRA et al. 1986) sowie mittels PCR (SOSA et al. 2007).

2.4.3 Virale Infektionserreger

Bei Maifischen erfolgte bislang kein Nachweis viraler Infektionserreger. Daher werden die bei verwandten Fischarten aus der Familie Clupeidae vorkommenden Viren nachfolgend kurz dargestellt.

Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie

Das Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV), welches auch als *Oncorhynchus 2 Novirhabdovirus* bezeichnet wird, ist ein einzelsträngiges, behülltes RNA-Virus aus der Gattung *Novirhabdovirus* und Erreger der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS). Die VHS ist auf der Nordhalbkugel bei einer Vielzahl von Fischarten im Süß- und Salzwasser verbreitet. Das VHSV verursacht eine hämorrhagische Septikämie einhergehend mit einer hohen Mortalität und bei chronischen Verläufen eine Schädigung des Nervensystems (SMAIL und SNOW 2011). Bei VHS handelt es sich um die ökonomisch bedeutendste Erkrankung in der europäischen Regenbogenforellen-Aquakultur (EINER-JENSEN 2004). Daher ist VHS als Tierseuche bei der OIE gelistet (OIE 2018a) und in der Gesetzgebung innerhalb der EU als nicht exotische Seuche aufgeführt und somit anzeigepflichtig (Anhang IV, Teil II der Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006, ABl. EU Nr. L328 S. 14). Nach deutschem Recht ist die Anzeigepflicht für VHS im §1 der Verordnung über anzeigepflichte Tierseuchen (TierSeuchAnzV) festgelegt.

In der Familie Clupeidae wurde das VHSV beim Atlantischen Hering (*Clupea harengus*) in Nord- und Ostsee (MORTENSEN et al. 1999) sowie dem Ärmelkanal (DIXON et al. 1997) nachgewiesen. Weiterhin wurde das VHSV im Zusammenhang mit Bestandseinbrüchen des Pazifischen Herings (*Clupea pallasi*) in den USA isoliert (MEYERS et al. 1994). Zum Virusnachweis wurde zunächst eine Anzucht auf den Zelllinien BF-2 (Bluegill Sunfish Fibroblast) (MEYERS et al. 1994, MORTENSEN et al. 1999), EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) (DIXON et al. 1997, MEYERS et al. 1994) bzw. CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) (MEYERS et al. 1994) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Virusidentifikation mittels ELISA (DIXON et al. 1997, MORTENSEN et al. 1999), Virusneutralisationstest, Transmissionselektronenmikroskop und PCR (MEYERS et al. 1994).

Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose

Bei dem Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHNV) oder *Oncorhynchus 1 Novirhabdovirus* handelt es sich um ein einzelsträngiges, behülltes RNA-Virus der Gattung *Novirhabdovirus*. Das IHNV ist der Erreger der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHN), welche im Nordwest-Pazifik bei Süß- und Salzwasserfischen, insbesondere Salmoniden der Gattungen *Oncorhynchus, Salmo* und *Salvelinus,* vorkommt (LAFFERTY et al. 2015). Die IHN ist gekennzeichnet durch Hämorrhagien und Septikämien mit Mortalitäten von 18-78 % (ST-HILAIRE et al. 2002). Aufgrund seiner großen Bedeutung für die Aquakultur, aber auch für bedrohte Salmonidenarten (BOOTLAND und LEONG. 2011), ist IHN ebenfalls eine nicht exotische (OIE 2018c) und nach §1 der TierSeuchAnzV anzeigepflichtig.

Im Rahmen einer Beprobung von Wildfischen in der Umgebung von Netzkäfigen mit Lachsen in British Columbia, Kanada, wurde das IHNV bei einem Pazifischen Hering nachgewiesen (KENT et al. 1998b). Der Virusnachweis erfolgte mittels Anzucht auf den Zelllinien EPC und CHSE-214 und nachfolgendem Virusneutralisationstest. Obwohl der Pazifische Hering in der Richtlinie 2006/88/EG nicht als für IHNV empfängliche Art gelistet wird, beurteilt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) den Pazifischen Hering aufgrund dieser wissenschaftlichen Daten als empfänglich für IHN (EFSA 2008).

Virus der infektiösen Lachsanämie

Bei dem Erreger der infektiösen Anämie der Lachse (ISA), auch ansteckende Blutarmut der Lachse genannt, handelt es sich um ein zur Familie Orthomyxoviridae, Gattung *Isavirus*, gehörendes behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus (ISAV). Das ISAV verursacht schwere Erkrankungen bei Wild- und Zuchtpopulationen des Atlantischen Lachses und des Silberlachses (*Oncorhynchus kisutch*) in Amerika, Nordeuropa sowie Chile (KIBENGE et al. 2001, RIMSTAD und MJAALAND 2002). Andere Fischspezies, wie beispielsweise Regenbogenforellen, Aale oder der Seesaibling (*Salvelinus alpinus*), können als latente Virusträger fungieren. Die Symptome einer Erkrankung umfassen neben einer Anämie auch Exophthalmie, Aszites, Hepatomegalie mit Nekrosen sowie Hämorrhagien in der

Niere (KIBENGE et al. 2004). Die ISA ist insbesondere für die Salmoniden-Aquakultur wegen hoher Tierverluste von großer wirtschaftlicher Bedeutung (HASTINGS et al. 1999). Aus diesem Grund wurde die ISA von der OIE als Tierseuche gelistet (OIE 2018d) und ist in Deutschland als nicht exotische Tierseuche anzeigepflichtig (§1 der TierSeuchAnzV).

In Norwegen und Kanada wird der Atlantische Hering als latente Überträger der ISA für regelmäßig beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) auftretende Krankheitsausbrüche der ISA verantwortlich gemacht (NYLUND et al. 2002). Die Empfänglichkeit des Atlantischen Herings für das ISAV wurde im Immersionsbad experimentell nachgewiesen. Der Virusnachweis war jedoch nur in der RT-PCR, nicht in der Anzucht auf ASK-Zellen (Atlantic Salmon Kidney) erfolgreich. Darüber hinaus wurde ISAV bei Nordamerikanischen Flussheringen ohne klinische Symptome nachgewiesen (ROLLAND 2004). Dieser Nachweis wurde jedoch aufgrund mangelhafter wissenschaftlicher Daten beispielweise zur Virusreplikation und Pathologie als unzureichend beurteilt (EFSA 2008).

Virus der infektiösen Pankreasnekrose

Das Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) ist ein doppelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus der Gattung *Aquabirnavirus* und Erreger der infektiösen Pankreasnekrose (IPN). Bei der IPN handelt es sich um eine in Amerika, Asien und Europa verbreitete, sowohl im Süß- als auch im Meerwasser vorkommende Erkrankung mit großer Bedeutung für die Aquakultur (ROBERTS und PEARSON. 2005, SALGADO-MIRANDA 2006). Die Virusisolation erfolgte bislang aus zahlreichen Fischspezies, wobei Salmoniden, insbesondere Regenbogenforellen und Saiblinge, besonders empfänglich sind. Die Infektion verursacht vor allem bei Jungfischen eine Umfangsvermehrung des Abdomens, petechiale Blutungen in den inneren Organen, eine Pankreasnekrose und eine akute katarrhalische Enteritis mit Mortalitäten bis zu 90 % (MUNRO und MIDTLYNG 2011).

Das IPNV wurde bei der kanadischen Alse und dem Atlantischen Menhaden in den USA nachgewiesen (MCALLISTER et al. 1984, STEPHENS et al. 1980). Bei dem Atlantischen Menhaden verursacht das IPNV jährlich auftretende Frühjahrsmortalitäten (STEPHENS et al. 1980). In beiden Studien erfolgte der Virusnachweis

durch Anzucht auf verschiedenen Zelllinien, Virusneutralisationstest und im Elektronenmikroskop sowie bei STEPHENS et al. (1980) zusätzlich durch Untersuchung der Sensibilität des Virus für Chloroform. Als Zelllinien wurden Menhaden-Nierenzellen (STEPHENS et al. 1980) oder die Zelllinien BF-2, CHSE-214, RTG-2 (Rainbow Trout Gonad), BB (Brown Bullhead) und FHM (Fathead Minnow) (MCALLISTER et al. 1984) verwendet.

Piscines Orthoreovirus

Das piscine Orthoreovirus (PRV) ist ein doppelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus aus der Familie Reoviridae, welches erstmals im Jahr 2010 als piscines Reovirus als Erreger der Entzündung der Herz- und Skelettmuskulatur (HSMI) beschrieben wurde (PALACIOS et al. 2010). Nach taxonomischer Einordnung durch das Internationale Komitee für Taxonomie der Viren (ICTV) in die Gattung *Orthoreovirus* wurde das Virus dementsprechend in piscines Orthoreovirus umbenannt (MARKUSSEN et al. 2013). Die HSMI wurde erstmals 1999 bei Atlantischen Lachsen in einer Lachsfarm in Norwegen beschrieben (KONGTORP et al. 2004) und hat sich mittlerweile bis Schottland ausgebreitet (FERGUSON et al. 2005). Kürzlich wurde PRV in Nordwest Amerika beim Atlantischen Lachs und Rotlachs (*Oncorhynchus nerka*) ohne klinische Symptome nachgewiesen. Die charakteristischsten Symptome der HSMI sind Nekrosen im Herzen und der roten Skelettmuskulatur. Die Morbidität ist hoch und die Mortalität kann kumulativ bis zu 20 % betragen (KONGTORP et al. 2004). Die Erythrozyten stellen die Hauptzielzellen des Virus dar (WESSEL et al. 2015). Zusammenfassend ist PRV ein neu aufgetretenes Pathogen mit noch nicht abschließend geklärter Bedeutung für Wildfische und Aquakultur (TENGS und RIMSTAD 2017).

Bei Atlantischen Heringen an der Nordwestküste Norwegens wurde das erst vor kurzem entdeckte PRV mit einer PRV-spezifischen RT-qPCR nachgewiesen (WIIK-NIELSEN et al. 2012). Die Prävalenz war mit einem positiven von 37 untersuchten Organpools (insgesamt 170 Fische) niedrig. Inwiefern der Atlantische Hering klinisch erkranken kann oder ob es sich bei ihm um einen latenten Überträger handelt, ist bislang ungeklärt.

Virus der Erythrozyten-Nekrose

Bei dem Virus der Erythrozyten-Nekrose (ENV) handelt es sich um ein zur Gattung *Iridovirus* gehörendes, doppelsträngiges, behülltes DNA-Virus, welches die virale Erythrozyten-Nekrose (VEN) verursacht (WOLF 1988). Weltweit wurde die VEN bei mehr als 20 verschiedenen marinen und anadromen Fischspezies beschrieben und als eine Ursache von Massensterben bei Pazifischen Heringen identifiziert (HERSHBERGER et al. 2009, MEYERS et al. 1986). Die Infektion führt zunächst zur Bildung von zytoplasmatischen Einschlusskörperchen in Erythrozyten, Karyopyknose, Karyorrhexis und Karyolyse und nachfolgend zu einer Anämie (DANNEVIG und THORUD 2011, GLENNAC et al. 2012).

Das ENV wurde sowohl beim Nordamerikanischen Flusshering (SHERBURNE 1977), beim Pazifischen Hering (MEYERS et al. 1986) sowie beim Atlantischen Hering (RENO et al. 1978b) nachgewiesen. Die Prävalenz lag beim Nordamerikanischen Flusshering zwischen 10,5 % und 56,1 % (SHERBURNE 1977) bzw. zwischen 4 % und 59 % beim Pazifischen Hering (MACMILLAN und MULCAHY 1979). Bei einem ENV-Ausbruch im Jahr 2005 erreichte die Prävalenz bei juvenilen Pazifischen Heringen 67 % (HERSHBERGER et al. 2009). Die Diagnose erfolgte über den Nachweis typischer Zellläsionen in der lichtmikroskopischen Untersuchung von Blutausstrichen, die mit Giemsa (MACMILLAN und MULCAHY 1979, SHERBURNE 1977) oder Diff-Quick (MEYERS et al. 1986) gefärbt wurden. In zwei Studien erfolgte der Virusnachweis in Erythrozyten im Elektronenmikroskop (MEYERS et al. 1986, RENO et al. 1978b). Vor Kurzem gelang erstmals die molekularbiologische Identifikation des Virus und die Etablierung einer spezifischen PCR (EMMENEGGER et al. 2014).

Pilchard Herpesvirus

Bei Herpesviren der Fische handelt es sich um behüllte, doppelsträngige DNA-Viren, die zusammen mit Herpesviren der Amphibien die Familie Alloherpesviridae bilden (WALTZEK et al. 2009). Alloherpesviren sind weltweit bei vielen Fischarten im Süß- und Salzwasser verbreitet und verursachen zum Teil schwere Infektionen mit hohen Mortalitäten wie beispielsweise das Koi-Herpesvirus (KHV) (ILOUZE et al. 2010) oder das Herpesvirus der Ictaluridae (Katzenwelse)

(IcHV-1) (PLUMB 1978). Wie bei den Herpesviren der Säuger, Vögel und Reptilien sind die Alloherpesviridae charakterisiert durch eine hohe Wirtsspezifität, die Fähigkeit, mit komplexen Mechanismen mit der Wirtsabwehr zu interagieren und latente Infektionen zu verursachen (HANSON et al. 2011).

In den Jahren 1995 und 1998-1999 wurden bei der Pazifischen Sardine (*Sardinops sagax neopilchardus*) in australischen und neuseeländischen Gewässern Massensterben mit Populationsverlusten bis zu 75 % beobachtet (GAUGHAN et al. 2000, HYATT et al. 1997, JONES et al. 1997, MURRAY et al. 2001). Im Jahr 1995 wurde in den Kiemen betroffener Tiere elektronenmikroskopisch ein Herpesvirus nachgewiesen und als Pilchard Herpesvirus (PHV) beschrieben (HYATT et al. 1997, JONES et al. 1997). Bis zur Entwicklung einer PCR (CROCKFORD et al. 2005) erfolgte der Virusnachweis ausschließlich elektronenmikroskopisch. In den Folgejahren nach 1999 traten trotz Nachweis von PHV mittels PCR mit einer Prävalenz von bis zu 55 % an australischen Küsten keine virusbedingten Mortalitäten mehr auf. Deshalb wurde das Pilchard Herpesvirus als mittlerweile endemisch in diesem Gebiet angesehen, wobei seine ursprüngliche Herkunft nach wie vor ungeklärt bleibt (WHITTINGTON et al. 2008).

Virus der Lymphocystis-Erkrankung

Bei dem Virus der Lymphocystis-Erkrankung (LCDV) handelt es sich um ein doppelsträngiges, behülltes DNA-Virus der Familie Iridoviridae. Es werden zwei genetisch verschiedene Spezies, LCDV-1 und LCDV-2, unterschieden (CANO et al. 2006). LCDV-1 kommt vorwiegend bei der Flunder (*Platichthys flesus*) und der Scholle (*Pleuronectes platessa*) vor, während LCDV-2 zumeist aus Wundtupfern der Kliesche (*Limanda limanda*) isoliert wurde. Das Wirtsspektrum von LCDV umfasst weltweit mehr als 125 Fischarten aus dem Süß-, Brack- und Meerwasser, bei denen es sich sowohl um Wild-, Nutz- und Zierfische handelt (BORREGO et al. 2017). In Europa ist die Lymphocystis-Erkrankung (LCD) insbesondere in der Nordsee und dem Mittelmeer endemisch. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch das Auftreten von kleinen, cremefarbenden Läsionen in Haut und Flossen. Diese entstehen durch Papillom-ähnliche Hypertrophie infizierter Fibroblasten im Bindegewebe, die wie epitheliale Tumore proliferieren können

(SAMALECOS 1986). LCD ist eine chronische Erkrankung, welche selten zu Todesfällen führt, jedoch aufgrund fehlender Vermarktbarkeit betroffener Fische deutliche ökonomische Verluste verursachen kann (BORREGO et al. 2017, SINDERMANN 1984).

Das LCDV wurde in den Jahren 1971-1972 durch elektronenmikroskopischen Nachweis mit einer Prävalenz von 1-2,7 % beim Ostsee-Hering beschrieben (ANEER und LJUNGBERG 1976). In einer weiteren Studie beim Ostsee-Hering wurde durch makroskopischen Nachweis von LCDV-Läsionen eine Prävalenz von 0-7,4 % nachgewiesen (GRYGIEL 1999).

2.4.4 Parasitäre Infektionserreger

Parasiten bei Maifischen wurden früher eher nebensächlich in Publikationen über die Biologie und Ökologie der Maifische erwähnt (für eine Gesamtübersicht siehe Anhang I: Tabelle 18). Zurzeit wird jedoch die Bedeutung von Makroparasiten für die Maifischpopulation zunehmend wissenschaftlich untersucht. BAO et al. (2015) analysierten in zwei Studien ausschließlich Makroparasiten bei Maifischen in Flüssen der iberischen Halbinsel (BAO ET AL. 2015A, BAO ET AL. 2015B). Kürzlich untersuchten GERAD et al. (2016, 2017) den Einfluss verschiedener Makroparasiten auf verschiedene Konditionsindizes (Körpermasse, Länge, Fettreserven, Korpulenzfaktor) beim Maifisch aus dem Nordost-Atlantik und den angrenzenden großen Flusssystemen. Die Ergebnisse der Studie werden nachfolgend bei den entsprechenden Parasitenarten dargestellt. Die parasitologischen Untersuchungen galten jedoch ausschließlich dem Nachweis metazoischer Parasiten, während protozoische Parasiten bislang nicht untersucht und beschrieben wurden. Nachfolgend werden ausschließlich die im LIFE Projektgebiet in Frankreich und Deutschland vorkommenden Parasiten dargestellt.

Im LIFE-Projektgebiet in Frankreich wurden die Parasiten *Clavellisa emarginata* (Copepoda: Ruderfußkrebse) und *Mazocraes alosae* (Monogenea: Hakensaugwürmer) auf den Kiemen sowie *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Rundwürmer) und *Hemiurus appendiculatus* (Trematoda: Saugwürmer) im Magen und Darm von Maifischen nachgewiesen (TAVERNY 1991).

Im deutschen LIFE-Projektgebiet wurde *Clavellisa emarginata* (BOXSHALL 1974) auf den Kiemen sowie *Hysterothylacium aduncum* (PUNT 1941) und *Eubothrium fragile* (JOYEUX und BAER 1936) im Darm von Maifischen beschrieben. WILLEMSE (1968) entdeckte *Scolex pleuronectis* syn. *Scolex polymorphus* (Cestoda) im Darm von Maifischen in Holland. Bei Maifischen von der belgischen Küste, aus dem Rhein bei Basel und aus der Keltischen See wurde *Pronoprymna ventricosa* (Trematoda) im Darm nachgewiesen (BRAY und GIBSON 1980). Im Hochrhein in der Schweiz beschrieb FATIO (1890) ebenso *Mazocraes alosae, Eubothrium fragile, Hemiurus appendiculatus* und *Hysterothylacium aduncum* bei Maifischen. Zusätzlich wies der Autor noch *Agamonema capsularia* (Nematoda) im Magen und Darm sowie *Hemiurus luehei* und *Rhadinorhynchus pristis* (Acanthocephala: Kratzwürmer) im Darm nach.

Die Identifikation der Parasiten erfolgte bei allen Studien anhand von morphologischen Charakteristika.

Copepoda (Ruderfußkrebse)

Bei *Clavellisa emarginata* (Unterklasse: Copepoda, Familie: Lernaeopodidae) handelt es sich um einen hochspezialisierten Ektoparasiten der Kiemen insbesondere der Gattung *Alosa*, an der Atlantikküste Europas, im Mittelmeer und im Schwarzen Meer (KABATA 1964). Die Infektion beschränkt sich bei anadromen Arten auf die Lebensphase im Meerwasser, während bei der Wanderung ins Süßwasser die Parasitenprävalenz und -dichte deutlich abnimmt (APRAHAMIAN 1985). *C. emarginata* ist getrenntgeschlechtlich und hat einen monoxenen Lebenszyklus mit verschiedenen Lebensstadien (Naupliuslarve, Copepoditstadium) (HAIRSTON und BOHONAK 1998). Bei keinem der Maifische wurden pathologische Veränderungen durch den Befall mit *C. emarginata* beschrieben (BOXSHALL 1974, TAVERNY 1991). Zudem war die Prävalenz von 2 % im GGD-System (TAVERNY 1991) und 1 % im Nordost-Atlantik (GÉRARD et al. 2017) gering, weshalb keine wesentliche Bedeutung des Parasiten für die Maifischpopulation angenommen wurde.

Monogenea (Hakensaugwürmer)

Mazocraes alosae (Unterklasse: Polyopisthocotylea, Familie: Mazocraeidae) ist ein Kiemenparasit und wirtsspezifisch für die Gattung *Alosa*. Wie andere Polyopisthocotylea weist *Ma. alosae* einen monoxenen Lebenszyklus auf und ernährt sich durch Hämatophagie. Sein Verbreitungsgebiet liegt im Kaspischen und im Schwarzen Meer und angrenzenden Süßwassersystemen (BARZEGAR et al. 2012, GÉRARD et al. 2016) sowie in Ästuaren und Flüssen Westeuropas (APRAHAMIAN 1985, APRAHAMIAN et al. 2003, DOHERTY et al. 2004). Die Prävalenz von *Ma. alosae* und die Parasitendichte bleibt bei der Laichwanderung unverändert (APRAHAMIAN 1985). Um die Bedeutung von *Ma. alosae* zu evaluieren, wurden in einer aktuellen Studie von GÉRARD et al. (2016) Maifische und Finten aus dem Nordost-Atlantik sowie großen Atlantik-Zuflüssen untersucht. Der Autor wies bei Maifischen eine Prävalenz von 95-100 % mit einer Parasitendichte von 12-243 Exemplaren pro Fisch nach. Dabei korrelierte die Parasitendichte positiv mit dem Fettgehalt sowie dem Korpulenzfaktor der untersuchten Maifische. Es wurde daher von einer langen Koevolution von Wirt und Parasit ausgegangen, welche zu einem Gleichgewicht zwischen Platz- und Nahrungsbedarf des Parasiten und Gesundheit des Wirts geführt hat. Im GGD-System wurden lediglich vereinzelte Exemplare von *Ma. alosae* ohne pathologische Veränderungen der Kiemen nachgewiesen (TAVERNY 1991).

Acanthocephala (Kratzwürmer)

Rhadinorhynchus pristis (Klasse: Palaeacanthocephala, Familie: Rhadinorhynchidae) hat ein Verbreitungsgebiet an der Küste Brasiliens, der kanadischen Atlantikküste, im Nordwest-Atlantik und europäischen Gewässern (GIBSON 2004). Bei Maifischen wurde *R. pristis* bislang im Rhein (FATIO 1890) sowie in Flüssen der Westiberischen Halbinsel mit einer Prävalenz von 14,8 % nachgewiesen (BAO et al. 2015b, MOTA et al. 2015). Bei diesem Acanthocephala handelt es sich um einen Darmparasiten mit einem komplexen Lebenszyklus bestehend aus Euphausiiden (Krill) als Zwischenwirten und marinen Fischen als Endwirten. Krankheitsausbrüche durch Acanthocephala bei Fischen und dadurch bedingte bedeutende ökonomische Verluste sind selten (NICKOL 2006). Obwohl

Rhadinorhynchus sp. kommerziell wichtige Fischgattungen infiziert (GREGORI et al. 2013), ist über seine Pathogenität bislang wenig bekannt.

Cestoda (Bandwürmer)

Der marine, bezüglich der Gattung *Alosa* wirtsspezifische Parasit *Eubothrium fragile* (Klasse: Cestoda, Familie: Triaenophoridae) hat ein Verbreitungsgebiet in Nordeuropa, bestehend aus England (Fluss Severn), der Ost-, Nord- und Irischen See sowie dem Rhein (KENNEDY 1978, KUCHTA et al. 2005). In Frankreich wurde dieser Parasit bislang nicht nachgewiesen (KENNEDY 1978). Die Entwicklung von *E. fragile* verläuft über Amphipoden (Flohkrebse) als Zwischenwirt und *Alosa* spp. als Endwirt. Der Hauptwirt von *E. fragile* ist dabei die Finte. Dieser Parasit wurde bisher nur selten (KENNEDY 1981, KUCHTA et al. 2005) und in geringer Prävalenz von 1 % im Darm und den Pylorusanhängen beim Maifisch nachgewiesen (GÉRARD et al. 2017).

Bei dem anderen nachgewiesenen Cestoden *Scolex pleuronectis* syn. *Scolex polymorphus* (WILLEMSE 1968) handelt es sich nicht um eine eigene Art, sondern um eine früher verwendete Sammelbezeichnung für Larvenstadien, die nicht bestimmt werden konnten (MOLNÁR et al. 2006).

Trematoda (Saugwürmer)

Hemiurus appendiculatus, He. luehei (Familie: Hemiuridae) und *Pronoprymna ventricosa* (Familie Faustilidae) gehören zu den Digenea, welche häufig im Magen und Darm von marinen und diadromen Fischen, insbesondere bei Clupeiden im Atlantik, dem Mittelmeer sowie dem Schwarzen Meer nachgewiesen werden (BYKHOVSKAYA-PAVLOVSKAYA et al. 1964). Der heteroxene Lebenszyklus von *He. appendiculatus* und *He. luehei* beinhaltet wirbellose Zwischenwirte wie Gastropoden (Schnecken), Copepoden (Ruderfußkrebse) und Chaetognathen (Pfeilwürmer) sowie Teleostei (echte Knochenfische) als Endwirte (GIBSON und BRAY 1986). *P. ventricosa* hat ebenfalls einen obligat heteroxener Lebenszyklus mit Amphipoden als wirbellosen Zwischenwirten und Clupeiden als Endwirten (BRAY und GIBSON 1980). TAVERNY 1991 wies *He. appendiculatus* mit einer Prävalenz von 53,6 % (im Meer) bzw. 87,0 % (im Ästuar) bei Juvenilen

und von 28,5 % bei den Rückkehrern im GGD-System nach. Diese hohe Prävalenz von *He. appendiculatus* wurde ebenfalls bei Maifischen aus anderen geographischen Regionen in Europa festgestellt (BAO et al. 2015b, DOHERTY und MCCARTHY 2002, GÉRARD et al. 2017). Obwohl das Vorkommen von *P ventricosa* in verschiedenen Maifischpopulationen belegt ist (BRAY und GIBSON 1980, DOHERTY und MCCARTHY 2002), wurde dieser Parasit noch nicht bei Maifischen im GGD-System nachgewiesen.

Nematoda (Rundwürmer)

Hysterothylacium aduncum (Familie: Raphidascarididae) ist ein weit verbreiteter, obligat heteroxener Parasit bei Meeresfischen. Wie bei allen Anisakidae verfügt *Hy. aduncum* über einen komplizierten Lebenszyklus mit verschiedenen Fischspezies und zahlreichen Invertebraten als Zwischen-, paratenischen und Transportwirten (MATTIUCCI et al. 2008). Der Lebenszyklus von *Hy. aduncum* umfasst vier Larvenstadien in verschiedenen Zwischenwirten (vorwiegend Crustacea [Krebstiere], Chaetognathen [Pfeilwürmer] und kleinen Fischpezies). Als Endwirt dienen Meeresfische, in denen die adulten getrenntgeschlechtlichen Würmer nachgewiesen werden können (KLIMPEL und RÜCKERT 2005, KØIE 1993). Obwohl Anisakidae als marine Parasiten gelten, wurde experimentell ein vollständiger Lebenszyklus von *Hy. aduncum* im Süßwasser beschrieben, wobei als Voraussetzung hierfür infizierte anadrome Fischarten als Eintragsquelle in Flüssen angesehen wurden (YOSHINAGA et al. 1987). In die Leibeshöhle migrierende Nematoden verursachen zum Teil massive Infektionen, welche eine entzündliche Reaktion des peripheren Gewebes verursachen (LARSEN et al. 2002, MOLNÁR et al. 2006, SANTAMARINA et al. 1994). Weiterhin wird bei *Hysterothylacium* sp. vermutet, dass verzehrte, lebende Larven Erkrankungen beim Menschen verursachen können (NORRIS und OVERSTREET 1976). *Hy. aduncum* wurde bei 0-4,5 % der Juvenilen im Ästuar, 55,5 % der Maifische in der marinen Lebensphase und bei 94,5 % der adulten Rückkehrer im GGD-System mit hoher Parasitenzahl nachgewiesen. In anderen Maifischpopulationen wurden vergleichbar hohe Prävalenzen festgestellt (BAO et al. 2015b, DOHERTY und MCCARTHY 2002, GÉRARD et al. 2017). Bei Maifischen im Nordost-Atlantik wurde von

GÉRARD et al. (2017) eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen von *Hy. aduncum* und den Körperindizes (Körpermasse, Länge, Fettreserven, Korpulenzfaktor) nachgewiesen. Daher scheint *Hy. aduncum* keine wesentlichen negativen Auswirkungen auf die Maifischpopulation auszuüben.

Bei *Agamonema capsularia* handelt es sich nicht um eine valide Spezies, da alle *Agamonema* spp. als unreife Askariden eingeordnet wurden (ÖRLEY 1882).

2.5 Der Einfluss der Wasserqualität auf die Fischgesundheit

Der Einfluss der Wasserqualität auf die Fischgesundheit ist in der Literatur vielfach belegt (BHATNAGAR und DEVI 2013, POXTON und ALLOUSE 1982, SEGNER et al. 2011, SVOBODOVÁ et al. 1993). Hierbei sind sowohl grundlegende physikalisch-chemische Wasserparameter (insbesondere Temperatur (EIFAC 1969a) und pH-Wert (EIFAC 1969b), Sauerstoffkonzentration (O_2) (DEAN und RICHARDSON 1999), Gesamt- und Karbonathärte (PURSLEY und WOLTERS 1994), Ammonium/Ammoniak (NH_4^+/NH_3) (EIFAC 1973), Nitrit (NO_2^-) (EIFAC 1984) und Nitrat (NO_3^-) (DAVIDSON et al. 2014)), als auch in das Wasser eingetragene chemische Substanzen bzw. Toxine (z. B. Pestizide, Schwermetalle, Kohlenwasserstoffe) von großer Bedeutung (AUSTIN 1999, SVOBODOVÁ et al. 1993). Eine Schädigung der Fische kann zum einen direkt erfolgen, beispielweise durch eine toxische Substanz wie Nitrit (SVOBODOVÁ et al. 2005) oder durch extreme Abweichungen physikalisch-chemischer Wasserparameter vom Referenzbereich einer Fischart (DAYE und GARSIDE 1976). Darüber hinaus hat die Wasserqualität zusätzlichen einen indirekten Einfluss auf die Fischgesundheit. Eine für die Bedürfnisse einer Fischart unzureichende Wasserqualität verursacht bei dieser eine stressbedingte Immunsuppression, welche die Fische nachfolgend empfänglicher für sekundäre Erkrankungen macht (CONTE 2004, ROTTMANN et al. 1992, SEGNER et al. 2011, SNIESZKO 1974). Ein klassisches Beispiel hierfür sind die bereits in Kap. 2.4.1 beschriebenen, sekundären Infektionen mit motilen Aeromonaden (HALEY et al. 1967, JANDA und ABBOTT 2010). Insbesondere geschlossene Aquakultursysteme sind besonders anfällig für Abweichungen der Wasserqualität (MASSER et al. 1999). Aber auch in Flusssystemen können beispielsweise hohe Temperaturen und niedrige Sauerstoffkonzentrationen auftreten und zu Massensterben von Fischen führen (HALEY et al. 1967). Daher sollten grundlegende Wasserparameter wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, Wasserhärte, Ammonium/Ammoniak, Nitrit und Nitrat bei der Beurteilung der Fischgesundheit als mögliche Ursachen oder Cofaktoren von Erkrankungen mit berücksichtigt werden.

2.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Hinblick auf den Maifisch (*A. alosa*) wurden bislang weder national noch im Rahmen des LIFE-Wiederansiedlungsprojekts umfassende Studien zu Infektionserregern durchgeführt. Bisherige Erkenntnisse zu Erregern beziehen sich im Wesentlichen auf Parasiten. Die Datenlage im Projektgebiet ist jedoch auch in diesem Bereich aufgrund der zum Teil weit zurückliegenden Studienzeitpunkte sowie der Beschränkung auf die Untersuchung von Makroparasiten nicht ausreichend. Virologische, bakteriologische und mykologische Untersuchungen von Maifischen fehlen bisher vollständig. Unter Berücksichtigung der Richtlinien zur Risikoanalyse bei Wildtiererkrankungen der IUCN ist jedoch die Kenntnis vorkommender Infektionserreger essentiell für die Projektplanung und Projektdurchführung von Wiederansiedlungsprojekten (OIE und IUCN 2014). Um den Erfolg von Wiederansiedlungsprojekten zu maximieren, sollten möglichst viele Daten vorliegen, um, unter anderem, möglichen infektiösen Gefahren konsequent begegnen zu können (FISCHER und LINDENMAYER 2000, OIE und IUCN 2014). Als kritische Punkte des LIFE-Maifischprojekts werden dabei (i) der Bestandseinbruch der Spenderpopulation aus dem GGD-System, (ii) die Gesundheit der Maifischelterntiere in Bruch, (iii) die Freiheit von Infektionserregern sowohl der im Rhein ausgewilderten Larven als auch der Zuchtpopulation in Aßlar definiert.

Deshalb umfasst das Forschungsvorhaben vorrangig die Untersuchung der Wild- als auch der Zuchtpopulation auf vorkommende Infektionserreger mit bakteriologischen, mykologischen, virologischen und parasitologischen Methoden. Dazu sollten zum einen adulte und juvenile Maifische der Wildtierpopulationen aus dem GGD-System und dem Rhein, zum anderen die Zuchtpopulation in Aßlar untersucht werden. Aufgrund der großen Bedeutung der Wasserwerte für die Interpretation vorkommender Erkrankungen sollten wichtige Wasserparameter bei eigenständiger Probennahme ebenfalls analysiert werden. Für beide Aufgabenbereiche wurden Maifische vom LIFE-Projekt oder von französischen Behörden zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungsdauer sollte drei Jahre betragen. Der gewählte Zeitrahmen sollte sowohl jährliche Schwankungen von Erkrankungen in

den Wildtierpopulationen abbilden, als auch ein kontinuierliches Monitoring der Zuchtpopulation in Aßlar ermöglichen. Nach Erstellung einer Übersicht des Krankheitsspektrums bei Maifischen sollten diese mit der bereits vorhandenen Literatur abgeglichen werden, um eine möglichst vollständige Zusammenfassung vorkommender Infektionserreger zu erhalten. Weiterhin sollte der Maifisch als neue Wirtsspezies oder als latente Überträger von in Deutschland und Frankreich vorkommenden, anzeigepflichtigen Tierseuchen ausgeschlossen werden. Anschließend sollten die nachgewiesenen Infektionserreger in Bezug auf die kritischen Punkte (Gesundheitsstatus der Wildpopulation im GGD-System sowie der Zuchtpopulation in Aßlar, Seuchenfreiheit der im Rhein ausgewilderten Larven) evaluiert werden und eine Risikobeurteilung für das Wiederansiedlungsprojekt erstellt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Maifische

Die für das Forschungsvorhaben verwendeten Maifische wurden vom LIFE+ Projekt und den französischen Behörden zur Verfügung gestellt. Im Untersuchungszeitraum von 2010 bis 2014 wurden 438 Maifische untersucht (Tabelle 1). Bei diesen handelte es sich um juvenile und adulte Maifische der Wildpopulation aus dem Rhein, Deutschland und dem GGD-System, Frankreich (n = 374) sowie der Zuchtpopulation in Aßlar, Deutschland (n = 64). Die Koordinaten der Fangorte der Wildfische sind im Anhang II in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 1: Gesamtübersicht der verwendeten Maifische aus Deutschland und Frankreich, 2010-2014

Jahr	Land	Herkunft	Alter	Anzahl
2010	Deutschland	Rhein	Juvenil	10
2011	Frankreich	Garonne	Juvenil	52
2012	Frankreich	Garonne	Adult	43
			Juvenil	19
		Dordogne	Juvenil	3
	Deutschland	Zuchtpopulation	Juvenil	44
2013	Frankreich	Garonne	Adult	41
		Dordogne		40
		Garonne	Juvenil	12
	Deutschland	Rhein	Juvenil	1
			Adult	1
		Zuchtpopulation	Juvenil	13
2014	Frankreich	Garonne	Adult	70
			Juvenil	19
	Deutschland	Rhein	Adult	8
			Juvenil	55
		Zuchtpopulation	Juvenil	7
Insgesamt:				**438**

Wildpopulation

Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Im Untersuchungszeitraum von 2010 bis 2014 wurden insgesamt 299 Maifische aus dem GGD-System, bestehend aus 105 juvenilen Maifischen (Tabelle 2) und 194 adulten Rückkehrern (Tabelle 3), untersucht.

Die juvenilen Maifische wurden im Rahmen des Fischpopulations-Monitorings von den französischen Behörden gefangen und umgehend bei -20 °C eingefroren bzw. in Ethanol (99,8 %) fixiert (2014). Die Beprobung erfolgte jährlich zwischen Mai und August, wobei die meisten Juvenilen in den Monaten Juli und August gefangen wurden. Die Fangorte in der Garonne, jeweils ohne verfügbare Koordinatenangaben, lagen in der Nähe der Städte Sainte-Bazeille (n = 6), Couthures (n = 22), Marmande (n = 42), Jusix (n = 7) und St. Sixte (n = 3) (unbekannt: n = 22) (Abbildung 4). Der Fangort der drei juvenilen Maifische aus der Dordogne ist unbekannt. Die Sektion der Maifische erfolgte an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische in Gießen (KVRAF). Die Untersuchungsmethoden wurden in Abhängigkeit von der Qualität des Probenmaterials (Ethanol-Fixierung, Autolysegrad) sowie der Fischgröße durchgeführt (Kap. 3.2.1).

Tabelle 2: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, juvenile Maifische, 2011-2014, GGD-System, Frankreich
G: Garonne, D: Dordogne, n. d.: nicht durchgeführt

Probenmaterial			Untersuchungsmethode				
Jahr	**Herkunft**	**Anzahl**	**Bakteriologie**	**Mykologie**	**Virologie**	**Parasitologie**	**Histologie**
2011	G	52*	n. d.	52	n. d.	52	n. d.
2012	G	19	19	19	9	19	n. d.
	D	3	3	3	2	3	n. d.
2013	G	12	n. d.	12	12	12	12
2014	G	19**	n. d.	19	n. d.	19	n. d.
Insgesamt:		**105**	**22**	**105**	**23**	**105**	**12**

* Zwei Jahre bei -20°C gelagert und fortgeschrittener Autolyse
** Ethanol fixiert

Die adulten, geschlechtsreifen Maifische (n = 194) wurden jeweils im Frühjahr (jeweils im Mai, im Jahr 2013 zusätzlich im Juni) in Fischpässen in Golfech (Garonne, n = 154) und in Tuilières (Dordogne, n = 40) gefangen (Koordinaten im Anhang II: Tabelle 19) und in die Maifischprojektanlage nach Bruch transportiert. In der Maifischprojektanlage wurden die Maifische in zwei Becken während der LIFE-Projektphase im Frühjahr und Sommer gehältert (für eine Beschreibung der Anlage siehe Kap. 2.2 und Abbildung 5). Die Projektphase endete jeweils saisonal wenn die Rückkehrer vollständig abgelaicht hatten. Die Sektion im Verlauf der Projektphase verstorbener und am saisonalen Projektphasenende euthanasierter Maifische erfolgte umgehend vor Ort (Kap. 3.2.1). Abweichend hiervon wurden im Jahr 2014 die während der Hälterung in Bruch verstorbenen Maifischen eingefroren. Am Ende der Projektphase wurden neben allen euthanasierten Maifischen von den verstorbenen, eingefrorenen Maifischen alle maximal mittelgradig autolytischen Exemplare ausgewählt und seziert (n = 10). Von den insgesamt 194 Maifischen wurden bei 73 verstorbenen Exemplaren aufgrund eines deutlich fortgeschrittenen Autolysegrades lediglich Körpermasse, Gesamt- und Standardlänge sowie das Geschlecht bestimmt (für weiterführende Erläuterungen zum Autolysegrad siehe Kap. 3.2.1). Die histologische Untersuchung wurde ebenfalls abhängig vom Autolysegrad durchgeführt, wobei nur Maifische mit maximal mittelgradiger Autolyse für diese Untersuchungsmethode ausgewählt wurden (n = 110) (Tabelle 3). Bei zwei Maifischen aus dem Jahr 2012 wurde gleichfalls Autolyse-bedingt auf die Durchführung der bakteriologischen Untersuchung verzichtet.

Tabelle 3: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, adulte Maifische, 2012-2014, GGD-System, Bruch, Frankreich

G: Garonne, D: Dordogne

Probenmaterial			Maifischprojektanlage Bruch		Untersuchungsmethode					
Jahr	**Anzahl**	**Herkunft**	**Becken Nr.**	**Anzahl im Becken**	**Bakteriologie**	**Mykologie**	**Virologie**	**Parasitologie**	**Histologie**
2012	42	G	1	22	19	21	21	21	10
			2	21	21	21	21	21	21
2013	55	G	1	41	29	29	29	29	29
		D	2	39	25	25	25	25	25
			Ohne*	1	1	1	1	1	1
2014	24	G	1	23	8	8	8	8	8
			2	43	12	12	12	12	12
			Ohne*	4	4	4	4	4	4
Insgesamt				**194**	**119**	**121**	**121**	**121**	**110**

*Auf dem Transport verstorben

Maifische aus dem Rhein, Deutschland

Maifische aus der Wildpopulation im Rhein waren für die Beprobung ausschließlich in den Jahren 2010, 2013 und 2014 verfügbar. Von insgesamt 75 Maifischen aus dem Rhein waren 66 juvenil (Tabelle 4) und 9 adult (Tabelle 5).

Die juvenilen Maifische aus dem Rhein wurden jeweils von August bis Oktober gefangen. Die meisten Maifische aus dem Jahr 2014 stammten aus dem Kühlwasserzulauf des Atomkraftwerks Philippsburg (n = 50). Die anderen Exemplare wurden gezielt im Rahmen des Monitorings des LIFE+ Projekts in Kalkar Grieth (n = 16) gefangen (Abbildung 6, Koordinaten im Anhang II: Tabelle 19). Nach dem Fang wurden die Maifische unmittelbar bei -20 °C eingefroren und an der KVRAF seziert. Die Untersuchungsmethoden wurden in Abhängigkeit von der Qualität des Probenmaterials (Autolysegrad) sowie der Fischgröße durchgeführt. Aufgrund der Größe der Fische wurden an einem Fisch jeweils nur ein Teil der Untersuchungsmethoden durchgeführt (Kap. 3.2.1).

Tabelle 4: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, juvenile Maifische, 2010-2014, Rhein, Deutschland
n. d.: nicht durchgeführt

Probenmaterial		**Untersuchungsmethode**				
Jahr	**Anzahl**	**Bakteriologie**	**Mykologie**	**Virologie**	**Parasitologie**	**Histologie**
2010	10*	n. d.	10	n. d.	10	n. d.
2013	1**	n. d.	1	n. d.	1	1
2014	55	26	55	26	55	29
Insgesamt:	**66**	**26**	**66**	**26**	**66**	**30**

*Zwei Jahre bei -20°C gelagert und fortgeschrittener Autolyse
**Ethanol fixiert

Die adulten Maifische wurden zum einen im Rahmen von Monitoringuntersuchungen des LIFE+ Projekts gezielt gefangen sowie von lokalen Behörden zur Verfügung gestellt. Die Fangorte waren in der Nähe der Städte Speyer (n = 3), Rees (n = 2), Philippsburg (n = 1), dem Landeshafen Wörth (n = 1), Ladenburg

(n = 1) und Urmitz (n = 1) (Abbildung 6, Koordinaten im Anhang II: Tabelle 19). Die Maifische wurden unmittelbar gekühlt und innerhalb von 24 h beprobt (n = 3) oder umgehend bei -20 °C eingefroren (n = 6) und zeitnah an der KVRAF seziert (Kap. 3.2.1).

Tabelle 5: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, adulte Maifische, 2013 und 2014, Rhein, Deutschland
n. d.: nicht durchgeführt

Probenmaterial		Untersuchungsmethode				
Jahr	**An-zahl**	**Bakte-riologie**	**Myko-logie**	**Virolo-gie**	**Parasito-logie**	**Histo-logie**
2013	1*	n. d.	1	n. d.	1	n. d.
2014	8	8	8	8	8	8
Insgesamt:	**9**	**8**	**9**	**8**	**9**	**8**

* Nur die Karkasse

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

In der Zuchtpopulation wurden bei klinisch unauffälligem Allgemeinzustand der Fische eine festgelegte Anzahl Maifische untersucht. In einem Zeitraum von drei Monaten wurden, soweit vorhanden, drei frisch verstorbene Maifische beprobt. Bei Auftreten von erhöhten Mortalitäten sowie pathologischen Veränderungen wurden zusätzlich verstorbene Maifische untersucht. Da die Fische aber aus demselben Kreislaufsystem stammten, wurde angenommen, dass sich potentielle Pathogene zum Untersuchungszeitpunkt auf mehrere Fische übertragen hatten. Für das Forschungsvorhaben wurden insgesamt 64 Maifische aus der Zuchtpopulation untersucht (Tabelle 6). Diese stammten sowohl aus dem kleinen, als auch aus dem großen Kreislauf (Kap. 2.2, Abbildung 7) und zählten zu den Generationen 0+, 1+ und 2+. Die Maifische wurden dabei sowohl frisch verstorben, als auch gefroren über das LIFE+ Projekt zur Verfügung gestellt. Sofern erforderlich (Untersuchung der Malformationen Kap. 4.3.10) wurden moribunde Maifische mit MS-222 (200 mgL^{-1} für 20 min) euthanasiert. Unter Berücksichtigung der Größe der Fische (z. B. 0+) und der Probenqualität (Autolyse) wurde an einem Fisch nur ein Teil der Untersuchungsmethoden durchgeführt (Kap. 3.2.1).

Tabelle 6: Probenmaterial und Untersuchungsmethoden, Zuchtpopulation, 2012-2014, Aßlar, Deutschland

Probenmaterial		Untersuchungsmethode				
Jahr	**An-zahl**	**Bakterio-logie**	**Myko-logie**	**Virolo-gie**	**Parasito-logie**	**Histo-logie**
2012	44	19	24	6	33	13
2013	13	10	13	13	13	9
2014	7	3	7	7	7	4
Insgesamt:	**64**	**32**	**44**	**26**	**53**	**26**

3.1.2 Wasserproben

In der Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich (Wildpopulation) und in der Maifischzuchtanlage in Aßlar, Deutschland (Zuchtpopulation) wurden parallel zu den Sektionszeitpunkten 1 x täglich Wasserproben aus den Becken genommen. Im Jahr 2014 wurden in Bruch zusätzlich die Messergebnisse (Sauerstoff, Temperatur) des Projektpersonals für das Datum des Todes der gefrorenen und am Projektende sezierten Maifische notiert. Die Wasserproben wurden mit sterilen 5 mL Spritzen direkt aus dem Wasserkörper entnommen, in mehrfach mit dem zu testenden Wasser gespülte Glasgefäße überführt und umgehend untersucht (Kap. 3.2.8). Das Beckenwasser wurde in der Maifischprojektanlage in Bruch insgesamt 51 x (n = 17 [2012], n = 25 [2013], n = 9 [2014], bei der Zuchtpopulation 12 x (n = 6 [2012], n = 3 [2013], n = 3 [2014]) eigenhändig untersucht. Bei Fang und Einsendung der Maifische an die KVRAF durch die französischen Behörden oder das LIFE-Projekt waren keine Wasserproben des Herkunftsgewässers zur Untersuchung verfügbar.

3.1.3 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die für die Untersuchungen verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Nähr- und Selektivmedien, Zelllinien und Geräte sind im Anhang III aufgeführt.

3.2 Methoden

Es erfolgte eine selbstständig durchgeführte, kontinuierliche (Maifischprojektanlage in Bruch) oder probennahmekorrelierte (Maifischzuchtanlage in Aßlar) veterinärmedizinische Begutachtung des Bestandes. Die Sektion von Maifischen wurde anhand eines Standard-Probennahmeplans (Kap. 3.2.1) durchgeführt. Der gonadosomatische Index wurde anhand der Körper- und Gonadenmasse berechnet (Kap. 3.2.2). Die bei der Sektion entnommen Proben wurden mit histologischen (Kap. 3.2.3), bakteriologischen (Kap 3.2.4), mykologischen (Kap. 3.2.5), virologischen (Kap. 3.2.6) und parasitologischen (Kap. 3.2.7) Methoden untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung von Wasserproben aus den Becken der Maifischprojektanlage in Bruch und denjenigen der Maifischzuchtanlage in Aßlar (Zuchtpopulation) (Kap. 3.2.8).

3.2.1 Sektionsgang und pathologisch-anatomische Untersuchung

Zunächst wurde der Autolysegrad des Maifisches anhand der Kiemenfarbe, der Augentrübung und des Verwesungsgeruchs bestimmt. Exemplare mit Verwesungsgeruch, trüben Augen sowie vollständig weißen Kiemen wurden von der weiterführenden Untersuchung ausgeschlossen. Die Gesamt- sowie die Standardlänge wurden mittels Metermaß und die Körper- sowie Gonadenmasse mittels Waage bestimmt. Als Standardlänge wurde die Länge des Fisches von der Schnautzenspitze bis zum Beginn der mittleren Flossenstrahlen der Schwanzflosse erfasst. Zur Auswertung dieser Parameter wurden geschlechts-, herkunfts- und jahresspezifische Mittelwerte inklusive Standardabweichung berechnet. Der Ernährungszustand wurde anhand der Fettreserven und der Bemuskelung beurteilt und alle äußerlich sichtbaren pathologischen Veränderungen schriftlich und fotographisch dokumentiert. Bei euthanasierten adulten Maifischen wurde eine Blutentnahme aus der *Vena caudalis* unter Verwendung einer Heparin-gespülten, sterilen 2 mL Spritze mit einer 21 Gauge Kanüle vorgenommen. Mit dem gewonnenen Blut wurden auf je fünf Objektträgern Blutausstriche angefertigt und luftgetrocknet. Nach Blutentnahme erfolgte zur sicheren Tötung zusätzlich ein Genick-

schnitt. Bei verstorbenen Maifischen wurde Blut aus dem Herzen entnommen und ebenfalls je fünf Blutausstriche angefertigt. Nach Entnahme von jeweils zwei Abstrichen von Haut, Kiemen und Flossen (Kap. 3.2.7) wurde eine 3 x 2 x 0,5 cm große Probe der Kiemen sowie eine 1 x 1 x 1 cm große Muskelprobe mit darüber liegender Haut und Schuppen für die histologische Untersuchung in Bouin´scher Lösung fixiert (Kap. 3.2.3). Weiterhin wurde eine ca. 1 x 1 x 0,3 cm große Probe der Schwanzflosse für die virologische Untersuchung (Kap. 3.2.6) in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei pathologischen Veränderungen wurden zusätzlich die Augen als Ganzes für die histologische Untersuchung in Formalin 5 % fixiert (Kap. 3.2.3). Bei Verdacht auf eine Mykose wurden zusätzlich Abstriche von betroffenen Stellen für die mikroskopische Untersuchung sowie bei nicht gefrorenen Maifischen für die mykologische Anzucht genommen (Kap. 3.2.5). Bei gefrorenen Maifischen wurde von der betroffenen Stelle mittels eines sterilen Sektionsbestecks eine Probe in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Maifisch unter Verwendung von Ethylalkohol (94 %) äußerlich desinfiziert. Die Leibeshöhle wurde mit einem sterilen Sektionsbesteck eröffnet und die entfernte Muskulatur der Körperwand für die parasitologische Untersuchung in eine Petrischale (Kap. 3.2.7) überführt. Nach Eröffnung der Leibeshöhle wurden alle inneren Organe pathologisch-anatomisch untersucht und pathologische Veränderungen schriftlich und fotographisch dokumentiert. Mit sterilen Impfösen wurden Abstriche aus Anschnitten von Herz, Leber, Kopfniere und Milz für die bakteriologische Untersuchung entnommen (Kap. 3.2.4). Daraufhin erfolgte die pathologisch-anatomische Beurteilung der inneren Organe. Das Vorkommen von Makroparasiten wurde dokumentiert (Kap. 3.2.7). Nachfolgend wurden die Gonaden entnommen und gewogen. Für die virologische Untersuchung wurden Organproben jeweils von Milz, Niere und Gehirn in je zwei 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, wobei in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 0,5 mL RNA*later* vorgelegt waren (Kap. 3.2.6). Der Gastrointestinaltrakt wurde der Länge nach eröffnet und jeweils zwei Abstriche vom Magen, den Pylorusanhängen sowie dem Darm für die parasitologische Untersuchung angefertigt (Kap. 3.2.7). Von Herz, Leber, Kopfniere, Milz, Gehirn, Magen, Pylorusanhängen und Darm wurden Organproben von max. 1 x 1 x 1 cm

für die histologische Untersuchung in Formalin 5 % bzw. max. 1 x 1 x 1 cm große Proben der Gonaden in Bouin´scher Lösung fixiert. Bei pathologischen Veränderungen wurden außerdem max. 1 x 1 x 1 cm große Proben von Schwimmblase, Gallenblase und Ösophagus für die Histologie in Formalin 5 % fixiert (Kap. 3.2.3). Zusätzlich wurden Proben von Kopfniere, Milz und Leber zwischen einem Objektträger und einem Deckgläschen gequetscht und umgehend mikroskopisch ausgewertet. Anschließend wurden von allen verbleibenden Organen und makroskopisch sichtbaren Parasiten Rückstellproben entnommen. Mit einem scharfen Messer wurde die Muskulatur längs eröffnet und auf Einblutungen hin untersucht. Die Proben für die Virologie wurden umgehend bei -80 °C eingefroren[1]. Die Muskel- und Organrückstellproben sowie die Proben gefrorener Maifische zur mykologischen Untersuchung wurden bei -20 °C eingefroren.

Abweichend vom beschriebenen Sektionsprotokoll wurden bei juvenilen Maifischen aufgrund Ihrer geringen Größe nicht alle Untersuchungsmethoden bei jedem Exemplar durchgeführt. Für die histologische (bei Maifischlarven auch die virologische) Untersuchung wurde ein Fisch als Ganzes verwendet. Die anderen Untersuchungsmethoden hingegen wurden je nach Größe des Maifisches kombiniert (Bakteriologie, Mykologie, Virologie und Parasitologie). Darüber hinaus wurde bei juvenilen Maifischen keine bakteriologische Untersuchung von Herz, Leber, Niere und Milz durchgeführt, sondern ein Abstrich aus der Leibeshöhle für die Anzucht verwendet. Für die virologische Untersuchung wurde bei Fischen < 4 cm der gesamte Fisch verwendet, bei 4-6 cm wurden die inneren Organe einschließlich der Niere entnommen, während bei Fischen > 6 cm eine Entnahme von Kopfniere, Milz und Gehirn erfolgte. Für die parasitologische Untersuchung bei Maifischen der Wildpopulation wurden zusätzlich Nierenproben entnommen und in Ethanol (≥ 99,5 %) fixiert oder gefroren (Kap. 3.2.7). Bei adulten, frisch verstorbenen oder euthanasierten Maifischen aus dem GGD-System und adulten Rückkehrern aus dem Rhein wurden außerdem Proben der Kopfniere in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 500 µL Aqua dest. und Penicillin/Streptomycin überführt (Kap. 3.2.7).

[1]In der Maifischprojektanlage in Bruch bestand lediglich die Möglichkeit Proben bei -20 °C einzufrieren. Es erfolgte ein zeitnaher Versand an das Friedrich-Loeffler-Institut und eine Lagerung der Proben bei -80 °C.

3.2.2 Berechnung des gonadosomatischen Index

Der gonadosomatische Index (GSI) dient der Schätzung der Geschlechtsreife eines Tieres und ob insbesondere Weibchen abgelaicht haben (DEVLAMING et al. 1982, WEST 1990). Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde der GSI eigenständig bei adulten Maifischen aus dem GGD-System ermittelt. Der GSI (in %) berechnet sich folgendermaßen (DEVLAMING et al. 1982):

$$\mathrm{GSI} = \left(\frac{\text{Gonadenmasse [in g]}}{\text{Körpermasse [in g]}}\right) \times 100$$

3.2.3 Histologische Untersuchung

Die fixierten Organe wurden unter Verwendung eines Haushaltssiebes von der Fixierlösung getrennt, zugeschnitten und in Einbettkassetten positioniert. Bouin-fixierte Präparate wurden anschließend über 24 h in Entfärbelösung (Rezept siehe Anhang III.I) entfärbt (BURCK 1988) und danach zusammen mit den Formalin-fixierten Präparaten weiter bearbeitet. Das Zuschneiden der fixierten Organe sowie die Auswertung der histologischen Schnitte unter einem Lichtmikroskop wurden eigenständig am Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) in Zusammenarbeit mit Dr. Hans Ulrich Eskens[2] durchgeführt. Die Paraffineinbettung, das Schneiden (4 µm) und Färben erfolgte von Mitarbeitern des LHL nach Standardmethoden (MULISCH und ULRICH 2010). Als Standardfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet. Außerdem wurden zahlreiche Sonderfärbungen zur Abklärung histologischer Verdachtsfälle angefertigt (Giemsa-Färbung, Grocott-Färbung, Eisen-Färbung, Kongorot-Färbung, Kossa-Färbung, PAS-Reaktion, Ziehl-Neelsen-Färbung) (MULISCH und ULRICH 2010). Aufgrund fehlender Literatur über die Histologie des Maifisches wurde zur Auswertung die Standardliteratur über Histologie bei Fischen verwendet (AINSWORTH 1992, FERGUSON et al. 2006a, GARDINER und POYNTON 1999, MÖLLER und ANDERS 1983, REIMSCHUESSEL 2008, REITE und EVENSEN 2006, ROBERTS 2012). Zusätzlich wurde Literatur zur Identifikation von Parasiten in histologischen

[2] Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Gießen, Deutschland

Schnitten herangezogen (BRUNO et al. 2006, CHITWOOD und LICHTENFELS 1972, GARDINER et al. 1988, GARDINER und POYNTON 1999, SAKANARI und MCKERROW 1989).

3.2.4 Bakteriologische Untersuchung

Abstriche aus Anschnitten der Leber, Milz, Herz, und Niere beziehungsweise der Leibeshöhle (Kap. 3.2.1) wurden jeweils auf einer Columbia Blutagarplatte mit 5 % Schafsblut, auf Gassner-Agar sowie auf modifiziertem Shieh-Medium (WHITMAN 2004) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden bei Raumtemperatur fünf Tage lang aerob bebrütet und täglich auf Keimwachstum kontrolliert (BULLER 2014, WHITMAN 2004). Angezüchtete Bakterien wurden morphologisch klassifiziert, ihr Vorkommen dokumentiert sowie ihr Wachstum eingestuft (geringstgradig, geringgradig, mittegradig, hochgradig). Von morphologisch unterschiedlichen Bakterien (von Agarplatten verschiedener Organe und Fische von einem Herkunftsort in zeitlicher Nähe) wurde jeweils exemplarisch ein Isolat entnommen und dieses bis zum Erhalt einer Reinkultur subkultiviert. Anschließend wurde jedes Isolat zweifach bei -80 °C eingefroren (Roti® Store Cryoröhrchen, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe). Zur Klassifizierung der Isolate wurde zunächst eine Gram-Färbung (Färbeprotokoll im Anhang IV) durchgeführt anhand derer weiterführende Untersuchungen eingeleitet wurden.

Biochemische Untersuchungen

Im Rahmen der weiteren Identifikation angezüchteter Bakterienisolate wurden standardmäßig die Oxidase- (Bactident® Oxidase, Merck KGaA, Darmstadt) und Katalase-Reaktion (ID-ase, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) nach Herstellerangaben getestet. Weiterhin wurde der oxidative und fermentative Glukoseabbau mittels eines O/F-Mediums (O/F-Medium, Merck KGaA, Darmstadt) nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die Voridentifikation der Isolate wurden abhängig von den vorherigen Testergebnissen kommerzielle Testkits (API [Analytical Profile Index]) als bunte Reihe nach Herstellerangaben verwendet (API 20 NE, API Rapid 32E oder API

ID 32 Strep von bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen). Bei der Bestimmung mittels API-System waren nach Herstellerangaben teilweise weiterführende, biochemische Untersuchungen erforderlich. Das Testkit API 20 NE ermöglicht keine Unterscheidung der nahe verwandten Arten *Ae. caviae* und *Ae. hydrophila.* Hierfür wird vom API-System eine Untersuchung auf Bildung von Gas beim Abbau von Glukose zur Unterscheidung vorgeschrieben. Dies wurde mittels Zuckeranreicherung im Reagenzglas mit Durham-Röhrchen überprüft (Rezept im Anhang III.II). Bei einem positiven Ergebnis handelt es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 2 % um *Ae. caviae* und von 94 % um *Ae. hydrophila.* Zusätzlich wurde die Beweglichkeit der Aeromonaden im Hitchens-Agar (Rezept im Anhang III.II) überprüft. Zur Bestätigung der Unterscheidung zwischen Aeromonaden und Vibrionen wurde am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere[3] eine Überprüfung der Sensibilität des Isolates gegen 0/129 durchgeführt. Das Vibriostatikum 0/129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridinphosphat) hemmt das Wachstum der Gattung *Vibrio* im Gegensatz zur Gattung *Aeromonas* (SCHUBERT 1962).

Massenspektrometrie

Anhand der Ergebnisse des API-Systems wurden alle in der bakteriologischen Untersuchung angezüchteten Isolate von Maifischen gleichen Alters und gleicher Herkunft (beispielsweise adulte Maifische aus Bruch) mit gleichem API-Ergebnis (inkl. weiterführender biochemischer Untersuchungen) zusammengefasst. Aus jeder dieser Gruppen von Isolaten wurde zufällig ein Isolat zur Untersuchung mittels MALDI-TOF MS ausgewählt. Diese Untersuchung wurde eigenständig unter Betreuung von Prof. Dr. Christa Ewers[3] sowie Dr. Ellen Prenger-Berninghoff[3] durchgeführt. Dabei wurden 24 h alte Kolonien vom Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut auf ein Stahl-Target überführt und 5 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Koloniematerial mit einer Matrix-Lösung (Bruker Matrix HCCA, portioned; Bruker Daltonics, Bremen) überschichtet und nach Herstellerangaben im MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen) gemessen und ausgewertet (CLARK et al. 2013, SINGHAL et al. 2015). Hierbei

[3] Institut für Hygiene und Infektionserreger der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

wurden Ergebnisse mit einer Übereinstimmungs-Kategorie von mindestens „B“ (Genus-Übereinstimmung) oder „A“ (Spezies-Übereinstimmung) sowie einem Scorewert von mindestens ++ (2.000 bis 2.299; sichere Genusidentifikation, wahrscheinliche Speziesidentifikation) bis +++ (2.300 bis 3.000; hoch wahrscheinliche Speziesidentifikation) als ausreichend definiert.

Wenn die Messung durch MALDI-TOF MS keine eindeutige Speziesidentifikation ermöglichte, wurde die Untersuchung mit vorangehender Extraktion bakterieller Proteine mit Ameisensäure wiederholt. Dafür wurde Koloniematerial in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300 µL Aqua dest. überführt und gut durchmischt. Es wurden 900 µL Ethanol absolut hinzugefügt, die Probe gut durchmischt und anschließend bei 10.000 $Umin^{-1}$ für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Abpipettieren vollständig entfernt und das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden 50 µL Ameisensäure (70 %) hinzugefügt und das Pellet resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µL Acetonitril wurde erneut gemischt und die Probe bei 10.000 $Umin^{-1}$ für 2 min zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurde 1 µL auf das Stahltarget pipettiert, 5 min luftgetrocknet und mit 1 µL Matrix überschichtet. Anschließend erfolgte die Messung im MALDI-TOF MS nach Herstellerangaben (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland).

Molekularbiologische Untersuchung

Eine molekularbiologische Untersuchung wurde zur Identifikation bei Isolaten (exklusive Aeromonaden, siehe unten) durchgeführt, bei denen durch MALDI-TOF MS keine eindeutige Speziesidentifikation möglich war. Dabei wurde die 16S rRNA PCR (CHUNG et al. 2007) von Koloniematerial von Dr. Ellen Prenger-Berninghoff[3] und Dr. Werner Herbst[3] vorgenommen. Vom PCR-Produkt wurde jeweils eine Sequenzierung des partiellen 16S rRNA-Gens vorgenommen. Zur Identifikation der Subspezies von *Lactococcus lactis* wurden für eine weitere 16S-rRNA-PCR zur vollständigen Sequenzierung des 16S rRNA-Gens die modifizierten Primer E8F und U1510R verwendet (BAKER et al. 2003). Die Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Sequenzierservice (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des

BLAST Programms (NCBI o. J.) mit allen in der GenBank gelisteten Sequenzen verglichen (BENSON et al. 2017).

Weiterführende Untersuchungen bei Aeromonaden

Sofern das MALDI-TOF MS in Verbindung mit der biochemischen Untersuchung keine sichere Speziesidentifikation der Aeromonaden ermöglichte, wurde eine abschließende Untersuchung des Isolats durch Dr. Jörg Rau[4] vorgenommen. Es wurde erneut eine MALDI-TOF MS Untersuchung mit Abgleich gegen die hauseigene Datenbank, ein Clustervergleich auf Ähnlichkeit der Isolate, eine *gyr*B Teilsequenzierung sowie eine biochemische Reihe durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit allen vorher erhobenen, übermittelten Daten zur abschließenden Speziesidentifikation verwendet.

Mykobakterien

Im Fall eines histologischen Verdachts auf das Vorliegen einer Mykobakteriose (Nachweis säurefester Stäbchen) wurden weitere Untersuchungen von Organrückstellproben eingeleitet. Diese wurden von Dr. habil. Tobias Eisenberg[5] durchgeführt. Organmaterial histologisch verdächtiger Maifische wurde dabei mittels Anzucht (AVID 1997) sowie mittels PCR mit dem Primerpaar 27F/926R und nachfolgender Sequenzierung des 16S rRNA-Gens (LAG 2006) untersucht. Die Sequenzierung des PCR-Produktes wurde anschließend ebenfalls durch einen kommerziellen Sequenzierservice (Seqlab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des BLAST Programms mit allen in der GenBank gelisteten Sequenzen verglichen (BENSON et al. 2017). Im Fall einer nicht ausreichend sicheren Identifikation der Isolate auf Speziesniveau wurde das *rpo*B-Gen der β-Einheit der bakteriellen RNA-Polymerase sequenziert. Diese Sequenz bietet bei der Identifikation von Mykobakterienspezies ein höheres diskriminatorisches Potential (KIM et al. 1999). Diese Untersuchung wurde von Dr. Jörg Rau[4] und Dr. Matthias Contzen[4] durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden ebenfalls mit allen in der GenBank gelisteten Sequenzen verglichen.

[4] Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Sitz Fellbach, Deutschland
[5] Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Gießen

3.2.5 Mykologische Untersuchung

Kiemen-, Haut und Flossenabstriche (Kap. 3.2.1) wurden umgehend lichtmikroskopisch unter 100-facher und 400-facher Vergrößerung untersucht. Nachgewiesene Pilzhyphen wurden fotographisch dokumentiert und taxonomisch anhand der Morphologie der Zoosporangien eingeordnet (ADL et al. 2005). Bei makro- oder mikroskopischen Verdacht auf das Vorliegen einer Mykose wurde bei frischen (nicht gefrorenen oder ethanolfixierten) Maifischen zusätzlich Kiemen-, Haut und Flossenabstriche sowie ggf. Augenabstriche mit einer Impföse (Kap. 3.2.1) genommen. Diese wurden auf einem Kimmig Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) ausgestrichen und aerob über fünf Tage bei Raumtemperatur kultiviert.

Zur Bestätigung der morphologischen Voridentifikation wurden Proben der auf Kimmig-Agar angezüchteten Pilze von Prof. Dr. Markus Thines[6] mittels ITS- (PLOCH et al. 2010) und *cox*2-Sequenzierung (CHOI et al. 2015) untersucht. Hierbei wurden jeweils eine Probe von adulten Maifischen aus Bruch vom Beginn und eine vom Ende der Reproduktionsphase aus jedem Jahr verwendet.

3.2.6 Virologische Untersuchung

Die Anzucht von Viren, die PCRs sowie die Agar-Gelelektrophoresen wurden eigenständig unter Anleitung von Dr. Dr. habil. Sven M. Bergmann[7] im Institut für Infektionsmedizin des Friedrich-Loeffler-Institutes durchgeführt.

Anzucht

Für die virologische Anzucht wurden die Organproben (Niere, Milz, Gehirn) in dem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß ohne RNA*later* verwendet (Kap. 3.2.1). Zunächst wurde ein Pool von maximal fünf adulten bzw. sechs juvenilen Maifischen eines Alters und einer Herkunft (z. B. adulte Maifische aus der Garonne im Jahr 2012) hergestellt. Dazu wurde ca. 20-25 mg Organmaterial (Gehirn, Niere, Milz) von jedem Individuum mit einem sterilen Besteck gepoolt und in

[6] Biodiversität und Klima Forschungszentrum, Frankfurt am Main, Deutschland
[7] Institut für Infektionsmedizin des Friedrich-Loeffler-Institutes, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, Deutschland

einem sterilen Mörser unter Verwendung von sterilem Seesand mit einem Pistill angerieben. Da adulten Maifische aus dem Rhein nicht zwischengehältert wurden (Abbildung von Hälterung unbeeinflusster Prävalenzen im Gewässer möglich) und das Material frisch war wurden diese Maifische einzeln untersucht. Bei diesen Maifischen wurden daher nur die verschiedenen Organe eines Fisches gepoolt. Anschließend wurden bei allen Proben 10 mL MEM Nr. 5 mit 0,01 mL Baytril 10 % zugeben und mit dem Mörser unter die homogene Organmasse gemischt. Das Homogenisat wurde in ein 10 mL Reagenzglas mit Schraubverschluss überführt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Reagenzgläser 30 min bei 4 °C und 5.000 $Umin^{-1}$ abzentrifugiert und der Überstand in ein weiteres 10 mL Reagenzglas überführt und bei -80 °C eingefroren. Der Überstand wurde für die Virusanzucht verwendet. Die Untersuchung der ersten Proben (alle Proben bis Ende 2013) wurde im Doppelansatz auf sieben verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Zelllinien von Clupeiden waren bei der Europäischen Sammlung von Zellkulturen (European Collection of Cell Cultures, ECACC) nicht verfügbar (ECACC o. J.). Da Zelllinien von Clupeiden nicht zur Verfügung standen, wurden Zelllinien von Salmoniden, Cypriniden, Spariformen und Anguilliformes verwendet, auf welchen die zu untersuchenden Viren ebenfalls kultivierbar sind. Dabei handelte es sich um die Zelllinien FHM, RT/F, EPC, BF-2, EK-1, CCB und CHSE/F (Beschreibung in Anhang V: Tabelle 20). Für die Proben aus dem Jahr 2014 wurden im Kontext eines reduzierten Untersuchungsprotokolls die Zelllinie RT/F, EK-1, CCB sowie zusätzlich die Zelllinie SAF-1 verwendet. Das Handling und die Subkultivierung der Zelllinien erfolgte nach Standardmethoden (siehe Anhang V: Tabelle 21). Zur Beimpfung der Zelllinien in geeigneten Zellkulturgefäße (z. B. 24-Well-Platten) wurde das Medium abgesaugt und 100 µL des Überstandes von den angeriebenen Organen über einen 0,22 µm Filter in je zwei Kavitäten im Doppelansatz beimpft. Jede Well-Platte beinhaltete wenigstens zwei nicht beimpfte Zellkontrollen. Nach Inkubation der Zellkulturgefäße mit dem Überstand aus den angeriebenen Organen für 12 h im Brutschrank wurden die Zellen wieder mit je 1 mL des jeweiligen Mediums überschichtet und sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturgefäße wurden jeweils am Tag drei und Tag sieben auf einen zytopathogenen Effekt (CPE) hin kontrolliert.

Nachfolgend wurden die Zelllinien jeweils dreimal verblindet passagiert, bevor eine Anzucht als negativ beurteilt wurde. Für die Passage wurden die beimpften Zellkulturgefäße am Tag sieben nach der Beimpfung über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Well-Platten aufgetaut, der Überstand von den beiden Kavitäten der Doppelbestimmung eines Organpools zusammen pipettiert, gemischt und nach oben beschriebenem Schema auf eine 24 h alte Zellkultur übertragen.

RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden die Organproben (Gehirn, Niere und Milz) in RNA*later* verwendet. Die Organpools wurden analog zu den Organpools für die virologische Anzucht gebildet. Aus dem Organpool wurden 20-25 mg Organmaterial in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 5 mm Metallkugel und 80 µL PBS abgewogen und im TissueLyser II (Qiagen GmbH, Hilden) homogenisiert. Danach wurde die RNA mittels TRIzol® Präparation (Phenol-Chloroform-Extraktion) nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt) an einer DNA-Workstation extrahiert (CHOMCZYNSKI und SACCHI 2006). Dem Organgewebe wurde 1 mL TRIzol® (Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt) hinzugefügt und das Eppendorf-Reaktionsgefäß nach 5 s Durchmischen seines Inhaltes für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert, 200 µL Chloroform hinzu pipettiert und nach erneutem Durchmischen für 5 s 20 min bei 4 °C und 10.000 $Umin^{-1}$ zentrifugiert. Die oberste, klare Phase wurde in ein vorbereitetes 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µL Isopropanol überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe 15 min bei 4 °C bei 10.000 $Umin^{-1}$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch langsames Abgießen verworfen und das Präzipitat mit 1 mL 70 % Ethanol (mit DEP-Wasser) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 8.500 $Umin^{-1}$ wurde der Überstand erneut verworfen und das Präzipitat an der Raumluft im offenen, umgedrehten Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 min getrocknet. Das Präzipitat wurde abschließend in 50 µL DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser eluiert und bei -80 °C eingefroren.

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde sowohl aus dem zurückbleibenden Pellet (Bodensatz) nach der Anreibung der Organe als auch von den Schwanzflossen (Kap. 3.2.1) durchgeführt. Die Schwanzflossen von maximal fünf adulten bzw. sechs juvenilen Maifischen einer Herkunft wurden analog zu den Organpools für die virologische Anzucht für die weitere Untersuchung gepoolt. Dazu wurden insgesamt 20-25 mg Flossengewebe in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße mit einer 3 mm Metallkugel überführt. Nach Zugabe von 80 µL PBS wurde das Flossengewebe 10 min quellen gelassen. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung im TissueLyser II (Qiagen GmbH, Hilden) für 2 min bei einer Frequenz von 30 x min^{-1}.

Die DNA-Extraktion aus den vorbereiteten Proben aus der Schwanzflosse sowie dem Organpellet erfolgte unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kit nach Herstellerangaben (Qiagen GmbH, Hilden) manuell an einer DNA-Workstation (LAG 2003). Die anschließende Lagerung der Probe erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank bei 4 °C.

Messung und Einstellung der Nukleinsäure-Konzentrationen

Nach der Nukleinsäure-Extraktion wurden die RNA- bzw. DNA-Konzentrationen in den jeweiligen Proben gemessen[8]. Anschließend wurden die RNA-Konzentrationen entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen GmbH, Hilden) des für die PCRs von RNA-Viren verwendeten Enzym Mix durch Verdünnung auf < 200 ng/µL eingestellt. Ebenso wurden die DNA-Konzentrationen entsprechend der Herstellerangaben (Promega, Mannheim) der für die PCRs von DNA-Viren verwendeten GoTaq® Flexi DNA Polymerase durch Verdünnung auf < 100 ng/µL eingestellt.

Überprüfung der RNA-Extraktion

Zur Überprüfung der erfolgreichen Extraktion der RNA wurde stichprobenartig mit je zwei Proben von Maifischen eines Alters und einer Herkunft und mindes-

[8] Eigenständige Messung im Labor von Dr. Heike Schütze, Institut für Infektionsmedizin des Friedrich-Loeffler-Institutes, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, Deutschland

tens mit je zwei Proben eines Isolationsprozesses eine β-Actin-PCR (KNÜSEL et al. 2007) durchgeführt.

Molekularbiologische Untersuchung (PCR)

Für die PCRs zum Nachweis von RNA-Viren wurde das Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) und für die PCRs zum Nachweis von DNA-Viren die GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die verwendeten Mastercycler-Programme werden zusammenfassend in Tabelle 7 dargestellt.

Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV)

Für den Nachweis des VHSV wurde eine RT-PCR mit den Primern VG-1 und VD-3 (BioTez, Berlin-Buch) durchgeführt (BERGMANN et al. 2000, MILLER et al. 1998). Diese Primer erzeugen Amplikons mit einer Größe von 697 Bp. Der Mastermix bestand je Probe aus 9 µL DEP-Wasser, 5 µL Q-Solution, 5 µL 5x Puffer, 1 µL dNTPs, 0,5 µL VG-1, 0,5 µL VG-3 1 µL Enzymmix sowie 0,25 µL Rnasin. Es wurden 2,5 µL Probe sowie 22,5 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Als Positivkontrolle diente das Isolat „VHS-5“. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „Fisch Q-52“.

Anschließend wurde mit den PCR-Produkten eine semi-nested-PCR durchgeführt (BERGMANN et al. 2000, MILLER et al. 1998). Für die semi-nested PCR wurden die Primer VD-3 und VD-5 (BioTez, Berlin-Buch) verwendet, welche Amplikons mit einer Größe von 444 Bp erzeugen. Der Mastermix bestand je Probe aus 15 µL DEP-Wasser, 4,5 µL $MgCl_2$, 2,5 µL 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer, 0,4 µL dNTPs, 0,5 µL VG-3, 0,5 µL VG-5 sowie 0,125 µL GoTaq DNA Polymerase. Es wurden 1 µL Probe der aus dem Organpool isolierten RNA sowie 24 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „VHS-4“.

Virus der infektiösen hämorrhagischen Nekrose (IHNV)

Zum Nachweis des IHNV wurde zunächst eine RT-PCR mit den Primern IG-1 und IG-3 (BioTez, Berlin-Buch) durchgeführt, welche ein Amplikon von 682 Bp

erzeugen (BERGMANN et al. 2000, MILLER et al. 1998). Als Positivkontrolle dienten die Isolate „FPI 489“ oder „FPI 493“. Die Zusammensetzung des Mastermixes entspricht unter Verwendung der Primer IG-1 und IG-3 dem des oben beschriebenen Mastermixes für den Nachweis von VHSV. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „Fisch Q-52“.

Nachfolgend wurde mit den PCR-Produkten eine semi-nested PCR mit den Primern IG-3 und IG-5 (BioTez, Berlin-Buch) durchgeführt (BERGMANN et al. 2000, MILLER et al. 1998). Diese erzeugen Amplikons mit einer Größe von 444 Bp. Die Zusammensetzung des Mastermixes entsprach bei Verwendung der Primer IG-3 und IG-5 demjenigen für VHSV. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „VHS-4“.

Tabelle 7: Für die Studie verwendete Mastercycler-Programme

Programm-name	**Mastercycler-Programm**				
VHS-4	-	95°C 1 min	**25 Zyklen** 93 °C 30 s, 55 °C 40 s 72 °C 40 s	72 °C 5 min	4 °C
Fisch Q-52	50 °C 40 min	95 °C 15 min	**35 Zyklen** 94 °C 1 min, 52 °C 1 min 72 °C 1 min	72 °C 10 min	4 °C
Fisch Q-55	50 °C 40 min	95 °C 15 min	**35 Zyklen** 94 °C 1 min, 55 °C 1 min 72 °C 1 min	72 °C 10 min	4 °C
KHV55	-	95 °C 10 min	**35 Zyklen** 95 °C 1 min, 55 °C 1 min 72 °C 1 min	72 °C 7 min	4 °C
KHV55N	-	95 °C 10 min	**35 Zyklen** 95 °C 1 min, 55 °C 1 min 72 °C 1 min	72 °C 1 min	4 °C
LCDV	-	95°C 2 min	**35 Zyklen** 95 °C 30 s, 50 °C 30 s 72 °C1 min	70 °C 10 min	4 °C

Virus der infektiösen Anämie der Lachse (ISAV)

Zum Nachweis von ISAV wurde eine RT-PCR mit den Primern ISA-1 und ISA-2 durchgeführt (MJAALAND et al. 1997). Diese erzeugen Amplikons mit einer Größe von 155 Bp. Der Mastermix bestand je Probe aus 9,75 µL DEP-Wasser, 5 µL Q-Solution, 5 µL 5x Puffer, 1 µL dNTPs, 0,5 µL ISA-1, 0,5 µL ISA-2, 1 µL Enzymmix sowie 0,5 µL Rnasin. Als Positivkontrolle diente das Isolat „+ ISA ve 70“. Es wurden 2,5 µL Probe sowie 22,5 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „Fisch Q-55“.

Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPNV)

Zum Nachweis des IPNV wurde eine RT-PCR mit den Primern DIAIPNF (IPN-1F) und DIAIPNR (IPN-2R) (BioTez, Berlin-Buch) durchgeführt (TAKSDAL et al. 2001). Diese Primer erzeugen Amplikons mit einer Größe von 224 Bp. Zunächst wurden 2,5 µL der aus dem Organpool isolierter RNA bestehenden Probe mit 0,5 µL Primer IPN-1 versetzt und im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) für 5 min bei 99 °C inkubiert. Nachfolgend wurden zur Probe 22,5 µL Mastermix pipettiert. Der Mastermix bestand je Probe aus 10 µL DEP-Wasser, 5 µL Q-Solution, 5 µL 5x Puffer, 1 µL dNTPs, 0,5 µL IPN-2, 1 µL Enzymmix sowie 0,25 µL Rnasin. Als Positivkontrolle diente das Isolat „+ IPN Spjarup“. Im Mastercycler durchliefen die Proben anschließend das Programm „Fisch Q-52“

Herpesviren

Zum Nachweis von Herpesviren der Gattung *Cyprinivirus* wurde eine PCR mit den Primern CyHVpolfor und CyHVpolrev durchgeführt (ENGELSMA et al. 2013). Diese erzeugen ein Amplikon von 361 Bp. Der Mastermix bestand je Probe aus 13,7 µL DEP-Wasser, 5 µL 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer, 2,5 µL $MgCl_2$, 0,25 µL dNTPs, 0,5 µL CyHVpolfor, 0,2 µL CyHVpolrev sowie 0,125 µL GoTaq DNA Polymerase. Als Positivkontrolle diente das Isolat „HP 832“ Es wurden 2,5 µL Probe der aus dem Organpool isolierten DNA sowie 22,5 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „KHV55“.

Anschließend wurde mit den PCR-Produkten eine nested-PCR mit den Primern CyHVpolforint und CyHVpolrevint durchgeführt (ENGELSMA et al. 2013). CyHVpolforint und CyHVpolrevint erzeugen Amplikons mit einer Größe von 339 Bp. Der Mastermix setzte sich je Probe aus 15,2 µL DEP-Wasser, 2,5 µL $MgCl_2$, 5 µL 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer, 0,25 µL dNTP`s, 0,5 µL CyHV-polforint, 0,5 µL CyHVpolrevint und 0,125 µL GoTaq DNA Polymerase zusammen. Es wurden jeweils 1 µL Probe und 24 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „KHV55N".

Virus der Lymphocystis-Erkrankung (LCDV)

Für den Nachweis von LCDV wurde eine PCR mit den Primern OBL 3 und OBL 4 durchgeführt (CANO et al. 2006). Die Primer OBL 3 und 4 erzeugen Amplikons mit einer Größe von 270 Bp bei Isolaten aus Südeuropa bzw. 306 Bp bei Nordeuropäischen-Isolaten. Der Mastermix bestand je Probe aus je 15,5 µL DEP-Wasser, 2,5 µL 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer, 4,5 µL $MgCl_2$, 0,4 µL dNTPs, 0,5 µL OBL 3, 0,5 µL OBL 4 sowie 0,125 µL GoTaq DNA Polymerase (Promega, Mannheim). Es wurde 1 µL Probe der aus dem Flossen isolierten DNA sowie 24 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Als Positivkontrolle diente das Isolat „SR Kliesche F486". Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchliefen die Proben das Programm „LCDV".

Für die nachfolgend mit den PCR-Produkten durchgeführte LCDV-nested PCR wurden die Primer OBL 5 (5´-GTA TGG ATT ACT AAT GCA GTG-3´) und OBL 6 (5´-GAT TAA CAG CTG CAT GAG-3´) verwendet (BERGMANN, nicht publiziert). Die Primer OBL 5 und OBL 6 erzeugen Amplikons mit einer Größe von 205 Bp. Der Mastermix setzte sich je Probe aus 15 µL DEP-Wasser, 4,5 µL $MgCl_2$, 2,5 µL 5x Colorless GoTaq® Flexi buffer, 0,4 µL dNTP`s, 0,5 µL OBL 5, 0,5 µL OBL 6 und 0,125 µL GoTaq DNA Polymerase zusammen. Es wurden jeweils 1 µL Probe und 24 µL Mastermix in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Diese durchliefen im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) das Programm „LCDV".

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein Agarosegel (Geldichte: 1,5 %) mit Ethidiumbromid verwendet. Dabei wurden je 10 µL Probe mit 2,5 µL 6 x DNA loading buffer (1:4 verd.) (VWR International GmbH, Darmstadt) vermischt und in eine Kavität des Agarosegels pipettiert. Anschließend wurden 3,5 µL DNA-Leiter (100 bp, peqGOLD) in die randständigen Kavitäten eingefüllt und die Probe bei 60 Volt und 2,00 Ampere 60 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Ergebnis unter UV-Licht ausgewertet und fotographisch dokumentiert.

Blutausstriche

Es wurden von den jeweils fünf pro Maifisch angefertigten Blutausstrichen die zwei qualitativ besten Blutausstriche (Kap. 3.2.1) mit Giemsa 7 % mit Phosphat-Puffer (pH-Wert: 6,8) (Färbeprotokoll im Anhang IV) im Labor der KVRAF in einer Färbebank gefärbt und über Nacht luftgetrocknet. Danach wurden beide Blutausstriche unter Verwendung von Entellan® eingedeckt. Nach einer weiteren Trocknung über Nacht wurde jeder Blutausstrich bei 100-facher Vergrößerung durchgeschaut. Anschließend wurden mindestens 30 Sichtfelder insgesamt 10 min bei 400-facher Vergrößerung auf charakteristische, pathologische Veränderungen der viralen Erythrozyten-Nekrose hin untersucht (GLENNAC et al. 2012, HERSHBERGER et al. 2009, HETRICK 1984, MEYERS et al. 1986, NEWMAN 1985, RENO et al. 1978a).

3.2.7 Parasitologische Untersuchung

Eine Identifikation der nachgewiesen Parasiten erfolgte eigenständig zunächst durch morphologischen Vergleich mit bereits beim Maifisch beschriebenen Parasiten (APRAHAMIAN et al. 2003, BAO et al. 2015a, BAO et al. 2015b) sowie unter Verwendung von Standardliteratur (BRAY und GIBSON 1980, BRAY 2008, BYKHOVSKAYA-PAVLOVSKAYA et al. 1964, EIRAS et al. 2008, GARDINER et al. 1988, GARDINER und POYNTON 1999, GIBSON und BRAY 1979, GIBSON und BRAY 1986, MÖLLER und ANDERS 1983, WOO 2006).

Nachweis von Ekto- und Endoparasiten durch Abstriche

Zunächst wurden die Abstriche von Flossen, Haut und Kiemen (Kap. 3.2.1) unmittelbar nach Entnahme lichtmikroskopisch bei 100-facher und 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Abstriche von Magen, Pylorusanhängen und Darm (Kap. 3.2.1) sowie die Quetschpräparate der Niere, der Milz und der Leber (Kap. 3.2.1) wurden ebenfalls unmittelbar lichtmikroskopisch bei 100-facher und 400-facher Vergrößerung begutachtet. Die Identifikation der Parasiten erfolgte dabei ausschließlich morphologisch soweit möglich auf Gattungs-/Speziesebene (BYLUND et al. 1980).

Myxozoa

Eine erste Klassifizierung der *Myxozoa* in der Niere sowie die Bestimmung ihrer histologischen Prävalenz und die Beurteilung ihres pathogenen Potentials wurde im Rahmen der histologischen Untersuchung durchgeführt (Kap 3.2.3). Für die weiterführenden Untersuchungen wurden zusätzliche Nierenproben entnommenen (Kap. 3.2.1) und die darin enthaltenen *Myxozoa* von Dr. Astrid S. Holzer[9], Hana Pecková[9] und Dr. Pavla Bartošová-Sojková[9] wie nachfolgend erläutert morphologisch und molekularbiologisch mittels SSU rDNA Sequenzanalyse beschrieben und ein diagnostisches PCR-Protokoll etabliert.

Parasitenmorphologie

Die Nierenproben (n = 14) in destilliertem Wasser mit Penicillin/Streptomycin (500 µL Aqua dest. + 100 U/mL Penicillin/Streptomycin) von frisch verstorbenen oder euthanasierten adulten Maifischen aus dem GGD-System wurden unmittelbar mikroskopisch (BX51 Mikroskop mit Olympus DP72 Digitalkamera) auf Plasmodien und Sporen von *Myxozoa* hin untersucht. Die Messungen an den Sporen (n = 25) wurden an Digitalfotos unter Verwendung der Software ImageJ v.1_44p (RASBAND o. J.) durchgeführt (LOM und ARTHUR 1989).

[9] Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Tschechien

Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Sporen vorsichtig aufgewirbelt und auf ein Filterpapier pipettiert (Millipore Millex-HV, Größe: 0.45 µl). Das Filterpapier wurde auf einem Sockel mit Tissue-Tek befestigt und in schmelzendem Stickstoff (< 10^{-3} K/s) schockgefroren. Nach dem Einfrieren wurden die Proben in eine Hochvakuum Präparationskammer (ALTO 2500, Gatan) verbracht. Die Oberfläche der Proben wurde bei -95 °C für 1 min sublimiert. Nach der Sublimation wurden die Proben bei -135 °C mit einem Gemisch aus Platin und Palladium überzogen und auf einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (JSM-7401 F, JEOL) untersucht.

SSU rDNA Sequenzanalyse

Für die molekularbiologische Analyse wurden die bei -20°C oder in Ethanol (≥99,5 %) fixierten Nierenproben (n = 100) verwendet. Die Nieren wurden aus dem Ethanol entnommen und kurz auf einem Papiertuch getrocknet. Danach wurden sie in TNES Harnstoff-Puffer (ASAHIDA et al. 1996) überführt. Die DNA wurde mittels Proteinase K und einer vereinfachten Phenol-Chloroform Extraktions-Methode extrahiert (HOLZER et al. 2004). Zwei partielle, überlappende SSU rDNA Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Die universellen eukaryotischen Primer ERIB1 und ERIB10 (BARTA et al. 1997) wurden im ersten Durchlauf verwendet. Das entstandene PCR-Produkt wurde in zwei nested-PCRs mit den *Myxozoa*-spezifischen Primern (i) MyxGP2F (KENT et al. 1998a) und ACT1R (HALLETT und DIAMANT 2001) beziehungsweise (ii) Myxgen4F (DIAMANT et al. 2004) and ERIB10 (BARTA et al. 1997) verwendet. Der Mastermix bestand aus insgesamt 10 µL mit Verwendung der Titanium Taq DNA Polymerase. Das Programm für die nachfolgend durchgeführte PCR bestand aus 95 °C für 3 min, und danach 30 Zyklen mit 94 °C für 1 min, 60 °C (erste PCR-Runde)/58 °C (nested-PCRs) für 1 min, 68 °C für 2 min (erste PCR-Runde)/ 1 min (nested-PCRs) gefolgt von einem Elongations-Schritt bei 68 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel visualisiert und anschließend mit einem Gel/PCR DNA Fragment

Extractions Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) aufgereinigt und kommerziell sequenziert (SEQME o. J.).

Diagnostisches PCR-Protokoll

Um die tatsächlichen Prävalenzen der in den Untersuchungen gefundenen *Myxozoa* (*Hoferellus*) bei Maifischen abschätzen zu können, wurde eine diagnostische PCR auf der Basis von spezifischen Nukleotidunterschieden in hoch variablen Abschnitten der SSU rDNA entwickelt. Hierfür wurden die Primer HaloF (5'-CTT TGC GGT TTA CCC CAG AGG-3') und HaloR (5'-AAT TTC GAC GCC CAT AGT TGC-3') mit dem oben beschriebenen PCR-Protokoll mit 56 °C als Annealing-Temperatur und 40 s für die Elongation verwendet. Das hieraus resultierende PCR-Produkt von 865 Bp Größe wurde exemplarisch von 17 Nierenisolaten unter Berücksichtigung aller Flüsse sequenziert (Garonne = 6, Dordogne = 9, Rhein = 2). Die Spezifität des PCR-Protokolls wurde bei DNA-Isolaten der phylogenetisch verwandten Myxosporea *Hoferellus cyprini* Doflein,1898, *H. carassii* Akhmerov, 1960, *Hoferellus* sp., *H. anurae* Mutschmann, 2004, *H. gnathonemi* Alama-Bermejo, Jirků, Kodádková, Pecková, Fiala & Holzer, 2016, *Ortholinea orientalis* (Shul'man & Shul'man-Albova, 1953) und *Ortholinea* sp. (diese Studie) überprüft. Alle Nierenproben wurden anhand dieser PCR auf eine Infektion mit *H. alosae* sp. nov. getestet.

Externe Digestionsmethode von Muskulatur

Die Muskelproben der seitlichen Körperwand (Kap. 3.2.1) wurden mittels einer externen Digestionsmethode verdaut, um Parasitenstadien in der Muskulatur zu identifizieren (HERLICH 1956). Diese Untersuchung wurde eigenständig unter Anleitung von Prof. Dr. Taubert[10] und Prof. Dr. Carlos Hermosilla[10] durchgeführt. Dafür wurden 5 g Muskulatur und 62,5 mL einer Pepsin-Lösung (Rezept siehe Anhang III.I) in einen 100 mL Urinbecher mit Schraubdeckel überführt. Nach Zugabe von 2,5 mL Salzsäure (37 %) wurden die Urinbecher zum Verdau der Muskulatur vier Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C mit einem unterständigen Magnetrührer unter kontinuierlicher Durchmischung durch einen Rührfisch inku-

[10] Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

biert. Anschließend wurde die flüssige Probe durch ein 300 µm und ein darunterliegendes 25 µm Sieb filtriert. Das herausgefilterte Material wurde jeweils in 15 mL Plastikgefäße mit spitzem Boden mit Leitungswasser abgespült und diese 8 min bei 5.000 $Umin^{-1}$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet am Bodengrund mittels Pasteur Pipette in eine Zählkammer überführt und bei 200-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht.

Blutausstriche

Die Blutausstriche wurden wie in Kap. 3.2.1 und 3.2.6 beschrieben angefertigt. Zunächst erfolgte eine Durchsicht der Blutausstriche bei 100-facher Vergrößerung. Anschließend wurden mindestens 30 Sichtfelder insgesamt 10 min bei 400-facher Vergrößerung auf Blutparasiten untersucht. Die Auswertung der Blutausstriche hinsichtlich parasitärer Infektionserreger erfolgte anhand von Standardliteratur (FERGUSON et al. 2006a, HENRY 1913, KHAN et al. 1980, ROBERTS 2012).

3.2.8 Untersuchung von Wasserparametern

Die Wasserproben wurden wie in Kap. 3.1.2 beschrieben entnommen. Es wurden die Konzentrationen von Ammonium (NH_4^+), Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-) sowie die Gesamthärte und Karbonathärte mittels eines Tröpfchentests (JBL Testlab, JBL GmbH & Co. KG, Neuhofen, Germany) nach Herstellerangaben überprüft. Zusätzlich wurden die Sauerstoffkonzentration (O_2), der pH-Wert und die Temperatur (Frankreich: PCE-PHD-1, PCE Instruments, Meschede; Deutschland: PCETestr 35 Multiparameter, Eutech Instruments Europe B.V., PC Landsmeer, Niederlande) überprüft. Dazu wurden die Messsonden bis zum Einstellen des digital angezeigten Messwertes direkt in den Wasserkörper gehängt.

4 ERGEBNISSE

Nachfolgend werden die Mortalität in den Projektanlagen (Kap 4.1), die Ergebnisse der pathologisch-anatomischen (Kap. 4.2), histologischen (Kap. 4.3), bakteriologischen (Kap. 4.4), mykologischen (Kap. 4.5), virologischen (Kap. 4.6) und parasitologischen (Kap. 4.7) Untersuchung sowie der Wasseranalysen (Kap. 4.8) dargestellt.

4.1 Mortalität

4.1.1 Maifischprojektanlage, Wildpopulation, Bruch, Frankreich

Von den 194 im GGD-System im Zeitraum von 2012-2014 gefangenen adulten Rückkehrern verstarben fünf Maifische auf dem Transport in die Maifischprojektanlage in Bruch. Insgesamt wurden in Bruch dementsprechend 189 Maifische über 23-41 Tage in zwei Kunststoffbecken zur Reproduktion gehalten (Tabelle 8). Während dieser Zeit verstarben im Jahr 2012 67 % (29/43), 2013 84 % (67/80) bzw. 2014 85 % (56/66) der Maifische. Im Hinblick auf die beiden verschiedenen Kunststoffbecken, in denen die Laichfische gehalten wurden, variierte die Mortalität zwischen den Rundbecken zwischen 38-95 %. Am saisonalen Projektende wurden alle verbleibenden Maifische euthanasiert (n = 37).

Tabelle 8: Mortalität während der Reproduktionsphase in der Maifischprojektanlage in Bruch, 2012-2014, Frankreich
Herkunft (H), Garonne (G), Dordogne (D), Anzahl euthanasierter Maifische (E)

Jahr	H	Becken Nr.	Anzahl	Fang-Datum	Saisonales Projekt-ende	Maximale Haltungs-dauer (Tage)	E	Mortalität (in %)
2012	G	1	22	17.05.	14.06.	28	1	95
	G	2	21	22.05.	14.06.	23	13	38
2013	G	1	41	08.05.	02.06.	28	2	95
	D	2	39	05.06.	03.07.	32	11	72
2014	G	1	23	09.05.	20.06.	41	4	83
	G	2	43	21.05.	22.06.	32	6	86

4.1.2 Maifischzuchtanlage, Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

Maifische der Zuchtpopulation in Aßlar wurden im Zeitraum von Mai 2012 bis Mai 2014 untersucht. Die Mortalität der aus Frankreich importierten Maifischlarven lag nach Auswertung durch das Projektpersonal kumulativ nach einem Monat bei ungefähr 85 %, nach vier Monaten bei ungefähr 90 %.

Aufgrund von zwei Stromausfällen mit Ausfall des Filters sowie der Belüftungsanlage verstarb im großen Kreislauf am 23.01.2013 ein Großteil der Maifische aus dem Jahrgang 2012 sowie am 03.12.2013 alle Maifische aus den Jahrgängen 2011 und 2012. Im Mai 2014 verstarben die letzten Maifische der bisherigen Zuchtpopulation.

4.2 Befunde der pathologisch-anatomischen Untersuchung

4.2.1 Geschlecht, Länge und Körpermasse untersuchter Maifische

Juvenile Maifische der Wildpopulation, Deutschland und Frankreich

Bei den juvenilen Maifischen war weder makroskopisch noch histologisch das Geschlecht feststellbar. Darüber hinaus war die Gesamtlänge (GL) aufgrund von Einfrierartefakten (Flossenschäden) zumeist nicht eindeutig bestimmbar. Die mittlere Körpermasse und die mittlere Standardlänge (SL) wurden allen in einem Monat gefangenen Maifischen berechnet. Die mittlere Körpermasse von juvenilen Maifischen aus dem GGD-System variierte im Jahresverlauf zwischen 4,5 g und 6,3 g (Abbildung 8) bei einer mittleren SL zwischen 7,2 cm und 9,6 cm (Abbildung 9). Im Jahr 2014 nahm bei juvenilen Maifischen aus dem Rhein von August bis Oktober die mittlere Körpermasse von 2,6 g auf 4,8 g und die mittlere SL von 5,4 cm auf 6,6 cm zu. Im Jahr 2010 hingegen waren die im Rhein gefangenen juvenilen Maifische mit durchschnittlich 13,7 g und einer SL von 9,2 cm deutlich größer.

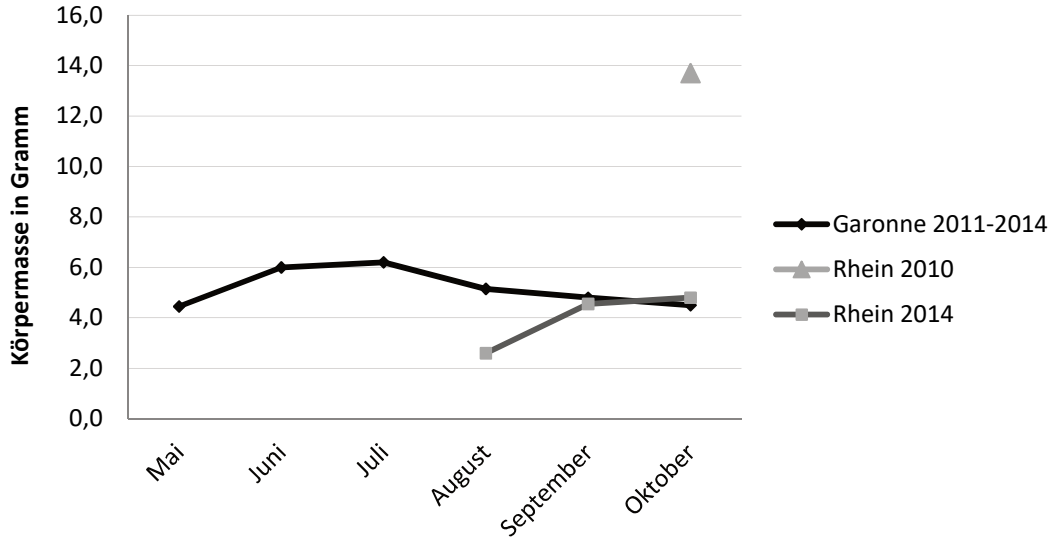


Abbildung 8: Durchschnittliche Körpermasse juveniler Maifische, 2010-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland

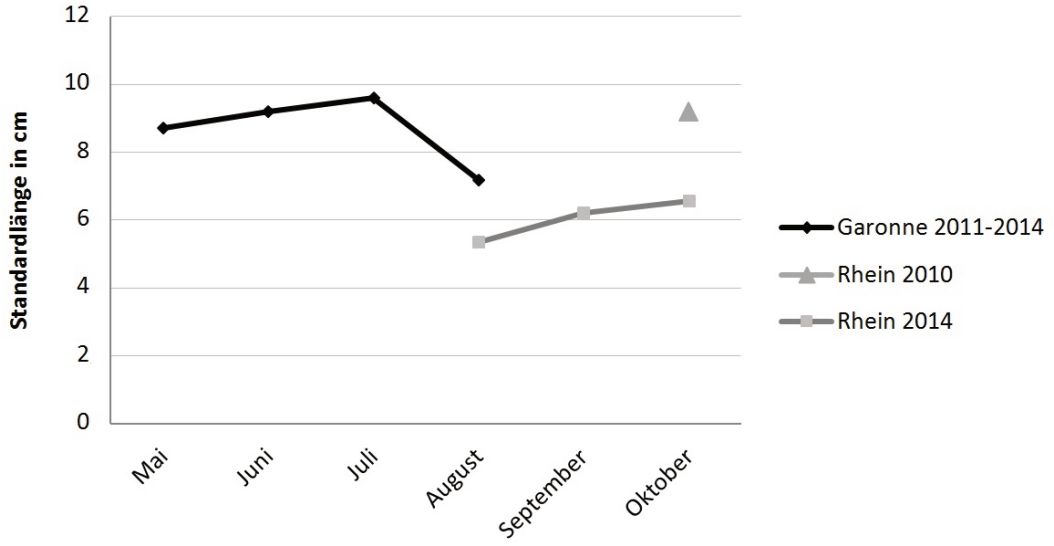
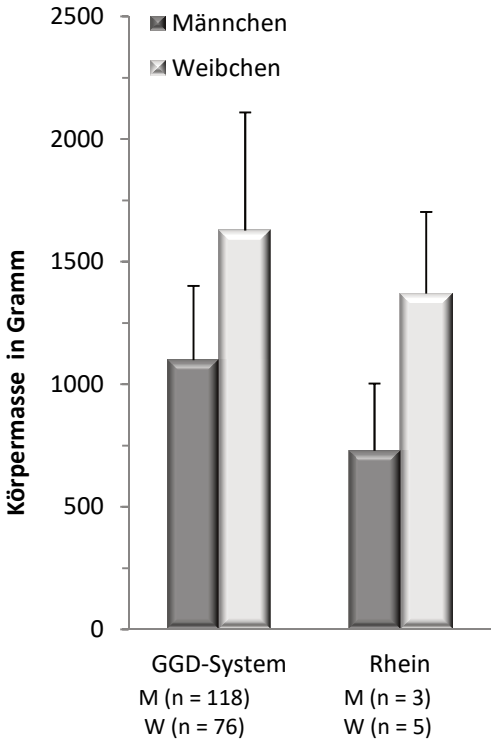


Abbildung 9: Durchschnittliche Standardlängen juveniler Maifische, 2010-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland

Adulte Maifische der Wildpopulation, Deutschland und Frankreich

Von den aus dem GGD-System zur Untersuchung entnommenen 194 adulten Maifischen waren 118 Fische männlich und 76 weiblich. Das Geschlechterverhältnis in den beiden Rundbecken betrug im Jahr 2012 1:1-2,5:1 (Männchen:Weibchen), im Jahr 2013 und 2014 1,5:1-1,9:1. Die Männchen waren mit 1099 g durchschnittlich 68 % leichter als die Weibchen mit 1628 g (Abbildung 10). Weiterhin waren sie in der durchschnittlichen GL 10 % (52,3 cm zu 58,3 cm) bzw. in der SL 11 % (47 cm zu 52,6 cm) kleiner als die Weibchen.



Körpermasse adulter Maifische, 2012-2014, GGD-System, Frankreich und Rhein, Deutschland

Von den neun adulten Maifischen aus dem Rhein waren vier Fische

männlich und fünf weiblich. Die Körpermasse konnte nur von drei Männchen ermittelt werden, da ein Exemplar nur als Karkasse zur Verfügung stand. Die Männchen waren mit 729 g durchschnittlich 53 % leichter als die Weibchen mit 1370 g (Abbildung 10). Weiterhin waren die Männchen in der GL 9 % (46,7 cm zu 51,1 cm) bzw. der SL 10 % (40,9 cm zu 45,3 cm) kleiner als die Weibchen.

Im Vergleich waren die Rückkehrer beider Geschlechter im Rhein kleiner und leichter als die Rückkehrer im GGD-System. Dabei waren die Männchen aus dem Rhein durchschnittlich 34 % und die Weibchen durchschnittlich 16 % leichter als jeweils männliche bzw. weibliche Maifische aus dem GGD-System. Weiterhin waren die Männchen aus dem Rhein in der GL und SL 11 % bzw. 13 % kleiner als männliche Maifische aus dem GGD-System. Ebenso waren die Weibchen aus dem Rhein in der GL und SL 13 % bzw. 14 % kleiner als weibliche Maifische aus dem GGD-System.

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

Bei acht von 64 untersuchten Maifischen war altersbedingt eine Geschlechtsbestimmung möglich. Von diesen waren drei Exemplare männlich und fünf weiblich. Die mittlere Körpermasse bei Maifischen der Generation 0+ (n = 18) betrug 1,1 g, bei 1+ (n = 16) 62 g und bei 2+ (n = 5) 269,5 g. Die mittlere GL lag bei Maifischen der Generation 0+ bei 5,0 cm, der Generation 1+ bei 18,8 cm und der Generation 2+ bei 30,5 cm. Die mittlere SL betrug bei Maifischen der Generation 0+ 4,2 cm, der Generation 1+ 14,1 cm und der Generation 2+ 25,8 cm.

4.2.2 Gonadosomatischer Index

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Der GSI wurde bei 114 männlichen und 75 weiblichen Maifischen berechnet. Der GSI betrug bei den Männchen jeweils im Mai durchschnittlich 5,6 % (n = 31), im Juni 5,2 % (n = 72) und im Juli 5,3 % (n = 11). Bei den Weibchen nahm der GSI jeweils von durchschnittlich 10,0 % (n = 26) im Mai auf 9,5 % (n = 47) im Juni und 3,5 % (n = 2) im Juli ab. Im Juni 2013 lag der GSI bei Weibchen aus der

Dordogne mit 14,1 % deutlich höher als im Juni 2012 mit 6,1 % oder Juni 2014 mit 7,4 %. (Abbildung 11). Bei im Mai 2014 auf dem Transport verstorbenen Weibchen lag der GSI bei 13,3 % (n = 4).

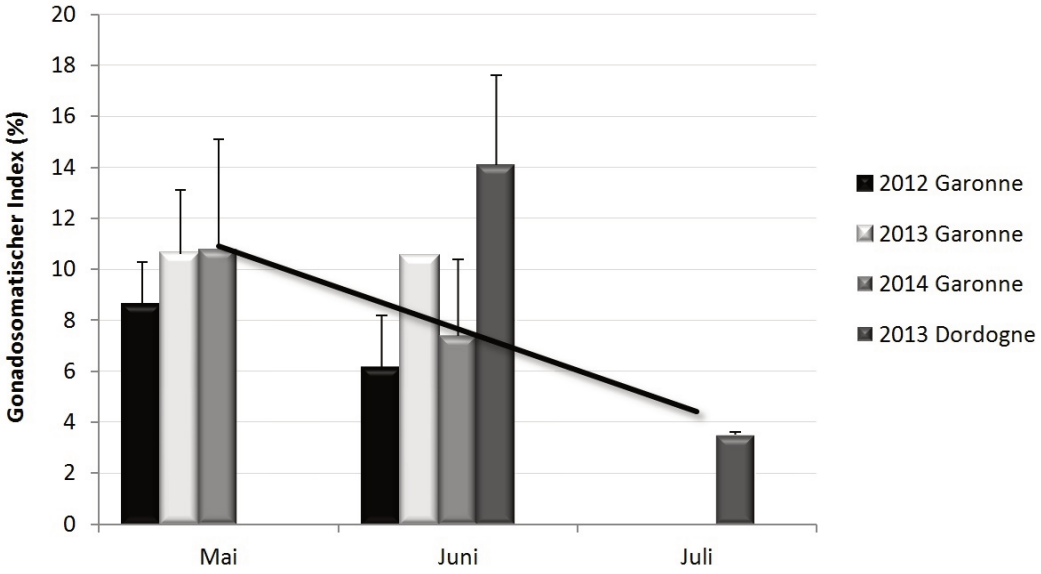


Abbildung 11: Gonadosomatischer Index, Weibchen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich
Im Juni 2013 war nur ein Weibchen aus der Garonne verfügbar, weshalb keine Standardabweichung ermittelt werden konnte

4.2.3 Sektion

Juvenile Maifische der Wildpopulation, Deutschland und Frankreich

Die juvenilen Maifische waren bis auf hochgradig eingerissene Flossen, hochgradig eingefallene Augen und mittelgradige Autolyse bei der äußeren Adspektion ohne besonderen Befund. In der Sektion stellte sich der Gastrointestinaltrakt gut gefüllt mit Ingesta dar. Alle inneren Organe waren bei eingeschränkter Beurteilbarkeit aller Exemplare makroskopisch sowie zusätzlich die Leber, Niere und Milz im Quetschpräparat mikroskopisch ohne besonderen Befund.



Abbildung 12: Im September 2014 im Rhein gefangener juveniler Maifisch, Rhein, Deutschland

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

In der Maifischprojektanlage in Bruch lag die Mortalität bei den weiblichen Maifischen im Jahr 2012 mit 94 % (16/17), 2013 mit 97 % (29/30) und 2014 mit 100 % (24/24) deutlich über derjenigen der Männchen mit 50 % im Jahr 2012 (13/26) und jeweils 76 % im Jahr 2013 und 2014 (38/50 bzw. 32/42). Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung waren im Jahr 2012 89 % (25/28), 2013 64 % (27/42) und 2014 57 % (8/14) der verstorbenen Maifische aufgrund einsetzender Autolyse nur eingeschränkt beurteilbar. Bei der äußeren Adspektion waren die Maifische von mäßigem Ernährungszustand. Bei insgesamt 53 % (64/121) der Maifische wurde eine Mykose der Haut, Flossen, Augen und Kiemen festgestellt (Kap. 4.5). Darüber hinaus wurden weitere pathologische Veränderungen der Haut, Flossen und Augen festgestellt, welche bei verstorbenen und euthanasierten Maifischen in unterschiedlicher Häufigkeit auftraten. Bei den 84 verstorbenen



Abbildung 13: Im Mai 2012 verstorbener adulter Maifisch, GGD-System, Frankreich
Maifisch mit hochgradigen Rötungen der Haut und Flossen, Schuppenverlusten sowie bis auf die Muskulatur reichende Ulzerationen der Haut

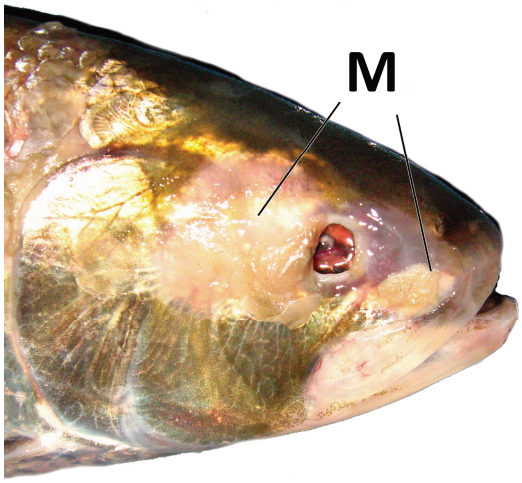


Abbildung 14: Adulter Maifisch mit Panophthalmitis, 2013, GGD-System, Frankreich
Verstorbener Maifisch mit vollständig hämorrhagisch-nekrotisierender Panophthalmitis mit infiltrativ wachsenden Pilzhyphen sowie fast vollständigem Verlust des rechten Augapfels und einer peripheren Mykose (M)

Maifischen wurden bei 68 % (n = 57) Flossenschäden, bei 90 % (n = 76) Haut- und Flossenrötungen sowie Schuppenverluste bei 79 % (n = 66) festgestellt (Abbildung 13). Bei den Hautrötungen handelte es sich teilweise um fokale, im Durchmesser maximal wenige mm große Hautstellen. Zum Teil erstreckten sich die Hämorrhagien jedoch großflächig über die Körperwand sowie den Kopfbereich. Bei 8 % (n = 7) der Maifische wurden bis auf die Muskulatur reichende Ulzerationen festgestellt. Außerdem wurden bei 41 % (n = 34) der verstorbenen Maifische pathologische Veränderungen der Augen festgestellt. Hierbei waren das linke und das rechte Auge ungefähr gleich häufig betroffen, in 12 % (n = 10) der Fälle zeigten beide Augen pathologische Veränderungen. Bei 10 % (n = 8) der verstorbenen Maifische wurden Einblutungen in die vordere Augenkammer festgestellt. Einen makroskopisch sichtbaren Pilzbefall der Cornea zeigten 15 % (n = 18) der Maifische, von denen 17 Maifische aus dem Jahr 2013 und nur einer aus dem Jahr 2012 stammten (siehe Kap. 4.3.6). In 20 % (n = 24) der Fälle zeigten die Maifische hochgradige Veränderungen mit Corneaulzera, bei 14 % (n = 12) der verstorbenen Maifische wurde eine vollständige Ruptur der Cornea festgestellt (Abbildung 14). Von den 37 euthanasierten Maifischen zeigten dagegen 5 % (n = 2) Flossenschäden, 43 % (n = 16) Hautrötungen, 38 % (n = 14) Flossenrötungen, 3 % (n = 1) Schuppenverluste und keiner eine Cornearuptur.

Nach Eröffnung der Leibeshöhle waren die inneren Organe makroskopisch, abgesehen von parasitären Stadien (Kap. 4.7.2), ohne populationsrelevanten

Befund. Der Gastrointestinaltrakt war jeweils futterleer. Bei drei von 121 Maifischen wurden fokale, bis zu 1 x 0,5 cm große Ulcera der Magen- bzw. Ösophagusmukosa festgestellt (Kap. 4.3.1 und 4.3.6). In Quetschpräparaten der Leber, Niere und Milz wurden mikroskopisch Granulome (Kap. 4.3.2) sowie Parasitenstadien in der Niere nachgewiesen (Kap. 4.7.4).

Adulte Maifische aus dem Rhein, Deutschland

Die Rückkehrer aus dem Rhein wurden alle als beurteilbar eingestuft und waren von mäßigem Ernährungszustand. Bei der äußeren Adspektion zeigten 78 % (7/9) der Maifische Flossenschäden, 22 % (2/8) Hautrötungen, 11 % (1/9) Flossenrötungen und je 44 % (4/9) Schuppenverluste bzw. Einblutungen in die vordere Augenkammer. Die möglicherweise populationsrelevanten Befunde der pathologisch-anatomischen Untersuchung der inneren Organe entsprachen denjenigen bei adulten Maifischen aus dem GGD-System.

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung der Zuchtpopulation zeigten im Jahr 2012 100 % der juvenilen Maifische im Alter von 1-2 Monaten eine vom Bereich des Oberkiefers ausgehende, zystische Malformation. In den folgenden Monaten entwickelten die juvenilen Maifische schwerwiegende Deformationen des Schädels, der Kiemendeckel sowie der Flossen. Die Verluste bestanden im Wesentlichen aus stark deformierten, zumeist unterernährten Individuen. Maifische unter einem Jahr waren deutlich stärker betroffen als ältere Fische. Juvenile, deformierte Maifische zeigten einen kachektischen bis mäßigen Ernährungszustand, während die untersuchten Maifische der 1+ und 2+ Generation gut genährt waren. Im Rahmen der äußeren Adspektion wurden bei 46 % (18/39) Flossenschäden, bei 15 % (6/39) Schuppenverluste und bei je 3 % (1/39) Flossenrötungen bzw. Einblutungen in die Augen festgestellt. Bei der Sektion war der Gastrointestinaltrakt gut gefüllt mit Ingesta. Alle inneren Organe waren makroskopisch sowie Leber, Niere und Milz mikroskopisch im Quetschpräparat ohne besonderen Befund.

4.3 Befunde der histologischen Untersuchung

Juvenile Maifische der Wildpopulation, Deutschland und Frankreich

In der histologischen Untersuchung wurden 12 juvenile Maifische aus dem GGD-System und 30 Juvenile aus dem Rhein untersucht (Tabelle 2 und Tabelle 4). Die juvenilen Maifische waren aufgrund mittelgradiger Autolyse und Einfrierartefakten eingeschränkt beurteilbar. Es wurden keine eindeutigen Hinweise auf pathologische Veränderungen durch populationsrelevante Pathogene nachgewiesen.

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden 110 adulte Maifische aus dem GGD-System histologisch untersucht (Tabelle 3), wobei die histologische Beurteilbarkeit bei verstorbenen (n = 84) und/oder eingefrorenen (n = 10) Maifischen eingeschränkt war. Es wurden zahlreiche pathologische Veränderungen mit möglicher Populationsrelevanz festgestellt, welche nachfolgend in den Kapiteln 4.3.1-4.3.8 ausführlich beschrieben werden.

Adulte Maifische aus dem Rhein, Deutschland

Bei acht adulten Maifischen aus dem Rhein wurde eine histologische Untersuchung durchgeführt (Tabelle 5). Bei eingefrorenen (n = 6) Maifischen war die histologische Beurteilbarkeit geringgradig eingeschränkt. Die nachgewiesenen pathologischen Veränderungen werden in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.8 näher erläutert.

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

In der histologischen Untersuchung wurden 26 Maifische der Zuchtpopulation untersucht (Tabelle 6). Verstorbene (n = 21) und/oder eingefrorene (n = 7) Maifische waren aufgrund einsetzender Autolyse eingeschränkt beurteilbar. Bei der Zuchtpopulation waren pathologische Veränderungen der Meningen (Kap. 4.3.4) sowie zystische Malformationen am Oberkiefer (Kap. 4.3.10) nachweisbar.

4.3.1 *Endocarditis valvularis et parietalis thromboticans*

Das Herz war bei 15 % (16/110) der Rückkehrer aus dem GGD-System histologisch nur eingeschränkt beurteilbar. Im Jahr 2012 wurden bei 16 % (5/31) und im Jahr 2014 bei 25 % (6/24) der adulten Maifische aus dem GGD-System eine Endokarditis mit Ansammlungen kokkoider Bakterien festgestellt. Insgesamt wurde die Endokarditis bei 26 % (9/31) der verstorbenen und bei 8 % (2/24) der euthanasierten Maifische nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde im Jahr 2013 bei keinem der adulten Maifische aus dem GGD-System eine Endokarditis festgestellt. Die Endokarditiden in den Jahren 2012 und 2014 waren histologisch zumeist (10/11) durch fokale oder multifokale nekrotische Läsionen des Endokards, der Herzklappen, des subendokardialen Bindegewebes und teilweise des Myokards charakterisiert. Im Bereich nekrotischer Läsionen wurden mehr oder weniger ausgeprägte, fibrinöse Thromben und/oder eine fibrinöse Exsudation sowie zahlreiche, teilweise phagozytierte, kokkoide Bakterien und eine Infiltration mit Makrophagen nachgewiesen. In einem Fall (1/11) wurde eine Endokarditis ohne nekrotische Läsionen jedoch mit Ansammlung zahlreicher kokkoider Bakterien und fibrinöser Exsudation festgestellt.

Insgesamt handelte es sich in sieben Fällen um eine *Endocarditis valvularis et parietalis thromboticans* und in je zwei Fällen nur um eine *Endocarditis valvularis thromboticans* bzw. nur um eine *Endocarditis parietalis thromboticans*. Bei Fischen mit *Endocarditis valvularis thromboticans* waren in vier Fällen die Atrioventrikular- und die Bulboventrikular-Klappen, in drei Fällen nur die Bulboventrikular-Klappen und in zwei Fällen nur die Atrioventrikular-Klappen betroffen. Die *Endocarditis valvularis thromboticans* wurde zumeist als fibrinös-nekrotisierend (n = 6), nekrotisierend (n = 1), fibrinös (n = 1) bzw. fibrinopurulent-nekrotisierend (n = 1) sowie viermal als mittelgradig (Abbildung 15), und fünfmal als hochgradig (Abbildung 16) eingestuft. Die *Endocarditis parietalis thromboticans* wurde ebenfalls als fibrinös-nekrotisierend (n = 4) bzw. nekrotisierend (n = 5) beurteilt (Abbildung 17). Der Schweregrad der *Endocarditis parietalis thromboticans* wurde in einem Fall als gering-, in sechs Fällen als mittel- und in zwei Fällen als hochgradig bewertet. Insgesamt zeigten zwei der Endokarditiden mit einer fokalen Proliferation von Fibroblasten und dem

Auftreten einer Neoangiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) Anzeichen eines subakuten Entzündungsgeschehens (Abbildung 18).

Außerdem wurde bei zwei Maifischen mit Endokarditis eine geringgradige, akute, fokale Perikarditis, bestehend aus Ansammlungen kokkoider Bakterien und einer Infiltration mit Makrophagen im subepikardialem Gewebe festgestellt.

Weitere pathologische Veränderungen durch kokkoide Bakterien bei adulten Maifischen, GGD-System, Frankreich

Zusätzlich zur Endokarditis zeigten zwei Maifische eine hochgradige, ulzerative Gastritis mit Nachweis von kokkoiden und stäbchenförmigen Bakterien sowie in einem Fall von Pilzhyphen (Kap. 4.3.6). Ein weiterer Maifisch wies eine hochgradige, subakut-aktive, ulzerativ-nekrotisierende, granulierende und granulomatöse Ösophagitis mit oberflächlicher Ansammlung von kokkoiden und stäbchenförmigen Bakterien sowie Pilzhyphen auf.

Darüber hinaus wurden bei neun Maifischen fibrinöse Thromben sowie bakterielle Emboli nachgewiesen. Die Thromben befanden sich unter anderem in den Blutgefäßen von Herz, Milz, Gonaden, Ösophagus, Magen, Darm, Meningen, Gehirn, Muskel, Auge, Haut sowie in den Sinusoiden der Leber. Die Emboli bestanden aus kokkoiden Bakterien sowie Makrophagen, welche zum Teil phagozytierte Bakterien enthielten. Zusammenfassend wurden in den Jahren 2012 und 2014 bei 42 % (13/31) der verstorbenen, histologisch untersuchten Maifische eine Septikämie durch kokkoide Bakterien festgestellt.

Bei zwei Maifischen ohne Endokarditis wurden ebenfalls pathologische Veränderungen durch kokkoide Bakterien nachgewiesen. In einem Fall wurde eine Dermatitis mit kokkoiden und stäbchenförmigen Bakterien sowie Pilzhyphen festgestellt. In einem anderen Fall bestand bei mittelgradig autolytischen Kiemen der Verdacht auf eine bakterielle Branchitis durch kokkoide Bakterien.

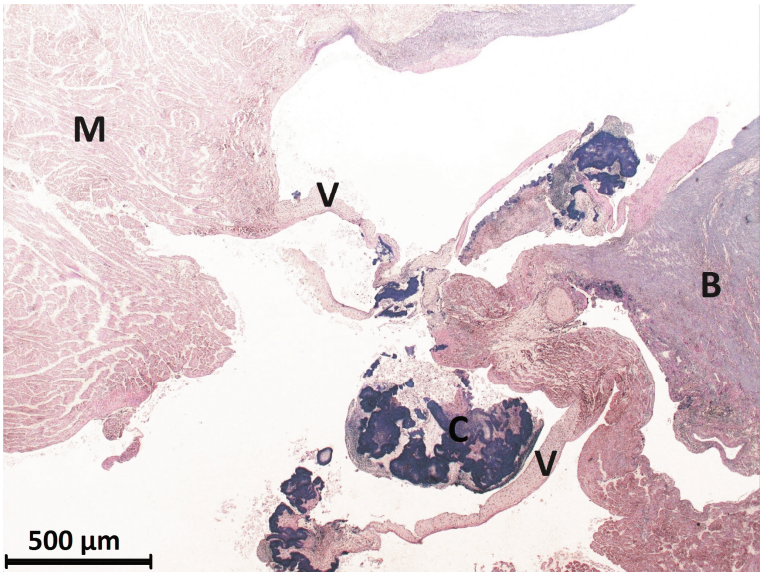


Abbildung 15: Geringgradig ausgeprägte, akute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, GGD-System
Kokkoide Bakterien (C) an der Bulboventrikular- und Atrioventrikularklappe (V) (B: Bulbus, M: Myokard; 50-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

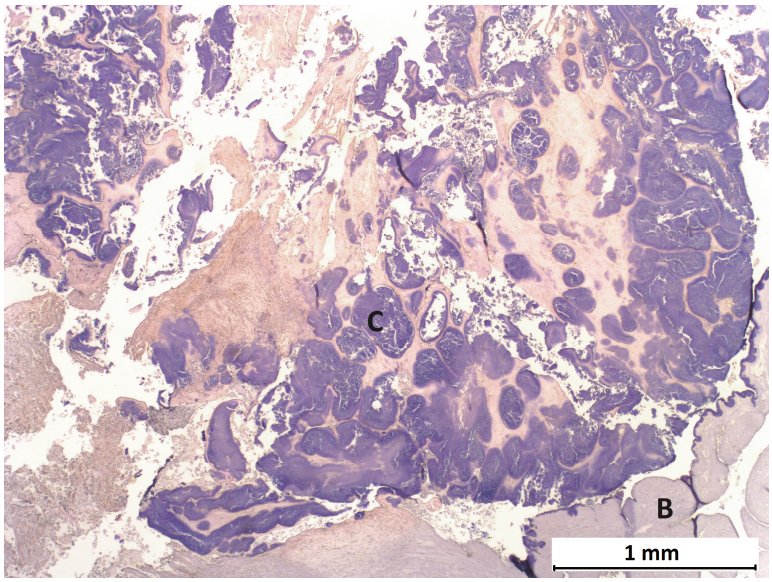


Abbildung 16: Hochgradig ausgeprägte, akute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, 2012, GGD-System, Frankreich
Kokkoide Bakterien (C), Bulbus (B) (25-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

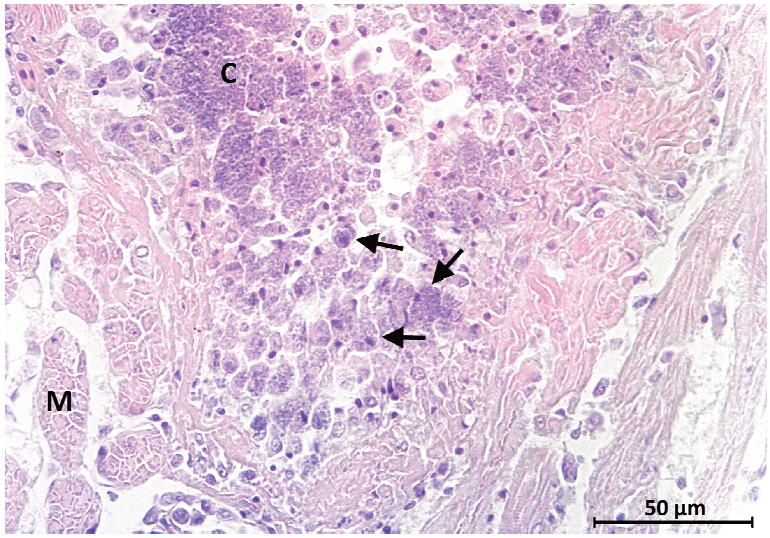


Abbildung 17: Akute, ulzerative *Endocarditis parietalis* bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich
Im Myokard (M) kokkoide Bakterien (C). Zahlreiche Makrophagen mit phagozytierten kokkoiden Bakterien (Pfeile) (400-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

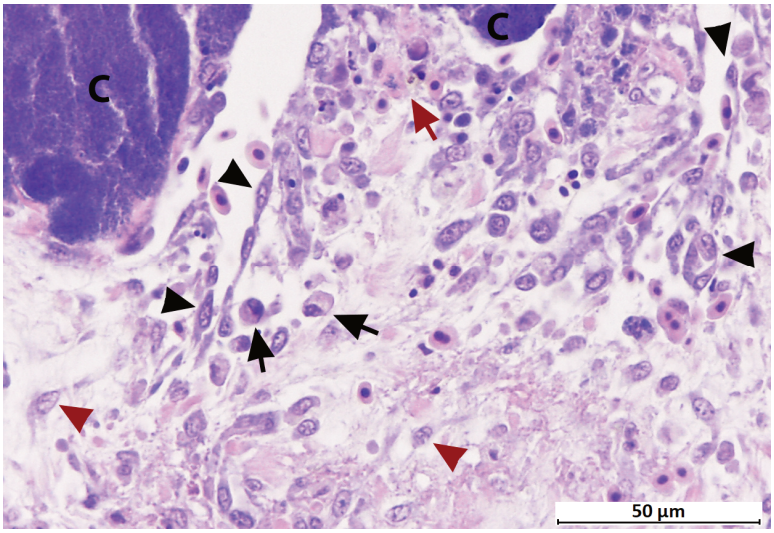


Abbildung 18: Subakute *Endocarditis valvularis thromboticans* bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich
***Endocarditis valvularis* mit kokkoiden Bakterien (C), Angiogenese (schwarze Pfeilköpfe), Fibroblasten (rote Pfeilköpfe), Makrophagen (schwarze Pfeile) und Nekrosen (roter Pfeil) (400-fache Vergrößerung, HE-Färbung)**

4.3.2 Granulomatöse Entzündung

Bei der histologischen Untersuchung wurden im Jahr 2012 bei 77 % (24/31), 2013 bei 84 % (46/55) und 2014 bei 92 % (22/24) der adulten Maifische aus dem GGD-System Granulome in den inneren Organen festgestellt. Hierbei konnten zwei Granulomarten unterschieden werden: Bei 82 % (90/110) der Maifische wurden Granulome mit zentraler Nekrose sowie unterschiedlichem Epitheloidzellanteil (nachfolgend als zentralnekrotisierende Granulome bezeichnet), und bei 28 % (31/110) epitheloidzellige Granulome ohne zentrale Nekrose (nachfolgend als epitheloidzellige Granulome bezeichnet) nachgewiesen (Abbildung 19).

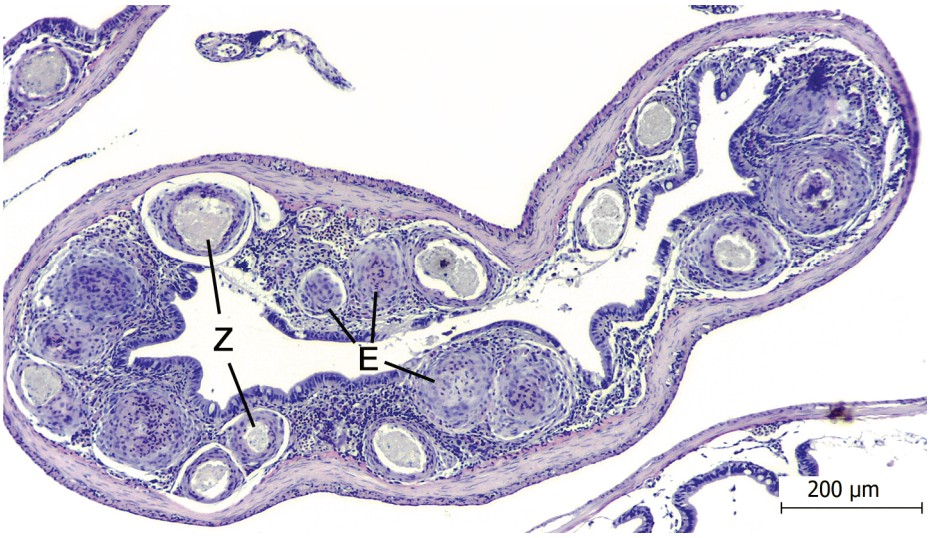


Abbildung 19: Pylorusanhang eines adulten Maifisches mit zahlreichen Granulomen, 2013, GGD-System, Frankreich
Dieser Pylorusanhang weist in der *Tunica submucosa* und *Tunica propria* zahlreiche epitheloidzellige Granulome (E) sowie zentralnekrotisierenden Granulomen (Z) auf (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)

Die im epitheloidzelligen Randbereich angeschnittenen, zentralnekrotisierenden Granulome können sich jedoch histologisch als rein epitheloidzellige Granulome darstellen, weshalb die Einstufung als epitheloidzelliges Granulom nicht mit abschließender Sicherheit möglich ist. Die Verteilung der epitheloidzelligen Granulome in den inneren Organen war homogen. Hingegen wurden zentralnekrotisierende Granulome insbesondere in den Adnexen der inneren Organe

sowie im Gastrointestinaltrakt selbst nachgewiesen. Außerdem wurde eine herdförmige, epitheloidzellige, granulomatöse Entzündung der Haut bei 1 % (1/110), der Niere bei 2 % (2/110), der Milz bei 1 % (1/110) sowie der Adnexe der Pylorusanhänge bei 3 % (3/110) der Maifische nachgewiesen.

Bei den Rückkehrern im Rhein wurden bei 88 % (7/8) der Maifische Granulome in den inneren Organen festgestellt. Ebenso wurden bei 58 % (7/12) der juvenilen Maifische aus dem GGD-System bzw. 13 % (4/30) aus dem Rhein Granulome nachgewiesen. Bei den Rückkehrern im Rhein und den Juvenilen aus dem GGD-System fanden sich jeweils zentralnekrotisierende Granulome vorwiegend in den Adnexen, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt. Bei den Granulomen der Juvenilen aus dem Rhein handelte es sich um zwei zentralnekrotisierende Granulome in der Skelettmuskulatur und jeweils ein Fremdkörpergranulom in der Kieme beziehungsweise der Schwimmblase. Bei keinem Maifisch aus der Zuchtpopulation in Aßlar wurden mikroskopisch oder histologisch Granulome oder interstitielle granulomatöse Entzündungen in den inneren Organen nachgewiesen.

Mykobakteriose

Zur Abklärung des histologischen Verdachts einer Mykobakteriose wurde beim Vorliegen einer überwiegend epitheloidzelligen, granulomatösen Entzündung ohne Hinweise auf mögliche Ursachen, wie beispielsweise Nematodenlarven, immer eine Sonderfärbung (Ziehl-Neelsen(ZN)-Färbung) vorgenommen. Insgesamt wurde eine ZN-Färbung bei 40 % (36/110) der adulten Maifische aus dem GGD-System durchgeführt. Bei 25 % (9/36) der ZN-Färbungen wurden säurefeste Stäbchen nachgewiesen und zwar im Jahr 2012 bei 6 % (2/31), 2013 bei 4 % (2/55) beziehungsweise 2014 bei 21 % (5/24) der Maifische (Abbildung 20). Alle sieben Fälle mit histologischem Nachweis einer epitheloidzelligen, granulomatösen Entzündung waren positiv. Bei den anderen zwei Fällen wurden säurefeste Stäbchen in einem zentralnekrotisierenden Granulom in der Niere sowie in herdförmigen Ansammlungen teilweise phagozytiert in Niere und Mesenterium der Pylorusanhänge nachgewiesen. Die Mykobakteriose wurde von allen untersuchten Organen am häufigsten in Nieren, Milz und Pylorusanhängen diagnostiziert,

welche zugleich die größten Ansammlungen säurefester Stäbchen aufwiesen. Ein zusätzlicher Nachweis von einzelnen Makrophagen oder Makrophagenansammlungen mit säurefesten Stäbchen im Parenchym erfolgte in Leber, Pankreas, Herz, Magen, Gonaden, Haut bzw. Kiemen. Allerdings wurden bei Maifischen mit Nachweis säurefester Stäbchen diese nicht in allen zentralnekrotisierenden bzw. epitheloidzelligen Granulomen nachgewiesen. Beispielsweise wurden bei einem Maifisch mit multiplen, subdermalen, granulomatösen Entzündungsherden säurefeste Stäbchen ausschließlich in den Makrophagenansammlungen zwischen den ZN-negativen zentralnekrotisierenden Granulomen nachgewiesen.

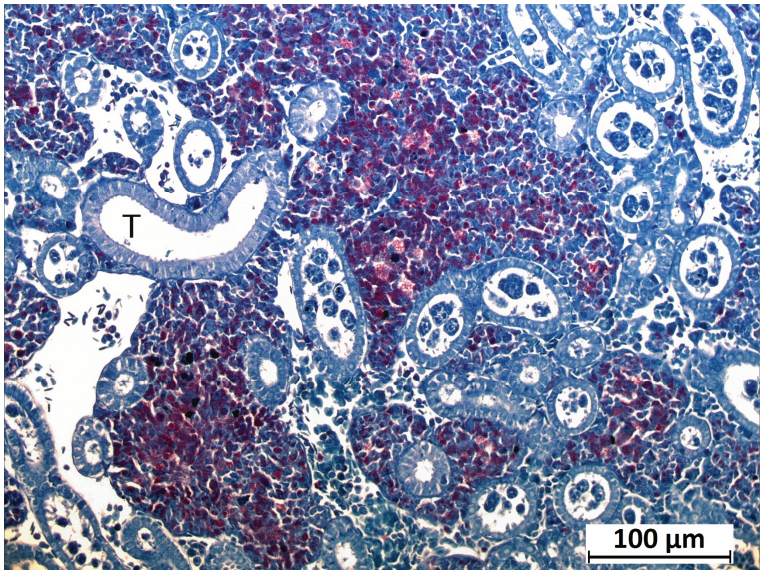


Abbildung 20: Säurefeste Stäbchen im hämatopoetischen Gewebe der Niere eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich
Zwischen den Nierentubuli (T) sind im hämatopoetischem Gewebe der Niere hochgradig säurefeste Stäbchen (rot) darstellbar (ZN-Färbung, 200-fache Vergrößerung)

4.3.3 Pathologische Veränderungen durch mittellange Stäbchenbakterien ohne granulomatöse Reaktion

In der histologischen Untersuchung der adulten Maifische aus dem GGD-System wurden mittellange Stäbchen von ca. 1,0 × 3,5 µm Größe regelmäßig in verschie-

denen Organen nachgewiesen. Diese befanden sich dabei zumeist ohne periphere Gewebsreaktion insbesondere bei autolytischen Maifischen im Parenchym oder auf Schleimhäuten. Mittellange Stäbchenbakterien wurden jedoch auch in Verbindung mit kokkoiden Bakterien und/oder Pilzhyphen im Kontext von zwei Gastritiden, einer Ösophagitis, einer Dermatitis, einer Endokarditis und Branchitiden nachgewiesen. Als einziger histopathologisch nachweisbarer Erreger wurden sie darüber hinaus unmittelbar in pathologisch verändertem Gewebe dargestellt, und zwar bei einer Panophthalmitis und multiplen Nekroseherden in der Milz bzw. Leber (jeweils ein Maifisch).

4.3.4 Meningitiden und Enzephalitiden

Bei der histologischen Untersuchung wurden im gesamten Beprobungszeitraum bei fast allen adulten wie juvenilen Maifischen aus der Wild- wie auch der Zuchtpopulation vereinzelt Zellen mit feinen eosinophilen Granula (EGZs) mit einem randständigen Kern und einem durchschnittlichen Durchmesser von 9,1 (7,8-10,9 [Minimum-Maximum]) µm x 10,6 (9-12,6) µm in den Meningen festgestellt (Abbildung 21 B).

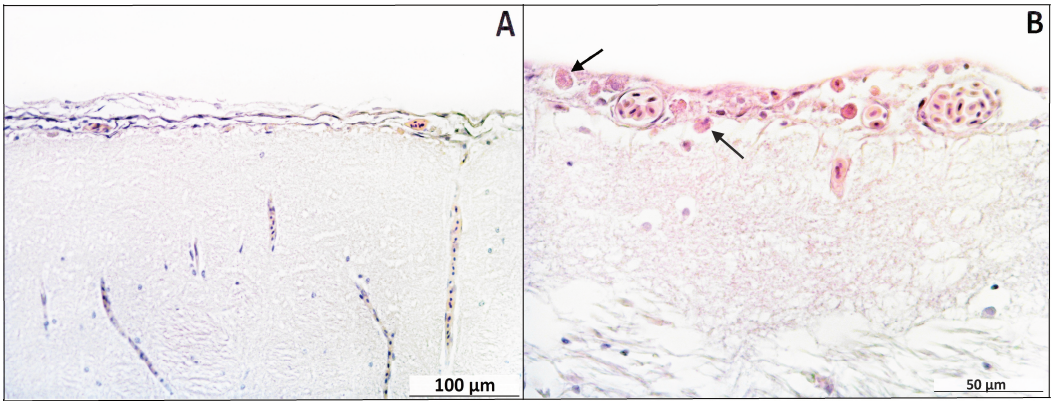


Abbildung 21: Infiltration der Meningen von adulten Maifischen durch EGZs, 2013, GGD-System, Frankreich
A: Meningen ohne besonderen Befund (200-fache Vergrößerung, HE-Färbung) B: Geringgradige Infiltration der Meningen mit EGZs (Pfeile) (400-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Diese herdförmige Infiltration erreichte bei einigen Maifischen eine mittelgradige Intensität (Abbildung 22 A). Gleichartige Zellen infiltrierten ebenso regelmäßig das Gehirnparenchym peripher des Ventrikellumens. Es gab nur vereinzelte Maifische, bei denen die in der Histologie angeschnittenen Gehirn- und Meningenanteile ohne Infiltration von EGZs waren (Abbildung 21 A).

Bei 19 % (6/31, 2012), 20 % (11/55, 2013) und 29 % (7/24, 2014) der Rückkehrer aus dem GGD-System lag eine akute, in wenigen Fällen eine subakut bis chronische, herdförmige, eitrige Meningitis mit Infiltration durch Phagozyten (vermutlich Makrophagen) vor (Abbildung 22 B). Die Phagozyten wiesen einen durchschnittlichen Durchmesser von 7,3 (7,1-7,4) µm x 7,5 (7,4-7,5) µm bis zu 10,1 (9,0-10,8) x 11,5 (10,7-11,6) µm, einen randständigen, zum Teil gelappten Kern sowie entweder ein homogenes oder granuläres und/oder vakuolisiertes, hell basophiles Zytoplasma auf. Lediglich bei einem Maifisch aus dem Jahr 2012 waren in einem Teil dieser Zellen phagozytierte Kokken nachweisbar. Bei Maifischen der Zuchtpopulation zeigten im Jahr 2013 22 % (2/9) eine gleichartige Meningitis.

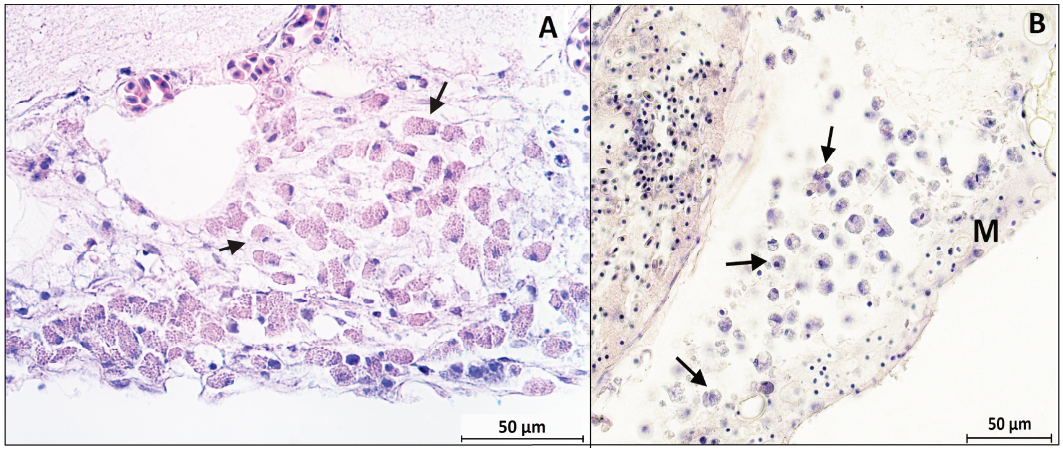


Abbildung 22: Meningitiden bei adulten Maifischen, 2012, GGD-System, Frankreich
A: Mittelgradige, herdförmige Infiltration der Meningen mit EGZs (Pfeile)
B: mittelgradige, herdförmige Infiltration der Meningen (M) mit Phagozyten (Pfeile) (400-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Ausschließlich bei adulten Maifische aus dem GGD-System wurde im Jahr 2012 bei 6 % (2/31), 2013 bei 4 % (2/55) und 2014 bei 4 % (1/24) eine herdförmige,

nicht eitrige Enzephalitis nachgewiesen (Abbildung 23 A). Diese war charakterisiert durch multiple, 20-200 µm große, perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate und/oder etwa gleich große Gliazellproliferate im Neuropil des Klein-, Mittel- sowie Stammhirns und/oder Medulla oblongata. Einhergehend mit der Enzephalitis war teilweise eine verstärkte Infiltration der Meningen mit EGZs nachweisbar.

Weiterhin wurde im Jahr 2012 bei 3 % (1/31) und im Jahr 2013 bei 4 % (2/55) der adulten Maifische aus dem GGD-System eine herdförmige, gemischtzellige Enzephalitis mit Infiltration durch EGZs und mononukleären Entzündungszellen im Neuropil festgestellt (Abbildung 23 B).

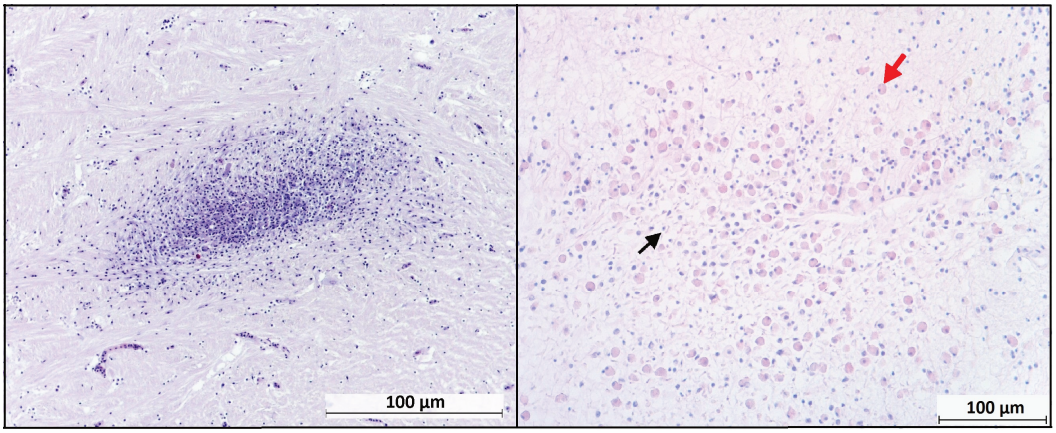


Abbildung 23: Enzephalitiden bei adulten Maifischen, 2013, GGD-System, Frankreich
A: Ein ca. 100 x 200 µm großes, herdförmiges Infiltrat mononukleärer Entzündungszellen im Neuropil B: Akute, herdförmig hochgradige, gemischtzellige Enzephalitis mit fein eosinophil granulierten Zellen (schwarzer Pfeil) und mononukleären Entzündungszellen (roter Pfeil) (200-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

4.3.5 Epitheliocystis

Bei der histologischen Untersuchung der adulten Maifische aus dem GGD-System waren 45 % (49/110) der Kiemen frisch und 3 % (3/110) geringgradig autolytisch. Dagegen wurden 15 % (16/110) der Kiemen als mittel- sowie 36 % (42/110) als hochgradig autolytisch und daher nur eingeschränkt beurteilbar eingestuft.

Insgesamt wurden im Jahr 2012 bei 13 % (4/31), 2013 bei 22 % (12/55) sowie 2014 bei 42 % (10/24) der Maifische ca. 7-40 µm große, rundliche subepitheliale, dünnwandig umhüllte Strukturen mit fein granuliertem, basophilen Inhalt in den Sekundärlamellen nachgewiesen (Abbildung 24). In einigen Fällen wurde eine periphere Gewebereaktion bestehend aus Proliferation des Epithels der Sekundärlamellen festgestellt. Zumeist lagen diese Gebilde jedoch reaktionslos im Kiemenparenchym. Diese pathologischen Veränderungen sind konsistent mit dem histologischen Bild einer Epitheliocystis. Der Nachweis einer Epitheliocystis erfolgte auch bei einem auf dem Transport in die Maifischprojektanlage in Bruch verstorbenen Maifisch.

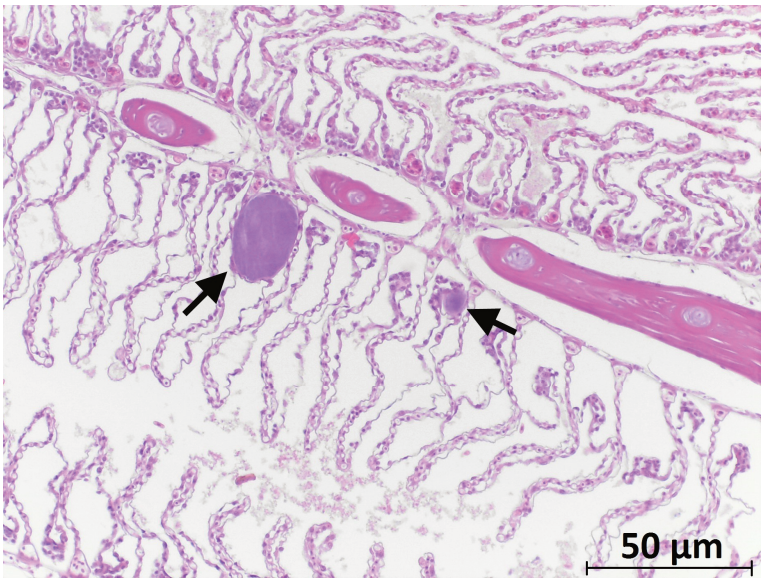


Abbildung 24: Epitheliocystis bei einem adulten Maifisch, 2014, GGD-System, Frankreich
Zwei subepitheliale, rundliche, fein basophil granulierte, dünn abgekapselte Gebilde (Pfeile) (200-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

4.3.6 Mykose

Pilzhyphen wurden in der histologischen Untersuchung in Haut, Muskel, Kiemen, Augen und Magen-Darm-Trakt ausschließlich bei adulten Maifischen aus dem GGD-System festgestellt. Die Prävalenzen werden zusammen mit den Ergebnissen der mykologischen Untersuchung im Kap. 4.5 dargestellt. Insgesamt zeigten

die Pilzhyphen ein infiltratives Wachstum ohne periphere Reaktion (n = 10) oder mit ausgeprägter, peripherer, zellulärer Infiltration (n = 14). In der Haut reichte das infiltrative Wachstum bis in die Subkutis und die oberflächliche Muskulatur. Bei 25 % (13/52) der Maifische (neun Fälle aus dem Jahr 2013) wurden akute, hochgradige, profunde, eitrig-nekrotisierende und hämorrhagische, ulzerative Dermatitiden und Myositiden mit zahlreichen Anschnitten von infiltrativ wachsenden Pilzhyphen und z. T. Ansammlungen von Bakterien nachgewiesen. Bei 23 Maifischen wurden Pilzhyphen in den Kiemen nachgewiesen (Abbildung 25), wobei in sieben Fällen im angrenzenden Kiemengewebe keine pathologischen Reaktionen feststellbar waren. Hingegen zeigten 16 Maifische eine herdförmig hochgradige, subakut hämorrhagisch-nekrotisierende Branchitis mit Infiltration durch zahlreiche Pilzhyphen und teilweise Bakterien sowie Thromben in Gefäßen.



Abbildung 25: Mykose der Kieme bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich
Pilzhyphen (Pfeile) im Kiemengewebe; P: Sekundärlamellen (200-fache Vergrößerung, Grocott)

Bei 70 % (7/10) der histologisch untersuchten Augen wurden infiltrativ bis in die hintere Augenkammer wachsende Pilzhyphen nachgewiesen. In vier Fällen wurde dabei eine hämorrhagisch-ulzerative Entzündung des peripheren Gewebes festgestellt. In der histologischen Untersuchung wurden zusätzlich bei einem Maifisch infiltrativ wachsende Pilzhyphen im Ösophagus bzw. bei zwei Exemplaren im

Magen nachgewiesen. Die Pilzhyphen waren dabei jeweils von einer ulzerierenden Entzündung und Bakterien umgeben.

4.3.7 Parasitär-bedingte Branchitis

Eine parasitär-bedingte Branchitis wurde nur bei adulten Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesen. Die Branchitis war jeweils gekennzeichnet durch eine fokale, teilweise hochgradige Hyperplasie des Primär- und Sekundärlamellenepithels mit Verschmelzung und Deformation von Sekundärlamellen. Im Zusammenhang mit diesen pathologischen Veränderungen wurden, jeweils getrennt voneinander, zwei verschiedene Erreger beobachtet:

Bei 11 % (6/55, 2013) und 4 % (1/24, 2014) der Maifische wurden in Bereichen mit Epithelproliferationen der Sekundärlamellen herdförmig gehäuft vorkommende, polymorphe Zellen ohne großen Zellkern mit basophilem Zytoplasma und stark basophilen Granula nachgewiesen (Abbildung 26). Die Granula waren in den durchgeführten Sonderfärbungen Grocott- und PAS-positiv und stellten sich in der Giemsa-Färbung eosinophil dar. Dieses histologische Bild entspricht dem einer Amöbeninfektion (Amöbiasis).

Bei 3 % (1/31, 2012) sowie 16 % (9/55, 2013) der Maifische wurden sub- oder intraepithelial in den Sekundärlamellen sowie an der Basis der Primärlamellen gelegene, zum Teil fokal gehäuft vorkommende, runde, stark basophile Zellen mit einem Durchmesser von 5-6 µm im Zusammenhang mit einer Proliferation des Sekundärlamellengewebes nachgewiesen. In 1000-facher Vergrößerung zeigten die Zellen kleine Vakuolen sowie eosinophile Granula und waren von einem optisch leeren Hof umgeben (Abbildung 27). In den durchgeführten Sonderfärbungen stellten sie sich Grocott-positiv, Ziehl-Neelsen-negativ, PAS-negativ sowie stark basophil in der Giemsa-Färbung dar (Abbildung 28).

Die anderen nachgewiesenen Parasiten (Trichodinidae*, Chilodonella* sp., Monogenea) kamen sowohl in Verbindung mit pathologisch verändertem als auch auf unverändertem Kiemengewebe vor. Die Prävalenzen werden in Verbindung mit den Ergebnissen der parasitologischen Untersuchung in Kap. 4.7.1 dargestellt.

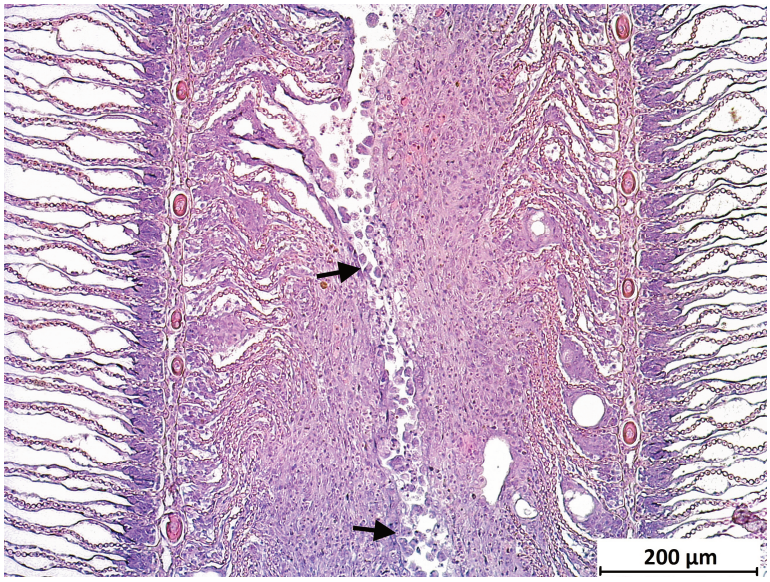


Abbildung 26: Hochgradige Amöbiasis bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich
Hochgradige chronische Branchitis mit Proliferation des Kiemenepithels und Verwachsung von Sekundärlamellen mit zahlreichen Amöben (Pfeile) (100-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

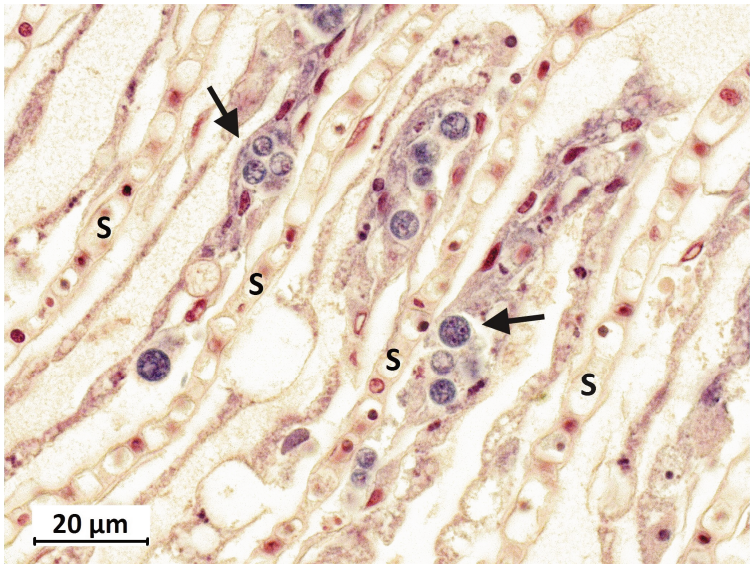


Abbildung 27: Parasitärer Organismus im Kiemengewebe eines adulten Maifisches, HE-Färbung, GGD-System, 2013, Frankreich
Die stark basophilen Zellen (Pfeile) im Epithel der Sekundärlamellen (S) zeigen kleine Vakuolen und eosinophile Granula (1000-fache Vergrößerung)

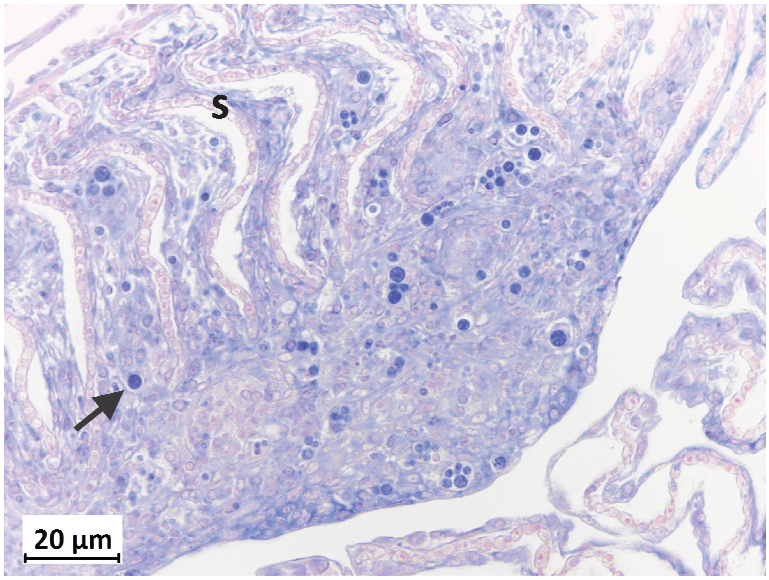


Abbildung 28: Parasitärer Organismus im Kiemengewebe eines adulten Maifisches, 2013, Giemsa-Färbung, GGD-System, Frankreich
Hochgradige Epithelproliferation mit Verwachsung von Sekundärlamellen (S), im proliferierten Kiemengewebe zahlreiche, stark basophile, rundliche Zellen (Pfeil) (400-fache Vergrößerung)

4.3.8 Parasitär-bedingte, pathologische Veränderungen der inneren Organe

Anisakidae

Der Magen war bei 42 % (46/110), der Darm bei 58 % (64/110) und die Pylorusanhänge bei 53 % (58/110) der Rückkehrer aus dem GGD-System sowie der gesamte Gastrointestinaltrakt bei adulten Maifischen aus dem Rhein autolysebedingt nur eingeschränkt beurteilbar. In der Magenwand wurden bei 19 % (21/110) der Maifische aus dem GGD-System Anschnitte von Nematodenlarven festgestellt (Abbildung 29). Histologisch wiesen diese im Querschnitt einen Durchmesser von 300-400 µm sowie coelomyare Muskelzellen auf und konnten dem Larvenstadium III der Familie Anisakidae zugeordnet werden (Abbildung 30). Bei Parasiten, die bei Fixation noch nicht degeneriert und vermutlich vital waren, zeigte das umliegende Gewebe, wie in Abbildung 30 dargestellt, zumeist

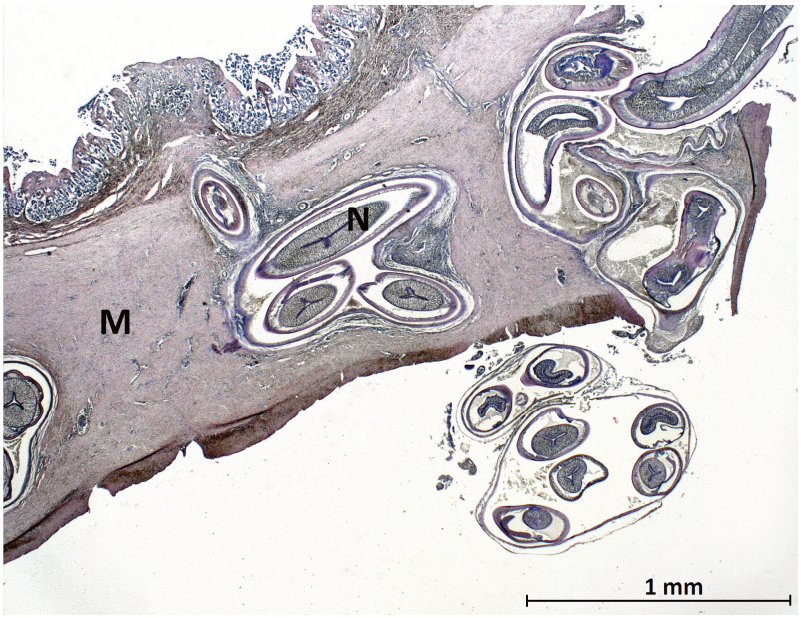


Abbildung 29: Abgekapselte Anisakidae (N) in der *Tunica muscularis* (M) des Magens eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich (50-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

keine Reaktion. Peripher abgestorbener Parasiten wurden ein schmaler epitheloidzelliger Randsaum sowie eine gemischtzellige, entzündliche Infiltration mit Beteiligung von EGZs festgestellt. Bei zunehmender Degeneration abgestorbener Parasiten wurde eine zunehmende Abkapselung des verminösen Materials beobachtet. Zudem lagen gleichartige Nematodenlarven bei 4 % (4/110) der Maifische intraluminal in den Pylorusanhängen sowie bei 60 % (66/110) teilweise degeneriert und abgekapselt im Mesenterialgewebe der Pylorusanhänge. Das Mesenterialgewebe (n = 26) sowie das darin enthaltene Pankreas (n = 20) zeigten eine gering- bis mittelgradige, gemischtzellige, entzündliche Infiltration vorwiegend mit EGZs.

Bei adulten Maifischen im Rhein wurden gleichartige Nematoden mit vergleichbarer peripherer Reaktion in der Magenwand (n = 2), intraluminal (n = 8) sowie im Mesenterium der Pylorusanhänge (n = 8) gefunden.

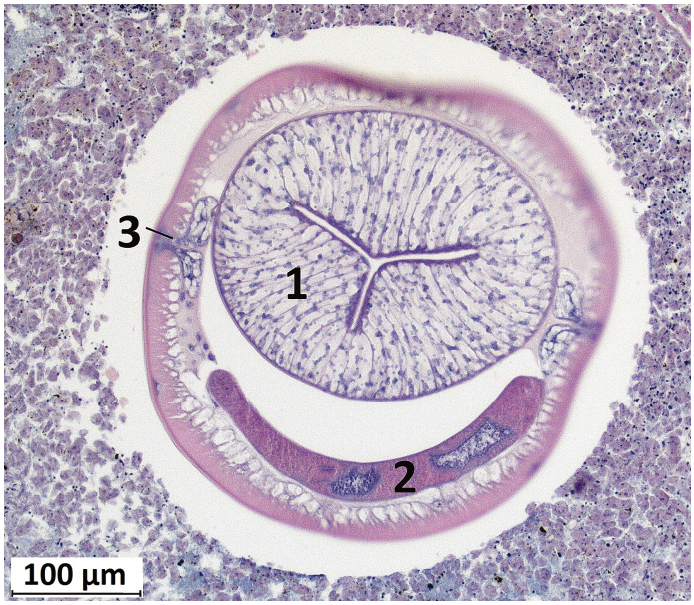


Abbildung 30: Nematodenlarve der Familie Anisakidae in der Leber eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich
1: Darm, 2: große exkretorische Drüsenzellen, 3: Y-förmige förmige laterale Sehnen (200-fache Vergrößerung, HE-Färbung).

Weiterhin wurden Anisakidae-Anschnitte bei Maifischen aus dem GGD-System im Parenchym der Leber (n= 6), im Gehirn (n = 1) und der Niere (n = 1) festgestellt. Bei adulten Maifischen aus dem Rhein zeigte ein Maifisch Anisakidae-Anschnitte in der Milz. Insgesamt wurden bei 100 % der adulten Maifische aus dem GGD-System und dem Rhein Anisakidaelarven nachgewiesen.

Myxozoa

Die Niere wurde bei 31 % (34/110) der Rückkehrer aus dem GGD-System und bei 63 % (5/8) der Rückkehrer aus dem Rhein autolysebedingt als eingeschränkt beurteilbar eingestuft. Bei adulten Maifischen aus dem GGD-System wurde bei 92 % (101/110) und bei adulten Maifischen aus dem Rhein bei 13 % (1/8) ein myxozoischer Parasit in den Nierentubuli, den ableitenden Harnwegen sowie in Einzelfällen auch im Bowman'schen Kapselraum nachgewiesen. Bei Maifischen aus dem GGD-System war die Infektion bei 45 % geringgradig, bei 47 % mittelgradig und bei 9 % hochgradig ausgeprägt. In hochgradigen Fällen wurde eine Dilatation der Nierentubuli durch die hohe Parasitenanzahl nachgewiesen (Abbildung 31). In einem Fall wurde die Ruptur eines Tubulus mit Ausstritt von Harn und Parasitenstadien in das umliegende Parenchym und einer peripheren, herdförmigen, granulomatösen und vorwiegend epitheloidzelligen Reaktion festgestellt (Abbildung 33). Eine weitere Beschreibung dieses Parasiten erfolgt in Kap. 4.7.4.

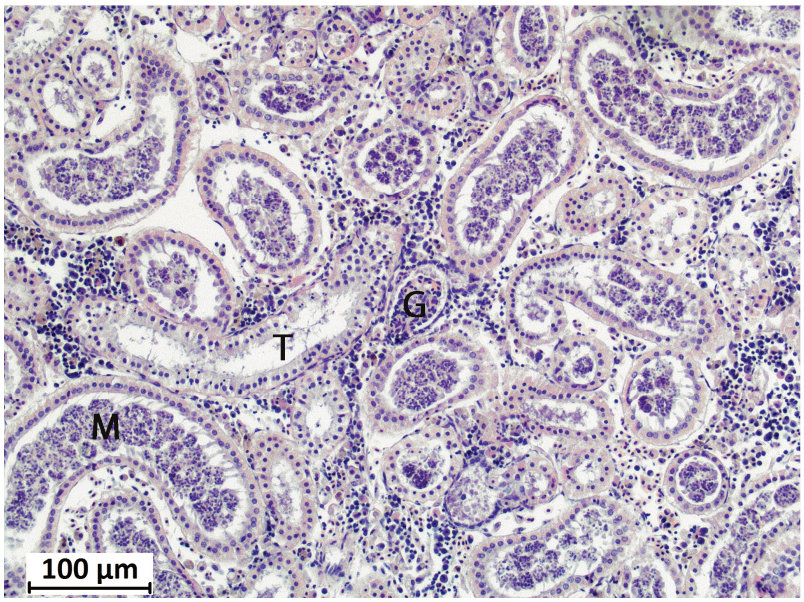


Abbildung 31: *Myxozoa* in den Tubuluslumina der Nieren eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich
In zahlreichen Nierentubuli (T) sind zum Teil hochgradig Parasiten des Taxons *Myxozoa* (M) nachweisbar, während die Corpuscula renalia (C) meist nicht betroffen waren (200-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

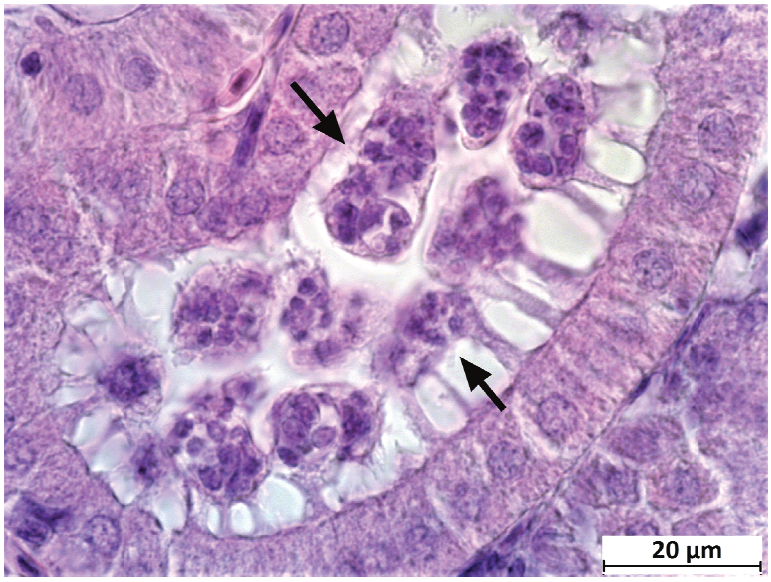


Abbildung 32: *Myxozoa* in den Nierentubuli eines adulten Maifisches,2012, GGD-System, Frankreich
Zahlreiche Parasitenstadien in einem Nierentubulus (Pfeile) (400-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

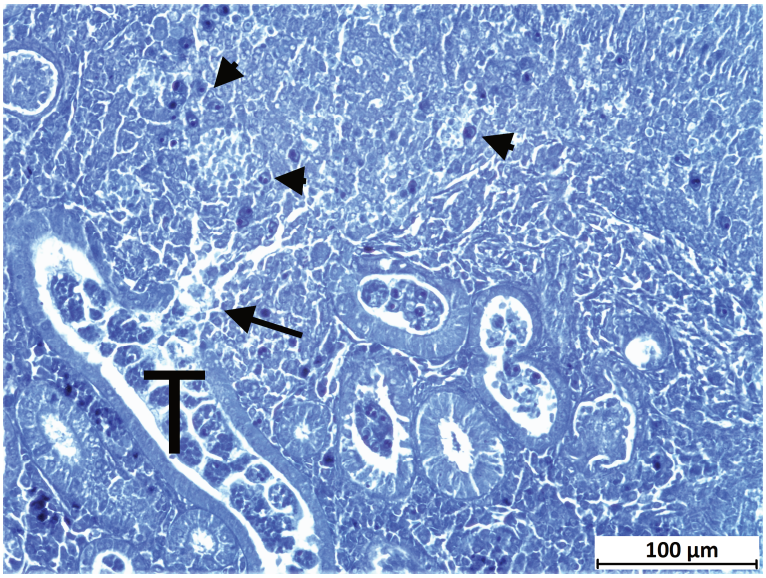


Abbildung 33: Myxozoa im Niereninterstitium eines adulten Maifisches, 2014, GGD-System, Frankreich
Ruptur eines Tubuli (T) mit Austritt von Myxozoa-Sporen ins Interstitium (Pfeil). Einzelne Myxozoa-Sporen im Niereninterstitium (Pfeilköpfe) umgeben von einer granulomatösen, vorwiegend epitheloidzelligen Reaktion (200-fache Vergrößerung, ZN-Färbung)

4.3.9 Gonaden adulter Maifische

Adulte Maifische aus dem GGD-System

Bei den Männchen war die Morphologie der Hoden sehr homogen. Die überwiegende Zellpopulation im Hoden waren Spermien, während Keimepithel nur als ein- bis mehrreihiges Epithel in den Hodenkanälchen vorhanden war. Die Ovarien zeigten bei Maifischen, welche im Mai und Juni gestorben waren, Follikel in verschiedenen Reifegraden sowie wenige Bereiche mit Resorption nach dem Ablaichen. Die Ovarien der beiden im Juli 2013 verstorbenen Weibchen zeigten überwiegend Bereiche mit Resorption und Reorganisation verbleibender Follikelhüllen und atretische Follikel nach dem Ablaichen.

4.3.10 Malformationen bei Maifischen der Zuchtpopulation

Die zystischen Veränderungen der 0+ Generation stellten sich histologisch als vom Oberkiefer ausgehende, flüssigkeitsgefüllte Zysten dar, welche von einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet wurden (Abbildung 34). Die äußere Wand der Zysten bestand aus lockerem Bindegewebe und epidermalem Epithel. An der Basis der Zysten war ein unregelmäßig konturiertes Knochenstück darstellbar. Es waren histologisch keine Hinweise auf Atypien, mechanische Verletzungen oder Infektionserreger nachweisbar.

Bei der 1+ Generation bildeten sich die flüssigkeitsgefüllten Zysten zugunsten von vorwiegend knöchernen Zubildungen mit einem Durchmesser von bis zu 2 mm zurück.



Abbildung 34: Zystische Malformation bei einem zwei Monate alten Maifisch, 2012, Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

Transversalschnitt von einem juvenilen Maifisch mit einer bindegewebigen, flüssigkeitsgefüllten Zyste (Z) linksseitig (25-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

4.4 Befunde der bakteriologischen Untersuchung

Juvenile Maifische der Wildpopulation, Frankreich und Deutschland

Es wurden 22 gefrorene juvenile Maifische aus dem GGD-System und 26 gefrorene Juvenile aus dem Rhein bakteriologisch untersucht (Tabelle 2 und Tabelle 4). In keiner der Proben wurde bakterielles Wachstum nachgewiesen.

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Von den adulten Rückkehrern aus dem GGD-System wurden insgesamt 119 Maifische bakteriologisch untersucht (Tabelle 3). Die Untersuchung erfolgte umgehend, lediglich im Jahr 2014 waren zehn Exemplare vor der Untersuchung gefroren. Zusammenfassend wurde im Jahr 2012 bei 83 % (33/40), 2013 bei 56 % (31/55) und 2014 bei 63 % (15/24) der Maifische bakterielles Wachstum festgestellt. Verstorbene Maifische wiesen in der bakteriologischen Untersuchung häufiger positive Befunde auf als euthanasierte Fische. Jedoch waren im Jahr 2013 33 % (14/42) sowie im Jahr 2014 29 % (4/14) der verstorbenen Maifische ohne Keimwachstum. Insgesamt wurden im Jahr 2012 15 sowie in den Jahren 2013 und 2014 jeweils 14 verschiedene Isolate gewonnen, zu deren Bestimmung biochemische (n = 43) und molekularbiologische Untersuchungen (n = 6), MALDI-TOF MS (n = 27) und Untersuchungen am CVUAS (n = 8) durchgeführt wurden. Außerdem wurden Organrückstellproben von insgesamt neun Maifischen am Landesbetrieb Hessisches Landeslabor auf Mykobakterien hin untersucht. Insgesamt wurden neun verschiedene Bakterienspezies identifiziert. Bei drei Isolaten war nur die taxonomische Einordnung in eine Gattung bzw. Gruppe valide. Die Ergebnisse der Speziesbestimmung dieser Isolate sowie deren Prävalenz sind in Tabelle 9 dargestellt. Im Fall von *Lactococcus lactis* und den Mykobakterien wurden Sequenzierungen durchgeführt, welche nachfolgend dargestellt werden. Die Untersuchung motiler Aeromonaden am CVUAS wird abschließend vom Kap. 4.4 populationsübergreifend erläutert.

Tabelle 9: Bei adulten Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesene Bakterienspezies, 2012-2014, Frankreich

Bakterium	Lokalisation	Prävalenz		
		2012	2013	2014
Aeromonas bestarium	Innere Organe	48 % (19/40)	49 % (27/55)	29 % (7/24)
Aeromonas caviae	Innere Organe	30 % (12/40)	- -	- -
Aeromonas media	Innere Organe	3 % (1/40)	- -	8 % (2/24)
Aeromonas sobria	Innere Organe	- -	23 % (13/55)	4 % (1/24)
Aeromonas veronii	Innere Organe	40 % (16/40)	13 % (7/55)	13 % (3/24)
Aeromonas sp. (motil)	Innere Organe	- -	31 % (17/55)	17 % (4/24)
Citrobacter freundii	Innere Organe	- -	7 % (4/55)	- -
Lactococcus lactis	Innere Organe	55 % (22/40)	- -	33 % (8/24)
Mycobacterium chelonae/abscessus-Gruppe	Innere Organe	- -	- -	4% (1/24*)
Mycobacterium salmoniphilum	Niere	6 % (2/31*)	- -	- -
Plesiomonas shigelloides	Innere Organe	- -	- -	21 % (5/24)
Pseudomonas sp.	Innere Organe	- -	- -	8 % (2/24)

*Gesamtanzahl bezogen auf die histologische Untersuchung, da nur bei histologischem Verdacht bakteriologische Untersuchungen auf Mykobakterien durchgeführt wurden

Lactococcus lactis

Ausschließlich in der bakteriologischen Untersuchung adulter Maifische aus dem GGD-System wurde mit einer Prävalenz von 55 % (22/40) im Jahr 2012 bzw.

33 % (8/24) im Jahr 2014 ein kokkoides Bakterium angezüchtet. Es handelte sich um ein Gram-positives, Katalase-negatives Bakterium, welches bei Wachstum auf Blutagar eine α-Hämolyse zeigte. Dieses kokkoide Bakterium wurde bei verstorbenen Maifischen erstmals 15-20 Tage (2012) bzw. 22-42 Tage (2014) nach dem Transport nach Bruch nachgewiesen. Die jeweils erstmalige Anzucht erfolgte bei verstorbenen Maifischen aus beiden Kunststoffbecken am selben Tag (2012) oder innerhalb von sieben Tagen (2014). Insgesamt wurde dieses kokkoide Bakterium bei 62 % (16/26) der verstorbenen und 43 % (6/14) der euthanasierten (2012), bzw. 43 % (6/14) der verstorbenen und 20 % (2/10) der euthanasierten (2014) Maifische aus Herz, Leber, Niere und/oder Milz isoliert. In vier (2012) bzw. zwei (2014) Fällen wuchs das kokkoide Bakterium in Reinkultur, während es in den anderen Fällen Mischkulturen mit Gram-negativen Stäbchen (vor allem Aeromonaden) bildete. Der bakterielle Nachweis dieses kokkoiden Bakteriums erfolgte bei allen Maifischen mit histologisch nachgewiesener Endokarditis. Bei einem Maifisch mit *Endocarditis parietalis thromboticans* wurde das kokkoide Bakterium in Reinkultur isoliert. Darüber hinaus wurde das kokkoide Bakterium immer aus Herz, Leber, Niere oder Milz angezüchtet, wenn histologisch ebenfalls kokkoide Bakterien, beispielsweise als Emboli, in den entsprechenden Organen nachgewiesen wurden.

Insgesamt wurden sechs Isolate gewonnen, wobei vier Isolate aus dem Jahr 2012 und zwei aus dem Jahr 2014 stammten. Alle sechs Isolate wurden mittels API ID 32 Strep (bioMérieux) als *L. lactis* subsp. *lactis* (ausgezeichnete Identifizierung, 99,9 % ID) identifiziert. Eine weiterführende Untersuchung dieser Isolate mittels MALDI-TOF MS (DB 5627, Bruker Daltonics) bestätigte die Bakterienspezies als *L. lactis* subsp. *lactis* (5 x) oder *L. lactis* (1 x) mit einer Übereinstimmungskategorie von „A“ (Spezies-Übereinstimmung) sowie einem Scorewert von 2,181 bis 2,398. Die Sequenzierung der 16S rRNA-Gens (CHUNG et al. 2007) des Isolates „F 26/12“ ergab ein Amplikon mit einer Länge von 638 Bp sowie bei der BLAST-Analyse die höchste Übereinstimmung von 99 % mit drei *L. lactis*-Isolaten (Accession No.: KT260999.1, JQ973595.1, KT260688.1) und einem *L. lactis* subsp. *lactis*-Isolat (Accession No.: JQ712020.1). Die vollständige Sequenzierung des 16S rRNA-Gens in eine Richtung (BAKER et al. 2003) wurde

von einem Isolat aus dem Jahr 2012 und zwei Isolaten aus jedem Jahr 2014 durchgeführt. Alle Amplikons zeigten bei der BLAST-Analyse eine Übereinstimmung von 100 % mit *L. lactis* CAU7908 (Accession No.: MF108817). Die Sequenzen wurden bei GenBank unter den Accession No.: MH014933, MH014934 und MH014935 eingereicht.

Mykobakterien

Mykobakterien wurden ausschließlich bei adulten Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesen. Zur Identifikation der Mykobakterien wurde eine Anzucht aus gefrorenen Rückstellproben der betroffenen Organe von insgesamt neun histologisch ZN-positiven Fischen mit Granulomen durchgeführt. In drei Fällen wurde je ein Isolat kultiviert und nachfolgend das 16S rRNA-Gen sequenziert. Das erste Amplikon aus dem Jahr 2012 mit einer Länge von 829 Bp wies bei der BLAST-Analyse die höchste Identitätsübereinstimmung (99 %) mit Sequenzen von dem zur *M. chelonae/abscessus*-Gruppe gehörenden *M. salmoniphilum* (Accession No.: NR043989.1; HM638446.1; FJ616983.2; EF535601.1; DQ866768.1) auf. Das zweite Amplikon aus dem Jahr 2012 mit einer Länge von 805 Bp zeigte die höchste Identitätsübereinstimmung (100 %) mit denselben Sequenzen von *M. salmoniphilum*. Bei dem im Jahr 2014 angezüchteten Isolat ergab die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens keine eindeutige Speziesübereinstimmung. Dementsprechend wurde eine Sequenzierung des *rpo*B-Gens angeschlossen. Die erhaltene, fragmentierte Sequenz von 409 Bp zeigte eine Identitätsübereinstimmung von 98 % mit *M. chelonae* (Accession No. KT779896.1, KT779895.1, KT779894.1) und von 97 % mit *M. franklinii* (Accession No. KM392056.1). Da beide Spezies zur *M. chelonae/abscessus*-Gruppe gehören, wurde das Isolat als nicht abschließend identifizierbare Bakterienspezies der *M. chelonae/abscessus*-Gruppe eingeordnet. Zusätzlich wurden im Jahr 2014 bei einem adulten Maifisch mit dem histologischen Nachweis säurefester Stäbchen und einem histologisch unauffälligen Maifisch jeweils aus dem GGD-System in der routinemäßig durchgeführten bakteriologischen Untersuchung auf 5 % Columbia Schafsblut-Agar winzige, runde, glänzende, graue Kolonien angezüchtet, die eine geringgradige

Hämolyse zeigten. Durch Untersuchung der Isolate mittels MALDI-TOF MS wurde das Bakterium ebenfalls der Gattung *Mycobacterium* zugeordnet.

Adulte Maifische aus dem Rhein, Deutschland

Insgesamt wurden acht Rückkehrer aus dem Rhein bakteriologisch untersucht (Tabelle 5). Sechs Maifische waren ohne Keimwachstum. Bei zwei Maifischen (beide zuvor gefroren) wurden insgesamt vier Isolate gewonnen, die mittels biochemischer Untersuchungen (n = 4) und MALDI-TOF MS (n = 3) zwei verschiedenen Bakterienspezies zugeordnet wurden (Tabelle 10). Bei zwei Isolaten war nur eine valide Genusidentifikation möglich.

Tabelle 10: Bei adulten Maifischen aus dem Rhein nachgewiesene Bakterienspezies, 2014, Deutschland

Bakterium	Lokalisation	Prävalenz (2014)
Aeromonas sobria	Innere Organe	25 % (2/8)
Aeromonas veronii	Innere Organe	25 % (2/8)
Aeromonas sp. (motil)	Innere Organe	13 % (1/8)
Shewanella sp.	Innere Organe	13 % (1/8)

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden 32 Maifische aus der Zuchtpopulation bakteriologisch untersucht (Tabelle 6), von welchen fünf euthanasiert wurden und 27 verstorben waren. Zusammenfassend wurden in 18 Fällen Abstriche aus der Leibeshöhle, in 14 Fällen Abstriche aus Herz, Leber, Niere und Milz sowie zusätzlich in fünf Fällen Zystenpunktat kultiviert. Die bakteriologische Untersuchung von Maifischen mit Zysten sowie der Fische aus dem Jahr 2014 verlief negativ. Im Jahr 2012 wurde bei 37 % (7/19) und im Jahr 2013 bei 60 % (6/10) der Maifische bakterielles Wachstum festgestellt und insgesamt 19 Isolate gewonnen. Diese Isolate wurden anhand von biochemischen Untersuchungen (n = 19), MALDI-TOF MS (n = 2) sowie durch Untersuchungen am CVUAS (n = 2) drei verschiedenen Bakterienspezies zugeordnet. Bei drei Isolaten war nur eine valide Bestimmung der Gattung möglich (Tabelle 11).

Tabelle 11: Bei der Zuchtpopulation in Aßlar nachgewiesene Bakterienspezies, 2012-2014, Deutschland

Bakterium	Lokalisation	Prävalenz	
		2012	2013
Aeromonas bestarium	Innere Organe	37 % (7/19)	- -
Aliivibrio fischeri	Innere Organe	- -	40 % (4/10)
Listonella anguillarum	Innere Organe	5 % (1/19)	20 % (2/10)
Pseudomonas sp.	Innere Organe	11 % (2/19)	- -
Pseudomonas sp.	Innere Organe	5 % (1/19)	- -
Shewanella sp.	Innere Organe	21 % (4/19)	- -

Untersuchung motiler Aeromonaden am CVUAS

In der bakteriologischen Untersuchung wurden motile Aeromonaden (häufig Mischkultur verschiedener motiler *Aeromonas* spp. bei einem Fisch) insgesamt bei 68 % (27/40, 2012), 56 % (31/55), 2013 sowie 54 % (13/24, 2014) der adulten Maifische aus dem GGD-System sowie bei 25 % (2/8) der adulten Maifische aus dem Rhein und bei 39 % (7/19) der Maifisch in der Zuchtpopulation nachgewiesen. Der Nachweis motiler Aeromonaden erfolgte dabei zumeist bei verstorbenen Maifischen, wobei die Kolonieanzahl subjektiv makroskopisch mit dem Autolysegrad zunahm. Jedoch waren im Jahr 2013 33 % (14/42) sowie im Jahr 2014 29 % (4/14) der adulten, verstorben Maifische aus dem GGD-System ohne Keimwachstum. Hingegen wurden mittellange Stäbchen im Jahr 2012 auch aus 7 % (1/14), 2013 aus 23 % (3/13) sowie 2014 aus 30 % (3/10) der euthanasierten adulten Maifische aus dem GGD-System isoliert. Es handelte sich um weiße bis gelbliche, rundliche, glänzende und teilweise hämolysierende Kolonien bestehend aus motilen, Gram-negativen, Oxidase- und O/F-positiven, mittellangen Stäbchenbakterien. Insgesamt wurden 43 Isolate gewonnen, die mittels biochemischer Untersuchungen (n = 43), MALDI-TOF MS (n = 14) und Untersuchungen am CVUAS (n = 10) als *Aeromonas bestiarum, Ae. sobria, Ae. veronii, Ae. media* sowie ein nicht weiter klassifizierbarer *Aeromonas* sp. identifiziert wurden.

4.5 Befunde der mykologischen Untersuchung

Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden bei der mykologischen Untersuchung bei keinem der juvenilen Maifische aus dem GGD-System (n = 105) oder dem Rhein (n = 66) bzw. der adulten Maifische aus dem Rhein (n = 9) sowie der Zuchtpopulation (n = 44) Hinweise auf mykotische Infektionserreger nachgewiesen.

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Insgesamt wurden 121 adulte Maifische aus dem GGD-System auf das Vorkommen von Pilzen hin untersucht (Tabelle 3). Bei 53 % (64/121) der Maifische wurden in der mikroskopischen Untersuchung von Haut-, Flossen-, Kiemen- und Augenabstrichen sowie in der Histologie (Kap. 4.3.5) Pilzhyphen festgestellt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Saprolegniasis bei adulten Maifischen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich
Ergebnisse der makroskopischen, mikroskopischen, mykologischen und histologischen Untersuchung (H: Herkunft, G: Garonne, D: Dordogne)

Proben-material		Mikroskopie und Histologie				Gesamt-prävalenz der Saprolegniasis
Jahr	**H**	**Haut**	**Flosse**	**Kieme**	**Auge**	
2012	G	12	2	9	5	40 % (17/42)
2013	G	24	23	21	21	93 % (27/29)
	D	11	1	5	0	60 % (15/25)
		0	0	0	0	0 % (0/1*)
2014	G	5	0	1	1	25 % (5/20)
		0	0	0	0	0 % (0/4*)
Insgesamt:		**52** (43 %)	**26** (21 %)	**36** (30 %)	**27** (22 %)	**53 % 64/ 121**

* auf dem Transport verstorben

Die Mykose wurde insbesondere bei verstorbenen Maifischen (n = 56) festgestellt, während euthanasierte Maifische (n = 8) nur im Jahr 2013 und mit einer geringgradigen Infektionsintensität betroffen waren. Keiner der auf dem Transport verstorbenen Maifische war betroffen (n = 5). Die Infektion wurde bei Weibchen mit 62 % (26/42) etwas häufiger nachgewiesen als bei Männchen mit 48 % (38/79). Insgesamt war die Haut mit 43 % (52/121) das am häufigsten betroffene Organ, gefolgt von Kiemen, Augen und Flossen. In Fällen mit geringgradiger Infektion lag der Pilzbelag oberflächlich auf einem makroskopisch intakten Gewebe mit deutlicher, peripherer Rötung. In höhergradigen Fällen wurden Nekrosen oder Ulzerationen des darunterliegenden Gewebes (Kap. 4.3.5) sowie ein infiltratives Pilzwachstum festgestellt (Abbildung 35).

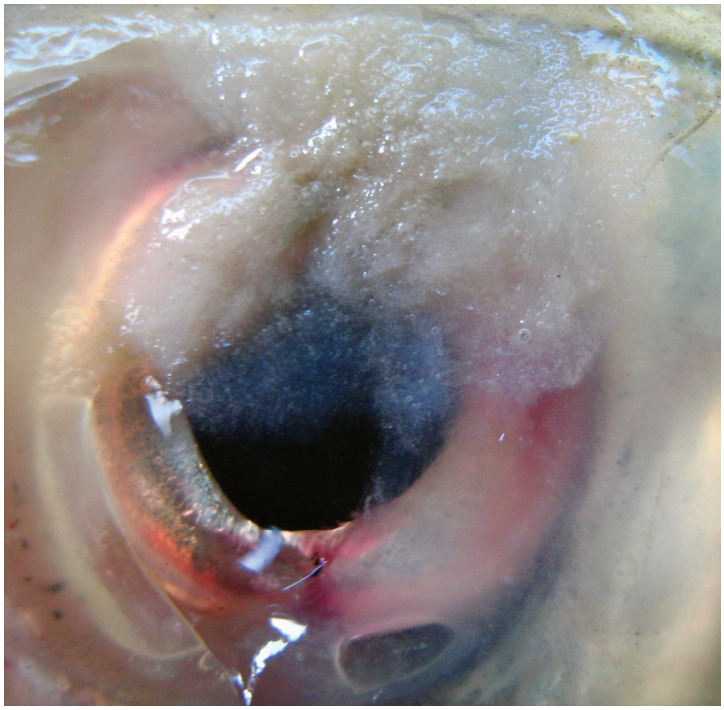


Abbildung 35: Saprolegniasis des Auges bei einem adulten Maifisch, 2012, GGD-System, Frankreich
Hochgradig infiltratives Wachstum von *Saprolegnia parasitica* durch die Cornea in die vordere Augenkammer

Bei 11 % (13/121) der Maifische (neun Fälle aus dem Jahr 2013) wurden zum Teil großflächige Läsionen der Haut und Muskulatur (Abbildung 36) festgestellt. Bei 50 % (9/18) der verstorbenen, bakteriologisch negativen Maifische wurde eine hochgradige Mykose nachgewiesen.



Abbildung 36: Großflächiges Hautulkus mit Saprolegniasis bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich
Adulter Maifisch mit hochgradiger Saprolegniasis und Ulzeration der Haut an der Schwanzbasis

Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden von 41 Maifischen Pilz-Isolate angezüchtet. Die Anzucht von Abstrichen von bereits gefrorenen Maifischen war nicht erfolgreich. In der morphologischen Untersuchung wurden alle Isolate der Familie Saprolegniaceae (Taxon: Peronosporomycetes DICK, 2001; früher Oomycota) zugeordnet.

Aus dem Jahr 2013 und dem Jahr 2014 wurden aus beiden Kunststoffbecken je zwei Isolate zur molekularbiologischen Untersuchung ausgewählt. Das Ergebnis der Sequenzierung der ITS- und *cox*2- Genregionen aller untersuchten Isolate ergab *S. parasitica*.

4.6 Befunde der virologischen Untersuchung

Im Rahmen der virologischen Untersuchung wurden in den Jahren 2012-2014 insgesamt 204 Maifische untersucht (Tabelle 13). Von den 204 Maifischen stammten 178 aus der Wild- und 26 aus der Zuchtpopulation.

Tabelle 13: Gesamtübersicht Probenmaterial und Untersuchungsmethoden für die Virologie, 2012-2014
A: adult, J: juvenil, OP: Organpool (Pool bestehend aus maximal 5-6 Maifischen), SF: Schwanzflosse (Pool bestehend aus maximal 5-6 Maifischen)

Probenmaterial				Untersuchungsmethode			
Jahr	**Herkunft**	**Alter**	**Anzahl Fisch**	**PCR SF**	**PCR OP**	**Anzucht OP**	**Blut-aus-strich***
2012	Garonne	A	42	0	8	0	24/37**
		J	9	2	2	2	0
	Dordogne	J	2	1	1	1	0
	Zucht-population	J	6	0	2	1	5/6
2013	Garonne	A	29	6	6	6	27/29
	Dordogne		26	8	8	8	23/26
	Garonne	J	12	2	2	2	0
	Rhein	J	0	0	0	0	0
	Zucht-population	J	13	3	3	3	3/6**
2014	Garonne	A	24	8	8	8	14/24
		J	0	0	0	0	0
	Rhein	A	8	8	8	8	2/6**
		J	26	5	5	5	0
	Zucht-population	J	7	1	1	1	0
Insgesamt			**204**	**44**	**54**	**45**	**98/134**

*Auswertbar/absolute Anzahl
**Von verstorben Maifischen wurde in wenigen Fällen nicht ausreichend Blut für einen Blutausstrich gewonnen

4.6.1 Anzucht

Alle Proben auf den Zelllinien EPC, BF-2, CCB und CHSE/F wurden nach der 3. Passage als negativ beurteilt. Bei den Zelllinien EK-1, FHM und RT/F wurden sieben Passagen durchgeführt, bevor die Proben als negativ beurteilt wurden. Alle Proben auf den Zelllinien EK-1 und SAF-1 waren nach drei Passagen negativ. Bei der Zelllinie CCB und RT/F wurden vier Passagen durchgeführt, bevor die Proben als negativ beurteilt wurden.

4.6.2 Molekularbiologische Untersuchungen (PCR)

Die β-Actin-PCR verlief bei allen 19 RNA-Extraktionen positiv.

Alle durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen (PCRs) zum Nachweis des VHSV, des IHNV, des ISAV, des IPNV, cypriniden Herpesviren und des LCDV verliefen negativ.

4.6.3 Blutausstriche

Von den angefertigten Blutausstrichen von 134 Maifischen wurden aufgrund einsetzender Autolyse die Blutausstriche von 98 Maifischen als auswertbar klassifiziert (Tabelle 13). In keinem der untersuchten Blutausstriche wurden für eine VEN-Infektion charakteristische Veränderungen der Erythrozyten festgestellt.

4.7 Befunde der parasitologischen Untersuchung

Bei der parasitologischen Untersuchung wurden insgesamt 354 Maifische auf parasitäre Infektionen untersucht (Tabelle 14). Bei der Wildpopulation wurden Endo- und Ektoparasiten nachgewiesen, während die Zuchtpopulation in Aßlar parasitologisch negativ war.

4.7.1 Ektoparasiten

Juvenile Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Bei den 76 juvenilen Maifischen aus dem GGD-System wurde als einzige Ektoparasitose eine Infektion mit Einzellern der Familie Trichodinidae nachgewiesen. Die Prävalenz lag bei Juvenilen aus der Garonne im Jahr 2011 bei 13 % (7/52), 2012 bei 11 % (2/19) und 2013 bei 25 % (3/12). Hingegen wurden Trichodinidae bei allen drei untersuchten juvenilen Maifischen aus der Dordogne im Jahr 2012 nachgewiesen. Die Trichodinose war zumeist gering- selten mittel- bis hochgradig und wurde ausschließlich auf den Kiemen ohne histopathologische Veränderungen (Kap. 4.3.7) nachgewiesen.

Adulte Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

In der parasitologischen Untersuchung wurden bei den untersuchten 121 adulten Maifischen aus dem GGD-System Ektoparasitosen durch Protozoen und Metazoen nachgewiesen. Bei Maifischen aus der Maifischprojektanlage in Bruch waren die Prävalenzen von Ektoparasiten höher als bei Maifischen, welche auf dem Transport (n = 5) verstorben waren. Darüber hinaus war die Prävalenz von Ektoparasiten in der Maifischprojektanlage in Bruch in den Jahren 2012 mit 93 % (39/42) und 2013 mit 98 % (53/54) höher als im Jahr 2014 mit 60 % (12/20).

Auf Haut, Flossen und Kiemen wurden Trichodinidae und *Chilodonella* sp. festgestellt (Tabelle 15). Die häufigste Ektoparasitose sowohl auf den Kiemen als auch auf der Haut mit einer Prävalenz von bis zu 80 % (44/55) bzw. 87 % (48/55) war die Trichodinose. Diese wurde im gesamten Untersuchungszeitraum auf den

Tabelle 14: Gesamtübersicht Probenmaterial und Untersuchungsmethoden für die Parasitologie, 2012-2014
Al.: Alter, A: Adult, J: Juvenil, Ab. Ek.: Abstriche von Haut, Flossen und Kiemen, Ab. En.: Abstriche von Magen, Darm, Pylorusanhängen, n. d.: nicht durchgeführt

Probenmaterial				Untersuchungsmethode			
Jahr	**Herkunft**	**Al.**	**Anzahl**	**Ab. Ek.**	**Ab. En.**	**Verdau Muskulatur**	**PCR Niere (*Myxozoa*)**
2010	Rhein	J	10	10	n. d.	n. d.	n. d.
2011	Garonne	J	52	52	n. d.	n. d.	n. d.
2012	Garonne	A	42	42	42	n. d.	5
		J	19	19	n. d.	19	n. d.
	Dordogne	J	3	3	n. d.	3	n. d.
	Zuchtpopulation	J	33	25	25	15	n. d.
2013	Garonne	A	29	29	29	29	3
	Dordogne		26	26	26	26	13
	Garonne	J	12	12	n. d.	n. d.	3
	Rhein	J	1	n. d.	n. d.	n. d.	1
		A	1	1	n. d.	n. d.	1
	Zuchtpopulation	J	13	13	9	7	n. d.
2014	Garonne	A	24	24	24	24	24
		J	19	n. d.	n. d.	n. d.	19
	Rhein	A	8	8	8	7	6
		J	55	26	n. d.	38	27
	Zuchtpopulation	J	7	7	n. d.	n. d.	n. d.
Insgesamt:			**354**	**297**	**163**	**168**	**102**

Kiemen mit 47 % (40/86) zumeist als hochgradig, auf Haut und Flossen hingegen mit 71 % (63/88) am häufigsten als geringgradig eingestuft. Ausschließlich auf den Flossen und der Haut wurden *Argulus* sp. (Karpfenläuse) jeweils in geringer

Parasitenanzahl nachgewiesen (Tabelle 15). Der Nachweis von *Argulus* sp. erfolgte doppelt so häufig bei Maifischen mit Saprolegniasis (n = 8) als ohne Saprolegniasis (n = 4) und dreimal so häufig bei Maifischen mit Hämorrhagien der Haut (n = 9) wie ohne Hämorrhagien (n = 3). In den Kiemen wurden histologisch zusätzlich Amöben (Abbildung 26), ein nicht abschließend identifizierbarer parasitärer Organismus (Abbildung 28) sowie Hakensaugwürmer der Klasse Monogenea festgestellt (Kap. 4.3.7).

Tabelle 15: Ektoparasiten bei adulten Maifischen, 2012-2014, GGD-System, Frankreich
Die Prävalenzen ergeben sich aus Abstrichen und der histologischen Untersuchung

Parasit	Lokalisation	Prävalenz		
		2012	2013	2014
Protozoen				
Trichodinidae	Kiemen	71 % (30/42)	80 % (44/55)	50 % (12/24)
	Haut	81 % (34/42)	87 % (48/55)	25 % (6/24)
Chilodonella sp.	Kiemen	10 % (4/42)	11 % (5/55)	4 % (1/24)
	Haut	7 % (3/42)	0 % (0/55)	0 % (0/24)
Amöben*	Kiemen	0 % (0/31)	11 % (6/55)	4 % (1/24)
Metazoen				
Klasse Monogenea*	Kiemen	13 % (4/31)	7 % (4/55)	4 % (1/24)
Argulus sp.	Haut	10 % (4/42)	11 % (6/55)	8 % (2/24)
Unbekannt				
Nicht spezifizierbarer Organismus*	Kiemen	3 % (1/31)	16 % (9/55)	0 % (0/24)

*nur histologisch nachgewiesen, darum Prävalenz auf Gesamtzahl histologisch untersuchter Maifische bezogen

Maifische aus dem Rhein, Deutschland

Bei keinem der adulten oder juvenilen Maifische aus dem Rhein wurden in der mikroskopischen oder der histologischen Untersuchung Ektoparasiten auf Haut, Flossen oder Kiemen nachgewiesen.

4.7.2 Endoparasiten in der Leibeshöhle

Nematoden bei adulten Maifischen der Wildpopulation, Deutschland und Frankreich

Nematoden in der Leibeshöhle wurden makroskopisch bei 100 % (121/121) der adulten Maifische aus dem GGD-System sowie bei 63 % (5/8) bei den adulten Maifischen aus dem Rhein nachgewiesen (Abbildung 37). Die Nematoden wiesen eine mittlere Gesamtlänge von 2,1 cm ([Minimum-Maximum] 1,8-2,5 cm, n = 10) sowie eine mittlere Dicke von 0,5 mm (0,4-0,5 mm, n = 10) auf. Die Verteilung der Nematoden in der Leibeshöhle war dabei sehr charakteristisch. Die hellgelb bis weißlichen Nematoden lagen zumeist dünn abgekapselt und spiralig zu einer flachen Scheibe aufgerollt außerhalb der Coelomhöhle. Die höchste Befallsintensität war jeweils am terminalen Ende des Blindsackes des Magens sowie am hier ansetzenden, zur Schwimmblase ziehenden *Ductus pneumaticus* nachweisbar. Bei den seltenen geringen Befallsintensitäten waren die Einzelexemplare der Nematoden auf diesen Bereich begrenzt. Im Fall mittel- bis hochgradiger Befallsintensitäten bildete sich in diesem Bereich eine bis zu 6 x 3 x 3 cm große Nematodenansammlung.

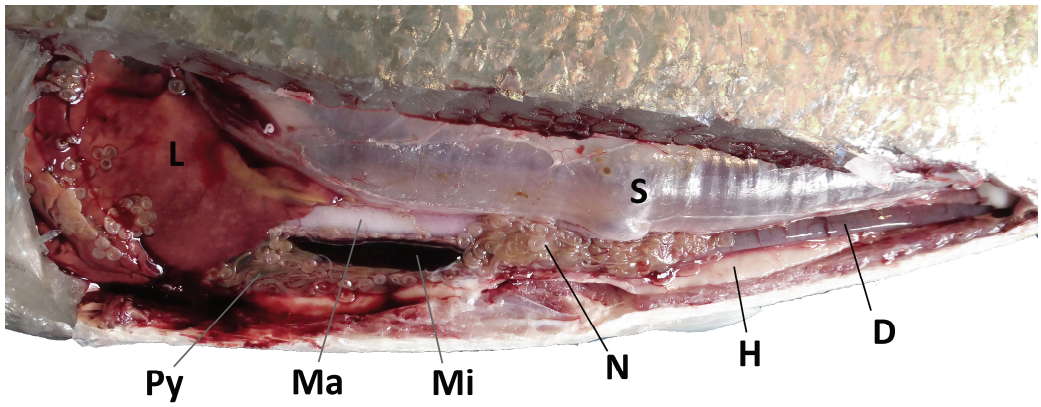


Abbildung 37: Anisakidae in der Leibeshöhle eines adulten Maifisches, 2012, GGD-System, Frankreich
Mittel- bis hochgradiger Befall mit Nematodenlarven am terminalen Ende des Blindsacks des Magens, zwischen den inneren Organen sowie auf der Leber (L: Leber, Py: Pylorusanhänge, Ma: Magen, Mi: Milz, N: Nematoden, S: Schwimmblase, H: Hoden, D: Darm)

Bei hohen Befallsintensitäten wurden Nematoden zusätzlich oberflächlich auf den Serosen von Darm, Pylorusanhängen, Leber, Milz, Schwimmblase und in der Muskulatur nachgewiesen. Zum Beispiel waren bei 88 % (107/121) der adulten Maifische aus dem GGD-System eingerollte Nematoden auf der Leber zu beobachten.

Externe Digestionsmethode (Muskulatur)

Bei Verwendung des 300 µm Filters wurden Nematoden im Jahr 2013 bei 62 % (18/29) und im Jahr 2014 bei 58 % (14/24) der adulten Maifische aus der Garonne sowie im Jahr 2013 bei 50 % (13/26) der adulten Maifische aus der Dordogne nachgewiesen. Bei adulten Maifischen aus dem Rhein erfolgte der Nachweis in 29 % (2/7) der Maifische, während alle untersuchten juvenilen Maifische negativ waren. Bei Verwendung des 25 µm Filters wurden im Jahr 2013 bei 7 % (2/29) der adulten Maifische aus der Garonne zwei verschiedene Arten von Nematodeneiern nachgewiesen. Bei einer handelte es sich um ein ca. 83 x 80 µm großes, dünnschaliges Ei mit einer Larve des Stadiums II der Familie Anisakidae (Abbildung 38 A). Die zweite Art von Nematodeneiern war länglich mit einer Größe von 67 x 45 µm sowie einem inneren Larvenstadium. Diese waren morphologisch nicht abschließend bestimmbar (Abbildung 38 B).

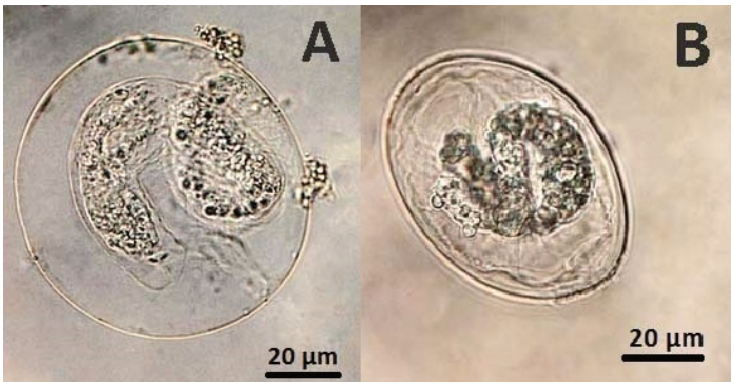


Abbildung 38: Nematodeneier (Lichtmikroskopie) bei adulten Maifischen, GGD-System, Frankreich

4.7.3 Endoparasiten des Gastrointestinaltrakts

Eine parasitäre Infektion des Gastrointestinaltrakts wurde im Jahr 2012 bei 60 % (25/42), 2013 bei 87 % (48/55) sowie 2014 bei 50 % (12/24) der adulten Maifische aus dem GGD-System sowie 100 % (8/8) der adulten Maifische aus dem Rhein nachgewiesen. Die juvenilen Maifische waren mit einer Prävalenz von 17 % (2/12) im GGD-System und 0 % (0/29) im Rhein deutlich weniger betroffen. Bei den Parasiten handelte sich um Nematoden, zwei nicht identifizierbare Parasitenstadien, Trematoden sowie Hemiuridae (Tabelle 16). Die Nematoden mit einer mittleren Gesamtlänge von 2,5 cm (1,2-5,5 cm, n = 26) sowie einer mittleren Dicke von 0,7 mm (0,5-1 mm, n = 26) befanden sich vor allem im Magen und in der Magenwand zur Migration in die Leibeshöhle (Abbildung 39). Die Hemiuridae (Abbildung 40) waren nur im Magen nachweisbar, während *Pronoprymna* sp. im Darm und den Pylorusanhängen gefunden wurden (Abbildung 41).

Tabelle 16: Parasitosen des Gastrointestinaltrakts, 2012-2014, Wildpopulation, Deutschland und Frankreich
Die Prävalenzen ergeben sich aus Abstrichen und der Histologie. A: adult, J: juvenil, H: Herkunft, G: Garonne, D: Dordogne, R: Rhein

Probenmaterial			Parasitosen des Gastrointestinaltrakts			
Jahr	**A**	**H**	***Pronoprymna* sp.**	**Hemiuridae**	**Nicht identifiziertes Parasitenstadium**	**Nematoden**
2012	A	G	57 % (24/42)	2 % (1/42)	7 % (3/42)	0 % (0/42)
2013	A	G	84 % (24/29)	21 % (6/29)	10 % (3/29)	0 % (0/29)
		D	85 % (22/26)	15 % (4/26)	42 % (11/26)	8 % (2/26)
	J	G	0 %* (0/12*)	0 % (0/12)	0 % (0/12)	8 % (1/12)
2014	A	G	50 % (12/24)	0 % (0/24)	4 % (1/24)	4 % (1/24)
	A	R	88 % (7/8)	13 % (1/8)	38 % (3/8)	25 % (2/8)
	J	R	0 % (0/29)	0 % (0/29)	0 % (0/29)	0 % (0/29)

*bei 2/12 Maifischen wurden histologisch nicht identifizierbare Trematoden nachgewiesen

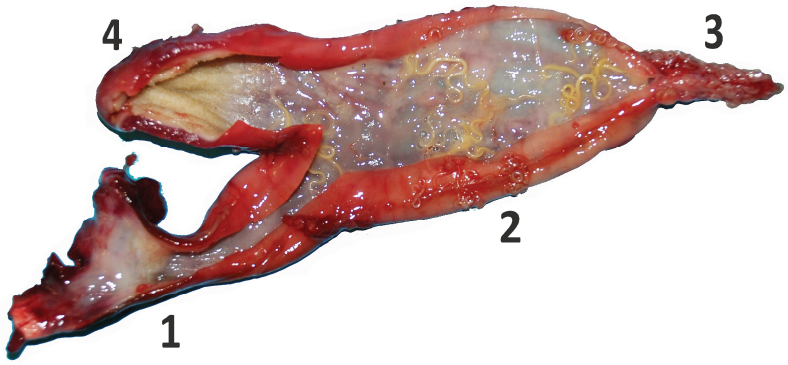


Abbildung 39: Nematoden im Magenlumen eines adulten Maifisches, 2014, GGD-System, Frankreich
Zahlreiche weißlich-beige Nematoden im Magenlumen. 1: Ösophagus, 2: Blindsack, 3: Terminales Ende des Blindsacks und Beginn des *Ductus pneumaticus*, 4: Kaumagen

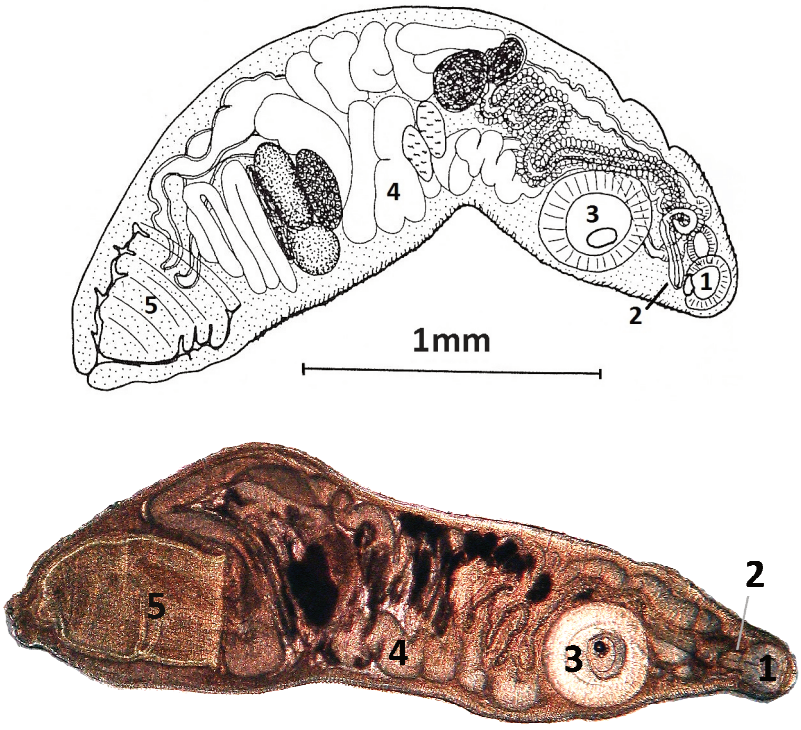


Abbildung 40: Hemiuridae bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich
1: Mundsaugnapf, 2: Pharynx, 3: Bauchsaugnapf, 4: Uterus, 5: Eksoma; oben: modifizierte Schemazeichnung von *Hemiurus appendiculatus* ex *Alosa fallax* in GIBSON und BRAY (1986), unten: Hemiuridae aus einem adulten Maifisch, GGD-System, Lichtmikroskopie

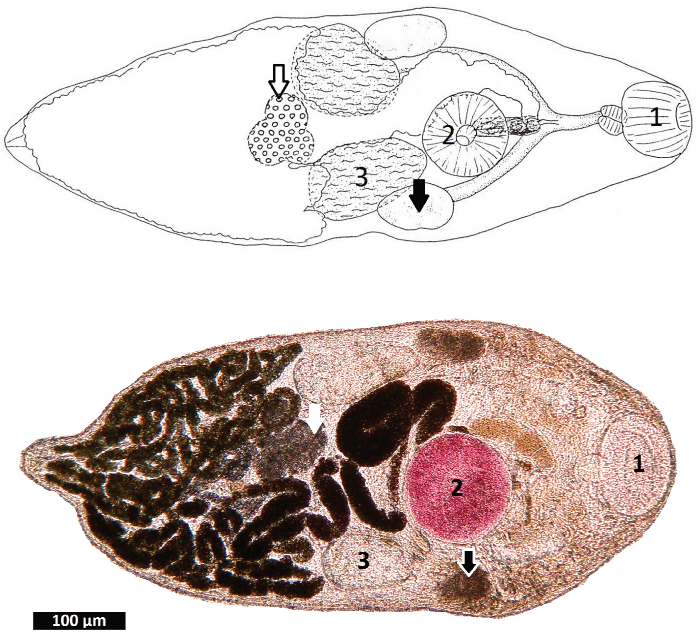


Abbildung 41: *Pronoprymna* sp. bei einem adulten Maifisch, 2013, GGD-System, Frankreich
1: Mundsaugnapf, 2: Bauchsaugnapf, 3: Hoden, kondensierte vitelline Follikel (schwarzer Pfeil), dreigelappte, mediane, posttestikuläre Ovarien (weißer Pfeil); oben: modifizierte Schemazeichnung von *Pronoprymna ventricosa* ex *Alosa alosa* in BRAY (2008), unten: *Pronoprymna* sp. aus einem adulten Maifisch, GGD-System, Lichtmikroskopie

Die taxonomisch nicht näher bestimmbaren Parasitenentwicklungsstadien wurden ausschließlich bei adulten Maifischen aus dem GGD-System und dem Rhein im Magen, Darm und den Pylorusanhängen nachgewiesen. Bei diesen wurden zwei verschiedene Entwicklungsstadien identifiziert (Abbildung 42). Das eine Parasitenstadium war rundlich mit einem Durchmesser von 50-70 µm und wies gräuliche, längsovale Strukturen im Inneren auf. Die dünne äußere Membran zeigte unter dem Lichtmikroskop kontraktile Bewegungen. Bei dem zweiten Parasitenstadium handelte es sich um einen langgestreckten, sehr kontraktilen Organismus wiederum mit gräulichen, längsovalen Gebilden im Inneren. Dieser erreichte eine Länge von 0,8 cm und eine Breite von 0,6 cm. Anhand der durchgeführten Untersuchungen war eine abschließende Bestimmung nicht möglich.

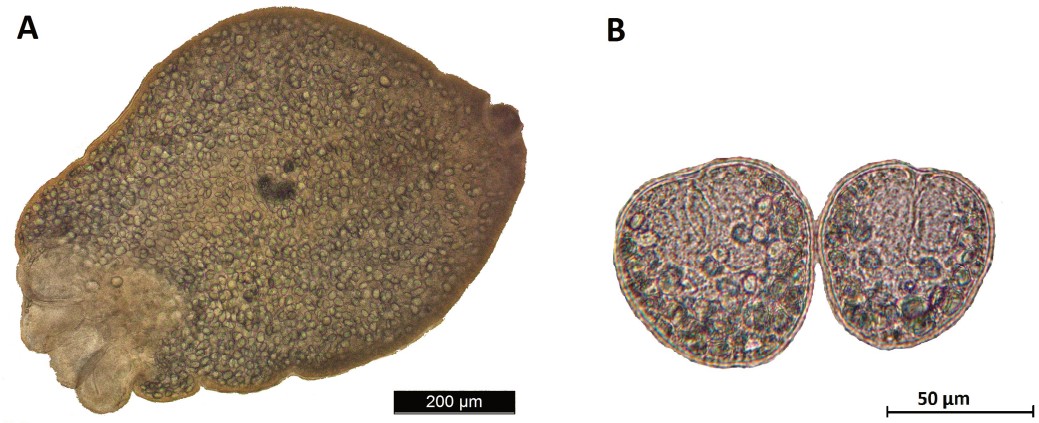


Abbildung 42: Zwei Parasitenstadien aus dem Darm eines adulten Maifisches, 2013, GGD-System, Frankreich
A: 600 x 800 µm großes Parasitenstadium B: kugeliges Parasitenstadium mit einem Durchmesser von 50-70 µm; Lichtmikroskopie

4.7.4 Neue *Myxozoa*-Spezies

In der Auswertung nativer Quetschpräparate sowie der histologischen Untersuchung der Niere (Kap. 4.3.8) von Maifischen der Wildpopulation wurde eine Infektion mit einem myxozoischen Parasiten nachgewiesen. Bei adulten Maifischen lag die Prävalenz in Quetschpräparaten im Jahr 2013 bei 86 % (25/29) in der Garonne und bei 92 % (24/26) in der Dordogne sowie im Jahr 2014 bei 83 % (20/24) in der Garonne und bei 0 % (0/8) im Rhein.

Morphologie

Die Parasitenstadien in den Nierentubuli befanden sich in der Sporogonie und bestanden aus Plasmodien und reifen Sporen. Die Plasmodien stellten sich dabei polymorph (rund, sphärisch oder länglich) dar und wiesen häufig Finger-ähnliche Fortsätze mit einer durchschnittlichen Länge von 20 µm auf (Abbildung 44). Weiterhin enthielten die 25-71 x 18-53 µm messenden Plasmodien mindestens zwei reife Sporen ohne sichtbare Bildung von Pansporoblasten. Reife Sporen waren kugelig bis elliptisch, am Hinterende abgerundet und maßen in der Länge 9,7±0,4 µm, in der Breite 8,4±0,5 µm und 7,7±0,3 µm in der Tiefe (n = 25 Sporen). Die Schalen verdickten sich am Hinterende der Sporen mit

gelegentlich auftretenden, drei bis maximal sieben Filamenten von 5-22 µm Länge. Die reifen Sporen enthielten zwei gleichförmige kugelartige Polkapseln, welche 4,0±0,2 µm lang und 3,0±0,3 µm breit waren (n = 25 Sporen). Das Polfilament zeigte fünf Umdrehungen und das Sporoplasma befand sich mit zwei Kernen im hinteren Teil der reifen Spore (Abbildung 43). Aufgrund der morphologischen Charakteristik wurde der Parasit der Gattung *Hoferellus* zugeordnet. In der Literatur ist zum aktuellen Zeitpunkt kein morphologisch entsprechender *Hoferellus* sp. beschrieben. Für diese neue *Hoferellus*-Spezies wurde aufgrund ihres Vorkommens bei Maifischen (*Alosa alosa*) der Name *Hoferellus alosae* sp. nov. vorgeschlagen.

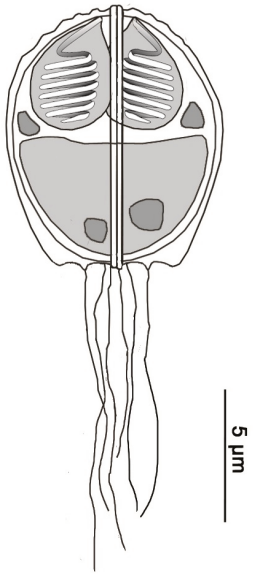


Abbildung 43: Schemazeichnung von *Hoferellus alosae* sp. nov.
Darstellung einer reifen Spore mit den beiden rundlichen Polkapseln, dem halbmondförmigen Sporoplasma sowie den Filamenten am Hinterende (Abbildung Dr. Astrid S. Holzer)

Sequenzierung

Alle erhaltenen Sequenzen von Parasitenstadien von Maifischen aus dem GGD-System gehörten aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung untereinander zu derselben Spezies. Diese Sequenz wurde ebenfalls von adulten Maifischen aus dem Rhein erhalten. Bei keiner der erhaltenen Sequenzen der SSU rDNA waren Äquivalente bei GenBank gelistet. Die Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung stammten von der Art *Ortholinea orientalis* mit einer Sequenzübereinstimmung von 87-88 %. Bei zwei Maifischen aus dem Rhein ergab die Sequenzierung eine zusätzliche SSU rDNA Sequenz von 912 Bp, welche der Gattung *Ortholinea* zugeordnet werden konnte. Diese Sequenz zeigte eine Divergenz von 1,8-2,0 % zu *Ortholinea orientalis*, wobei eine durchgängige Zahl von 15 Nukleotidänderungen auf eine zwar nah verwandte, aber neue Spezies hinwies.

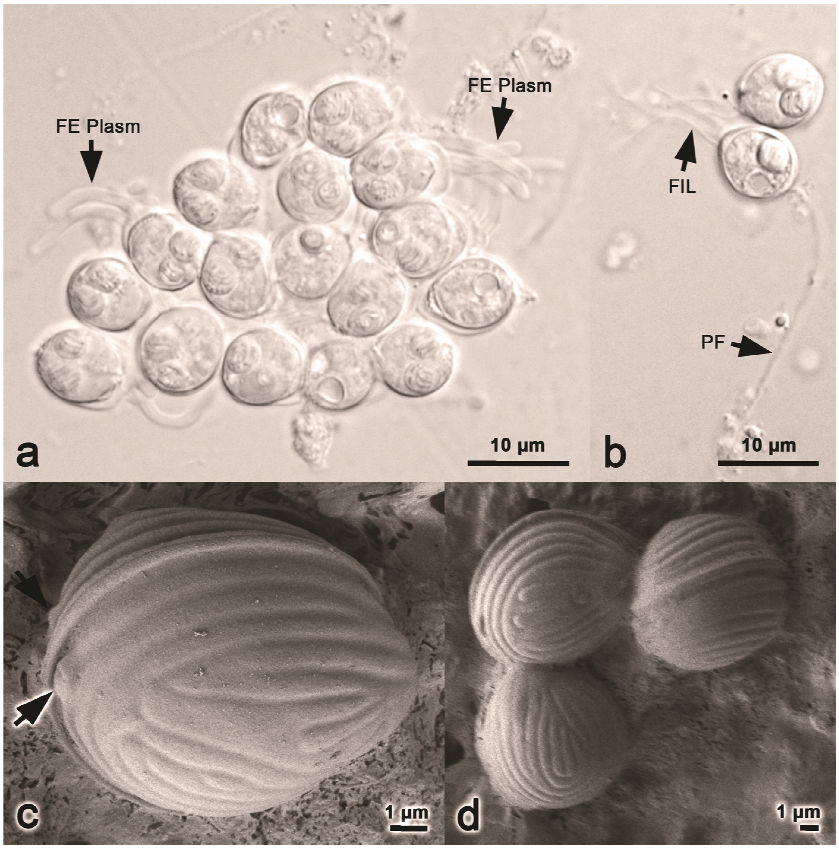


Abbildung 44: Morphologie von *Hoferellus alosae* sp. nov. a: Plasmodium mit Finger-ähnlichen Oberflächenausstülpungen (FE Plasm). b: Reife Sporen mit Filamenten (FIL), eine Polkapsel mit verdrängtem Polfilament (PF). c und d: Sporenoberfläche mit einer sichtbaren Naht zwischen den beiden Schalenhälften und longitudinalen Furchen; apikaler Pol der Spore (Pfeil) (a&b: Lichtmikroskopie, c&d: Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung Dr. Astrid S. Holzer)

Die SSU rDNA-Sequenz der *Hoferellus*-Isolate aus dem Rhein wurde bei der GenBank unter der Accession No. KU301050, aus der Dordogne unter KU301051, aus der Garonne unter KU301052 hinterlegt. Die partielle SSU rDNA Sequenz der Gattung *Ortholinea* sp. von adulten Maifischen aus dem Rhein wurde unter der Accession No. KU301053 eingereicht.

Prävalenz (PCR)

Eine spezifische PCR für *Hoferellus alosae* sp. nov. ergab in der Garonne eine Prävalenz bei adulten Maifischen von 100 % (33/33) (2012-2014) und von 64 %

(14/22) bei juvenilen Maifischen (2013 & 2014). In der Dordogne (2013) waren ebenfalls 100 % (10/10) der adulten Maifische infiziert. Im Gegensatz dazu lag die Prävalenz im Rhein nur bei 22 % (2/9) bei adulten und bei 0 % (0/26) bei juvenilen Maifischen.

4.7.5 Blutausstriche

In keinem der untersuchten Blutausstriche wurden parasitäre Organismen nachgewiesen (Tabelle 13).

4.8 Wasserparameter

4.8.1 Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich

Die Wasserparameter in der Maifischprojektanlage in Bruch wurden im Jahr 2012 17 x, 2013 25 x und 2014 9 x gemessen. Die Wassertemperatur lag im Jahr 2012 zwischen 19,5 °C und 25,5 °C, im Jahr 2013 zwischen 15,0 °C und 23,6 °C und im Jahr 2014 zwischen 18,1 °C und 25,7 °C. Der pH-Wert schwankte im Jahr 2013 zwischen 6,87 und 8,61 und im Jahr 2014 zwischen 7,17 und 8,35. Insgesamt variierte die Sauerstoffkonzentration im Untersuchungszeitraum zwischen 4,2 mgL^{-1} und 7,1 mgL^{-1} (Abbildung 45). Die Sauerstoffsättigung lag im Jahr 2012 durchschnittlich bei 58 %, im Jahr 2013 bei 60 % und im Jahr 2014 bei 72 %. Im gesamten Untersuchungszeitraum lagen die Parameter der Nitrifikation im Referenzbereich (NH_4^+: < 0,05 mgL^{-1}, NO_2^-: < 0,1 mgL^{-1}, NO_3^-: 1 mgL^{-1}). Das Wasser wies eine Gesamthärte von 5-6 °dH und eine Karbonathärte von 4-6 °dH auf.

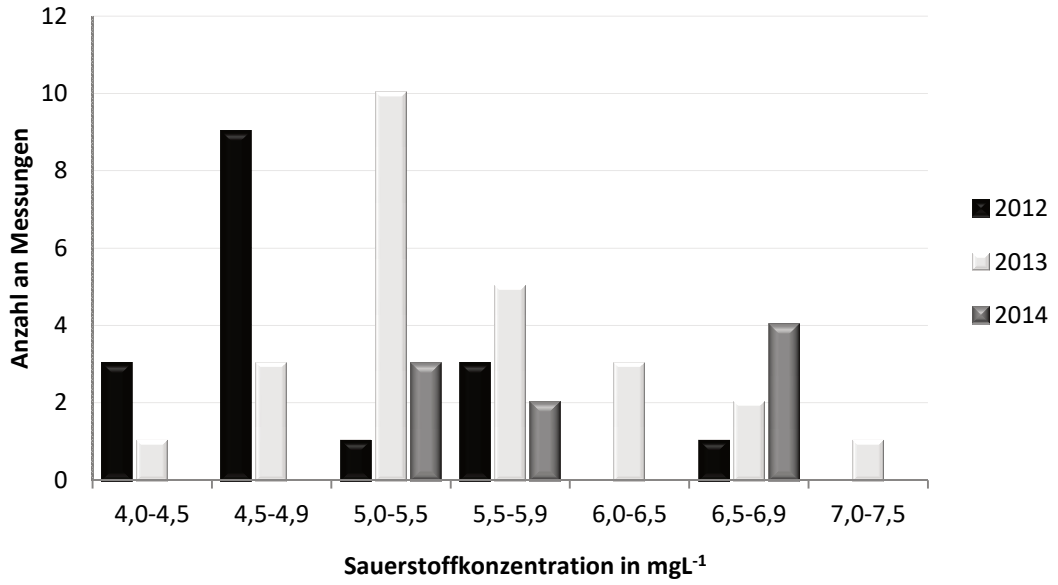


Abbildung 45: Sauerstoffkonzentrationen in der Maifischprojektanlage 2012-2014, Bruch, Frankreich

4.8.2 Maifischzuchtanlage in Aßlar, Deutschland

Die Wasserparameter der Maifischzuchtanlage in Aßlar wurden 12 x (n = 6 [2012], n = 3 [2013], n = 3 [2014]) gemessen. Die Temperatur variierte im Jahresverlauf zwischen 14,8 °C und 24,3 °C, der pH-Wert zwischen 6,7 und 8,6. Die Sauerstoffkonzentration betrug 5,7 mgL^{-1} bis 9,0 mgL^{-1}. In Bezug auf die Wasserparameter der Nitrifikation lag die Ammoniumkonzentration zwischen < 0,05 mgL^{-1} und 0,4 mgL^{-1}, der Nitrit-Wert zwischen 0,03 mgL^{-1} und oberhalb des messbaren Bereiches von 2 mgL^{-1} und der Nitratwert zwischen 5 mgL^{-1} und 50 mgL^{-1}. Bei den meisten Messungen lag der Nitritwert zwischen 0,1 mgL^{-1} und 0,3 mgL^{-1} und die Ammoniumkonzentration < 0,05 mgL^{-1}.

Nach mehrstündigen Stromausfällen am 23.01.2013 und 04.12.2013 wurden im großen Kreislauf Nitritwerte von 0,8 mgL^{-1} bzw. >2 mgL^{-1} sowie eine Ammoniumkonzentration von 0,4 mgL^{-1} gemessen.

5 DISKUSSION

5.1 Geschlecht, Länge und Körpermasse untersuchter Maifische

Juvenile Maifische, Wildpopulation, Frankreich und Deutschland

Bei den 105 juvenilen Maifischen aus dem GGD-System aus den Jahren 2011-2014 wurde die mittlere Körpermasse und die mittlere SL für den Monat, in dem die Fische gefangen wurden, berechnet. Die mittlere Körpermasse betrug minimal 4,5 g im Mai und maximal 6,2 g im Juli. Die mittlere SL variierte zwischen minimal 7,2 cm im August und maximal 9,6 cm im Juli. Anhand der von QUIGNARD und DOUCHEMENT (1991) beschriebenen Daten zu juvenilen Maifischen in der Garonne können die gefangenen Maifische der Generation 0+ oder 1+ zugeordnet werden, wobei jedoch anhand der vorliegenden Daten eine eindeutige Bestimmung nicht abschließend möglich ist.

Die SL juveniler Maifische aus dem Rhein im Jahr 2010 bezogen auf den Monat Oktober war 0,6 cm größer als die von QUIGNARD und DOUCHEMENT (1991) für juvenile Maifische der 0+ Generation im Rhein beschriebene GL Daten zur 1+ Generation im Rhein waren nicht verfügbar. Die deutlich schwereren Juvenilen aus dem Rhein wurden im Jahr 2010 in Kalkar Grieth gefangen. Dieser Ort liegt deutlich küstennäher als das Atomkraftwerk Philippsburg, der Fangort der meisten anderen juvenilen Maifische. Daher könnte es sich bei diesem Exemplaren um Maifische der 1+ Generation handeln.

Adulte Maifische, Wildpopulation, Frankreich und Deutschland

Bei den Rückkehrern aus dem GGD-System entsprachen die Weibchen mit ihrer mittleren Körpermasse sowie ihrer mittleren GL ebenso wie die Männchen dem in der Literatur für laichreife Maifische in der Garonne beschrieben Größenbereich (QUIGNARD und DOUCHEMENT 1991). Der Größen- und Körpermasseunterschied zwischen weiblichen und männlichen Maifischen wurde bereits von QUINARD und DOUCHEMENT (1991) dokumentiert. Die Größe der Weibchen im Vergleich zu

den kleineren Männchen ist dabei nicht nur durch das höhere Alter der Weibchen vor Beginn der Laichwanderung, sondern auch durch ein insgesamt schnelleres Wachstum der weiblichen Maifische bedingt. Anhand vorhandender Literaturdaten waren die Weibchen entsprechend ihrer Größe vermutlich zwischen 5-6 Jahren und die Männchen zwischen 4-5 Jahren alt.

In Bezug auf die adulten Maifische aus dem Rhein wurde ebenfalls der von QUINARD und DOUCHEMENT (1991) beschriebene Größenunterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt. Im Vergleich der beiden Maifischpopulationen waren beide Geschlechter der Rückkehrer im Rhein jeweils deutlich leichter und kleiner als die Rückkehrer im GGD-System. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sie mit einem Alter von vier Jahren (siehe Altersbestimmung dieser Maifische von (HUNDT et al. 2015) jünger und dementsprechend kleiner waren als die Maifische aus dem GGD-System (Schätzung anhand von Daten aus der Literatur). Möglicherweise ist dieser Unterschied jedoch zufällig bedingt, da die Anzahl der beprobten Tiere aus dem Rhein sehr gering war. Somit sind diese Unterschiede vorsichtig zu interpretieren.

Zuchtpopulation, Aßlar, Deutschland

In diesem Forschungsvorhaben wurden erstmals Körpermasse- und Längendaten von in Aquakultur aufgezogenen Maifischen erhoben. Das Größenwachstum von Fischen ist von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Fütterung und der Temperatur und somit vom Management in der Aquakulturanlage abhängig (PICKERING 1993), weshalb bei diesen Daten keine Interpretation möglich ist.

5.2 Prävalenzen, Pathogenität und mögliche Infektionsquellen nachgewiesener Infektionserreger

Bakterielle Infektionserreger

Insgesamt wurden 19 verschiedene Bakterientaxa bei Maifischen isoliert. Eine Beeinflussung der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung durch schwankende Bebrütungstemperaturen der Agarplatten und somit des Bakterienwachstums kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden die analysierten Isolate exemplarisch für sich morphologisch entsprechende Bakterienkulturen unterschiedlicher Organe und Fische einer Herkunft ausgewählt. Morphologisch ähnliche Bakterienkulturen könnten daher nicht als unterschiedliche Bakterienspezies erkannt worden sein. Diese Einschränkungen bei der bakteriologischen Untersuchung waren durch das Ziel der Studie als Übersichtsarbeit sowie die örtlichen Gegebenheiten bedingt. Im Rahmen weiterführender Studien zu bakteriellen Infektionserregern bei Maifischen könnte die verwendete Methodik noch angepasst werden.

In Bezug auf *L. lactis,* Bakterien der *M. chelonae/abscessus*-Gruppe sowie motile Aeromonaden ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Relevanz für das Wiederansiedlungsprojekt, weshalb diese nachfolgend erläutert werden.

L. lactis als Ursache der Endokarditiden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Im Jahr 2012 wurde histologisch bei 16 % (5/31) und im Jahr 2014 bei 25 % (6/24) der adulten Maifische aus dem GGD-System eine *Endocarditis valvularis* und/oder *parietalis thromboticans* festgestellt. Aufgrund der zum Teil schwerwiegenden histopathologischen Befunde handelt es sich bei den Endokarditiden vermutlich um eine Todesursache. Zusätzlich wurde bei 13/31 (42 %) der im Jahr 2012 und 2014 verstorbenen, histologisch untersuchten Maifische eine Septikämie durch kokkoide Bakterien nachgewiesen. Im Jahr 2012 lag außerdem bei 19 % (6/31), 2013 bei 20 % (11/55) und 2014 bei 29 % (7/42) der adulten Maifische aus dem GGD-System eine zumeist akute, in wenigen Fällen subakut bis chronische, herdförmige, eitrige Meningitis mit Infiltration durch Phagozyten (vermutlich

Makrophagen) vor. Bei einem Maifisch mit Endokarditis aus dem Jahr 2012 wurden im Kontext einer Meningitis Phagozyten mit phagozytierten kokkoiden Bakterien nachgewiesen. Dementsprechend könnte ein Teil der festgestellten Meningitiden ebenfalls durch die Septikämie durch das kokkoide Bakterium bedingt gewesen sein. Jedoch traten die Meningiten auch im Jahr 2013 sowie bei 22 % (2/9) der Zuchtpopulation in Aßlar im Jahr 2013 ohne Nachweis von kokkoiden Bakterien auf, weshalb dieses kokkoide Bakterium nicht die alleinige Ursache aller Meningitiden darstellen kann.

Das einzige in der bakteriologischen Untersuchung nachgewiesene kokkoide Bakterium war *L. lactis* mit einer hohen Prävalenz von 55 % (22/40) im Jahr 2012 bzw. 33 % (8/24) im Jahr 2014. Obwohl *L. lactis* sowohl aus frischen als auch aus gefrorenen (2014) Maifischen isoliert wurde, kann ein negativer Einfluss des Tieffrierens auf die kulturelle Nachweisbarkeit und somit auf die Prävalenz von *L. lactis* nicht ganz ausgeschlossen werden.

Bei der Spezies *L. lactis* können vier verschiedene Subspezies unterschieden werden, nämlich *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* subsp. *cremoris* und *L. lactis* subsp. *tructae* (PÉREZ et al. 2011, PU et al. 2002). Eine Identifikation der Subspezies der *L. lactis*-Isolate war anhand der durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht möglich, da beispielsweise keine Subspezies-spezifische PCR (GOYACHE et al. 2001) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse des API ID 32 Strep und der MALDI-TOF MS wiesen jedoch auf die Subspezies *L. lactis* subsp. *lactis* hin. Der Vergleich von Maifischen mit Endokarditiden sowie Septikämien durch kokkoide Bakterien und bakteriellem Nachweis von *L. lactis* zeigte eine eindeutige Übereinstimmung. Beispielsweise wurde bei histologischem Nachweis einer Endokarditis *L. lactis* immer aus dem entsprechenden Herzen angezüchtet. Außerdem wurden im Jahr 2013 histologisch keine pathologischen Veränderungen durch kokkoide Bakterien nachgewiesen und *L. lactis* ebenfalls nicht angezüchtet. Deshalb ist *L. lactis* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache der Endokarditiden und Septikämien.

Bei Laktokokken handelt es sich um fakultativ anaerobe, Katalase-negative, Gram-positive Milchsäurebakterien (SCHLEIFER et al. 1985). *L. lactis* subsp. *lactis*

wurde aus dem Darm verschiedener gesunder Fische isoliert (BULLER 2014, HAN et al. 2010, ITOI et al. 2008, ITOI et al. 2009). Laktokokken können jedoch auch schwere systemische Erkrankungen verursachen. Die Laktokokkose ist dabei charakterisiert durch eine perakute und hämorrhagische Septikämie und eine der bedeutendsten bakteriellen Erkrankungen in der Aquakultur von Meerwasserfischspezies (TORANZO et al. 2005, VENDRELL et al. 2006). *L. lactis* subsp. *lactis* wurde als Ursache von Krankheitsausbrüchen bei Wassergeflügel (GOYACHE et al. 2001), bei der Rosenberggarnele (*Macrobrachium rosenbergii*) (WANG et al. 2008) und bei einem Massensterben von Hybridstören (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*) (CHEN et al. 2012) nachgewiesen. In keinem dieser Fälle wurde jedoch eine *Endocarditis valvularis* oder *parietalis thromboticans* beschrieben. Daher handelt es sich hierbei um die Erstbeschreibung einer Endokarditis durch *L. lactis* beim Fisch. Der Beweis einer Ursachen-Wirkungsbeziehung zwischen einem neu entdeckten Krankheitserreger und einer Infektionskrankheit wird im Allgemeinen über die experimentelle Erfüllung der Henle-Koch-Postulate geführt. Im Fall der vom Aussterben bedrohten Maifische war dies nicht möglich, da keine Maifische für einen derartigen Tierversuch zur Verfügung standen. Darüber hinaus wurde *L. lactis* bereits als Erreger von septikämischen Infektionskrankheiten bei aquatischen Organismen (CHEN et al. 2012, WANG et al. 2008) sowie von Endokarditiden beim Menschen (ROSTAGNO et al. 2013, WOOD et al. 1955) beschrieben. Aus diesem Grund wurde *L. lactis* nicht als Infektionserreger neu beschrieben sondern dem Kenntnisstand über Infektionen mit *L. lactis* eine empfängliche Fischart und ein Symptom hinzugefügt.

Als mögliche Infektionsquelle kommen verschiedene Erregerreservoire in Betracht. Der nachgewiesene *L. lactis* könnte, wie bei anderen marinen Fischspezies auch (ITOI et al. 2008), zu den normalen Darmmikrobiota von Maifischen zählen. Die verwandte Spezies *L. garvieae* wurde im Darm von Fischen nachgewiesen und führte bei Immunsuppression der Fische durch Stressoren zu einer septikämischen Erkrankung mit Infektion des Gastrointestinaltrakts und der Niere (KUSUDA und KIMURA 1978, KUSUDA und SALATI 2011). Gegen diese Hypothese und für eine Infektion in der Maifischprojektanlage in Bruch spricht jedoch der erstmalige Nachweis bei verstorbenen Maifischen mindestens 15 Tage nach dem

Transport nach Bruch sowie der fehlende Nachweis im Jahr 2013 und bei anderen Maifischpopulationen. Da die Hälterungsbecken in der Maifischprojektanlage in Bruch in einem Durchflusssystem mit Wasser aus dem Canal Latéral à la Garonne versorgt wurden, könnte *L. lactis* von anderen Fischspezies, Wassergeflügel oder Abwässern eingetragen worden sein. Da *L. lactis* direkt im Süßwasser übertragen werden kann, beeinflusst die Hälterung der Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch die Prävalenz von *L. lactis* ebenfalls. Deshalb ist die nachgewiesene Prävalenz nicht auf die Wildpopulation im GGD-System übertragbar.

Mykobakterien als eine Ursache der granulomatösen Entzündungen in den inneren Organen adulter Maifische aus dem GGD-System, Frankreich

Bei 82% (90/110) der Rückkehrer aus dem GGD-System wurden histologisch Granulome in den inneren Organen festgestellt. Von 36 durchgeführten Ziehl-Neelsen Färbungen wurden bei 25 % säurefeste Stäbchen nachgewiesen, woraus sich der Verdacht auf das Vorliegen einer Mykobakteriose ergab. Die histologisch festgestellte Prävalenz säurefester Stäbchen lag im Jahr 2012 bei 6 % (2/31), 2013 bei 4 % (2/55) und 2014 bei 21 % (5/24). Unter Einbeziehung der Anzucht auf Schafsblut-Agar, bei welcher Mykobakterien bei einem weiteren Maifischen nachgewiesen wurde, lag die Prävalenz von Mykobakterien im Jahr 2012 bei 6 % (2/31), 2013 bei 4 % (2/55) bzw. 2014 bei 25 % (6/24). Das ubiquitäre Vorkommen von Mykobakterien kann jedoch bei ausschließlich molekularbiologischem oder bakteriologischem Nachweis mittels Anzucht falsch positive Ergebnisse verursachen (GAUTHIER und RHODES 2009). Die im Vergleich zum Nachweis säurefester Stäbchen (8%) deutlich höhere Prävalenz von Granulomen in den inneren Organen (82 %), welche für die zumeist vorkommende chronische Mykobakteriose charakteristisch sind (DECOSTERE et al. 2004), könnte auf eine tatsächlich höhere Prävalenz von Mykobakterien hinweisen. Die Histologie (ZN-Färbung) verfügt beim Nachweis latenter oder beginnender Infektionen durch säurefeste Stäbchen lediglich über eine eingeschränkte Sensitivität (FUKUNAGA et al. 2002, GAUTHIER et al. 2003). Die säurefesten Stäbchen wurden allerdings vor allem in nicht abgekapseltem, granulomatösem Entzündungsgewebe nachgewiesen und lediglich vereinzelt in zentralnekrotisierenden oder nicht zentralnekro-

tisierenden epitheloidzelligen Granulomen. Diese pathologischen Befunde sowie die pathologischen Veränderungen bezüglich der Nematoden (Kap. 4.3.8) weisen auf eine zusätzliche parasitäre Ätiologie für die Granulome neben den Mykobakterien hin. Da darüber hinaus der histologische Nachweis säurefester Stäbchen im Kontext pathologischer Veränderungen eine Infektion sicher beweist, werden im Folgenden die sich aus der histologischen Untersuchung ergebenden Prävalenzen verwendet. Die lediglich geringgradige Granulombildung durch Mykobakterien bei den Maifischen könnte auf eine jüngere, hoch akute Infektion hinweisen, die typischerweise bei hoher Bakteriendichte auftritt (KENT et al. 2004). Der Nachweis der Mykobakteriose erfolgte sowohl bei euthanasierten (n = 5) als auch bei verstorbenen (n = 4) Maifischen, bei denen jeweils keine vermehrte Häufung anderer Infektionserreger nachgewiesen wurde.

In den nachfolgend durchgeführten bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurde im Jahr 2012 *M. salmoniphilum* als Erreger identifiziert. *M. salmoniphilum* wurde unter anderem kürzlich als Ursache eines reduzierten Konditionsfaktors und pathologischer Veränderungen bei der Quappe (*Lota lota*) in Norwegen beschrieben (ZERIHUN et al. 2011). Eine molekularbiologische Identifikation der Mykobakterienspezies bei histologisch positiven Maifischen aus dem Jahr 2013 war aufgrund der nicht erfolgreichen Anzucht aus Organproben nicht möglich. Die Anzucht von Mykobakterien, insbesondere aus gefrorenem Organmaterial, ist generell als schwierig einzustufen (FRERICHS 1993). Die von einem Isolat aus dem Jahr 2014 erhaltene Sequenz zeigte die größte Übereinstimmung mit *M. franklinii* und *M. chelonae,* die beide zur *M. chelonae/abscessus*-Gruppe gehören. Zur *M. chelonae/abscessus*-Gruppe gehören desweiteren die Spezies *M. abscessus*, *M. immunogenum* und *M. salmoniphilum* (LEAO et al. 2011, NOGUEIRA et al. 2015). Insbesondere *M. chelonae* wurde als ursächlich für Mykobakteriosen insbesondere bei Salmoniden beschrieben (ASHBURNER 1977, BRUNO et al. 1998, DAOUST et al. 1989, DECOSTERE et al. 2004). Bei *M. franklinii* handelt es sich um eine erst kürzlich beschriebene Mykobakterienspezies, welche bislang nicht bei Fischen nachgewiesen wurde (NOGUEIRA et al. 2015).

Mykobakterien wurden bereits bei Wildfischen der Familie Clupeidae (KANE et al. 2007, STINE et al. 2010) sowie in einem Wiederansiedlungsprojekt für

verschiedene Salmoniden in Kalifornien und Alaska, USA beschrieben. Im Rahmen des Wiederansiedlungsprojekts infizierten sich die Nachzuchten durch kontaminiertes Futter mit Mykobakterien, wodurch bei Rückkehrern Prävalenzen von 58,9-100 % auftraten (FRYER und SANDERS 1981, ROSS et al. 1959, WOOD und ORDAL 1958). In der Chesapeake und der Coos Bay, USA persistieren seit dem Jahr 1984 (JACOBS et al. 2009) bis zu acht verschiedene Mykobakterienspezies in Felsenbarschpopulationen mit histologisch nachgewiesenen Prävalenzen von 25-68 % (OVERTON et al. 2003, SAKANARI et al. 1983). Betroffene Fische zeigten neben Granulomen insbesondere Hautläsionen sowie eine krankheitsbedingte Mortalität, welche zu deutlichen Bestandsrückgängen führte (GAUTHIER et al. 2008). Als begünstigende Faktoren für die Mykobakteriosen in der Chesapeake Bay wurden dabei eine Umweltbelastung durch Schwermetalle und organische Kontaminationen, Algenblüten sowie niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Wasser angesehen (HALL et al. 2002, KANE et al. 2007). Den Mykobakterien kommt somit zum einen, wie vielfach in der Literatur belegt, eine wichtige Indikatorrolle für ungünstige Umwelteinflüsse zu (BERG et al. 2013, KANE et al. 2007). Zum anderen verursachen sie chronische Erkrankungen, die sich wiederum negativ auf die Fischpopulation auswirken (DECOSTERE et al. 2004, GAUTHIER et al. 2008, RHODES et al. 2001).

Bei den Maifischen aus dem GGD-System könnte die Infektion mit den Mykobakterien sowohl im Meer, im Fluss, als auch in der Maifischprojektanlage in Bruch erfolgt sein. Der mögliche Einfluss von Umweltbedingungen im GGD-System auf die Mykobakteriose wird nachfolgend im Kap. 5.3 erläutert. Das hochgradige Vorkommen säurefester Stäbchen im Bindegewebe zwischen den Pylorusanhängen könnte auf eine orale Aufnahme der Mykobakterien durch den Maifisch und ihre nachfolgende Verschleppung aus dem Gastrointestinaltrakt bei der Auswanderung kontaminierter Nematodenlarven hinweisen. Die Nachweise von Mykobakterien im Kiemengewebe und der Dermis könnten ebenfalls auf mögliche Eintrittspforten für den Erreger hindeuten. Die adulten Maifische wurden in der Maifischprojektanlage in Bruch zu Reproduktionszwecken bis zu 42 Tage in zwei 10 m^3 Rundbecken gehalten, wodurch potentiell die Möglichkeit einer Ansteckung gegeben ist. Zurzeit sind jedoch in der publizierten Literatur

keine Studien verfügbar, welche die Zeitspanne zwischen natürlicher Infektion und Auftreten histologisch darstellbarer Veränderungen beim Wirtsfisch beschreiben. Der erste histologische Nachweis von säurefesten Stäbchen erfolgte im gesamten Untersuchungszeitraum jeweils zwischen Tag 16 und Tag 42 nach Überführung in die Maifischprojektanlage in Bruch. Eine gegenseitige Ansteckung durch infizierte Maifische in einem Rundbecken kann somit nicht ganz ausgeschlossen werden, weshalb die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Prävalenz der Mykobakteriose nicht ohne Einschränkungen auf die Wildpopulation im GGD-System übertragen werden kann. Ein Vorkommen von Mykobakterien bei der Wildpopulation im GGD-System wurde allerdings durch die bakterielle Anzucht von Mykobakterien aus den inneren Organen eines auf dem Transport in die Maifischprojektanlage verstorbenen Tieres bestätigt. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass sich die Maifische generell erst in der Maifischprojektanlage in Bruch selber infizieren.

Motile Aeromonaden als Ursache von Septikämien bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Histopathologische Veränderungen durch mittellange Stäbchenbakterien ohne granulomatöse Reaktion wurden vereinzelt in Verbindung mit Pilzhyphen und/oder kokkoiden Bakterien sowie in Verbindung mit fokalen bzw. multifokalen pathologischen Veränderungen in verschiedenen Organen nachgewiesen. Jedoch ist die histologische Untersuchung in Bezug auf den Nachweis von Septikämien nicht so sensitiv wie die kulturelle Anzucht, weshalb akute Septikämien histologisch nicht in jedem Fall dargestellt werden können.

In der bakteriologischen Untersuchung wurden motile Aeromonaden bei Rückkehrern aus dem GGD-System mit hohen Prävalenzen von 68 % (27/40, 2012), 56 % (31/55, 2013) sowie 54 % (13/24, 2014) in den inneren Organen nachgewiesen. Rezente Untersuchungen mittels DNA-Hybridisierungen bei mesophilen *Aeromonas* spp. weisen auf eine eingeschränkte Validität der taxonomischen Bestimmung dieser Aeromonaden auf Speziesebene hin (JANDA und ABBOTT 2010). Daher wird nachfolgend nicht auf die verschiedenen, nachgewiesenen

Aeromonas spp. eingegangen, sondern generell das Vorkommen der motilen Aeromonaden diskutiert.

Da die Nachweise von motilen Aeromonaden häufig bei verstorbenen Maifischen mit beginnender Autolyse erfolgten, kann das nachgewiesene bakterielle Wachstum teilweise durch eine postmortale Kontamination bedingt sein. Die 21 % (18/84) der verstorbenen Rückkehrer aus dem GGD-System, bei denen keine Bakterien aus den inneren Organen isoliert wurden, zeigen jedoch, dass eine postmortale Kontamination nicht bei allen verstorbenen Fischen vorkam. Weiterhin wurden motile Aeromonaden im Jahr 2012 bei 7 % (1/14), im Jahr 2013 bei 23 % (3/13) sowie im Jahr 2014 bei 30 % (3/10) der euthanasierten Rückkehrer aus dem GGD-System isoliert. Der Nachweis von Bakterien aus den inneren Organen euthanasierter Fische ist jedoch nicht generell mit einer bakteriellen Erkrankung gleichzusetzen (BISSET 1947, BULLOCKA und SNIESZKOA 1969, SNIESZKO 1974). Beispielsweise wurden *Ae. bestiarum, Ae. sobria* und *Ae. veronii* Biotyp s*obria* aus der Niere gesunder Karpfen (*Cyprinus carpio*) isoliert (KOZIŃSKA 2007). Da Aeromonaden darüber hinaus direkt im Süßwasser übertragen werden können, beeinflusst die Hälterung der Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch deren Prävalenz, welche daher nicht uneingeschränkt auf die Wildpopulation im GGD-System übertragbar ist.

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigten insbesondere verstorbene Rückkehrer im GGD-System Anzeichen einer Aeromonadose, wie Haut- und Flossenrötungen bei 90 % (76/84) sowie Hautulzerationen bei 8 % (7/84) der Fische. Das Auftreten dieser Erkrankung bei verwandten Fischarten während der Laichwanderung ist in der Literatur gut belegt (HALEY et al. 1967, ROCK und NELSON 1965, ROTHMANN 1968, TORANZO et al. 1989). Dennoch sind Haut- und Flossenrötungen unspezifische Symptome und können beispielsweise auch durch andere Infektionserreger (z. B. Viren, Parasiten) oder abiotische Faktoren (z. B. Stress, reizende Substanzen im Wasser) bedingt sein (NOGA 2010). Inwiefern motile Aeromonaden eine Infektion bei Fischen verursachen, hängt entscheidend von zwei Faktoren ab: dem Gesundheitszustand des Fisches und der Virulenz des Aeromonaden-Stammes (BEAZ-HIDALGO und FIGUERAS 2013, THUNE et al. 1993). Aufgrund der durch die Laichwanderung stressbedingten Immun-

suppression sowie ggf. durch den Transport und die Hälterung wäre der reduzierte Gesundheitszustand als Faktor für eine Infektion bei den adulten Rückkehrern gegeben, sodass bereits schwach virulente Aeromonaden bei moribunden Maifischen eine Septikämie verursachen könnten. Weiterhin wurden motile Aeromonaden als Ursache für Meningitiden beim Menschen in der Literatur beschrieben (CIPRIANO et al. 1984, JANDA und ABBOTT 2010). Die Einwanderung von eosinophil granulierten Zellen (EGZs) in Gewebe stellt bei Fischen eine Abwehrreaktion auf bakterielle Infektionen dar (REITE und EVENSEN 2006). Daher könnten die Aeromonaden ebenfalls mit ursächlich sein für die bei adulten Maifischen aufgetretenen Meningitiden und/oder die gemischtzelligen Enzephalitiden bei 3 % (1/31, 2012) bzw. 4 % (2/55, 2013) der adulten Maifische. Es wurden jedoch in keinem Fall histologische Belege für diese Hypothese festgestellt.

Zusammenfassend wird anhand der Ergebnisse der anatomisch-pathologischen Untersuchung und dem kulturellen Nachweis motiler Aeromonaden vom Vorliegen einer Aeromonadose bei adulten Maifischen aus dem GGD-System ausgegangen. Hierbei handelt es sich um die Erstbeschreibung einer Aeromonadose bei Maifischen. Aufgrund des in der Literatur beschriebenen Nachweises motiler Aeromonaden bei gesunden Tieren sowie einer möglichen postmortalen Infektion bei verstorbenen Tieren mit einsetztender Autolyse sind keine abschließenden Aussagen zur Prävalenz der Aeromonadose möglich. Die Koinfektionen mit *S. parasitica* und den zahlreichen Ektoparasiten können Epithelläsionen verursachen, die Eintrittspforten für die Aeromonaden darstellen und dadurch das Auftreten der Infektionen begünstigen.

Nachweis von Epitheliocystis ohne populationsrelevante pathologische Kiemenveränderungen bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Insgesamt wurden in der histologischen Untersuchung im Jahr 2012 bei 13 % (4/31), 2013 bei 22 % (12/55) und 2014 bei 42 % (10/24) der Maifische aus dem GGD-System Epitheliocystis in den Kiemen nachgewiesen. Die Intensität der Infektion war gering, weshalb aufgrund des geringen histologisch untersuchten Anteils des gesamten Organes die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse besteht. Zudem waren insgesamt 36 % (42/110) der Kiemen hochgradig auto-

lytisch und nur eingeschränkt beurteilbar, wodurch ebenfalls falsch negative Ergebnisse möglich sind. Hierbei handelt es sich jedoch grundsätzlich um die Erstbeschreibung von Epitheliocystis sowohl beim Maifisch als auch bei Clupeiden allgemein.

Epitheliocystis wird bei Süß- und Salzwasserfischen durch eine Infektion der Kiemen mit Gram negativen, intrazellulären Bakterien der Ordnung Chlamydiales verursacht (NOWAK und LAPATRA 2006). Die durchschnittliche nachgewiesene Prävalenz von 24 % (26/110) ist vergleichbar mit der von verschiedenen Wildfischpopulationen gemittelten maximalen Prävalenz von Epitheliocystis von 28 % (NOWAK und LAPATRA 2006). Inwiefern die Epitheliocystis-Infektion der Maifische im Süß- oder im Salzwasser erfolgte, ist anhand der bisherigen Ergebnisse nicht abschließend beurteilbar. Ein Einfluss der Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch auf die nachgewiesene Prävalenz kann daher nicht ausgeschlossen werden. Daher ist die beobachtete Prävalenz nicht ohne Einschränkungen auf die Wildpopulation im GGD-System übertragbar. Der Nachweis von Epitheliocystis bei einem auf dem Transport in die Maifischprojektanlage in Bruch verstorbenen Maifisch beweist jedoch, dass die Infektion nicht erst in der Maifischzuchtanlage, sondern bereits im GGD-System erfolgt ist. Die histologischen Befunde einer geringgradigen Infektion zumeist ohne nachweisbare Reaktion des Wirts entsprechen dabei dem bei anderen Wildfischpopulationen beschriebenen klinischen Bild der Epitheliocystis (NOWAK und LAPATRA 2006). Geringgradige Infektionen bei Wildfischen können jedoch bei derselben Spezies in Aquakultur zu schweren Erkrankungen mit Mortalität führen (PAPERNA 1977). Insbesondere bei juvenilen Fischen in Aquakultur sind Verluste von bis zu 100 % beschrieben. Aufgrund hoher taxonomischer Diversität (STRIDE et al. 2013) sowie der hohen Wirtsspezifität von Epitheliocystis, welche sich scheinbar bis auf die Speziesebene erstreckt (PAPERNA 1977, STRIDE et al. 2014), könnte es sich bei den Erregern der Epitheliocystis bei Maifischen um eine neue Spezies handeln. Daher wären weiterführende, insbesondere molekularbiologische Untersuchungen zur taxonomischen Einordnung der nachgewiesenen Erreger zukünftig sinnvoll.

Pilze als Infektionserreger

Der einzige nachgewiesene parasitäre Pilz *S. parasitica* wurde aufgrund seines infiltrativen Wachstums und der zum Teil hochgradigen pathologischen Veränderungen als relevant eingeordnet.

S. parasitica als Ursache der Saprolegniasis bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Die in der histologischen und mykologischen Untersuchung in Haut, Flossen Kiemen und Augen nachgewiesenen Pilzhyphen wurden exemplarisch molekularbiologisch als *S. parasitica* identifiziert. *S. parasitica* wurde im Jahr 2012 bei 40 % (17/42), 2013 bei 76 % (42/55) und 2014 bei 21 % (5/24) der Rückkehrer aus dem GGD-System nachgewiesen. Die Prävalenz schwankte zwischen den Jahren erheblich. Die sehr hohe Prävalenz im Jahr 2013 könnte im Zusammenhang mit dem im selben Jahr sehr kalten Frühjahr stehen. Dabei können sowohl die niedrigen Temperaturen selbst als auch eine hierdurch bedingte verzögerte Migration zu der hohen Prävalenz beigetragen haben (CHOUDHURY et al. 2014). Im Jahr 2014 wurde die Saprolegniasis hingegen mit Pyceze® (Wirkstoff: Bronopol) nach Herstellerangaben behandelt (David Clavé, pers. Komm.). Mit hoher Wahrscheinlichkeit lag deshalb die Prävalenz in diesem Jahr bei gleichzeitig geringerer Befallsintensität deutlich niedriger als in den vorherigen Jahren. Da *S. parasitica* im Süßwasser ohne Zwischenwirt übertragen werden kann beeinflusst die Hälterung der Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch die Prävalenz der Saprolegniasis, welche daher nicht uneingeschränkt auf die Wildpopulation im GGD-System übertragbar ist. Dies ist der erste Nachweis von *S. parasitica* bei Maifischen außerhalb des Ei-Stadiums (CZECZUGA und MUSZYNSKA 1997).

Im Hinblick auf verwandte Spezies wurde im Rahmen eines Massensterbens bei 20 % der verstorbenen Nordamerikanischen Flussheringe eine Saprolegniasis nachgewiesen (EDWARD und BROWN 1968). Beim Australischen Süßwasserhering waren jeweils im Frühjahr 10-64 % der adulten Fische von einer Saprolegniasis betroffen (PUCKRIDGE et al. 1989). Im Hinblick auf andere anadrome Arten wurde im Columbia Becken, USA bei bis zu 22,1 % der zum Laichen aufsteigenden,

semelparen Königslachse (*Oncorhynchus tshawytscha*) eine Infektion durch *Saprolegnia* sp. nachgewiesen (NEITZEL et al. 2004). Somit liegt die Prävalenz der Saprolegniasis bei Maifischen jahresabhängig deutlich über der in der Literatur beschriebenen, teilweise bei Massensterben nachgewiesenen Infektionsraten anderer anadromer Fischspezies.

Die Nachweise von *S. parasitica* erfolgten im Wesentlichen auf/in Augen, Haut, Flossen und Kiemen, bei denen es sich um die zumeist durch diesen Erreger betroffenen Organe handelt (CHOUDHURY et al. 2014, NOGA 1993). Zudem waren bei drei Maifischen die inneren Organe betroffen. In diesen Fällen wurden ulzerative Läsionen im Zusammenhang mit Pilzhyphen und Bakterien im Ösophagus bzw. Magen nachgewiesen. Die histologischen Befunde mit invasivem Hyphenwachstum entsprachen dabei den in der Literatur beschriebenen pathologischen Veränderungen bei einer Saprolegniasis (COPLAND und WILLOUGHBY 1982, GIESEKER et al. 2006). Bei der Saprolegniasis entsteht durch einen Verlust von Serumproteinen durch die geschädigte Haut bzw. Kiemen eine Hämodilution sowie nachfolgend ein Zusammenbruch der Osmoregulation, welche zu einem Versterben des infizierten Fisches führt (RICHARDS und PICKERING 1979). Insbesondere die 50 % (9/18) verstorbenen, bakteriologisch negativen Rückkehrer aus dem GGD-System zeigten zum Teil eine hochgradige Saprolegniasis. Daher könnte die Saprolegniasis wesentlich zum Versterben insbesondere dieser Maifische beigetragen haben.

Saprolegnia spp. sind ausschließlich im Süßwasser und in Ästuaren verbreitet (CHOUDHURY et al. 2014, VAN WEST 2006). Die Infektion der Maifische erfolgte dementsprechend erst im Rahmen der Laichwanderung beim Aufstieg in die Flüsse. Die Infektion entsteht dabei insbesondere an Hautstellen, die mechanische Verletzungen aufweisen (NEITZEL et al. 2004). Bei den Rückkehrern in Bruch können diese neben dem Aufstieg insbesondere beim Fang in den Staudämmen, dem Transport sowie der Hälterung entstanden sein. Obwohl wenige Individuen bereits geringe Verpilzungen beim Transport in die Maifischprojektanlage in Bruch aufwiesen (David Clavé, pers. Komm.), sind die hohen Prävalenzen und zum Teil hochgradigen Infektionen erst während der Hälterung entstanden.

Virale Infektionserreger

Bislang unentdeckte virale Infektionserreger als mögliche Ursache der Enzephalitiden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

In der histologischen Untersuchung wurden keine eindeutigen pathologischen Veränderungen nachgewiesen, die charakteristisch für bekannte virale Erkrankungen sind. Lediglich die herdförmigen, nicht eitrigen Enzephalitiden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System mit Prävalenzen bis zu 6 % (2/31) wurden in keinem eindeutigen Zusammenhang mit einem anderen Infektionserreger nachgewiesen und könnten eine virale Ätiologie aufweisen. Als Ursache von Enzephalitiden wurden bereits das Ictaluride Herpesvirus 1 sowie Irido- und Rhabdoviren beschrieben, welche allerdings Vakuolisierungen neuronalen Parenchyms und Ödeme verursachen (FERGUSON et al. 2006b). Darüber hinaus verfügt das Betanodavirus, Erreger der viralen Nervennekrose, über einen ausgesprochenen Neurotropismus und verursacht ebenfalls Vakuolisierungen neuronalen Parenchyms (GROTMOL et al. 1997). Obwohl keine Vakuolisierungen beim Maifisch festgestellt wurden, kann eine virale Ursache für die Enzephalitiden nicht ganz ausgeschlossen werden.

Kein Nachweis viraler Infektionserreger bei Maifischen

In der virologischen Untersuchung wurden weder im Rahmen der Anzucht noch bei den durchgeführten PCRs oder den untersuchten Blutausstrichen Hinweise auf eine virale Infektion bei Maifischen der Wild- oder Zuchtpopulation feststellt. In Bezug auf die Anzucht und die molekularbiologische Untersuchung können grundsätzlich falsch negative Ergebnisse aufgrund der Lagerung der Proben bis zur Untersuchung (HOSTNIK et al. 2002) sowie autolytischen Probenmaterials nicht ganz ausgeschlossen werden. Zudem kann sich die Auswahl der zu untersuchenden Organe entscheidend auf den Nachweis von Viren auswirken. Viren mit dem Gastrointestinaltrakt oder den Kiemen als Hauptzielorganen könnten in den zur Untersuchung ausgewählten Organen gar nicht bzw. in einer Kopieanzahl unterhalb der Nachweisgrenze der durchgeführten Untersuchung vorliegen und somit nicht detektiert worden sein. Außerdem könnten virale Erkrankungen mit

geringen Prävalenzen aufgrund der teilweise geringen Probenzahlen (z. B. acht adulte Maifische aus dem Rhein) unentdeckt geblieben sein. Der reduzierte Gesundheitszustand der Elternfische und deren Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch stellen indes optimale Bedingungen für die Verbreitung und den Ausbruch latenter oder subklinischer Infektionen dar. Diesbezüglich bestanden die bestmöglichen Voraussetzungen zum Nachweis vorkommender Viren.

Die Verwendung der Zellkultur ist die Methode der Wahl zum nichtzielgerichteten Nachweis bekannter sowie noch nicht in der Literatur beschriebener Viren (FRYER und LANNAN 1994, HETRICK und HEDRICK 1993). Bei Zellkulturen ist das Auftreten von CPEs (durch Zelllyse) sowie von Synzytien (Zellfusionen) Anzeichen einer viralen Infektion der Zellen, welche jedoch nicht bei jeder viralen Infektion und nicht auf jeder Zelllinie auftreten (VILLENA 2003). Derzeit kann, nach aktuellem Kenntnisstand, nicht jedes Virus in Zellkulturen angezüchtet werden (EMMENEGGER et al. 2014). In diesem Forschungsvorhaben wurde durch Verwendung von insgesamt acht verschiedenen Zelllinien verschiedener Fischfamilien ein möglichst großes Spektrum verschiedener Zellen getestet. Obwohl für diese Studie nicht verfügbar, wurden in der Literatur zwei Zelllinien von Clupeiden beschrieben (GSE [Gizzard Shad Embryo (FERNANDEZ et al. 1993)] sowie ASF-1 [*Alosa Sapidissima* Fibroblast (WOLF und MANN 1980)]). Im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten wäre die Verwendung dieser spezifischen Clupeiden-Zelllinien oder die Etablierung von Zelllinien vom Maifisch empfehlenswert. Gleichwohl wurden trotz intensiver Forschung bei einigen Fischarten bislang keine Viren beschrieben. Zum Beispiel wurden vom Froschwels *Clarias batrachus* zwar zahlreiche Zelllinien etabliert, welche empfänglich für verschiedene Viren sind, jedoch konnten bei dieser Spezies selber bislang keine Viren nachgewiesen werden (BABU et al. 2011).

Alle PCRs zum Nachweis von VHSV, IHNV, IPNV, ISAV, LCDV sowie von cypriniden Herpesviren verliefen negativ. Die durchgeführten β-Actin PCRs zeigten die erfolgreiche RNA-Isolation, weshalb falsch negative Ergebnisse durch eine fehlgeschlagene RNA-Isolation sehr unwahrscheinlich sind. Damit wurden die zurzeit bekanntesten und bedeutendsten viralen Infektionserreger bei Wild-

und Nutzfischen (CRANE und HYATT 2011, GOMEZ-CASADO et al. 2011, WALKER und WINTON 2010) nicht beim Maifisch nachgewiesen.

Parasitäre Infektionserreger

Von den 11 nachgewiesenen Parasitentaxa wurden im Zusammenhang mit vier Erregern pathologische Veränderungen nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um Amöben, den nicht näher bestimmbarem Kiemenparasiten sowie *Hoferellus alosae* sp. nov. und die Anisakidae.

Amöben als eine Ursache von Branchitiden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Amöben wurden ausschließlich histologisch auf den Kiemen mit einer Prävalenz von 11 % (6/55) im Jahr 2013 und 4 % (1/24) im Jahr 2014 nachgewiesen. Die Amöben wurden immer im direkten Zusammenhang mit pathologischen Kiemenveränderungen wie einer herdförmig hochgradigen Hyperplasie des Kiemengewebes beobachtet. Dies ist die Erstbeschreibung von Amöben bei Maifischen.

Bei Amöben handelt es sich um eukaryotische, monoxene Organismen, welche ubiquitär im Boden und aquatischen Habitaten verbreitet und häufig amphizoisch sind (DYKOVÁ und LOM 2004). Einige Spezies verfügen über ein hohes pathologisches Potential wie zum Beispiel die bekannteste Spezies *Neoparamoeba pemaquidensis*, welche die Amöbenkrankheit der Kiemen insbesondere bei marinen Salmoniden verursacht (ADAMS und NOWAK 2004, KENT et al. 1988). Im Süßwasser wurde eine bislang nicht bestimmte Amöbenart der Familie Cochliopodidae als Ursache der nodulären Kiemenerkrankung beschrieben (BUCHMANN et al. 2004, DAOUST und FERGUSON 1985, NOBLE et al. 1997, SPEARE 1999). Außerdem ist *Thecamoeba hoffmani* als pathogene Amöbenspezies bei Salmoniden bekannt (SAWYER et al. 1974). Bei Clupeiden wurden bislang nur amphizoische Amöben wie *Acanthamoeba* spp. und *Vannella* spp. beschrieben (WEBB et al. 2002, WEBB et al. 2005).

Obwohl bei den Maifischen in der makroskopischen Kiemenuntersuchung nur geringgradige Veränderungen festgestellt wurden, entsprach das histopathologische Bild den Befunden von BUCHMANN et al. (2004) in seiner Beschreibung

der nodulären Kiemenerkrankung. Es besteht indes weiterer Forschungsbedarf zur abschließenden Bestimmung der bei Maifischen nachgewiesenen Amöbenspezies. Da Amöben im Süßwasser ohne Zwischenwirt übertragen werden können, sind die bei Maifischen aus der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesenen Prävalenzen nicht generell auf die Wildpopulation adulter Maifische im GGD-System übertragbar.

Der nicht näher bestimmbare, parasitäre Organismus als eine Ursache von Branchitiden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Der nicht näher bestimmbare parasitäre Organismus wurde im Jahr 2012 in den Kiemen von 3 % (1/31) und im Jahr 2013 von 16 % (9/55) der adulten Maifische aus dem GGD-System nachgewiesen. Eine taxonomische Einordnung dieses Parasiten war anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. Die positive Grocott-Färbung sowie die Morphologie sprechen für einen Pilz, wobei die negative PAS-Färbung dieser Hypothese widerspricht. Anhand seines Färbeverhaltens kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen Protozoen handelt. Weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung dieses Parasiten waren im Rahmen dieser als Übersichtsarbeit geplanter Studie nicht durchführbar. Aufgrund seines regelmäßig mit herdförmig teilweise hochgradigen pathologischen Kiemenveränderungen einhergehenden Vorkommens wird von einer pathogenen Bedeutung ausgegangen. Darüber hinaus war bei einer Prävalenz von bis zu 16 % ein nicht zu vernachlässigender Anteil der Maifische betroffen. Wegen der unklaren taxonomischen Einordnung und des dementsprechend unbekannten Übertragungsweges kann die Bedeutung der Hälterung der Maifische auf die Prävalenz nicht bewertet werden. Daher sollten weitere Untersuchungen zur Identifizierung und Bewertung dieses Organismus durchgeführt werden.

Trichodinidae und Chilodonella als Schwächeparasiten bei Maifischen der Wildpopulation, Frankreich

Die bei Maifischen in der Maifischprojektanlage in Bruch am häufigsten nachgewiesenen Ektoparasiten waren Trichodinidae (bis zu 80 %) und *Chilodonella* sp. (bis zu 11 %). Die Infektionsintensität von Trichodinidae wurde im gesamten Untersuchungszeitraum auf der Haut mit 71 % (63/88) am häufigsten als gering-

gradig, auf den Kiemen hingegen mit 47 % (40/86) zumeist als hochgradig eingestuft. Histologisch erfolgte der Nachweis sowohl im Zusammenhang mit anderen Infektionserregern und pathologischen Veränderungen des Kiemenepithels, als auch auf unverändertem Kiemengewebe. Trichodinidae wurden ebenfalls, mikroskopisch zumeist geringgradig, bei bis zu 25 % (3/12) der juvenilen Maifische aus dem GGD-System auf unverändertem Kiemengewebe nachgewiesen. Dies ist die Erstbeschreibung von Trichodinidae und *Chilodonella* sp. beim Maifisch.

Bei Trichodinidae und *Chilodonella* sp. handelt es sich um weltweit vorkommende, opportunistische, monoxene Schwächeparasiten bei aquatischen Vertebraten und Invertebraten (BASSON und VAN AS 2006, VAN AS und BASSON 1989). Bei Wildfischen sind insbesondere Trichodinidae weit verbreitet ohne klinisch manifeste Erkrankungen zu verursachen. Jedoch können Infektionen mit Trichodinidae und Chilodonellen an den Kiemen auch zu pathologischen Veränderungen bestehend aus Hämorrhagien sowie einer Hyperplasie und in hochgradigen Fällen Zerstörung des Kiemenepithels führen (BASSON und VAN AS 2006, LANGDON et al. 1985, PAPERNA und VAN AS 1983, URAWA und YAMAO 1992).

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden Trichodinidae und *Chilodonella* sp. nicht eindeutig als Ursache pathologischer Kiemenveränderungen nachgewiesen. Aufgrund von Literaturdaten und einer bei 47 % der Maifische aus der Maifischprojektanlage in Bruch hochgradigen Infektionsintensität können infektionsbedingte, nachteilige Effekte auf diese Elterntiere jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auf Grund Ihres direkten Lebenszyklus ist die in der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesene Prävalenz nicht ohne Vorbehalt auf die Wildpopulation adulter Maifische im GGD-System übertragbar.

Nachweis von Monogenea ohne eindeutig korrelierte pathologische Veränderungen bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Parasiten der Klasse Monogenea wurden auf den Kiemen im Jahr 2012 von 13 % (4/31), 2013 von 7 % (4/55) und 2014 von 4 % (1/24) der Maifische aus dem GGD-System nachgewiesen. Histologisch wurden keine pathologischen Veränderungen in einem eindeutigen Zusammenhang mit der Infektion festgestellt.

Das Vorkommen des zur Klasse Monogenea gehörenden Parasiten *Mazocraes alosae* in den Kiemen von Maifischen aus dem GGD-System und dem Rhein ist ausführlich belegt (FATIO 1890, GÉRARD et al. 2016, TAVERNY 1991). Die Parasitendichte bei adulten Maifischen aus dem GGD-System war jedoch sehr gering (TAVERNY 1991). Bei dem in dieser Studie nachgewiesenen monogenen Parasiten könnte es sich ebenfalls um *Ma. alosae* handeln. GÉRARD et al. (2016) haben keine negativen Auswirkungen der Infektion mit *Ma. alosae* auf die Körperindizes von Maifischen feststellt.

Die Ergebnisse dieser Studie ergeben keine Hinweise auf eine mögliche Gefährdung der Maifische durch die nachgewiesenen Monogenea, wobei für eine abschließende Beurteilung eine exakte taxonomische Bestimmung des Parasiten erforderlich ist. *Ma. alosae* weist zwar einen monoxenen, jedoch grundsätzlich marinen Lebenszyklus auf, weswegen die Hälterung in der Maifischprojektanlage keinen wesentlichen Einfluss auf seine Prävalenz hätte.

Argulus sp. als mögliche Ursache von Hautläsionen bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, Frankreich

Argulus sp. wurde in Hautabstrichen im Jahr 2012 bei 10 % (10/42), 2013 bei 11 % (6/55) und 2014 bei 8 % (2/24) der adulten Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesen. Der Nachweis von *Argulus* sp. erfolgte dreimal bzw. doppelt so häufig im Zusammenhang mit Hämorrhagien der Haut bzw. Saprolegniasis als bei Maifischen mit unveränderter Haut. Dies ist die Erstbeschreibung von *Argulus* sp. bei Maifischen.

Im Unterstamm Crustacea (Krebstiere) gehören die weitverbreitetsten und ökonomisch bedeutendsten obligaten Ektoparasiten bei Fischen zur Gattung *Argulus* (WALKER et al. 2004). *Argulus* sp. verfügen über einen monoxenen Lebenszyklus im Süßwasser. Adulte *Argulus* sp. ernähren sich von dem Blut der Wirtsfische und können insbesondere bei Massenbefällen unter Jungfischen zu hohen Verlusten führen (LESTER und ROUBAL 2006). Neben ihrer direkten Schädigung durch den Entzug von Blut schädigen sie den Wirtsfisch zusätzlich indirekt durch die Entstehung sekundärer Infektionen an der Bissstelle durch *Saprolegnia* sp. (SINGHAL et al. 1990) und Bakterien mit nachfolgenden Septikämien (BANDILLA et al. 2006,

BANDILLA 2007) sowie als Vektoren von Nematoden (MORAVEC 2004) und Viren (AHNE 1985, CUSACK und CONE. 1986, OVERSTREET et al. 2009).

Insgesamt wurden die direkten negativen Auswirkungen von *Argulus* sp. auf die Maifische wegen der niedrigen Parasitenzahl als gering eingestuft. Der häufigere Nachweis von *Argulus* sp. im Zusammenhang mit Hauthämorrhagien sowie der Saprolegniasis weist jedoch auf eine sekundäre Schädigung der Maifische hin. Auf Grund seiner direkten Übertragbarkeit sind die nachgewiesenen Prävalenzen in der Hälterung der Maifischprojektanlage in Bruch nicht uneingeschränkt auf die Wildpopulation der Maifische im GGD-System übertragbar.

Anisakidae als Ursache verminöser Granulome in den inneren Organen bei adulten Maifischen der Wildpopulation, Frankreich und Deutschland

Unter Berücksichtigung der pathologisch-anatomischen und der histologischen Untersuchung wurden bei 100 % der adulten Maifische aus dem GGD-System und dem Rhein Nematoden in der Leibeshöhle nachgewiesen, welche histologisch der Familie Anisakidae zugeordnet wurden. Zusätzlich wurden beim externen Verdau von Muskulatur adulter Maifische Larvenstadien und Eier von Anisakidae nachgewiesen. Die migrierenden Nematodenlarven sind vermutlich im Gegensatz zu der bereits diskutierten Mykobakteriose hauptursächlich für die hohe Prävalenz von Granulomen in den inneren Organen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum betrug diese bei Rückkehrern aus dem GGD-System 82% (90/110) und bei Rückkehrern aus dem Rhein 88 % (7/8). Diese Hypothese wird zum einen durch ein histologisch nachgewiesenes Kontinuum von lebend abgekapselten Nematoden, verstorbenen und degenerierten Nematoden mit peripherer granulomatöser und epitheloidzelliger Reaktion und zentralnekrotisierenden Granulomen unterstützt. Zum anderen sprechen für diese Hypothese die 75 % (25/36) negativen ZN-Färbungen, bei denen keine säurefesten Stäbchen in den zahlreichen Granulomen festgestellt wurden. Darüber hinaus wurden auch bei Maifischen mit einem fokalen Nachweis von säurefesten Stäbchen zahlreiche ZN-negative Granulome beobachtet.

Bei der Familie Anisakidae handelt es sich um weltweit vorkommende, marine Parasiten, zu denen beispielsweise Nematoden der Gattungen *Anisakis, Pseudo-*

terranova, Contracaecum und *Hysterothylacium* zählen. Der Nematode *Hysterothylacium aduncum* wurde bereits in der Leibeshöhle von Maifischen im GGD-System von TAVERNY (1991) und im Rhein von FATIO (1890) nachgewiesen. Außerdem haben BAO et al. (2015a) *Anisakis simplex* und *An. pegreffii* mit einer Prävalenz von 100 % bei Maifischen in Flüssen der West-Iberischen Halbinsel beschrieben. Inwiefern die nachgewiesenen Nematoden der Gattung *Anisakis* oder *Hysterothylacium* angehören, konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen im Rahmen dieses Forschungsvorhabens nicht abschließend geklärt werden und ist für die klinische Relevanz von untergeordneter Bedeutung. Aufgrund des obligat heteroxenen, vorwiegend marinen Lebenszyklusses von Anisakidae ist die bei Maifischen in der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesene Prävalenz auf die Maifisch-Wildpopulation im GGD-System übertragbar.

Die Anisakidae befanden sich bei den Maifischen in der vorliegenden Studie vorwiegend am terminalen Ende des Blindsacks, in der Magenwand, den Adnexen in der Leibeshöhle sowie im Parenchym innerer Organe. Diese Befunde entsprachen vollständig dem von BAO et al. (2015a) festgestellten charakteristischen Verteilungsmuster der *Anisakis* sp. in der Leibeshöhle. Die histopathologischen Veränderungen, welche insbesondere durch die Migration der Anisakidae entstanden sind, entsprechen dabei den bereits beschriebenen pathologischen Veränderungen durch Anisakidae-Larven bei Fischen (MOLNÁR et al. 2006). Die Infektion mit Anisakidae führt dabei zu einer Schädigung des Wirtfisches durch Penetration des Magens, wodurch die Entstehung von Septikämien begünstig wird (MIYAZAKI et al. 1988). Darüber hinaus entstehen zum Teil hochgradige Entzündungen in der Leibeshöhle und Organschäden durch die Migration der Larven (DEZFULI et al. 2007, HAUCK und MAY 1977, MOLNÁR et al. 2006). Die in dieser Studie festgestellten entzündlichen Veränderungen im Binde- und Fettgewebe sowie des Pankreas zwischen den Pylorusanhängen waren vermutlich durch die migrierenden Nematoden bedingt. Im Gegensatz zu der Vielzahl und Intensität der verursachten pathologischen Veränderungen durch Anisakidae wurde in vorangegangenen Studien kein negativer Einfluss einer Infektion mit *Anisakis* spp. oder *Hy. aduncum* auf die Körpermasse, die Fettreserven oder den Korpulenzfaktor von Maifischen festgestellt (GÉRARD et al. 2017). Es wurde gezeigt,

dass eine gute Körperkondition der Fische mit einer hohen Futter- und dementsprechenden Parasitenaufnahme korrelierte (MLADINEO und POLJAK 2014). Hiermit übereinstimmend wurden auf Bestandsebene chronische Infektionen durch Anisakidae bislang nicht im Zusammenhang mit Populationsrückgängen oder Massensterben beschrieben (KENT und FOURNIE 1993, MOLNÁR et al. 2006, PODOLSKA 2003). Die Entstehung neuer Krankheitsbilder wie dem durch *An. simplex* verursachten, sogenannten Red Vent Syndrom bei anadromen Atlantischen Lachsen (*Salmo salar*) während der Laichwanderung (NOGUERA et al. 2009) zeigt jedoch, dass sich durch Änderung der Umweltbedingungen das Gleichgewicht zwischen Wirt und Parasit verschieben, und sich somit die Bedeutung der Infektion ändern kann.

Beschreibung der neuen Spezies Hoferellus alosae sp. nov. und Diskussion von H. alosae sp. nov. als Ursache pathologischer Nierenveränderungen

Bei adulten Maifischen aus dem GGD-System wurde bei 92 % (101/110) und bei adulten Maifischen aus dem Rhein bei 13 % (1/8) histologisch eine Infektion mit *Myxozoa* festgestellt. Die histopathologischen Veränderungen bei adulten Maifischen durch eine Infektion mit den *Myxozoa* bestanden aus einer je nach Infektionsstärke gering- bis hochgradigen Dilatation der Nierentubuli. In einem Fall wurde eine Ruptur eines Nierentubulus mit peripherer, granulomatöser Nephritis festgestellt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um einen Einzelfall handelt, welcher beispielweise durch ein Trauma beim Transport verursacht wurde. Juvenile Maifische zeigten keine pathologischen Nierenveränderungen durch die Infektion.

In der morphologischen Untersuchung wurde die nachgewiesene *Myxozoa*-Spezies der Gattung *Hoferellus* zugeordnet. Insgesamt wurden fünf verschiedene *Hoferellus* spp. bei Heringsartigen weltweit und vier bei der Gattung *Alosa* beschrieben, jedoch keine bei Maifischen. Bei Alosen wurden *H. caudatus* (PARISI 1910), *H. donecii* (GASIMAGOMEDOV 1970), *H. caspialosum* (DOGIEL und BYCHOVSK 1939) und *H. jurachni* (MOSHU und TROMBITSKY 2006) beschrieben, welche sich jedoch alle morphologisch signifikant von der bei Maifischen gefundenen Spezies unterscheiden. *H. donecii* und *H. jurachni* unterscheiden sich

deutlich von der neuen *Myxozoa*-Spezies bezüglich der Form und der Länge der reifen Sporen sowie bezüglich des Aufbaus der hinteren Sporenanhänge. *H. caspialosum* ist kleiner als die neue *Myxozoa*-Spezies. Die Spezies *H. caudatus* verfügt über einheitlich lange hintere Polfilamente und ein geriffeltes hinteres Sporenende, während die neue *Myxozoa*-Spezies nur gelegentlich hintere Fortsätze besitzt und ein glattes hinteres Sporenende mit jeweils nur einem kleinen Fortsatz aufweist.

Die Gattung *Hoferellus* gehört zu den *Myxozoa*, bei welchen es sich um weltweit verbreitete, parasitisch lebende Nesseltiere bei Tieren in Süß- und Salzwasser handelt. Sie verfügen über einen komplexen Lebenszyklus mit einem Vertebraten (vorwiegend Fische) als Zwischenwirt und einem Invertebraten (Anneliden, Ringelwürmer) als Endwirt (LOM und DYKOVÁ 2006, OKAMURA et al. 2015). Im gesamten Entwicklungszyklus werden zwei Typen von infektiösen Sporen gebildet: (a) die Myxosporea-Sporen und (b) die Actinosporea-Sporen. Die für den Fischwirt infektiösen Actinosporea-Sporen werden bei der geschlechtlichen Entwicklung im Invertebraten gebildet (LOM und DYKOVÁ 2006). Die Infektion des Fisches erfolgt zum einen über den Verzehr infizierter Endwirte (Invertebraten). Zum anderen können die Actinosporea-Sporen den Fisch aber auch unmittelbar über die Haut, Flossen oder Kiemen infizieren (YOKOYAMA und URAWA 1997). *Hoferellus*-Spezies, die interzellulär und/oder intrazellulär im Wirtsgewebe parasitieren, sind hochpathogen und bedingen zum Teil schwere Erkrankungen beim Wirtsfisch (KENT et al. 2001, LOM und DYKOVÁ 1992). Zum Beispiel verursacht *H. carassii* die infektiöse Nierenvergrößerung beim Goldfisch (*Carassius auratus*) (EL-MATBOULI et al. 1992, YOKOYAMA et al. 1990, YOKOYAMA et al. 1993). Ein Großteil der bekannten *Myxozoa*-Spezies verursacht hingegen zumeist asymptomatische, subklinische Infektionen (SCHMIDT-POSTHAUS und WAHLI 2015).

Die molekularbiologische Untersuchung ergab verschiedene SSU rDNA Sequenzen der bei Maifischen gefundenen *Myxozoa*-Spezies. In der Literatur sind jedoch keine Sequenzen von bei Heringsartigen vorkommenden *Myxozoa*-Spezies verfügbar. Bei keiner der erhaltenen Sequenzen der SSU rDNA waren Äquivalente bei GenBank gelistet. Die Sequenzen mit der höchsten Überein-

stimmung stammten von der Art *Ortholinea orientalis* mit einer Sequenzübereinstimmung von 87-88 %, welche auf eine Verwandtschaft der neuen *Myxozoa*-Spezies mit diesem myxozoischen Süßwasserparasiten des exkretorischen Nierensystems hinweist. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der erhaltenen Sequenzen von Parasitenstadien von Maifischen aus dem GGD-System wurden sie derselben Spezies zugeordnet, welche ebenfalls von adulten Maifischen aus dem Rhein erhalten wurde. Anhand der Ergebnisse der morphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurde dieser Parasit als *H. alosae* sp. nov. neu beschrieben (WÜNNEMANN et al. 2016). Bei zwei Maifischen aus dem Rhein ergab die Sequenzierung eine zusätzliche SSU rDNA Sequenz, welche auf eine neue Spezies in der Gattung *Ortholinea* sp. hinwies. Eine weitere Untersuchung von Maifischen aus dem Rhein mit Beschreibung dieser neuen Spezies der Gattung *Ortholinea* erscheint daher sinnvoll.

H. alosae sp. nov. wurde anhand des etablierten PCR-Protokolls mit einer Prävalenz von 100 % (33/33) bei adulten Maifischen aus der Garonne und ebenfalls 100 % (10/10) aus der Dordogne bestätigt, während die Prävalenz mit 64 % (14/22) bei juvenilen Maifischen aus der Garonne deutlich niedriger lag. Im Gegensatz dazu lag die Prävalenz im Rhein nur bei 22 % (2/9) bei adulten und bei 0 % (0/26) bei juvenilen Maifischen. Aufgrund ihres obligat heteroxenen Lebenszyklusses ist die bei Maifischen in der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesene Prävalenz auf die Maifisch-Wildpopulation im GGD-System übertragbar. Die Prävalenz-Untersuchungen zeigten zum einen, dass die PCR deutlich sensitiver ist als die Histologie. Zum anderen weist das Vorkommen von *H. alosae* sp. nov. bei den juvenilen Maifischen aus dem GGD-System darauf hin, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Süßwasser-Parasiten handelt. Unter Berücksichtigung der 0 % infizierten juvenilen Maifische aus dem Rhein zum Zeitpunkt der Untersuchung kann gefolgert werden, dass *H. alosae* sp. nov. bei den Zwischenwirten (Anneliden) im Rhein zurzeit nicht vorkommt. Da Maifische in Deutschland über fast 70 Jahre fast vollständig ausgestorben waren (BARTL und TROSCHEL 1997), fehlte zur Aufrechterhaltung der Infektionskette möglicherweise der obligate Zwischenwirt, sofern *H. alosae* sp. nov. wirtsspezifisch ist. Die Wirtsspezifität ist bei anderen, in Hohlorganen (z. B. ausführende Gänge von

Niere oder Gallenblase, Körperhöhle) vorkommenden Myxozoen (ALAMA-BERMEJO et al. 2011, BARTOSOVA et al. 2013, HEINIGER und ADLARD 2013) stark ausgeprägt (ALAMA-BERMEJO et al. 2016). Diese Hypothese würde auch erklären, warum die Prävalenzen bei adulten und juvenilen Maifischen aus dem GGD-System deutlich höher sind als bei adulten und juvenilen Maifischen aus dem Rhein. Darüber hinaus ergab die Sequenzierung bei zwei Maifischen aus dem Rhein eine zusätzliche SSU rDNA Sequenz, welche auf eine zwar nah mit *O. orientalis* verwandte, aber neue Spezies hinwies. Dies weist auf eine größere Vielfalt von *Myxozoa* bei der sich im Rhein neu etablierenden Wirt-Parasiten-Beziehungen im Vergleich zu dem schon lange unverändert bestehenden Gleichgewicht zwischen *H. alosae* sp. nov. und Maifischen im GGD-System hin.

Die geringe Pathogenität von *H. alosae* sp. nov. bei Maifischen, im Wesentlichen bestehend aus Tubulusdilatationen bei hochgradigen Infektionen, steht daher im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen geringen Pathogenität der meisten *Myxozoa*. Dies gilt insbesondere für *Myxozoa*-Spezies, die wie *H. alosae* sp. nov. nicht intrazellulär, sondern in Hohlorganen wie beispielsweise dem Harnsystem vorkommen. Die bei Maifischen beobachtete Dilatation der Tubuli ohne Schädigung des Tubulusepithels wurde gleichfalls bei anderen coelomischen *Myxozoa* beschrieben (KØIE et al. 2007, SITJÀ-BOBADILLA und ALVAREZ PELLITERO 2001). Zudem ist bei einer Prävalenz von 100 % bei den Maifischen aus dem GGD-System mit, bis auf einen Einzelfall, lediglich geringen histopathologischen Veränderungen beim Wirtsfisch von einer langen Koevolution auszugehen. Zahlreiche Faktoren sowohl von Seiten des Wirtes und als auch der Umwelt können jedoch die Prävalenz und die Pathogenität von *Myxozoa* maßgeblich beeinflussen (SCHMIDT-POSTHAUS und WAHLI 2015). Daher besteht insbesondere bei der sich wieder neu ausbildenden Parasiten-Wirts-Beziehung im Rhein weiterer Forschungsbedarf.

Nachweis zahlreicher Endoparasiten im Gastrointestinaltrakt ohne infektionsbedingte, pathologische Veränderungen bei Maifischen der Wildpopulation

In der histologischen und parasitologischen Untersuchung wurden im Gastrointestinaltrakt adulter Maifische Trematoden der Gattung *Pronoprymna*, Parasiten

der Familie Hemiuridae, nicht näher identifizierbare Parasitenstadien sowie Nematoden nachgewiesen. In der histologischen Untersuchung wurden keine infektionskorrelierten, pathologischen Veränderungen des Gastrointestinaltrakts festgestellt.

Die bei adulten Maifischen aus dem GGD-System und dem Rhein im Darm und den Pylorusanhängen nachgewiesene Trematodenspezies wurden anhand morphologischer Charakteristika der Gattung *Pronoprymna* zugeordnet. Die Prävalenz lag bei Maifischen aus dem GGD-System zwischen 50 % (12/24) und 85 % (22/26), während 88 % (7/8) der adulten Maifische aus dem Rhein betroffen waren. Die in der vorliegenden Studie bei Maifischen aus der Maifischprojektanlage in Bruch nachgewiesenen Prävalenzen sind trotz der Hälterung wegen des obligat heteroxenen Lebenszyklusses von *Pronoprymna* sp. (BRAY und GIBSON 1980) auf die Maifisch-Wildpopulation übertragbar. Zur Gattung *Pronoprymna* zählen neben *P. ventricosa* nur *P. mijun* (MACHIDA und KURAMOCHI 2003) mit einem Vorkommen in japanischen Gewässern sowie *P. petrowi* (MARGOLIS und CHING 1965) mit einem Verbreitungsgebiet im Schwarzen und Indischen Meer sowie im Nordpazifik. Da außerdem *P. ventricosa* bereits bei Maifischen im Rhein (BRAY und GIBSON 1980) und in Irland (DOHERTY und MCCARTHY 2002) beschrieben wurde, handelt es sich bei der nachgewiesenen Spezies vermutlich ebenfalls um *P. ventricosa*. Dies gilt insbesondere, da das Vorkommen von *P. ventricosa* bei Finten in der Dordogne mit einer Prävalenz von 80 % bereits in der Literatur belegt ist (GÉRARD et al. 2017). Bei Maifischen aus dem GGD-System, welche von GÉRARD et al. 2017 nicht untersucht wurden, erfolgte bislang kein Nachweis von *P. ventricosa* (TAVERNY 1991).

Im Fall der nahe verwandten Finte wiesen GÉRARD et al. (2017) einen signifikant negativen Einfluss von *P. ventricosa* auf die Körpermasse, die Fettreserven und den Korpulenzfaktor nach. Aus diesen Daten wurde eine Bedrohung der Fintenpopulation, insbesondere derjenigen in der Dordogne mit Prävalenzen von 80 %, durch *P. ventricosa* abgeleitet. Ein vergleichbar negativer Einfluss dieses Parasiten auf Maifische kann nicht ausgeschlossen werden, weil gleichartige Untersuchungen bei mit *P. ventricosa* infizierten Maifischen bislang nicht durchgeführt wurden. Da darüber hinaus im Rahmen dieser Studie *Pronoprymna* sp. bei Maifi-

schen aus dem GGD-System erstmals nachgewiesen wurde, besteht vermutlich keine lange Koevolution von Wirt und Parasit.

Im Magen von bis zu 21 % der adulten Maifische aus dem GGD-System wurden digene Trematoden der Familie Hemiuridae nachgewiesen. Diese Prävalenz ist ungeachtet der Hälterung der Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch wegen des obligat heteroxenen Lebenszyklusses von Hemiuridae (GIBSON und BRAY 1986) auf die Maifisch-Wildpopulation übertragbar. Aus der Familie Hemiuridae wurde bereits *Hemiurus appendiculatus* im Darm bzw. Magen von Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesen (TAVERNY 1991). GIBSON und BRAY (1986) beschreiben *He. appendiculatus* als marinen Parasiten, dessen Nachweis im Süßwasser lediglich durch die anadrome Wanderung seiner spezifischen Endwirte, dem Maifisch und der Finte, bedingt sind. TAVERNY (1991) wies dabei für *He. appendiculatus* eine Prävalenz von 28,5 % bei adulten Maifischen aus dem GGD-System nach, wobei der Parasit vorwiegend im Magen, selten in den Pylorusanhängen oder im Darm feststellbar war. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie. Im Fall von *He. appendiculatus* haben GÉRARD et al. (2017) eine signifikant negative Auswirkung der Infektionen auf die Körpermasse und den Korpulenzfaktor von Maifischen beschrieben. Aufgrund fehlender histopathologischer Veränderungen ist von einer Schädigung des Wirtes durch Entzugs verdaulicher Nahrung sowie durch Ernährung der Parasiten vom Wirtsgewebe, -blut oder -serum auszugehen (MOLNÁR et al. 2006).

Die beiden Stadien des nicht näher bestimmbaren Parasiten wurden im Gastrointestinaltrakt adulter Maifische aus dem GGD-System mit einer Prävalenz von bis zu 42 % (11/26) und dem Rhein von 38 % (3/8) nachgewiesen. Eine Bewertung der Übertragbarkeit dieser Prävalenzen auf die Wildpopulation ist angesichts der unklaren taxonomischen Einordnung und des unbekannten Lebenszyklus nicht möglich. Beide Parasitenstadien wurden zumeist zusammen bei einem Maifisch nachgewiesen, weshalb sie verschiedene Entwicklungsstufen einer Spezies darstellen könnten. Da juvenile, noch nicht ins Meer gewanderte Maifische nicht betroffen waren, könnte dieser Parasiten über einen marinen Lebenszyklus verfügen. Aufgrund des einen Mundsaugnapfes und der vier kaudal liegenden Saugnäpfen ähnelnden Strukturen bei dem 0,8 mm großen Stadium könnte es sich

um Metacercarien von digenen Trematoden handeln. Zu den bereits bei Maifischen beschriebenen Trematoden zählen sowohl die im Rahmen dieser Studie nachgewiesenen Parasiten der Gattung *Pronoprymna* und der Familie Hemiuridae als auch der bisher nur bei Maifischen in Irland beschriebenen Gattung *Diplostomum* (DOHERTY und MCCARTHY 2002). Das Zielorgan der beiden vorkommenden Spezies *D. gasterostei* und *D. spathaceum* ist das Auge, welches jedoch bei Maifischen aus dem GGD-System parasitenfrei war. Zur Identifikation dieses Parasiten ist daher weitere Forschungsarbeit erforderlich. Dies bezieht sich besonders auf die molekulare Ebene, welche den Umfang dieser Übersichtsarbeit deutlich überschritten hätte.

In der parasitologischen Untersuchung wurden Nematoden vor allem im Magenlumen, selten im Darm der adulten Maifische nachgewiesen. Die Prävalenz lag bei 8 % (Dordogne, 2013), bei 4 % (Garonne, 2014) sowie bei 25 % (Rhein, 2014). Im Gastrointestinaltrakt adulter Maifische aus dem GGD-System wurde bereits *Hysterothylacium aduncum* mit einer Prävalenz von 94,5 % nachgewiesen (TAVERNY 1991). Gleichwohl könnte es sich um *Anisakis* sp. handeln, deren Larven sich ebenfalls vor der Migration in die Leibeshöhle im Gastrointestinaltrakt befinden und deren Vorkommen beim Maifisch ebenfalls gut in der Literatur belegt ist (BAO et al. 2015a, GÉRARD et al. 2017). Anhand der durchgeführten Untersuchungen ist eine Einordnung der Nematoden im Gastrointestinaltrakt nicht abschließend möglich. Anhand der Ergebnisse der histologischen Untersuchung mit Nachweis von Anisakidaelarven in den inneren Organen sowie von Literaturdaten ist jedoch eine Zuordnung der Nematoden im Gastrointestinaltrakt zur Familie Anisakidae wahrscheinlich.

5.3 Bedeutung der nachgewiesenen Infektionserreger für das Wiederansiedlungsprojekt

Neben der bereits dargestellten Pathogenität eines Infektionserregers für das Einzeltier sind zur Beurteilung der Relevanz eines Erregers für die Wildpopulation die Auswirkungen einer Infektion auf die Mortalität sowie die Reproduktionsleistung der Fische von entscheidender Bedeutung (SCOTT 1988). Diese beiden Parameter wurden bei adulten Maifischen aus dem GGD-System in der Maifischprojektanlage in Bruch erfasst und werden nachfolgend diskutiert. Die Relevanz eines Infektionserregers für das LIFE-Projekt wird darüber hinaus von seiner Bedeutung für die ergriffenen Wiederansiedlungsmaßnahmen, bestehend aus der Nachzucht und dem Besatz von Maifischlarven im Rhein und der Etablierung einer Zuchtpopulation sowie den hierfür benötigten Maifischhaltungsanlagen in Bruch und Aßlar, bestimmt. Diese werden im Folgenden erläutert.

Der Einfluss von nachgewiesenen Infektionserregern auf die Mortalität und die Reproduktionsleistung adulter Maifische in der Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich

Die Mortalität lag im Jahr 2012 bei 67 % (29/43), 2013 bei 84 % (67/80) und 2014 bei 85 % (56/66). Die Gesamtmortalität von 80 % über den gesamten Untersuchungszeitraum entspricht weitgehend der in der Literatur beschriebenen Mortalität von Maifischen nach dem Ablaichen von mindestens 82 % (BAGLINIÈRE et al. 2003, MENNESSON-BOISNEAU et al. 2000b, QUIGNARD und DOUCHEMENT 1991, TAVERNY 1991). Der bis zum Ende der Reproduktionsphase in Bruch überlebende Anteil von ca. 18 % der Rückkehrer lag dabei unter den von TAVERNY (1991) beschriebenen maximal 27 % zum Laichen wiederkehrenden Maifischen, jedoch oberhalb der von MENNESSON-BOISNEAU et al. (2000a) beobachteten 5-6 %. Die Mortalität bei den weiblichen Maifischen lag insgesamt deutlich über derjenigen der Männchen. Bei unterschiedlicher Geschlechterverteilung in den zwei Rundbecken sind dadurch mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die unterschiedlich hohen Mortalitäten in den zwei Rundbecken im Jahr 2012 bedingt (38 *versus* 95 %). Ebenso waren alle fünf auf dem Transport verstorbenen Mai-

fische weiblich. Diese Ergebnisse scheinen der Studie von TAVERNY (1991) zu widersprechen, welche einen deutlich größeren Anteil von sich mehrfach fortpflanzenden Weibchen (17,9 %) als Männchen (9,1 %) beschreibt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass weibliche Maifische aufgrund ihrer hohen Reproduktionsleistung empfindlicher auf die zusätzlichen Stressfaktoren wie Transport und Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch reagieren. Im Rahmen der Studie wurde bis auf eine etwas höhere Prävalenz von *S. parasitica* bei Weibchen (62 % [26/42]) als bei Männchen (48 % [38/79[) keine Häufung von Infektionserregern bei weiblichen Maifischen als mögliche Ursache des frühzeitigen Versterbens festgestellt. In Bezug auf die Gesamtmortalität der Laichfische während der Projektphase in der Maifischprojektanlage in Bruch wurde in keinem Jahr eine eindeutige Korrelation mit dem Nachweis eines Infektionserregers festgestellt. Das unregelmäßig auftretende Bakterium *L. lactis* führte beispielsweise nicht zu einer Erhöhung der Mortalität in den Jahren 2012 und 2014 im Vergleich zum Jahr 2013, in dem *L. lactis* und die Endokarditiden nicht nachgewiesen wurden. Für die Populationsentwicklung ist jedoch entscheidend, ob die Elterntiere vor oder nach dem Ablaichen verstorben sind. Hierrüber gibt der GSI Aufschluss.

Bei männlichen Maifischen variierte der GSI in den Jahren von 2012-2014 jeweils von Mai bis Juli durchschnittlich zwischen 5,6 % und 5,2 %. Eine ähnlich geringe Schwankung des GSI wurde ebenfalls bei männlichen Maifischen im Fluss Minho auf der Westiberischen Halbinsel beschrieben (MOTA und ANTUNES 2011). Der GSI nahm bei Weibchen durchschnittlich von Mai bis Juli von 10,0 % auf 3,5 % ab. In der histologischen Untersuchung waren zumeist noch reife Follikel bzw. Follikel in Anbildung nachweisbar, lediglich bei den Weibchen aus dem Juni 2013 mit einem durchschnittlichen GSI von 3,5 % wurden keine reifen Follikel bzw. Follikel in Anbildung mehr festgestellt. Bei im Fluss Minho gefangenen weiblichen Maifischen zeigte der GSI im Juni einen Anstieg auf bis zu ca. 14,5 % und im Juli nach dem Ablaichen einem Abfall auf ca. 9 % (MOTA und ANTUNES 2011). In der Literatur wurde für weibliche Rückkehrer aus dem GGD-System ein vergleichbarere GSI von 15 % beschrieben (DOUCHEMENT 1981). Bei auf dem Transport in die Maifischprojektanlage in Bruch verstorbenen Weibchen, welche vermutlich noch nicht abgelaicht hatten, wurde ein GSI von 13,3 % errechnet. Bei

im Jahr 2013 im Juni verstorbenen, weiblichen Maifischen aus der Dordogne wurde ebenfalls ein hoher GSI von 14,1 % berechnet. Diese Daten zeigen, dass diese Maifische im Jahr 2013 vermutlich ebenfalls vor dem vollständigen Ablaichen verstorben sind. Diese Hypothese wird gleichermaßen durch die vom LIFE+ Projektteam erhobenen Daten zur Reproduktionsleistung unterstützt. Im Jahr 2013 war die gesamte Eiproduktion mit 680.000 Eiern geringer als die der Jahre 2012 und 2014 (2012: 980.000, 2014: 2,3 Millionen) (David Clavé, pers. Komm.). Die durch *L. lactis* verursachten Endokarditiden in den Jahren 2012 und 2014 verursachten im Vergleich zum Jahr 2013 ohne Endokarditiden somit keinen nachweisbaren negativen Effekt auf die Reproduktionsleistung durch frühzeitiges Versterben der weiblichen Rückkehrer. Hingegen korrelierte die hohe Prävalenz von *S. parasitica* im Jahr 2013 mit 60 % (15/25) bei Maifischen aus der Dordogne mit dem höchsten, bei verstorbenen Rückkehrern aus der Maifischprojektanlage in Bruch errechneten, durchschnittlichen GSI von 14,1 %. Diese Mykose wurde ebenfalls regelmäßig bei anderen anadromen Fischarten während der Reproduktionsphase nachgewiesen und war jeweils von großer Bedeutung (CHOUDHURY et al. 2014, EDWARD und BROWN 1968, NEITZEL et al. 2004, PUCKRIDGE et al. 1989).

Die Bedeutung der nachgewiesenen Infektionserreger für die unterschiedlichen Maifischhaltungsanlagen

Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich

Für den Erfolg des Maifisch-Wiederansiedlungsprojektes ist es essentiell, die Mortalität der Rückkehrer in der Maifischprojektanlage in Bruch so gering wie möglich zu halten, um ein Versterben der Elterntiere vor dem möglichst vollständigen Ablaichen zu verhindern. Bei Wanderfischen sind die maßgeblichen Faktoren für das Versterben nach dem Ablaichen das Ausmaß des Energieaufwandes für die Laichwanderung, die Anpassung an die geänderte Salinität des Süßwassers sowie der Reproduktionsstress (LEONARD und MCCORMICK 1999). Einige Fischspezies zeigen beispielsweise abhängig vom Habitat und von Umwelteinflüssen eine Mischung semelparer und iteroparer Lebensstrategien (CHRISTIANSEN et al. 2008, HAUTEKÈETE et al. 2001, LEONARD und MCCORMICK

1999, UNWIN et al. 1999). Diese Mischung der Lebensstrategien wurde gleichfalls für die Wanderfischpopulationen des Maifisches beschrieben, in welchen bis zu 30 % iteroparer Maifische vorkommen (MENNESSON-BOISNEAU und BOISNEAU 1990, TAVERNY 1991). Diese Fakten zeigen, dass die Lebensspanne der Laichfische eine gewisse Variabilität besitzt und Maifische nicht zwangsläufig nach der ersten Laichwanderung versterben. Infektionserreger wurden bisher nicht als primäre Todesursache bei semelparen Organismen beschrieben, ihr Auftreten wird jedoch durch Migrationsstress und Zusammenbruch essentieller Überlebensmechanismen begünstigt (NEITZEL et al. 2004, OAKWOOD 2004). Das hieraus resultierende gehäufte Vorkommen von Infektionserregern führt wiederum zu einer weiteren Schwächung der Fische und einer erhöhten Anfälligkeit für Erreger, wodurch sich die Gesundheit und Reproduktionsfähigkeit der Rückkehrer kontinuierlich verschlechtert. Im Rahmen des Wiederansiedlungsprojekts wurden die Elternfische in dieser sensiblen Lebensphase durch unvermeidliche Maßnahmen wie ihren Fang, Transport und die Hälterung über bis zu 41 Tagen zusätzlichem Stress ausgesetzt. Außerdem wurde bei den analysierten Wasserparametern des Beckenwassers in der Maifischprojektanlage in Bruch, welches aus dem Canal latéral à la Garonne eingeleitet wurde, eine zum Teil sehr niedrige Sauerstoffkonzentration von minimal 4,2 mg/l (Sättigung von ca. 49 %) festgestellt. Diese für eine aktive Fischspezies wie den Maifisch sehr niedrige Sauerstoffkonzentration stellt einen weiteren Stressfaktor dar. Dieser Stress sowie die im Vergleich zum Flusssystem hohe Populationsdichte in der Hälterung in Bruch begünstigen die Vermehrung von Infektionserregern (LAFFERTY et al. 2015, RENO 1998). Daher kommt insbesondere im Süßwasser übertragbaren Infektionserregern in dieser für den Erfolg des Wiederansiedlungsprojekts entscheidenden Lebensphase der Elterntiere eine wesentliche Bedeutung zu.

Maifischzuchtanlage in Aßlar, Deutschland

Die Zuchtpopulation in Aßlar ist mit dem Ziel des Aufbaus einer gesunden und stabilen Elternfischpopulation von Maifischen ein wesentlicher Bestandteil des LIFE+ Projektes. Eine mögliche Eintragsquelle für Infektionserreger in die Zuchtpopulation in Aßlar stellen in besonderem Maße die jährlich in den Bestand

aufgenommenen, französischen Maifischlarven dar. In der Maifischprojektanlage in Bruch befinden sich diese in enger räumlicher Nähe zu den hochgradig mit Infektionserregern belasteten adulten Maifischen (Vergleich Abbildung 5). Abgesehen von Mykobakterien, bei welchen eine horizontale Übertragung nicht ausgeschlossen werden kann (ASHBURNER 1977, CHINABUT 2011), steht bei der Infektion der Maifischlarven im Hinblick auf die nachgewiesenen Infektionserreger bei adulten Maifischen die horizontale Übertragung, beispielsweise über Personal und Gerätschäften, im Vordergrund. Eine Einschleppung und nachfolgende Vermehrung in der Zuchtpopulation in Aßlar ist bei Infektionserregern mit einem monoxenen Lebenszyklus im Süßwasser möglich. Hingegen kommt Infektionserregern mit einem obligat heteroxenen Lebenszyklus, wie beispielsweise *H. alosae* sp. nov. oder den Hemiuridae, keine Bedeutung für die Zuchtpopulation zu. Folglich handelt es sich bei den potentiell relevanten Infektionserregern um die bei den Rückkehren nachgewiesenen Erreger *L. lactis*, Mykobakterien der *M. chelonae/abscessus*-Gruppe, Chlamydiaceae (Epitheliocystis), *S. parasitica,* Trichodinidae, *Chilodonella* sp., Amöben, *Argulus* sp. sowie möglicherweise der nicht näher bestimmbare Kiemenparasit. Für alle genannten Infektionserreger finden sich in der Literatur Belege für durch sie verursachte Krankheitsausbrüche bei Fischen in Aquakultur. Besondere Bedeutung kommt dabei den Mykobakterien zu, da diese Erreger nach einmaliger Einschleppung aufgrund mangelhafter Therapiemöglichkeiten in der Zuchtpopulation in Aßlar persistieren und zu chronischen Verlusten führen würden. Die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens bezüglich der bei den Elternfischen nachgewiesenen Infektionserreger belegen daher eindeutig die große Bedeutung von Prophylaxe- und Hygienemaßnahmen im Rahmen des Projektes. Aufgrund der negativen Ergebnisse der mykologischen, virologischen und parasitologischen Untersuchung sowie des fehlenden Nachweises der zwei pathogenen Bakterien *L. lactis* und Mykobakterien in der Zuchtpopulation in Aßlar ergaben sich während des Untersuchungszeitraums keine Hinweise auf das Vorkommen von den Bestand gefährdenden Infektionserregern. Diese aktuelle Freiheit von relevanten Infektionserregern ist essentiell für eine erfolgreiche Nachzucht. Im Untersuchungszeitraum scheinen die ergriffenen Hygiene- und Desinfektions-

maßnahmen zur Verhinderung der Übertragung von Infektionserregern von den Elterntieren auf die Nachzuchten somit bislang erfolgreich zu sein.

Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für die Wiederansiedlung

Ein Schlüsselelement des LIFE+ Projektes ist neben der bereits dargestellten Etablierung einer Zuchtpopulation in Aßlar der Besatz mit Maifischlarven im Rhein zum Aufbau einer neuen Maifischpopulation. Hierfür ist zu allererst eine stabile Spenderpopulation essentiell. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Hinweise darauf gefunden, dass die untersuchten Maifische aus dem GGD-System eine höhere Anzahl unterschiedlicher Infektionserregertaxa aufwiesen als die untersuchten Maifische aus dem Rhein. Der Unterschied im Infektionserregerspektrum war insbesondere bei Rückkehrern aus dem GGD-System mit 24 verschiedenen Infektionserregertaxa im Vergleich zu neun verschiedenen Infektionserregertaxa bei Rückkehrern aus dem Rhein sehr ausgeprägt. Bei den Erregern, die bei adulten Maifischen aus dem GGD-System, aber nicht bei adulten Maifischen aus dem Rhein nachgewiesenen wurden, handelte es sich beispielsweise um *L. lactis*, Mykobakterien, Chlamydiaceae (Epitheliocystis), *S. parasitica* und alle Ektoparasiten. Diese Infektionserreger sind im Wesentlichen Erreger aus dem Süßwasser, mit welchen sich die Rückkehrer erst bei der Laichwanderung ins GGD-System infiziert haben. Dagegen sind die Prävalenzen sowie das Erregerspektrum von marinen Infektionserregern bei adulten Maifischen aus dem GGD-System und dem Rhein im Wesentlichen vergleichbar. Dieser Unterschied im Infektionserregerspektrum könnte durch unterschiedliche Umwelteinflüsse bedingt sein. Neben den zwei unterschiedlichen Flusssystemen, aus denen die Maifische stammten, wurden die Rückkehrer aus dem GGD-System in der Maifischprojektanlage in Bruch über bis zu 42 Tage im Wasser des Canal latéral à la Garonne gehältert. Mit einigen Infektionserregern könnten sich die Maifische folglich auch erst in dieser neuen Haltungsumwelt infiziert haben. Die Nachweise von Mykobakterien und Chlamydiaceae (Epitheliocystis) bei auf dem Transport verstorbenen Maifischen sowie das Vorkommen der Saprolegniasis ebenfalls bei Maifischen schon auf dem Transport (David Clavé, pers. Komm.) beweisen jedoch, dass die Infektionen der Maifische in diesen Fällen nicht erst in der

Maifischprojektanlage in Bruch, sondern bereits im GGD-System erfolgt sind. Die Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch könnte allerdings die Nachweiswahrscheinlichkeit bestimmter Infektionserreger bei Maifischen aus dem GGD-System erhöht haben. Da eine erhöhte Fischdichte in einem Wasserkörper wie beispielsweise in der Hälterung in Bruch im Vergleich zum GGD-System die Ausbreitung von Infektionserregern begünstigt (RENO 1998), wurden die Prävalenzen und somit die Nachweiswahrscheinlichkeit der im Süßwasser übertragbaren Erreger vermutlich durch die Hälterung positiv beeinflusst. Der fehlende Nachweis dieser Infektionserreger im Rhein könnte somit auch durch eine niedrige Prävalenz im Rhein bedingt sein, weshalb sie wegen der geringen Probenzahl von Maifischen aus dem Rhein (n = 8) nicht nachgewiesen wurden. Trotz dieser Einschränkungen weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf mögliche Unterschiede im Infektionserregerspektrum zwischen adulten Maifischen aus dem GGD-System und dem Rhein hin. Das vermehrte Auftreten von Infektionserregern bei Fischen stellt dabei einen seit langem bekannten Indikator für ungünstige Umweltbedingungen dar (BERG et al. 2013, HALEY et al. 1967, SNIESZKO 1974, SURES et al. 1999). Das bekannteste Beispiel hierfür sind die auch bei Maifischen aus dem GGD-System nachgewiesenen Mykobakteriosen, die in zahlreichen Wildfischpopulationen in hohen Prävalenzen aufgrund von Umweltbelastungen vorkommen (BERG et al. 2013, KANE et al. 2007, STINE et al. 2010, ZERIHUN et al. 2011). In Bezug auf die Maifischspenderpopulation im GGD-System wurde in den letzten Jahren ein deutlicher Populationsrückgang festgestellt (ROUGIER et al. 2012). Der Bestandseinbruch bei den Maifischen korrelierte mit einer deutlichen Veränderung in der Zusammensetzung der Fischspezies in der Gironde, was als Anzeichen signifikanter Änderungen der Umweltbedingungen im Ästuar angesehen wurde (CHEVILLOT et al. 2016). Im GGD-System, insbesondere nahe der Stadt Bordeaux, treten seit dem Jahr 1962 wiederholt Phasen mit sehr niedrigen Sauerstoffsättigungen von 25-40% auf (ETCHEBER et al. 2011). Diese hypoxischen Episoden wurden als Risikofaktoren vor allem im Hinblick auf Wanderfische eingestuft, weshalb ein Monitoringprogramm zur langfristigen Untersuchung möglicher Ursachen begonnen wurde (ETCHEBER et al. 2011). Außerdem sind aufgrund des in der Vergangenheit betriebenen Berg-

baus und der Erzverarbeitung (AUDRY et al. 2004, MASSON et al. 2007, SCHÄFER et al. 2006) sowie neuer Industrien wie Gerbereien und Elektrophorese-Fabriken (GROUSSET et al. 1999) insbesondere die Garonne und die Lot Haupteintragsquellen für Schwermetalle in das Gironde-Ästuar und die Küstenzone. Maifische aus dem GGD-System wurden im Hinblick auf Schwermetalle bislang lediglich auf Quecksilber untersucht, wobei sie im Vergleich mit anderen Fischspezies eine niedrige Belastung aufwiesen (LOCHET et al. 2008). In Aalen aus dem Gironde-Ästuar wurde jedoch eine hohe Belastung mit persistierenden organischen Schadstoffen (z. B. polychlorierte Biphenyle (PCB) oder PBDE) festgestellt (TAPIE et al. 2011). Organochlorierte Pestizide, PCB, Dioxin und PBDE wurden bereits in mittelgradigen Konzentrationen in Maifischen aus dem Fluss Vilaine, Frankreich nachgewiesen (BOCQUENE und ABARNOU 2013). Diese Kombination einer hohen Polykontamination mit organischen und anorganischen Substanzen sowie der phasenweise niedrigen Sauerstoffsättigung könnten die Krankheitsanfälligkeit der Maifische erhöhen und somit eine mögliche Mitursache der relativ hohen Infektionslast bei adulten Maifischen aus dem GGD-System darstellen. Diese Umweltverschmutzung könnte daher eine langfristige Schädigung der Spenderpopulation mit negativen Auswirkungen auf ihre Bestandsentwicklung bedingen.

Eine wesentliche Voraussetzung für erfolgreiche Besatzmaßnahmen sind außerdem gesunde Maifischlarven für die Wiederansiedlung im Rhein. Obgleich im Rahmen der Studie keine Maifischlarven unmittelbar in Bruch untersucht wurden, können sowohl durch die Untersuchung der Elterntiere (hinsichtlich vertikal übertragbarer Erkrankungen), als auch durch die Untersuchung der aus denselben Maifischlarven aus Bruch entstandenen Zuchtpopulation in der Maifischzuchtanlage in Aßlar Rückschlüsse auf den Infektionserregerstatus der Maifischlarven für den Besatz im Rhein gezogen werden. Aus seuchenhygienischer und –rechtlicher Sicht birgt diese Verbringung von Fischlarven mit einem bislang ungeklärten Infektionsstatus über Ländergrenzen hinweg und deren Besatz im Rhein – dem größten Flusssystem Deutschlands – zahlreiche Risiken. Aus seuchenrechtlicher Sicht sind daher die negativen virologischen Untersuchungsergebnisse bezüglich der Erreger in Deutschland anzeigepflichtiger Tierseuchen, nämlich dem VHSV, IHNV, ISAV sowie KHV von entscheidender Bedeutung. Die Ergebnisse der

molekularbiologischen Untersuchung und der Anzucht weisen darauf hin, dass diese Viren in den untersuchten Maifischpopulationen in dem Untersuchungszeitraum von 2012-2014 nicht verbreitet waren. Anhand der erhobenen Ergebnisse lässt sich der Maifisch jedoch nicht als empfängliche Art oder latenter Überträger dieser anzeigepflichtigen Tierseuchen ausschließen, da beispielsweise keine Infektionsversuche durchgeführt wurden. Aus diesem Grund erscheint ein fortgeführtes Monitoring der Elterntiere und Maifischlarven zur Sicherstellung der Freiheit der im Rhein besetzten Maifischlarven von anzeigepflichtigen Tierseuchen sinnvoll. Neben den tierseuchenrechtlichen Aspekten ist die Freiheit der im Rhein besetzten Maifischlarven auch von nicht reglementierten, pathogenen Infektionserregern sowohl für ihre eigene Überlebensrate als auch zum Schutz der im Rhein heimischen Fauna von großer Bedeutung.

Zoonosen

Das zoonotisches Potential einiger nachgewiesener Infektionserreger ist vor allem für die Projektmitarbeiter beider Maifischhaltungsanlagen von Bedeutung. Bei den potentiellen Zoonoseerregern handelt es sich um Mykobakterien (WAGNER und YOUNG 2004), motile Aeromonaden (LEHANE und RAWLIN 2000, PARKER und SHAW 2011) sowie *L. lactis* (CAMPBELL et al. 1993, DURAND et al. 1995, ROSTAGNO et al. 2013). Während *M. salmoniphilum* bislang noch nicht beim Menschen isoliert wurde (TORTOLI 2014), wurden andere Bakterien der *M. chelonae/abscessus*-Gruppe regelmäßig bei Menschen als Ursache von Erkrankungen nachgewiesen (WAGNER und YOUNG 2004).

Nach dem Aufbau einer Maifischpopulation im Rhein sollte das zoonotische Potential der Anisakidae (insbesondere *An. simplex* sensu stricto, *An. pegreffii* und *Hy. aduncum*) beachtet werden (ARIZONO et al. 2012, SANTOS et al. 2005). Bei Verzehr vom rohem, nicht durchgegartem sowie ungenügend gesalzenem, eingelegtem oder geräuchertem Fisch kann es zur einer Infektion des Menschen kommen, der Anisakiasis (BAIRD et al. 2014, CHAI et al. 2005, SAKANARI und MCKERROW 1989).

5.4 Malformationen bei Maifischen der Zuchtpopulation

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung der 0+ Generation der Zuchtpopulation in Aßlar waren die zystische Malformation am Oberkiefer sowie die sich im weiteren Verlauf entwickelnden zahlreichen weiteren Malformationen des Kopfes und Schwanzes die bedeutendsten festgestellten pathologischen Veränderungen. Aufgrund der hohen Prävalenz und des hohen Schweregrades dieser zystischen Malformation sowie der sich hierdurch auch langfristig ergebenden Beeinträchtigung der Fische wird von einer hohen Relevanz dieser Malformation für die Nachzucht von Maifischen in der Aquakultur ausgegangen. Obwohl auch andere *Alosa* spp. im Rahmen von Wiederansiedlungsprojekten gehalten und vermehrt wurden (LEBLANC et al. 2014, MILLER et al. 2010), wurden bei keiner Spezies gleichartige Malformationen beschrieben. Die bei dem Nordamerikanischen Flusshering und der kanadischen Alse beschriebenen nodulären Fibrosen (DIMAGGIO et al. 2015) entsprechen histologisch nicht den bei Maifischen nachgewiesenen Veränderungen. Anhand der durchgeführten Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf eine infektiöse Ätiologie. Als wahrscheinlichste Ursachen für diese Malformationen bei Maifischen wurden in der Literatur Umwelteinflüsse und die Ernährung beschrieben (BOGLIONE et al. 2013). In Bezug auf die Umwelteinflüsse sind beispielsweise die Besatzdichte, hydrodynamische Einflüsse, Wasserparameter oder das Handling relevante Faktoren (BOGLIONE et al. 2013). Bei der Ernährung von Larven können zum Beispiel die Gehalte von Fettsäuren, Phospholipiden, Vitaminen und Mineralien zur Entstehung von Malformationen beitragen (BOGLIONE et al. 2013, MAZURAIS et al. 2008, NGUYEN et al. 2008, ZAMBONINO et al. 1997). Zur Reduktion oder Vermeidung dieser Malformationen durch Optimierung der Haltung und Fütterung besteht daher weiterer Forschungsbedarf. Obwohl der Schwerpunkt dieser Studie auf dem Nachweis und der Bewertung von Infektionserregern lag, wurde durch die Erstbeschreibung der zystischen Malformation bei juvenilen Maifischen eine relevante, nicht infektiöse Problematik für die erfolgreiche Etablierung einer Zuchtpopulation identifiziert.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden bei Maifischen insgesamt 31 verschiedene Infektionserregertaxa nachgewiesen. Für die Bewertung dieser Infektionserregertaxa wurden verschiedene Kriterien herangezogen, welche in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt werden. Zu diesen Kriterien zählen die nachgewiesene und in der Literatur beschriebene Pathogenität eines Erregers, sein Gefährdungspotential für Wild- und Zuchtfischpopulationen sowie sein zoonotisches Potential. Dementsprechend wurden 19 nachgewiesene Infektionserreger als potentiell relevant für das LIFE-Projekt eingestuft. Bei diesen handelt es sich um die Bakterien *L. lactis, M. salmoniphilum*, Mykobakterien der *M. chelonae/ abscessus*-Gruppe, motile Aeromonaden (*Ae. bestarium, Ae. caviae, Ae. media, Ae. sobria, Ae. veronii, Aeromonas* sp.), der Pilz *S. parasitica* sowie die Parasiten der Familie Trichodinidae, *Chilodonella* sp., der nicht identifizierte Kiemenparasit, Amöben, *Argulus* sp., Anisakidae, *H. alosae* sp. nov., *Pronoprymna* sp. und Hemiuridae. *H. alosae* sp. nov. wurde im Rahmen der Studie in der exkretorischen Niere von Maifischen aus dem Rhein und dem GGD-System neu beschrieben. Neben einer möglichen Bedeutung für das Wiederansiedlungsprojekt ist diese Neuentdeckung aus parasitologischer Sicht von großer Bedeutung, da sie die wissenschaftliche Untersuchung einer neuen Etablierung von *Myxozoa* in einer naiven Fischpopulation ermöglicht. Hingegen ergab sich bei den Monogenea weder anhand der Untersuchungsergebnisse noch anhand von Literaturdaten bezüglich *Mazocraes alosae* ein mögliches Gefährdungspotential für das Wiederansiedlungsprojekt. Im Fall der nicht identifizierten Parasitenstadien im Gastrointestinaltrakt wurden ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf infizierte Maifische festgestellt. Eine abschließende Evaluierung der Bedeutung dieser Parasiten ist jedoch erst nach ihrer taxonomischen Zuordnung möglich.

Das höchste Vorkommen von Infektionserregern wurde im Vergleich aller Altersstufen und Fangorte bei adulten Maifischen in Bruch festgestellt, welche zugleich als Spenderpopulation essentiell für den Erfolg des Wiederansiedlungsprojekts sind. Für diese Häufung von Infektionserregern wurden als mögliche Ursachen die Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch sowie eine Umweltbelastung

Tabelle 17: Evaluation der Bedeutung nachgewiesener Infektionserreger
Die Bewertung einer hohen Prävalenz wurde bei in der Hälterung übertragbaren Infektionserregern in Klammern gesetzt, n. b.: nicht beurteilbar, X: trifft zu, x: trifft eingeschränkt zu, -: trifft nicht zu

Infektionserreger	Evaluation der Bedeutung der Infektionserreger für das Wiederansiedlungsprojekt					
	Veränderungen in der anatomisch-pathologische-Untersuchung	Histopathologische Veränderungen	Hohe Prävalenz in der Wildpopulation	Potentielle Zoonose	Mögliche Bedrohung für die Zuchtpopulation	Negativer Einfluss auf Fische in Literatur belegt
Bakterien						
Motile Aeromonaden	X	-	(X)	X	X	X
Lactococcus lactis	-	X	(X)	X	X	X
Mycobacterium chelonae/ abscessus-Gruppe	-	X	(X)	X	X	X
Chlamydiaceae (Epitheliocystis)	-	-	-	-	X	X
Pilze						
Saprolegnia parasitica	X	X	(X)	-	x	X
Parasiten						
Trichodinidae	-	-	(X)	-	x	x
Chilodonella sp.	-	-	(X)	-	x	x
Argulus sp.	x	-	-	-	X	x
Nicht bestimmbarer Kiemenparasit	x	X	-	n. b.	n. b.	n. b.
Amöben	x	X	-	-	X	X
Monogenea	-	-	-	-	-	-*
Pronoprymna sp.	-	-	X	-	-	X
Nicht bestimmbare Parasitenstadien (Gastrointestinaltrakt)	-	-	-	n. b.	n. b.	n. b.
Hemiuridae	-	-	-	-	-	X
Hoferellus alosae sp. nov.	-	x	X	-	-	n. b.
Anisakidae	X	X	X	X	-	x

*Bezogen auf *Mazocraes alosae*

des GGD-Systems angesehen. Unter diesem Gesichtspunkt können die Erkenntnisse, die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens gewonnen wurden, einerseits einen Beitrag zur Aufklärung des Bestandseinbruchs der Maifischpopulation im GGD-System leisten. Andererseits können die Ergebnisse zu einer Verbesserung der Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch und zur Reduktion von als relevant eingestuften Infektionserregern verwendet werden. Hierbei sind insbesondere die sich im Süßwasser der Hälterung rasant ausbreitenden Erreger von großer Bedeutung. Das Ziel einer Behandlung ist dabei, den Infektionsdruck zu senken, die Energiebilanz positiv zu beeinflussen, somit eine Verlängerung der Lebenspanne und im besten Fall eine Optimierung der Reproduktionsleistung zu bewirken. Darüber hinaus können anhand der Ergebnisse dieser Studie gezielte Prophylaxemaßnahmen zur Verhinderung der Einschleppung von Infektionserregern in die Zuchtpopulation in Aßlar ergriffen werden.

Zusammenfassend wird ein fortgesetztes Monitoring von Infektionserregern der Spenderpopulation zum besseren Verständnis des Einflusses der Infektionserreger auf die Elternfische sowie deren bestmögliche Reduzierung als ein wichtiger Bestandteil des Maifisch-Wiederansiedlungsprojekts angesehen. Außerdem wird die Überwachung der für die Wiederansiedlung im Rhein gezüchteten Maifischlarven auf relevante Infektionserreger als eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg des Wiederansiedlungsprojektes angesehen. Obgleich in diesem Forschungsvorhaben kein Virusnachweis erfolgte, wurden Maifische nicht z. B. mittels Infektionsversuch als empfängliche Art für anzeigepflichtige Viren gänzlich ausgeschlossen. Zudem können sporadisch auftretende oder sich neu an den Maifisch adaptierende Infektionserreger durch den Untersuchungszeitraum von drei Jahren unentdeckt geblieben sein und eine bislang unerkannte Gefährdung für die Maifischpopulation darstellen. Daher wird parallel zu den Wiederansiedlungsmaßnahmen eine Fortführung eines ganzheitlichen Monitoring-Ansatzes für Infektionserreger empfohlen, bestehend aus bakteriologischen, mykologischen, virologischen, parasitologischen und histologischen Untersuchungen. Hierbei sollte neben der Wildpopulation ebenfalls die Zuchtpopulation in Aßlar zur Sicherstellung der Erregerfreiheit Ziel der kontinuierlichen veterinärmedizinischen Überwachung sein.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die anadromen Maifische (*Alosa alosa*) sind seit Mitte des 20. Jahrhunderts in Deutschand ausgestorben und sollen im Rahmen der EU-LIFE-Projekte im Rhein wiederangesiedelt werden. Hierfür wurden Rückkehrer der Spenderpopulation aus den französischen Flüssen Garonne und Dordogne gefangen, in der Maifischprojektanlage in Bruch zu Reproduktionszwecken gehältert und die produzierten Maifischlarven im Rhein besetzt. Darüber hinaus wurden Maifische zur Etablierung einer Zuchtpopulation in einer Maifischzuchtanlage in Aßlar, Deutschland gehalten. Die Bedeutung von Infektionserregern für den Erfolg dieses Wiederansiedlungsprojekts wurde bisher noch nicht untersucht.

Daher sollte das Vorkommen von Infektionserregern bei Maifischen mittels bakteriologischer, mykologischer, virologischer, parasitologischer und histologischer Methoden untersucht und ihre Relevanz für das LIFE+ Projekt evaluiert werden. Hierzu wurden in einem Untersuchungszeitraum von 2010-2014 insgesamt 374 Maifische der Wild- und 64 Maifische der Zuchtpopulation in Aßlar untersucht. Bei den verwendeten Wildfischen handelte es sich um adulte Maifische der Spenderpopulation in Bruch (n = 194), im Gironde-Garonne-Dordogne-System (GGD-System) gefangene juvenile (n = 105) sowie im Rhein gefangene adulte (n = 9) und juvenile Maifische (n = 66).

Die Infektionserreger *L. lactis,* Mykobakterien der *M. chelonae/abscessus*-Gruppe, motile Aeromonaden, Chlamydiaceae (Epitheliocystis), Parasiten der Familie Trichodinidae, *Chilodonella* sp., Amöben und *Argulus* sp. wurden erstmals beim Maifisch nachgewiesen. *L. lactis* wurde dabei als Ursache von Endokarditiden im Jahr 2012 bei 16 % (5/31) und 2014 bei 25 % (6/24) der adulten Maifische aus dem GGD-System identifiziert. Außerdem wurde in der exkretorischen Niere eine neue *Myxozoa*-Spezies, *H. alosae* sp. nov., beschrieben. Die Prävalenz lag im GGD-System bei adulten bei 100 % (33/33) (2012-2014) und bei juvenilen Maifischen bei 64 % (14/22) (2013 & 2014). Im Gegensatz dazu lag die Prävalenz im Rhein nur bei 22 % (2/9) bei adulten und bei 0 % (0/26) bei juvenilen Maifischen. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden mittels Anzucht auf acht Zelllinien keine Viren bei Maifischen nachgewiesen. Außerdem verliefen die

durchgeführten PCRs zum Nachweis des Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHSV), des Virus der infektiösen hämorrhagischen Nekrose (IHNV), des Virus der infektiösen Lachsanämie (ISAV), des Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPNV), cyprinide Herpesviren und des Virus der Lymphocystis-Erkrankung (LCDV) negativ. In der Zuchtpopulation wurden bislang keine den Bestand gefährdenden Infektionserreger nachgewiesen, jedoch traten mit einer Prävalenz von 100 % zystische, nicht-infektionsbedingte Malformationen im Kopfbereich juveniler Maifische auf.

Insgesamt wurden von den 31 nachgewiesenen Infektionserregertaxa 19 als mögliche Bedrohung für das Wiederansiedlungsprojekt eingestuft. Zudem wurde eine unterschiedliche Verteilung der Infektionserreger zwischen den untersuchten Wildpopulationen festgestellt, welche vermutlich abhängig von Alter und Herkunft der Maifische war. Mögliche Ursachen für die Altersabhängigkeit sind eine Anreicherung von Parasiten im Laufe des Lebens sowie eine erhöhte Anfälligkeit der Rückkehrer während der Laichwanderung. Die regionalen Unterschiede, bestehend aus einer deutlich höheren Anzahl an Infektionserregertaxa bei Maifischen aus der Garonne und Dordogne im Vergleich zu Maifischen aus dem Rhein, könnten durch die Hälterung in der Maifischprojektanlage in Bruch sowie durch umweltbedingte Einflüsse bedingt sein. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben keine Hinweise auf das Vorkommen relevanter Infektionserreger bei im Rhein besetzten Maifischlarven. Im Hinblick auf die Zuchtpopulation in Aßlar weisen die zystischen Malformationen im Kopfbereich auf eine bislang noch nicht vollständig an die Bedürfnisse juveniler Maifische angepasste Aufzucht unter Aquakulturbedingungen hin. Insgesamt wird eine kontinuierliche, veterinärmedizinische Überwachung der Zucht- und der Spenderpopulation sowie der Maifischlarven für den Besatz im Rhein auf relevante Infektionserreger für einen Erfolg des Wiederansiedlungsprojektes empfohlen.

8 SUMMARY

The anadromous allis shad (*Alosa alosa*), belonging to the family of Clupeidae, is extinct in Germany since the middle of the 20th century. In order to re-introduce allis shad in the Rhine system the EU-LIFE-projects had been started. In the scope of the projects, adult allis shad of a donor population originating from the French rivers Garonne and Dordogne had been kept for reproduction in a fish farm in Bruch and the hatchery-reared juvenile allis shad had been subsequently stocked to the Rhine. The knowledge of occurring diseases is essential to ensure the success of the re-introduction project. To date, extensive studies on infectious diseases of allis shad have not yet been performed.

In this study allis shad should therefore be analyzed for infectious agents by use of bacteriological, mycological, virological, parasitological and histological methods. Afterwards, the relevance and the potential threat of occurring infectious agents should be evaluated for the re-introduction project. Thus, 374 allis shad from the wild and 64 allis shad from the breeding population were examined from 2010-2014. The wild population consisted of adult allis shad of the donor population (n = 194), juvenile allis shad caught in the Gironde-Garonne-Dordogne-system (GGD-system) (n = 105) as well as adult (n = 9) and juvenile (n = 66) allis shad originating from the Rhine.

This is the first report of the infectious agents *L. lactis,* Mycobacteria of the *M. chelonae/abscessus*-group, motile Aeromonads, Chlamydiaceae (Epitheliocystis) parasites of the family Trichodinidae, *Chilodonella* sp., Amoebae and *Argulus* sp. in allis shad. *L. lactis* was identified as causative agent of an endocarditis in 16 % (5/31) and 25 % (6/24) in 2012 and 2014, respectively. Moreover, a new myxozoan species, *H. alosae* sp. nov., was described in the excretory system of the kidneys. The prevalence in allis shad from the GGD-System was 100 % (33/33) in adults (2012-2014) and 64 % (14/22) in juveniles (2013 & 2014). In contrast, the prevalence in allis shad from the Rhine, amounting 22 % (2/9) in adults and 0 % (0/26) in juveniles, was much lower. During the investigation period no viruses were observed by use of cultivation in eight different cell lines. The conducted PCRs for detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV),

infectious hemorrhagic necrosis virus (IHNV), infectious salmon anemia virus (ISAV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), cyprinid herpes viruses and Lymphocystis disease virus (LCDV) were negative. In the breeding population no infectious agents threatening the stock were proven. However, severe, non-infectious malformations developed on the upper jaw in 100 % of juvenile allis shad.

In total, 19 out of 31 proven infectious agents were identified as potential threats for the reintroduction program. Moreover, differences in the distribution of infectious agents between the examined wild populations were discovered. In the wild population the number and prevalence of infectious agents was related to the age and the location of catches. The higher incidence of infectious diseases in adult allis shad could result from an accumulation of parasites throughout life and a high susceptibility of migrating fish. The high burden of infectious diseases in allis shad from the GGD-system in comparison to shad from the Rhine system could be explained by the handling and keeping of fish in the fish farm Bruch, differing population density as well as environmental factors. The results of this study indicated that the potentially relevant infectious agents did not occur in allis larvae which were introduced to the Rhine system. In the breeding population the occurring malformations demonstrate that the rearing conditions in aquaculture not yet completely meet requirements of juvenile shad. A continuous veterinary surveillance assuring the absence of relevant pathogens in the breeding population and optimizing the health and reproduction output of the donor population is regarded as an imperative for the success of the re-introduction program.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ACOLAS, M.-L. und LAMBERT, P. (2016): Life histories of anadromous fishes. In: DAVERAT, F. und MORAIS, P. (eds.). An Introduction to Fish Migration. CRC Press, London. S. 55-77.

ADAMS, M. B. und NOWAK, B. F. (2004): Experimental amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: further evidence for the primary pathogenic role of *Neoparamoeba* sp. (Page, 1987). *Journal of Fish Diseases* **27(2)**, 105-113.

ADL, S. M., SIMPSON, A. G., FARMER, M. A., ANDERSEN, R. A., ANDERSON, O. R., BARTA, J. R., BOWSER, S. S., BRUGEROLLE, G., FENSOME, R. A., FREDERICQ, S., JAMES, T. Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C. E., LEWIS, L. A., LODGE, J., LYNN, D. H., MANN, D. G., MCCOURT, R. M., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E., NERAD, T. A., SHEARER, C. A., SMIRNOV, A. V., SPIEGEL, F. W. und TAYLOR, M. F. (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **52(5)**, 399-451.

AHNE, W. (1985): *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). *Journal of Fish Diseases* **8(2)**, 241-242.

AINSWORTH, A. J. (1992): Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 123-148.

ALAMA-BERMEJO, G., RAGA, J. A. und HOLZER, A. S. (2011): Host-parasite relationship of *Ceratomyxa puntazzi* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) and sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) from the Mediterranean with first data on ceratomyxid host specificity in sparids. *Veterinary parasitology* **182(2-4)**, 181-192.

ALAMA-BERMEJO, G., JIRKŮ, M., KODÁDKOVÁ, A., PECKOVÁ, H., FIALA, I. und HOLZER, A. S. (2016): Species complexes and phylogenetic lineages of *Hoferellus* (Myxozoa, Cnidaria) including revision of the genus: A problematic case for taxonomy. *Parasites & Vectors* **9(13)**.

ALMAÇA, C. (1988): Fish and their environment in large european river ecosystems, Tejo and Guadiana. *Sciences de l´Eau* **7(1)**, 3-18.

ANEER, G. und LJUNGBERG, O. (1976): Lymphocystis disease in Baltic herring (*Clupea harengus* var. membras L.). *Journal of Fish Biology* **8(5)**, 345-350.

APRAHAMIAN, M. W. (1985): The effect of the migration of *Alosa fallax fallax* (Lacépède) into fresh water, on branchial and gut parasites. *Journal of Fish Biology* **27(5)**, 521-532.

APRAHAMIAN, M. W., APRAHAMIAN, C. D., BAGLINIÈRE, J. L., SABATIÉ, R. und ALEXANDRINO, P. (2003): *Alosa alosa* and *Alosa fallax* spp.: Literature review and bibliography. R&D Technical Report W1-014/TR. *Environment Agency*, Bristol. Abgerufen von: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290354/sw1-014-tr-e-e.pdf.

ARIZONO, N., YAMADA, M., TEGOSHI, T. und YOSHIKAWA, M. (2012): *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii:* biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Diseases* **9(6)**, 517-521.

ARMSTRONG, D. P. und SEDDON, P. J. (2008): Directions in reintroduction biology. *Trends in Ecology & Evolution* **23(1)**, 20-25.

ASAHIDA, T., KOBAYASHI, T., SAITOH, K. und NAKAYAMA, I. (1996): Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science* **62(5)**, 727-730.

ASHBURNER, L. D. (1977): Mycobacteriosis in hatchery–confined chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscua* Walbaum) in Australia. *Journal of Fish Biology* **10(6)**, 523-528.

AUDRY, S., SCHÄFER, J., BLANC, G., BOSSY, C. und LAVAUX, G. (2004): Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry* **19(5)**, 769-786.

AUSTIN, B. (1999): The effects of pollution on fish health. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **85(S1)**, 234S-242S.

AUSTIN, B. (2006): The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World JOURNAL* **6**, 931-945.

AUSTIN, B. und AUSTIN, D. A. (2012): Bacterial fish pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish., 5. Auflage. Springer Netherlands, Dordrecht. S. 30-36, 44-46.

AVID (1997): Mykobakterien. Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) - Fachgruppe der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Gießen. S. 1-10.

BABU, V. S., NAMBI, K. S. N., CHANDRA, V., ISHAQ AHMED, V. P., BHONDE, R. und SAHUL HAMEED, A. S. (2011): Establishment and characterization of a fin cell line from Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Diseases* **34(5)**, 355-364.

BAGLINIÈRE, J.-L. und ÉLIE, P. (2000): Les aloses: (*Alosa alosa* et *Alosa fallax* sp.): Écobiologie et variablité des populationes. Editions Quae, Versailles Cedex.

BAGLINIÈRE, J.-L., SABATIÉ, M. R., ROCHARD, E., ALEXANDRINO, P. und APRAHAMIAN, M. W. (2003): The Allis shad *Alosa alosa*: biology, ecology, range and status of populations. *American Fisheries Society Symposium* **35**, 85-102.

BAIRD, F. J., GASSER, R. B., JABBAR, A. und LOPATA, A. L. (2014): Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes* **28(4)**, 167-174.

BAKER, G. C., SMITH, J. J. und COWAN, D. A. (2003): Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55(3)**, 541-555.

BALLOU, J. D. (1993): Assessing the Risks of Infectious Diseases in Captive Breeding and Reintroduction Programs. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **24(3)**, 327-335.

BANDILLA, M., VALTONEN, E., SUOMALAINEN, L., APHALO, P. und HAKALAHTI, T. (2006): A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *International Journal for Parasitology* **36(9)**, 987-991.

BANDILLA, M. (2007): Transmission and host and mate location in the fish louse *Argulus coregoni* and its link with bacterial disease in fish. Dissertation, University of Jyväskylä, Jyväskylä.

BAO, M., MOTA, M., NACHON, D. J., ANTUNES, C., COBO, F., GARCI, M. E., PIERCE, G. J. und PASCUAL, S. (2015a): *Anisakis* infection in allis shad, *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758), and twaite shad, *Alosa fallax* (Lacepede, 1803), from Western Iberian Peninsula Rivers: zoonotic and ecological implications. *Parasitology Research* **114(6)**, 2143-2154.

BAO, M., ROURA, A., MOTA, M., NACHON, D. J., ANTUNES, C., COBO, F., MACKENZIE, K. und PASCUAL, S. (2015b): Macroparasites of Allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*) of the Western Iberian Peninsula Rivers: ecological, phylogenetic and zoonotic insights. *Parasitology Research* **114(10)**, 3721-3739.

BARTA, J. R., MARTIN, D. S., LIBERATOR, P. A., DASHKEVICZ, M., ANDERSON, J. W., FEIGHNER, S. D., ELBRECHT, A., PERKINS-BARROW, A., JENKINS, M.

C., DANFORTH, H. D., RUFF, M. D. und PROFOUS-JUCHELKA, H. (1997): Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* **83(2)**, 262-271.

BARTL, G. und TROSCHEL, H. J. (1997): Historische Verbreitung, Bestandsentwicklung und aktuelle Situation von *Alosa alosa* und *A. fallax* im Rheingebiet. *Zeitschrift für Fischkunde* **4(1/2)**, 119-162.

BARTOSOVA, P., FIALA, I., JIRKU, M., CINKOVA, M., CAFFARA, M., FIORAVANTI, M. L., ATKINSON, S. D., BARTHOLOMEW, J. L. und HOLZER, A. S. (2013): *Sphaerospora* sensu stricto: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **68(1)**, 93-105.

BARZEGAR, M., BOZORGNIA, A., YOUSSEFI, M. R. und HOSSEINIFARD, S. M. (2012): Determination of *Alosa caspia persica* parasites in fresh and brine water of Caspian Sea. *World Journal of Fish and Marine Sciences* **4(2)**, 175-178.

BASSON, L. und VAN AS, J. G. (2006): Trichodinidae and other Ciliophorans (Phylum Ciliophora). In: WOO, P. (ed.). Fish diseases and disorders. Volume 1: Protozoan and metazoan infections. Cab International Wallingford. S. 154-182.

BEAZ-HIDALGO, R. und FIGUERAS, M. J. (2013): *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases* **36(4)**, 371-388.

BEECK, P. (2003): Vorstudie zum möglichen Besatz des Maifisch (*Alosa alosa*) im Rheinsystem. *Unveröffentlichte Studie im Auftrag der HIT Umwelt und Naturschutz Stiftungs GmbH und dem Landesfischereiverband Nordrhein*.

BEECK, P. (2004): Konzeptstudie für ein wissenschaftlich begründetes Programm zur Wiederansiedlung des Maifischs im Rhein. *Unveröffentlichte Studie im Auftrag der Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten*, Recklinghausen, NRW.

BEJAR, J., PORTA, J., BORREGO, J. J. und ALVAREZ, M. C. (2005): The piscine SAF-1 cell line: genetic stability and labeling. *Marine Biotechnology* **7(4)**, 389-395.

BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. und SAYERS, E. W. (2017): GenBank. *Nucleic Acids Research* **45(D1)**, D37-D42.

BERG, V., ZERIHUN, M. A., JORGENSEN, A., LIE, E., DALE, O. B., SKAARE, J. U. und LYCHE, J. L. (2013): High prevalence of infections and pathological

changes in burbot (*Lota lota*) from a polluted lake (Lake Mjosa, Norway). *Chemosphere* **90(5)**, 1711-1718.

BERGMANN, S. M., EINER-JENSEN, K., MORTENSEN, H., ENZMANN, P., LORENZEN, N. und OLESEN, N. (2000): Development and examination of RT-PCR for the identification of VHSV and IHNV in cell culture and fish tissue. *Fourth Annual Meeting of National Reference Laboratories for Fish Diseases*, Brüssel, 26-27. September.

BHATNAGAR, A. und DEVI, P. (2013): Water quality guidelines for the management of pond fish culture. *International Journal of Environmental Sciences* **3(6)**, 1980-2009.

BISSET, K. A. (1947): Bacterial infection and immunity in lower vertebrates and invertebrates. *Journal of Hygiene-Cambridge* **45(2)**, 128-135.

BOCQUENE, G. und ABARNOU, A. (2013): Organochlorinated pesticides, PCBs, dioxins, and PBDEs in grey mullets (*Liza ramada*) and allis shads (*Alosa alosa*) from the Vilaine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research International* **20(2)**, 667-675.

BOGLIONE, C., GISBERT, E., GAVAIA, P., E. WITTEN, P., MOREN, M., FONTAGNÉ, S. und KOUMOUNDOUROS, G. (2013): Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture* **5(s1)**, 121-167.

BOOTLAND, L. M. und LEONG., J.-A. C. (2011): Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, baterial and fungal infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford. S. 66-109.

BORREGO, J. J., VALVERDE, E. J., LABELLA, A. M. und CASTRO, D. (2017): Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **9(2)**, 179-193.

BORRELL, N., ACINAS, S. G., FIGUERAS, M. J. und MARTINEZ-MURCIA, A. J. (1997): Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* **35(7)**, 1671-1674.

BOXSHALL, G. A. (1974): Infections with parasitic copepods in North Sea marine fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **54(2)**, 355-372.

BRAY, R. A. und GIBSON, D. I. (1980): The Fellodistomidae (Digenea) of fishes from the NE Atlantic. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Zoology series)* **37(4)**, 199-293.

BRAY, R. A. (2008): Family Faustulidae Poche, 1926. In: BRAY, R. A. und GIBSON, D. I. (eds.). Keys to the Trematoda. CABI International, London. S. 509-522.

BRUNO, D. W., GRIFFITHS, J., MITCHELL, C. G., WOOD, B. P., FLETCHER, Z. J., DROBNIEWSKI, F. A. und HASTINGS, T. S. (1998): Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory-infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* **33(2)**, 101-109.

BRUNO, D. W., NOWAK, B. und ELLIOTT, D. G. (2006): Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Diseases of Aquatic Organisms* **70(1-2)**, 1-36.

BUCHMANN, K., NIELSEN, T., SIGH, J. und BRESCIANI, J. (2004): Amoebic gill infections of rainbow trout in freshwater ponds. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **24(2)**, 87-91.

BULLER, N. B. (2014): Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals - A Practical Identification Manual, 2. Auflage. CABI, Wallington.

BULLOCKA, G. L. und SNIESZKOA, S. F. (1969): Bacteria in blood and kidney of apparently healthy hatchery trout. *Transactions of the American Fisheries Society* **98(2)**, 268-271.

BURCK, H.-C. (1988): Histologische Technik - Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis, 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

BYKHOVSKAYA-PAVLOVSKAYA, I. E., GUSEV, A. V., DUBININA, M. N., IZYUMOVA, N. A., SMIRNOVA, T. S., SOKOLOVSKAYA, I. L., SHTEIN, G. A., SHUL'MAN, S. S. und EPSHTEIN, V. M. (1964): Key to parasites of freshwater fish of the U.S.S.R. **80**. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem.

BYLUND, G., FAGERHOLM, H. P., CALENIUS, G., WIKGREN, B.-J. und WIKSTRÖM, M. (1980): Parasites of fish in Finland. II. Methodes for studying parasite fauna in fish. *Acta Acamediae Aboensis, Ser. B* **40(2)**.

CAHILL, M. M. (1990): Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* **19(1)**, 21-41.

CAMPBELL, P., DEALLER, S. und LAWTON, J. O. (1993): Septic arthritis and unpasteurised milk. *Journal of Clinical Pathology* **46(11)**, 1057-1058.

CANO, I., FERRO, P., ALONSO, M. C., BERGMANN, S. M., RÖMER-OBERDÖRFER, A., GARCIA-ROSADO, E., CASTRO, D. und BORREGO, J. J. (2006): Development of molecular techniques for detection of lymphocystis

disease virus in different marine fish species. *Journal of Applied Microbiology* **102(1)**, 32-40.

CASSOU-LEINS, F. und CASSOU-LEINS, J. J. (1981): Recherches sur la biologie et I'halieutique des migrateurs de la Garonne et principalement de I'alose, *Alosa alosa* L. Dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

CHAI, J.-Y., MURRELL, K. D. und LYMBERY, A. J. (2005): Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology* **35(11)**, 1233-1254.

CHEN, M. E., HENRY-FORD, D. und GROFF, J. M. (1995): Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health* **7(4)**, 318-326.

CHEN, M. H., HUNG, S. W., SHYU, C. L., LIN, C. C., LIU, P. C., CHANG, C. H., SHIA, W. Y., CHENG, C. F., LIN, S. L., TU, C. Y., LIN, Y. H. und WANG, W. S. (2012): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. *Research in veterinary science* **93(2)**, 581-588.

CHEN, S. N. und KOU, G. H. (1988): Establishment, characterization and application of 14 cell lines from warm-water fish. In: KURODA, Y., KURSTAK, E. und MARAMOROSCH, K. (eds.). Invertebrate and fish tissue culture. Japan Scientific Society Press, Tokyo und Springer Verlag, Berlin. S. 218-227.

CHEVILLOT, X., PIERRE, M., RIGAUD, A., DROUINEAU, H., CHAALALI, A., SAUTOUR, B. und LOBRY, J. (2016): Abrupt shifts in the Gironde fish community: an indicator of ecological changes in an estuarine ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* **549**, 137-151.

CHINABUT, S. (2011): Mycobacteriosis and Nocardiosis. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, baterial and fungal infections, 2. Auflage. CABI Publishing, Wallington. S. 319-340.

CHITWOOD, M. und LICHTENFELS, J. R. (1972): Identification of parasitic metazoa in tissue sections. *Experimental Parasitology* **32(3)**, 407-519.

CHOI, Y. J., BEAKES, G., GLOCKLING, S., KRUSE, J., NAM, B., NIGRELLI, L., PLOCH, S., SHIN, H. D., SHIVAS, R. G., TELLE, S., VOGLMAYR, H. und THINES, M. (2015): Towards a universal barcode of oomycetes - a comparison of the *cox1* and *cox*2 loci. *Molecular Eecology Resources* **15(6)**, 1275-1288.

CHOMCZYNSKI, P. und SACCHI, N. (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1(2)**, 581-585.

CHOUDHURY, T. G., SINGH, S. K., PARHI, J., BARMAN, D. und DAS, B. S. (2014): Common fungal diseases of fish: a review. *Environment and Ecology* **32(2)**, 450-456.

CHRISTIANSEN, J. S., PRÆBEL, K., SIIKAVUOPIO, S. I. und CARSCADDEN, J. E. (2008): Facultative semelparity in capelin *Mallotus villosus* (Osmeridae) - an experimental test of a life history phenomenon in a sub-arctic fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **360(1)**, 47-55.

CHUNG, H. Y., SUNG, H., LEE, M. Y., YOON, N. S., LEE, S. G., SUH, D. J. und KIM, M. N. (2007): A case of bacteremia by *Atopobium rimae* in a patient with liver cirrhosis. *The Korean Journal of Laboratory Medicine* **27(5)**, 351-354.

CIPRIANO, R. C., BULLOCK, G. L. und PYLE, S. W. (1984): *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *United States Department of the Interior*, Washington. Abgerufen von: https://articles.extension.org/sites/default/files/w/1/1e/Aeromonas_hydrophila.pdf.

CLARK, A. E., KALETA, E. J., ARORA, A. und WOLK, D. M. (2013): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26(3)**, 547-603.

CONTE, F. S. (2004): Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* **86(3-4)**, 205-223.

COPLAND, J. W. und WILLOUGHBY, L. G. (1982): The pathology of *Saprolegnia* infections of *Anguilla anguilla* L. elvers. *Journal of Fish Diseases* **5(5)**, 421-428.

CRANE, M. und HYATT, A. (2011): Viruses of fish: An overview of significant pathogens. *Viruses* **3(12)**, 2025-2046.

CROCKFORD, M., JONES, J. B., CRANE, M. S. und WILCOX, G. E. (2005): Molecular detection of a virus, Pilchard herpesvirus, associated with epizootics in Australasian pilchards *Sardinops sagax neopilchardus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **68(1)**, 1-5.

CUNNINGHAM, A. A., FRANK, J. M., CROFT, P., CLARKE, D. und PEARCE-KELLY, P. (1997): Mortality of captive british wartbiter crickets: implications for reintroduction programs. *Journal of Wildlife Diseases* **33(3)**, 673-676.

CUSACK, R. und CONE., D. K. (1986): A review of parasites as vectors of viral and bacterial diseases of fish. *Journal of Fish Diseases* **9(2)**, 169-171.

CZECZUGA, B. und MUSZYNSKA, E. (1997): Aquatic fungi growing on the eggs of some anadromous fish species of the family Clupeidea. *Acta Ichtylogica et Piscatoria* **27(1)**, 83-93.

DANNEVIG, B. H. und THORUD, K. E. (2011): Other viral diseases and agents of cold-water fish: infectious salmon anaemia, pancreas disease, and viral erythrocytic necrosis. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, baterial and fungal infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallington. S. 149-175.

DAOUST, P. Y. und FERGUSON, H. W. (1985): Nodular gill disease: a unique form of proliferative gill disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* **8(6)**, 511-522.

DAOUST, P. Y., LARSON, B. E. und JOHNSON, G. R. (1989): Mycobacteriosis in yellow perch (*Perca flavescens*) from two lakes in Alberta. *Journal of Wildlife Diseases* **25(1)**, 31-37.

DASZAK, P. und CUNNINGHAM, A. A. (1999): Extinction by infection. *Trends in Ecology & Evolution* **14(7)**, 279.

DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A. und HYATT., A. D. (2003): Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* **9(2)**, 141-150.

DAVIDSON, J., GOOD, C., WELSH, C. und SUMMERFELT, S. T. (2014): Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* **59**, 30-40.

DAVIS, J. M., CLAY, H., LEWIS, J. L., GHORI, N., HERBOMEL, P. und RAMAKRISHNAN, L. (2002): Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* **17(6)**, 693-702.

DAWES, B. (1947): The Trematoda of British Fishes. Ray Society, London.

DAYE, P. G. und GARSIDE, E. T. (1976): Histopathologic changes in surficial tissues of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), exposed to acute and chronic levels of pH. *Canadian Journal of Zoology* **54(12)**, 2140-2155.

DE GROOT, S. J. (1990): The former Allis and twaite shad fisheries of the lower Rhine, the Netherlands. *Journal of Applied Ichthyology* **6(4)**, 252-256.

DEAN, T. L. und RICHARDSON, J. (1999): Responses of seven species of native freshwater fish and a shrimp to low levels of dissolved oxygen. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **33(1)**, 99-106.

DECOSTERE, A., HERMANS, K. und HAESEBROUCK, F. (2004): Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology* **99(3-4)**, 159-166.

DELANNOY, C. M., CRUMLISH, M., FONTAINE, M. C., POLLOCK, J., FOSTER, G., DAGLEISH, M. P. und ZADOKS, R. N. (2013): Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiology* **13(1)**, 41.

DEVLAMING, V., GROSSMAN, G. und CHAPMAN, F. (1982): On the use of the gonosomatic index. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **73(1)**, 31-39.

DEZFULI, B. S., PIRONI, F., SHINN, A. P., MANERA, M. und GIARI, L. (2007): Histopathology and ultrastructure of *Platichthys flesus* naturally infected with *Anisakis simplex* S.L. larvae (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology* **93(6)**, 1416-1423.

DIAMANT, A., WHIPPS, C. M. und KENT, M. L. (2004): A new species of Sphaeromyxa (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: morphology, ultrastructure, and phylogeny. *The Journal of Parasitology* **90(6)**, 1434-1442.

DIMAGGIO, M. A., H. J. PINE, L. W. KENTER und D. L. BERLINSKY (2015): Spawning, larviculture, and salinity tolerance of Alewives and Blueback Herring in captivity. *North American Journal of Aquaculture* **77(3)**, 302-311.

DIXON, P. F., FEIST, S., KEHOE, E., KERRY, L., STONE, D. M. und WAY, K. (1997): Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English channel. *Diseases of Aquatic Organisms* **30(2)**, 81-89.

DOBSON, A. und LYLES, A. (2000): Black-footed ferret recovery. *Science* **288(5468)**, 985-988.

DOGIEL, V. A. und BYCHOVSK, B. E. (1939): Parasites of fishes of the Caspian Sea. *Trudy Kompleksnoi Izucheniyu Kaspiiskogo Morya* **7(1)**, 150.

DOHERTY, D. und MCCARTHY, T. K. (2002): Aspects of the ecology, parasites and future conservation of twaite shad (*Alosa fallax*) and allis shad (*Alosa alosa* L.) in south-eastern Ireland. In: JUNGWITH, M., SCHMUTZ, S. und

WEISS, S. (eds.). Freshwater fish conservation - options for the future. Fishing News Books, Vienna. S. 98-112.

DOHERTY, D., O'MAOILÉIDIGH, N. und CARTHY, T. K. M. (2004): The biology, ecology and future conservation of twaite shad (*Alosa fallax* LACÈPÉDE), allis shad (*Alosa alosa* L.) and Killarney shad (*Alosa fallax killarnensis* Tate Regan) in Ireland. *Biology and Environment. Proceedings of the Royal Irish Acadamy* **104B**, 93-102.

DOUCHEMENT, C. (1981): Les Aloses des fleuves français (*Alosa fallax* Lacépède 1803 et *Alosa alosa* Linné, 1758). Biométrie, écobiologie, Autonomie des populations. [The French rivers shad *Alosa fallax* Lacépède, 1803 and *Alosa alosa* Linne, 1758. Biometry, ecobiology: Population autonomy.]. Dissertation, Université des Sciences et Techniques du Languedoc Montpellier, Montpellier.

DULVY, N. K., SADOVY, Y. und REYNOLDS, J. D. (2003): Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and Fisheries* **4(1)**, 25-64.

DURAND, J. M., ROUSSEAU, M. C., GANDOIS, J. M., KAPLANSKI, G., MALLET, M. N. und SOUBEYRAND, J. (1995): *Streptococcus lactis* septicemia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology* **50(1)**, 64-65.

DYKOVÁ, I. und LOM, J. (2004): Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish. A review. *Folia Parasitologica* **51(2/3)**, 81-97.

DYKSTRA, M. J., NOGA, E. J., LEVINE, J. F., MOYE, D. W. und HAWKINS, J. H. (1986): Characterization of the *Aphanomyces* species involved with ulcerative mycosis (UM) in menhaden. *Mycologia* **78(4)**, 664-672.

ECACC (o. J.): Controlled terms of species/strains. *ECACC European Collection of Cell Cultures, CAMR Centre for Applied Microbiology and Research*. Webseite abgerufen von: http://bioinformatics.hsanmartino.it/cldb/descat5.html. Stand: 05.2012.

EDWARD, H. und BROWN, J. R. (1968): Population characteritics and physical conditions of Alewives, *Alosa pseudoharengus*, in a massive dieoff in Lake Michigan, 1967. Technical report 13. *Great Lakes Fishery Commission*. Abgerufen von: http://www.glfc.org/pubs/TechReports/Tr13.pdf.

EFSA (2008): Scientific Opinion of the Panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *The EFSA Journal* **808**, 1-144.

EIFAC (1969a): Water quality criteria for European freshwater fish: water temperature and inland fisheries. *Water Research* **3(8)**, 645-662.

EIFAC (1969b): Water quality criteria for European freshwater fish: extreme pH values and inland fisheries. *Water Research* **3(8)**, 593-611.

EIFAC (1973): Water quality criteria for European freshwater fish: Report on ammonia and inland fisheries. *Water Research* **7(7)**, 1011-1022.

EIFAC (1984): Water quality criteria for European freshwater fish: report on nitrite and freshwater fish. EIFAC technical Paper 46. *European Inland Fisheries and Aquaculture Advisory Commission. EIFAC Working Party on Water Quality Criteria for European Freshwater Fish*. Abgerufen von: http://www.fao.org/docrep/017/ap674e/ap674e.pdf.

EINER-JENSEN, K. (2004): Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of General Virology* **85(5)**, 1167-1179.

EIRAS, J. C., SEGNER, H., WAHLI, T. und KAPOOR, B. G. (2008): Fish Diseases. Science Publishers, Enfield.

EL-MATBOULI, M., FISCHER-SCHERL, T. und HOFFMANN, R. W. (1992): Transmission of *Hoferellus carassii* Achmerov, 1960 to goldfish *Carassius auratus* via an aquatic oligochaete. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **12(2)**, 54-56.

EMMENEGGER, E. J., GLENN, J. A., WINTON, J. R., BATTS, W. N., GREGG, J. L. und HERSHBERGER, P. K. (2014): Molecular identification of erythrocytic necrosis virus (ENV) from the blood of Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Veterinary Microbiology* **174(1-2)**, 16-26.

ENGELSMA, M. Y., WAY, K., DODGE, M. J., VOORBERGEN-LAARMAN, M., PANZARINA, V., ABBADI, M., EL-MATBOULI, M., FRANK SKALL, H., KAHNS, S. und STONE, D. M. (2013): Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. *Diseases of Aquatic Organisms* **107(2)**, 113-120.

ESCHMEYER, W. N. und FONG, J. D. (2016): Catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences, San Francisco.

ETCHEBER, H., SCHMIDT, S., SOTTOLICHIO, A., MANEUX, E., CHABAUX, G., ESCALIER, J. M., WENNEKES, H., DERRIENNIC, H., SCHMELTZ, M., QUÉMÉNER, L., REPECAUD, M., WOERTHER, P. und CASTAING, P. (2011): Monitoring water quality in estuarine environments: lessons from the MAGEST monitoring program in the Gironde fluvial-estuarine system. *Hydrology and Earth System Sciences* **15(3)**, 831-840.

EVANS, J. J., KLESIUS, P. H., GILBERT, P. M., SHOEMAKER, C. A., AL SARAWI, M. A., LANDSBERG, J., DUREMDEZ, R., MARZOUK, A. A. und AL ZENKI, S. (2002): Characterization of β-haemolytic Group B *Streptococcus*

agalactiae in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases* **25(9)**, 505-513.

FATIO, V. (1890): Histoire naturelle des Poissons, Part 2. In. Faune des vertébrés de la Suisse. Volume 5: Poisson. H. Georg, Genêve-Bale.

FERGUSON, H., KONGTORP, R., TAKSDAL, T., GRAHAM, D. und FALK, K. (2005): An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar* L) with observations on myocardial regeneration. *Journal of Fish Diseases* **28(2)**, 119-123.

FERGUSON, H., BJERKAS, E. und EVENSEN, O. (2006a): Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissue responses in teleosts, and their responses in disease, 2. Auflage. Scotian Press, London.

FERGUSON, H., BJERKAS, E. und EVENSEN, O. (2006b): Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissue responses in teleosts, and their responses in disease, 2. Auflage. Scotian Press, London. S. 231-235.

FERNANDEZ, R. D., YOSHIMIZU, M., EZURA, Y. und KIMURA, T. (1993): Comparative Growth Response of Fish Cell Lines in Different Media, Temperatures, and Sodium Chloride Concentrations. *Gyobyo Kenkyu* **28(1)**, 27-34.

FIJAN, N., SULIMANOVIĆ, D., BEARZOTTI, M., MUZINIĆ, D., ZWILLENBERG, L. O., CHILMONCZYK, S., VAUTHEROT, J.-F. und DE KINKELIN, P. (1983): Some properties of the *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de l'Institut pasteur/Virologie* **134(2)**, 207-220.

FINLAYSON, J. E. (1981): The biology of the mazocraeid gill parasites of mackerel, sprat and shad. Dissertation, University of Birmingham, Birmingham.

FISCHER, J. und LINDENMAYER, D. B. (2000): An assessment of the published results of animal relocations. *Biological Conservation* **96(1)**, 1-11.

FRERICHS, G. (1993): Mycobacteriosis: Nocardiosis. In: INGLIS, V., ROBERTS, R. und BROMAGE, N. (eds.). Bacterial diseases of fish. Halsted Press, New York. S. 219-233.

FREYHOF, J. (2002): Freshwater fish diversity in Germany, threats and species extinction. In: COLLARES-PEREIRA, M. J., COELHO, M. M. und COWX, I. G. (eds.). Conservation of freshwater fishes: Options for the future. Fishing News Books, Oxford. S. 3-22.

FREYHOF, J. und KOTTELAT, M. (2008): *Alosa alosa*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T903A13091343*. Abgerufen von: http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T903A13091343.en.

FREYHOF, J. und BROOKS, E. (2011): European red list of freshwater fishes. *Publications office of the European Union*, Luxembourg. Abgerufen von: http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/redlist/downloads/European_freshwater_fishes.pdf.

FRYER, J. L. und SANDERS, J. E. (1981): Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Annual Reviews in Microbiology* **35(1)**, 273-298.

FRYER, J. L. und LANNAN, C. N. (1994): Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods* **16(2)**, 87-94.

FUKUNAGA, H., MURAKAMI, T., GONDO, T., SUGI, K. und ISHIHARA, T. (2002): Sensitivity of Acid-Fast Staining for *Mycobacterium tuberculosis* in Formalin-fixed Tissue. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **166(7)**, 994-997.

GARDINER, C. H., FAYER, R. und DUBEY, J. P. (1988): An atlas of protozoan parasites in animal tissues. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

GARDINER, C. H. und POYNTON, S. L. (1999): An atlas of metazoan parasites in animal tissues. American Registry of Pathology, Washington.

GASIMAGOMEDOV, A. A. (1970): New species of myxosporea in the fishes of the Caspian Sea. [Sbornik Nauchnykh Soobshchenii Kafedry Fiziologii Cheloveka i Zhivomykh Respubliki Dagestan.]. *Makkachkala* **4**, 72-76.

GAUGHAN, D. J., MITCHELL, R. W. und BLIGHT, S. J. (2000): Impact of mortality, possibly due to herpesvirus, on pilchard *Sardinops sagax* stocks along the south coast of Western Australia in 1998-99. *Marine and Freshwater Research* **51(6)**, 601-612.

GAUGHAN, D. J. (2002): Disease-translocation across geographic boundaries must be recognized as a risk even in the absence of disease identification: the case with Australian *Sardinops*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **11(2)**, 113-123.

GAUTHIER, D. T., RHODES, M. W., VOGELBEIN, W. K., KATOR, H. und OTTINGER, C. A. (2003): Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **54(2)**, 105-117.

GAUTHIER, D. T., LATOUR, R. J., HEISEY, D. M., BONZEK, C. F., GARTLAND, J., BURGE, E. J. und VOGELBEIN, W. K. (2008): Mycobacteriosis-associated mortality in wild striped bass (*Morone saxatilis*) from Chesapeake Bay, USA. *Ecological Applications* **18(7)**, 1718-1727.

GAUTHIER, D. T. und RHODES, M. W. (2009): Mycobacteriosis in fishes: a review. *The Veterinary Journal* **180(1)**, 33-47.

GEPHARD, S. und MENEMY, J. M. (2004): An overview of the program to restore Atlantic salmon and other diadromous fishes to the Connecticut River with notes on the current status of these species in the river. *American Fisheries Society Monograph* **9**, 287-317.

GÉRARD, C., HERVÉ, M., RÉVEILLAC, E. und ACOU, A. (2016): Spatial distribution and impact of the gill-parasitic *Mazocraes alosae* (Monogenea Polyopisthocotylea) on *Alosa alosa* and *A. fallax* (Actinopterygii, Clupeidae). *Hydrobiologia* **763(1)**, 371-379.

GÉRARD, C., HERVÉ, M., GAY, M., BOURGAU, O., FEUNTEUN, E., ACOU, A. und RÉVEILLAC, E. (2017): Metazoan parasite communities in *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758) and *Alosa fallax* (Lacépède, 1803)(Clupeidae) from North-East Atlantic coastal waters and connected rivers. *Parasitology Research*, 1-20.

GIBSON, D. (2004): WoRMS taxon details: *Rhadinorhynchus pristis* (Rudolphi, 1802). *World Register of Marine Species (WoRMS)*. Webseite abgerufen von: http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=100642, Letzte Aktualisierung: 21.Dezember 2004. Stand: 03.2018.

GIBSON, D. I. und BRAY, R. A. (1979): The Hemiuroidea: terminology, systematics and evolution. *Bulletin of the British Museum (Natural History)* **36(2)**, 35-146.

GIBSON, D. I. und BRAY, R. A. (1986): The Hemiuridae (Digenea) of fishes from the north-east Atlantic. *Bulletin of the British Museum (Natural History)* **51(1)**, 1-125.

GIESEKER, C. M., SERFLING, S. G. und REIMSCHUESSEL, R. (2006): Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **253(1-4)**, 120-129.

GLENNAC, J. A., EMMENEGGERA, E. J., GRADYB, C. A., ROON, S. R., GREGG, J. L., CONWAY, C. M., WINTON, J. R. und HERSHBERGER, P. K. (2012): Kinetics of viral and erythrocytic inclusion body formation in Pacific Herring artificially infected with erythrocytic necrosis virus. *Journal of Aquatic Animal Health* **24(3)**, 195-200.

GOLVAN, Y. J. (1969): Systematique des Acanthocéphales. Ordre Palaeacanthocephala. *Memoirs du Museum d'Histoire Naturelle Paris, Ser. A., Zool. N. S* **57**, 1-373.

GOMEZ-CASADO, E., ESTEPA, A. und COLL, J. M. (2011): A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* **29(15)**, 2657-2671.

GOYACHE, J., VELA, A. I., GIBELLO, A., BLANCO, M. M., BRIONES, V., GONZALEZ, S. und FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. (2001): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals-Dispatches. *Emerging Infectious Disease* **7(5)**, 884-886.

GRAVELL, M. und MALSBERGER, R. G. (1965): A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Annals of the New York Academy of Sciences* **126(1)**, 555-565.

GREGORI, M., AZNAR, F. J., ABOLLO, E., ROURA, A., GONZALEZ, A. F. und PASCUAL, S. (2013): *Nyctiphanes couchii* as intermediate host for *Rhadinorhynchus* sp. (Acanthocephala, Echinorhynchidae) from NW Iberian Peninsula waters. *Diseases of Aquatic Organisms* **105(1)**, 9-20.

GROTMOL, S., TOTLAND, G. K., THORUD, K. und HJELTNES, B. K. (1997): Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus. Diseases of Aquatic Organisms* **29(2)**, 85-97.

GROUSSET, F. E., JOUANNEAU, J. M., CASTAING, P., LAVAUX, G. und LATOUCHE, C. (1999): A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **48(3)**, 401-414.

GRYGIEL, W. (1999): Synoptic survey of pathological symptoms in herring (*Clupea harengus*) and sprat (*Sprattus sprattus*) in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **56(2)**, 169-174.

HAENEN, O. L. M., MLADINEO, I., KONECNY, R., YOSHIMIZU, M., GROMAN, D., MUÑOZ, P., SARAIVA, A., BERGMANN, S. M. und BEURDEN, S. J. V. (2012): Diseases of eels in an international perspective: Workshop on Eel Diseases at the 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Split, Croatia, 2011. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **32(3)**, 109-115.

HAIRSTON, N. G. und BOHONAK, A. J. (1998): Copepod reproductive strategies: life-history theory, phylogenetic pattern and invasion of inland waters. *Journal of Marine Systems* **15(1-4)**, 23-34.

HALEY, R., DAVIS, S. P. und HYDE, J. M. (1967): Environmental stress and *Aeromonas liquefaciens* in American and threadfin shad mortalities. *The Progressive Fish-Culturist* **29(4)**, 193.

HALL, L. J., ANDERSON, R. und ALDEN, R. I. (2002): A ten year summary of concurrent ambient water column and sediment toxicity tests in the Chesapeake Bay watershed: 1990–1999. *Environmental Monitoring and Assessment* **76(3)**, 311-352.

HALLETT, S. L. und DIAMANT, A. (2001): Ultrastructure and smallsubunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* **46(3)**, 197-212.

HAN, S., LIU, Y., ZHOU, Z., HE, S., CAO, Y., SHI, P., YAO, B. und RINGØ, E. (2010): Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquaculture Research* **42(1)**, 47-56.

HANSON, L., DISHON, A. und KOTLER, M. (2011): Herpesviruses that infect fish. *Viruses* **3(11)**, 2160-2191.

HASSELMAN, D. J. und LIMBURG, K. E. (2012): Alosine restoration in the 21st Century: Challenging the status quo. *Marine and Coastal Fisheries* **4(1)**, 174-187.

HASTINGS, T., OLIVIER, G., CUSACK, R., BRICKNELL, I., NYLUND, A., BINDE, M., MUNRO, P. und ALLAN, C. (1999): Infectious salmon anaemia. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **19(6)**, 286-288.

HATAI, K. und HOSHIAI, G. (1992): Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases* **28(4)**, 532-536.

HAUCK, A. K. und MAY, E. B. (1977): Histopathological alterations associated with *Anisakis* larvae in pacific Hering from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases* **13(3)**, 290-293.

HAUPT, H., LUDWIG, G., GRUTTKE, H., BINOT-HAFKE, M., OTTO, C. und PAULY, A. (2009): Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands. Band 1: Wirbeltiere. Naturschutz Biologische Vielfalt **70**. Bundesamt für Naturschutz, Bonn-Bad Godesberg.

HAUTEKÈETE, N.-C., PIQUOT, Y. und DIJK., H. V. (2001): Investment in survival and reproduction along a semelparity–iteroparity gradient in the *Beta* species complex. *Journal of Evolutionary Biology* **14(5)**, 795-804.

HECKERT, R. A., ELANKUMARAN, S., MILANI, A. und BAYA, A. (2001): Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *Journal of Clinical Microbiology* **39(2)**, 710-715.

HEINIGER, H. und ADLARD, R. D. (2013): Molecular identification of cryptic species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxosporea: Bivalvulida) including the description of eight novel species from apogonid fishes (Perciformes: Apogonidae) from Australian waters. *Acta Parasitologica* **58(3)**, 342-360.

HENRY, H. (1913): A summary of the blood parasites of British Sea fish. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **18(1)**, 218-223.

HERLICH, H. (1956): A digestion method for post-mortem recovery of nematodes from ruminants. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **23(2)**, 102-103.

HERSHBERGER, P. K., ELDER, N. E., GRADY, C. A., GREGG, J. L., PACHECO, C. A., GREENE, C., RICE, C. und MEYERS, T. R. (2009): Prevalence of viral erythrocytic necrosis in Pacific herring and epizootics in Skagit Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Aquatic Animal Health* **21(1)**, 1-7.

HERSHBERGER, P. K., LEEUW, B. K., GREGG, J. L., GRADY, C. A., LUJAN, K. M., GUTENBERGER, S. K., PURCELL, M. K., WOODSON, J. C., WINTON, J. R. und PARSLEY, M. J. (2010): Amplification and transport of an endemic fish disease by an introduced species. *Biological Invasions* **12(11)**, 3665-3675.

HETRICK, F. M. (1984): DNA viruses associated with diseases of marine and anadromous fish. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **37**, 289-307.

HETRICK, F. M. und HEDRICK, R. P. (1993): New viruses described in finfish from 1988-1992. *Annual Review of Fish Diseases* **3**, 187-207.

HOLZER, A. S., SOMMERVILLE, C. und WOOTTEN, R. (2004): Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology* **34(10)**, 1099-1111.

HOSTNIK, P., BARLIC-MAGANJA, D., STRANCAR, M., JENCIC, V., TOPLAK, I. und GROM, J. (2002): Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods. *Diseases of Aquatic Organisms* **52(3)**, 179-184.

HUNDT, M., SCHARBERT, A., WEIBEL, U., KUHN, G., METZNER, K., JATTEAU, P., PIES, A., SCHULZ, R. und GERGS, R. (2015): First evidence of natural reproduction of the Allis shad *Alosa alosa* in the River Rhine following re-introduction measures. *Journal of Fish Biology* **87(2)**, 487-93.

HUSSEIN, M. und HATAI, K. (2002): Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. *Fisheries Science* **68(5)**, 1067-1072.

HYATT, A. D., HINE, P. M., JONES, J. B., WHITTINGTON, R. J., KEARNS, C., WISE, T. G., CRANE, M. S. und WILLIAMS, L. M. (1997): Epizootic mortality in the pilchard *Sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995. II. Identification of a herpesvirus within the gill epithelium. *Diseases of Aquatic Organisms* **28(1)**, 17-29.

ILOUZE, M., DAVIDOVICH, M., DIAMANT, A., KOTLER, M. und DISHON, A. (2010): The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecological Research* **26(5)**, 885-892.

ITIS (2018): *Aeromonas liquefaciens.* Taxonomic Serial No.: 78. *Integrated Taxonomic Information System (ITIS).* Webseite abgerufen von: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=78#null, Letzte Aktualisierung: 21. Oktober 2018. Stand: 10.2018.

ITOI, S., ABE, T., WASHIO, S., IKUNO, E., KANOMATA, Y. und SUGITA, H. (2008): Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology* **125(2)**, 214.

ITOI, S., YUASA, K., WASHIO, S., ABE, T., IKUNO, E. und SUGITA, H. (2009): Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology* **107(3)**, 867-874.

IUCN/SSC (2013): Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. *IUCN Species Survival Commission*, Gland. Abgerufen von: https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/2013-009.pdf.

JACOBS, J. M., HOWARD, D. W., RHODES, M. R., NEWMAN, M. W., MAY, E. B. und HARRELL, R. M. (2009): Historical presence (1975-1985) of mycobacteriosis in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis. Diseases of Aquatic Organisms* **85(3)**, 181-186.

JANDA, J. M. und ABBOTT, S. L. (1998): Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* **27(2)**, 332-344.

JANDA, J. M. und ABBOTT, S. L. (2010): The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* **23(1)**, 35-73.

JOLLY, M. T., MAITLAND, P. S. und GENNER, M. J. (2011): Genetic monitoring of two decades of hybridization between allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*). *Conservation Genetics* **12(4)**, 1087-1100.

JONES, J. B., HYATT, A. D., HINE, P. M., WHITTINGTON, R. J., GRIFFIN, D. A. und BAX, N. J. (1997): Australasian pilchard mortalities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13(4)**, 383-392.

JONSSON, B., WAPLES, R. S. und FRIEDLAND., K. D. (1999): Extinction considerations for diadromous fishes. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **56(4)**, 405-409.

JOYEUX, C. und BAER, J. G. (1936): Faune de France 30. Cestodes. Lechevalier et fils, Paris.

KABATA, Z. (1964): *Clavellisa emarginata* (Krøyer, 1873): Morphological study of a parasitic copepod. *Crustaceana* **7(1)**, 1-10.

KABATA, Z. (1979): Parasitic copepoda of British Fishes. *The Royal Society, London* **152**, 409-410.

KANE, A. S., STINE, C. B., HUNGERFORD, L., MATSCHE, M., DRISCOLL, C. und BAYA, A. M. (2007): Mycobacteria as environmental portent in Chesapeake Bay fish species. *Emerging infectious diseases* **13(2)**, 329-331.

KENNEDY, C. R. (1978): The biology, specificity and habitat of the species of *Eubothrium* (Cestoda: Pseudophyllidea), with reference to their use as biological tags: a review. *Journal of Fish Biology* **12(5)**, 393-410.

KENNEDY, C. R. (1981): The occurance of *Eubothrium fragile* (Cestoda: Pseudophyllidae) in twaite shad, *Alosa fallax* (Lacépéde) in the River Severn. *Journal of Fish Biology* **19(2)**, 171-177.

KENT, M. und FOURNIE, J. (1993): Importance of marine fish diseases - an overview. In: COUCH, J. und FOURNIE, J. (eds.). Pathobiology of marine estuarine organisms. CRC Press, Boca Raton. S. 1-24.

KENT, M., ANDREE, K., BARTHOLOMEW, J., EL-MATBOULI, M., DESSER, S., DEVLIN, R., FEIST, S., HEDRICK, R., HOFFMANN, R., KHATTRA, J., HALLETT, S., LESTER, R., LONGSHAW, M., PALENZEULA, O., SIDDALL, M. und XIAO, C. (2001): Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48(4)**, 395-413.

KENT, M. L., SAWYER, T. K. und HEDRICK, R. P. (1988): *Paramoeba pemaquidensis* (Sarcomastigophora, Paramoebidae) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Diseases of Aquatic Organisms* **5**, 163-169.

KENT, M. L., KHATTRA, J., HERVIO, D. M. L. und DEVLIN, R. H. (1998a): Ribosomal DNA sequence analyses of isolates of the PKX myxosporean

and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health* **10(1)**, 12-21.

KENT, M. L., TRAXLER, G. S., KIESER, D., RICHARD, J., DAWE, S. C., SHAW, R. W., PROSPERI-PORTA, G., KETCHESON, J. und EVELYN, T. P. T. (1998b): Survey of salmonid pathogens in ocean-caught fishes in British Columbia, Canada. *Journal of Aquatic Animal Health* **10(2)**, 211-219.

KENT, M. L., WHIPPS, C. M., MATTHEWS, J. L., FLORIO, D., WATRAL, V., BISHOP-STEWART, J. K., POORT, M. und BERMUDEZ, L. (2004): Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **138(3)**, 383-390.

KHAN, R. A., BARRETT, M. und MURPHY, J. (1980): Blood parasites of fish from the northwestern Atlantic Ocean. *Canadian Journal of Zoology* **58(5)**, 770-781.

KIBENGE, F. S., GARATE, O. N., JOHNSON, G. R., ARRIAGADA, R., KIBENGE, M. J. und WADOWSKA, D. (2001): Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* **45(1)**, 9-18.

KIBENGE, F. S., MUNIR, K., KIBENGE, M. J., JOSEPH, T. und MONEKE, E. (2004): Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Animal Health Research Reviews* **5(1)**, 65-78.

KIM, B. J., LEE, S. H., LYU, M. A., KIM, S. J., BAI, G. H., KIM, S. J., CHAE, G. T., KIM, E. C., CHA, C. Y. und KOOK, Y. H. (1999): Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology* **37(6)**, 1714-1720.

KLIMPEL, S. und RÜCKERT, S. (2005): Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. *Parasitology Research* **97(2)**, 141-149.

KLINGER, H. (2011): The re-introduction of Allis shad (*Alosa alosa*) in the Rhine system. Final Report Life project LIFE06 NAT/D//000005. *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in NRW (LANUV)*, Kirchhundem-Albaum. Abgerufen von: http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n_proj_id=3121&docType=pdf.

KNÜSEL, R., BERGMANN, S. M., EINER-JENSEN, K., CASEY, J., SEGNER, H. und WAHLI, T. (2007): Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *Journal of Fish Diseases* **30(9)**, 559-568.

KOCH, J. D. und QUIST, M. C. (2010): Current status and trends in shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*) management and conservation. *Journal of Applied Ichthyology* **26(4)**, 491-498.

KOCK, R. A., WOODFORD, M. H. und ROSSITER, P. B. (2010): Disease risks associated with the translocation of wildlife. *Revue Scientifique et Technique* **29(2)**, 329.

KØIE, M. (1993): Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology* **71(7)**, 1289-1296.

KØIE, M., KARLSBAKK, E. und NYLUND, A. (2007): *Parvicapsula bicornis* n. sp. and *P. limandae* n. sp. (Myxozoa, Parvicapsulidae) in Pleuronectidae (Teleostei, Heterosomata) from Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms* **76(2)**, 123-129.

KONGTORP, R. T., KJERSTAD, A., TAKSDAL, T., GUTTVIK, A. und FALK, K. (2004): Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a new infectious disease. *Journal of Fish Diseases* **27(6)**, 351-358.

KOZIŃSKA, A. (2007): Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Diseases* **30(5)**, 293-301.

KUCHTA, R., HANZELOVÁ, V., SHINN, A. P., PODDUBNAYA, L. G. und SCHOLZ, T. (2005): Redescription of *Eubothrium fragile* (Rudoilphi, 1802) and *E. rugosum* (Batsch, 1786) (Cestoda Pseusophyllidae) parasites of fish in the Holoarctic Region. *Folia Parasitologica* **52**, 251-260.

KUSUDA, R. und KIMURA, H. (1978): Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails *Seriola* spp.: the fate of *Streptococcus* sp. bacteria after inoculation. *Journal of Fish Diseases* **1(1)**, 109-114.

KUSUDA, R. und SALATI, F. (2011): *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Baterial and Fungal Infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford. S. 303-317.

LAFFERTY, K. D., HARVELL, C. D., CONRAD, J. M., FRIEDMAN, C. S., KENT, M. L., KURIS, A. M., POWELL, E. N., RONDEAU, D. und SAKSIDA, S. M. (2015): Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science* **7**, 471-496.

LAG (2003): Extraktion von Virus-DNA. AM013. *Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik*. Abgerufen von: http://www.lag-gentechnik.de/dokumente/uam-methoden/013.pdf.

LAG (2006): Identifizierung von Bakterien durch Sequenzierung der 16S-rDNA – Amplifikate. *Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)* **(AM020)**.

LAMBERT, P., MARTIN VANDEMBULCKE, D., ROCHARD, E., BELLARIVA, J. L. und CASTELNAUD, G. (2001): Âge à la migration de reproduction des géniteurs de trois cohortes de grande aloses (*Alosa alosa*) dans le bassin versant de la Garonne (France). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **362-363**, 973-987.

LANGDON, J. S., GUDKOVS, N., HUMPHREY, J. D. und SAXON, E. C. (1985): Deaths in Australian freshwater fishes associated with *Chilodonella hexasticha* infection. *Australian Veterinary Journal* **62(12)**, 409-413.

LANUV (2016): Schutz und Wiederherstellung der Bestände des Maifischs in den Einzugsgebieten der Gironde und des Rheins. LANUV-Fachbericht 70. LIFE09 NAT/DE/000008. *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV)*, Rechlinghausen. Abgerufen von: https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuvpubl/3_fachberichte/FB70%20Maifisch_D_web.pdf.

LARSEN, A. H., BRESCIANI, J. und BUCHMANN, K. (2002): Interactions between ecto- and endoparasites in trout *Salmo trutta*. *Veterinary Parasitology* **103(1)**, 167-173.

LEAO, S. C., TORTOLI, E., EUZEBY, J. P. und GARCIA, M. J. (2011): Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61(9)**, 2311-2313.

LEBLANC, M., STEVENS, J. und LICHTER, J. (2014): American Shad Habitat Plan. *Maine Department of Marine Resources, Sea-Run Fisheries Division*, Augusta. Abgerufen von: http://www.asmfc.org/files/ShadHabitatPlans/AmShadHabitatPlan_ME.pdf.

LEHANE, L. und RAWLIN, G. T. (2000): Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. *The Medical Journal of Australia* **173(5)**, 256-259.

LEONARD, J. B. und MCCORMICK, S. D. (1999): Effects of migration distance on whole-body and tissue-specific energy use in American shad (*Alosa sapidissima*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56(7)**, 1159-1171.

LESTER, R. J. G. und ROUBAL, F. R. (2006): Phylum Arthropoda. In: WOO, P. T. K. (ed.). Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections., 2. Auflage. CABI Publisher, Wallingford. S. 475-598.

LIMBURG, K. E. und WALDMAN, J. R. (2009): Dramatic Declines in North Atlantic Diadromous Fishes. *BioScience* **59(11)**, 955-965.

LIVIERI, T. M. (2011): Black-footed ferret recovery in North America. In: SOORAE, P. S. (ed.). Global Re-introduction Perspectives: 2011. More case studies from around the globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, Gland und Environment Agency-Abu Dhabi (UAE), Abu Dhabi, Gland. S. 157-164. Abgerufen von: https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2011-073.pdf.

LOCHET, A., MAURY-BRACHET, R., POIRIER, C., TOMÁS, J., LAHAYE, M., APRAHAMIAN, M. und ROCHARD, E. (2008): Mercury contamination and life history traits of Allis shad *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758) and Twaite shad *Alosa fallax* (Lacépède, 1803) in the Gironde estuary (South West France). *Hydrobiologia* **602**, 99-109.

LOM, J. und ARTHUR, J. R. (1989): A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases* **12(2)**, 151-156.

LOM, J. und DYKOVÁ, I. (1992): Protozoan parasites of fishes. Developments in Aquaculture and Fisheries Sciene **26**. Elsevier Science, Amsterdam.

LOM, J. und DYKOVÁ, I. (2006): Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* **53(1)**, 1-36.

LÖNNSTRÖM, L., WIKLUND, T. und BYLUND, G. (1994): *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus membras* with eye lesions. *Diseases of Aquatic Organisms* **18(2)**, 143-147.

LYLES, A. M. und MAY, R. M. (1987): Problems in leaving the ark. *Nature* **326**, 245-246.

MACHIDA, M. und KURAMOCHI, T. (2003): Digenean trematodes from clupeid fishes of the genus *Amblygaster* of Japan and the neighboring waters. *Bulletin of the National Science Museum, Series A, Zoology* **29(1)**, 1-6.

MACMILLAN, J. R. und MULCAHY, D. (1979): Artificial transmission to and susceptibility of Puget Sound fish to viral erythrocytic necrosis (VEN). *Journal of the Fisheries Board of Canada* **36(9)**, 1097-1101.

MARGOLIS, L. und CHING, H. L. (1965): Review of the trematode genera *Bacciger* and *Pentagramma* (Fellodistomatidae) and description of *P. petrowi*

(Layman, 1930) n. comb. from marine fishes from the Pacific coast of Canada. *Canadian Journal of Zoology* **43(2)**, 381-405.

MARKEVICH, A. P. (1956): Parasitic copepods of fishes of the USSR. Izdatelstvo Akademii nauk Ukrainskoi SSR, Kiev.

MARKOWSKI, S. (1937): Über die Entwicklungsgeschichte und Biologie des Nematoden *Contracaecum aduncum* (Rudolphi, 1802). *Pols. Akad. Umiej.* **2(227)**.

MARKUSSEN, T., DAHLE, M. K., TENGS, T., LØVOLL, M., FINSTAD, Ø. W., WIIK-NIELSEN, C. R., GROVE, S., LAUKSUND, S., ROBERTSEN, B. und RIMSTAD, E. (2013): Sequence Analysis of the Genome of Piscine Orthoreovirus (PRV) Associated with Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS ONE* **8(7)**, e70075.

MARTIN, J., ROUGEMONT, Q., DROUINEAU, H., LAUNEY, S., JATTEAU, P., BAREILLE, G., BERAIL, S., PÉCHEYRAN, C., FEUNTEUN, E., ROQUES, S., CLAVÉ, D., NACHÓN, D. J., ANTUNES, C., MOTA, M., RÉVEILLAC, E. und DAVERAT, F. (2015): Dispersal capacities of anadromous Allis shad population inferred from a coupled genetic and otolith approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **72(7)**, 991-1003.

MARTY, G. D., HULSON, P. J. F., MILLER, S. E., QUINN II, T. J., MOFFITT, S. D. und MERIZON, R. A. (2010): Failure of population recovery in relation to disease in Pacific herring. *Diseases of Aquatic Organisms* **90(1)**, 1-14.

MASSER, M. P., RAKOCY, J. und LORSORDO, T. M. (1999): Recirculating aquaculture tank production systems. SRAC Publication No. 452. *Southern Regional Aquaculture Center, USA*. Abgerufen von: http://aqua.ucdavis.edu/DatabaseRoot/pdf/452RFS.PDF.

MASSON, M., SCHAFER, J., BLANC, G. und PIERRE, A. (2007): Seasonal variations and annual fluxes of arsenic in the Garonne, Dordogne and Isle Rivers, France. *The Science of the total environment* **373(1)**, 196-207.

MATCHETT, M. R., BIGGINS, D. E., CARLSON, V., POWELL, B. und ROCKE, T. (2010): Enzootic plague reduces black-footed ferret (*Mustela nigripes*) survival in Montana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **10(1)**, 27 - 35.

MATHEWS, F., MORO, D., STRACHAN, R., GELLING, M. und BULLER, N. (2006): Health surveillance in wildlife reintroductions. *Biological Conservation* **131(2)**, 338-347.

MATTIUCCI, S., FARINA, V., CAMPBELL, N., MACKENZIE, K., RAMOS, P., PINTO, A. L., ABAUNZA, P. und NASCETTI, G. (2008): *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic

identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research* **89(2)**, 146-151.

MAZURAIS, D., DARIAS, M. J., GOUILLOU-COUSTANS, M. F., LE GALL, M. M., HUELVAN, C., DESBRUYÈRES, E., QUAZUGUEL, P., CAHU, C. und ZAMBONINO-INFANTE, J. L. (2008): Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294(2)**, R520-R527.

MCALLISTER, P. E., NEWMAN, M. W., SAUBER, J. H. und OWENS, W. J. (1984): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (serotype Ab) from diverse species of estuarine fish. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **37**, 317-328.

MCCALLUM, H. und DOBSON, A. (1995): Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* **10(5)**, 190-194.

MENNESSON-BOISNEAU, C. und BOISNEAU, P. (1990): Migration, répartition, reproduction, caractéristiques biologiques et taxonomie des aloses (*Alosa* sp.) dans le bassin de la Loire. Dissertation, University of Rennes I, Paris XII Val de Marne.

MENNESSON-BOISNEAU, C., APRAHAMIAN, C. D., SABATIÉ, R. und CASSOU-LEINS, F. (2000a): Remontée migratoire des adultes. In: BAGLINIÈRE, J. L. und ELIE, P. (eds.). Les aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp.): Écobiologie et variabilité des populationes. Institut National de la Recherche Agronomique-Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris. S. 55-72.

MENNESSON-BOISNEAU, C., APRAHAMIAN, C. D., SABATIÉ, R. und CASSOU-LEINS, F. (2000b): Charactéristiques des adultes. In: BAGLINIÈRE, J. L. und ELIE, P. (eds.). Les aloses (*Alos alosa* et *Alosa fallax* spp.): Écobiologie et variabilité des populations. Edition Quae. S. 33-53.

MEYERS, T. R., HAUK, A. K., BLANKENBECKLER, W. D. und MINICUCCI, T. (1986): First report of viral erythrocytic necrosis in Alaska, USA, associated with epizootic mortality in Pacific herring, *Clupea harengus pallasi* (Valenciennes). *Journal of Fish Diseases* **9(6)**, 479-491.

MEYERS, T. R., SHORT, S., LIPSON, K., BATTS, W. N., WINTON, R. J., WILCOCK, J. und BROWN, E. (1994): Association of viral haemorrhagic septicaemia virus with epizootic haemorrhages of the skin in Pacific herring *Clupea harengus pallasi* from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* **19(1)**, 27-37.

MILLER, L. M., DAVID, W., SHIELS, A. L., HENDRICKS, M. L., SADZINSKI, R. A. und LEMON, D. (2010): Migratory fish management and restoration plan

for the Susquehanna River Basin. *Susquehanna River Anadromous Fish Restoration Cooperative (SRAFRC)*, Annapolis. Abgerufen von: https://www.fws.gov/northeast/susquehannariver/pdf/FinalSRAFRCRestorationPlan.pdf.

MILLER, T. A., RAPP, J., WASTLHUBER, U., HOFFMANN, R. W. und ENZMANN, P. J. (1998): Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Diseases of Aquatic Organisms* **34(1)**, 13-20.

MIYAZAKI, T., ROGERS, W. A. und SEMMENS., K. J. (1988): Gastrointestinal histopathology of paddlefish, *Polyodon spathula* (Walbaum), infected with larval *Hysterothylacium dollfusi* Schmidt, Leiby & Kritsky, 1974. *Journal of Fish Diseases* **11(3)**, 245-250.

MJAALAND, S., RIMSTAD, E., FALK, K. und DANNEVIG, B. H. (1997): Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *Journal of Virology* **71(10)**, 7681-7686.

MLADINEO, I. und POLJAK, V. (2014): Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic commercial fish species. *Applied and Environmental Microbiology* **80(4)**, 1281-1290.

MÖLLER, H. und ANDERS, K. (1983): Krankheiten und Parasiten der Meeresfische. Verlag Heino Möller, Kiel.

MOLNÁR, K., BUCHMANN, K. und SZÉKELY, C. (2006): Phylum Nematoda. In: WOO, P. T. K. (ed.). Fish diseases and disorders. Volume 1: Protozoan and metazoan infections. CABI Publishing, Wallington. S. 417-443.

MONETTE, S., DALLAIRE, A. D., MINGELBIER, M., GROMAN, D., UHLAND, C., RICHARD, J. P., PAILLARD, G., JOHANNSON, L. M., CHIVERS, D. P., FERGUSON, H., LEIGHTON, F. A. und SIMKO, E. (2006): Massive mortality of common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in the St. Lawrence River in 2001: diagnostic investigation and experimental induction of lymphocytic encephalitis. *Veterinary Pathology Online* **43(3)**, 302-310.

MORAVEC, F. (2004): Some aspects of the taxonomy and biology of dracunculoid nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica* **51(1)**, 1-13.

MORTENSEN, H. F., HEUER, O. E., LORENZEN, N., OTTE, L. und OLESEN, N. J. (1999): Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Research* **63(1-2)**, 95-106.

MOSHU, A. J. und TROMBITSKY, I. D. (2006): New parasites (Apicomplexa, Cnidospora) of some Clupeidae fishes from the Danube and Dniestr Basins. *Eco-TIRAS International Environmental Association of River Keepers. Leo Berg Educational Foundation. Academician Leo Berg -103 Collection of Scientific Articles*, 95-103.

MOTA, M. und ANTUNES, C. (2011): First report on the status of Allis shad (*Alosa alosa*) in the Minho River (Northwestern Iberian Peninsula). *Journal of Applied Ichthyology* **27(s3)**, 56-59.

MOTA, M., BIO, A., BAO, M., PASCUAL, S., ROCHARD, E. und ANTUNES, C. (2015): New insights into biology and ecology of the Minho River Allis shad (*Alosa alosa* L.): contribution to the conservation of one of the last European shad populations. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **25(2)**, 395-412.

MULISCH, M. und ULRICH, W. (2010): Romeis-Mikroskopische Technik., 18. Auflage. Springer-Spektrum, Heidelberg. S. 556.

MUNRO, E. S. und MIDTLYNG, P. J. (2011): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, baterial and fungal infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford. S. 1-48.

MURRAY, A. G., O'CALLAGHAN, M. und JONES, B. (2001): Simple models of massive epidemics of herpesvirus in Australian (and New Zealand) pilchards. *Environment International* **27(2)**, 243-248.

MYERS, G. S. (1949): Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia* **2(2)**, 89-97.

NCBI (o. J.): BLAST® Basic Local Alignment Search Tool. *National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine*. Webseite abgerufen von: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Stand: 03.2018.

NEITZEL, D. A., ELSTON, R. A. und ABERNETHY, C. S. (2004): Prevention of prespawning mortality: cause of salmon headburns and cranial lesions. PNNL-14748. *Pacific Northwest National Laboratory*, Richland. Abgerufen von: https://www.pnnl.gov/main/publications/external/technical_reports/PNNL-14748.pdf.

NEUDECKER, T. und DAMM, U. (2005): Maifische an der deutschen Nordseeküste-zum Auftreten von Finte (*Alosa fallax*) und Alse (*Alosa alosa*). *Informationen aus der Fischereiforschung* **52(1)**, 43-50.

NEUKIRCH, M., BÖTTCHER, K. und SUMRARN., B. (1999): Isolation of a virus from koi with altered gills. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **19(5)**, 221-224.

NEWMAN, M. (1985): Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Leaflet No. 22. Viral erythrocytic necrosis. *ICES Working Group on the Pathology and Diseases of Marine Organisms*, Copenhagen. Abgerufen von: http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20no%2022.pdf.

NGUYEN, V. T., SATOH, S., HAGA, Y., FUSHIMI, H. und KOTANI, T. (2008): Effect of zinc and manganese supplementation in Artemia on growth and vertebral deformity in red sea bream (*Pagrus major*) larvae. *Aquaculture* **285(1-4)**, 184-192.

NICKOL, B. B. (2006): Phylum Acanthocephala. In: WOO, P. T. K. (ed.). Fish diseases and disorders. Volume 1: Protozoan and metazoan infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford. S. 444-465.

NIKOLIC, N., BAGLINIÈRE, J. L., RIGAUD, C., GARDES, C., MASQUILIER, M. L. und TAVERNY, C. (2011): Bibliometric analysis of diadromous fish research from 1970s to 2010: a case study of seven species. *Scientometrics* **88(3)**, 929-947.

NMFS, NCWRC, SCDNR und FWS (2017): Santee Basin diadromous fish restoration plan. *National Marine Fisheries Service (NMFS), North Caronlina Wildlife Resource Commission (NCWRC), South Carolina Department of Natural Resources (SCDNR), U.S. Fish and Wildlife Service (FWS)*. Abgerufen von: http://www.dnr.sc.gov/fish/pdf/SanteeBasinDiadromousFishRestorationPlan.pdf.

NOBLE, A. C., HERMAN, R. L., NOGA, E. J. und BULLOCK, G. L. (1997): Recurrent amoebic gill infestation in rainbow trout cultured in a semiclosed water recirculation system. *Journal of Aquatic Animal Health* **9(1)**, 64-69.

NOGA, E. J., WRIGHT, J. F., LEVINE, J. F., DYKSTRA, M. J. und HAWKINS, J. H. (1991): Dermatological diseases affecting fishes of the Tar-Pamlico estuary, North Carolina. *Diseases of Aquatic Organisms* **10(2)**, 87-92.

NOGA, E. J. (1993): Fungal diseases of marine and estuarine fish. In: COUCH, J. A. und FOURNIE, J. W. (eds.). Pathobiology of marine and estuarine organisms. CRC Press, Boca Raton. S. 85-110.

NOGA, E. J. (2010): Fish disease: Diagnosis and treatment, 2. Auflage. Wiley-Blackwell, Ames. S. 269-270.

NOGUEIRA, C. L., SIMMON, K. E., CHIMARA, E., CNOCKAERT, M., PALOMINO, J. C., MARTIN, A. und LEAO, S. C. (2015): *Mycobacterium franklinii* sp.

nov., a species closely related to members of the *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65(7)**, 2148-2153.

NOGUERA, P., COLLINS, C., BRUNO, D., PERT, C., TURNBULL, A., MCINTOSH, A., LESTER, K., BRICKNELL, I., WALLACE, S. und COOK, P. (2009): Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Diseases of Aquatic Organisms* **87(3)**, 199-215.

NOLET, B. A., BROEKHUIZEN, S., DORRESTEIN, G. M. und RIENKS, K. M. (1997): Infectious diseases as main causes of mortality to beavers *Castor fiber* after translocation to the Netherlands. *Journal of Zoology* **241(1)**, 35-42.

NORRIS, D. E. und OVERSTREET, R. M. (1976): The public health implications of larval *Thynnesceris* Nematodes from seafish. *Journal of Milk and Food Technology* **39(1)**, 47-54.

NOWAK, B. F. und LAPATRA, S. E. (2006): Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases* **29(10)**, 573-588.

NYLUND, A., DEVOLD, M., MULLINS, J. und PLARRE, H. (2002): Herring (*Clupea harengus*): a host for infectious salmon anemia virus (ISAV). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **22(5)**, 311-318.

OAKWOOD, M. (2004): Death after sex. *Biologist* **51(1)**, 5-8.

OIE und IUCN (2014): Guidelines for wildlife disease risk analysis. *World Organisation for Animal Health (OIE) in Zusammenarbeit mit der IUCN und der Species Survival Commission*, Paris. Abgerufen von: https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-006.pdf.

OIE (2018a): Aquatic Animal Health Code. Chapter 10.10.: Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus. *World Organisation for Animal Health (OIE)*. Abgerufen von: http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_vhs.htm.

OIE (2018b): Aquatic Animal Health Code. Chapter 10.2.: Infection with *Aphanomyces invadans* (Epizootic ulcerative syndrome). *World Organisation for Animal Health (OIE)*. Abgerufen von: http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_aphanomyces_invadans.htm.

OIE (2018c): Aquatic Animal Health Code. Chapter 10.6.: Infection with infectious haematopoietic necrosis virus. *World Organisation of Animal Health (OIE)*. Abgerufen von: http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_ihn.htm.

OIE (2018d): Aquatic Animal Health Code. Chapter 10.4.: Infection with infectious salmon anaemia virus. *World Organisation of Animal Health (OIE)*. Abgerufen von: http://www.oie.int/index.php?id=171&L=0&htmfile=chapitre_isav.htm.

OKAMURA, B., GRUHL, A. und BARTHOLOMEW, J. L. (2015): Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Springer International Publishing, Cham.

ÖRLEY, L. (1882): XXX.-Report on the nematodes in the possession of the British Museum, with a review of the classification of the order. *Journal of Natural History* **9(52)**, 301-318.

OVERSTREET, R. M., JOVONOVICH, J. und MA, H. (2009): Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integrative and Comparative Biology* **49(2)**, 127-141.

OVERTON, A. S., MARGRAF, F. J., WEEDON, C. A., PIEPER, L. H. und MAY, E. B. (2003): The prevalence of mycobacterial infections in striped bass in Chesapeake Bay. *Fisheries Management and Ecology* **10(5)**, 301-308.

PALACIOS, G., LOVOLL, M., TENGS, T., HORNIG, M., HUTCHISON, S., HUI, J., KONGTORP, R.-T., SAVJI, N., BUSSETTI, A. V., SOLOVYOV, A., KRISTOFFERSEN, A. B., CELONE, C., STREET, C., TRIFONOV, V., HIRSCHBERG, D. L., RABADAN, R., EGHOLM, M., RIMSTAD, E. und LIPKIN, W. I. (2010): Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS ONE* **5(7)**, e11487.

PAPERNA, I. (1977): Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata,* Sparidae) and grey mullets (*Liza ramada,* Mugilidae). *Aquaculture* **10(2)**, 169-176.

PAPERNA, I. und VAN AS, J. G. (1983): The pathology of *Chilodonella hexasticha* (Kiernik). Infections in cichlid fishes. *Journal of Fish Biology* **23(4)**, 441-450.

PARISI, B. (1910): *Sphaerospora caudata* n. sp. *Zoologischer Anzeiger* **36**, 253-254.

PARKER, J. L. und SHAW, J. G. (2011): *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection* **62(2)**, 109-118.

PEDLEY, S., BARTRAM, J., REES, G., DUFOUR, A. und COTRUVO, J. A. (2013): Pathogenic mycobacteria in water: A guide to public health consequences, monitoring and management. IWA Publishing, London. S. 36.

PEELER, E. J., OIDTMANN, B. C., MIDTLYNG, P. J., MIOSSEC, L. und GOZLAN, R. E. (2010): Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Invasions* **13(6)**, 1291-1303.

PÉRES-BOTE, J. L. (2005): First record of *Lernaea cyprinacea* on the allis shad. *Folia Biologica (Kraków)* **53(3-4)**, 197-198.

PÉREZ, T., BALCAZAR, J. L., PEIX, A., VALVERDE, A., VELAZQUEZ, E., DE BLAS, I. und RUIZ-ZARZUELA, I. (2011): *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61(8)**, 1894-1898.

PHILLIPS, A. J., ANDERSON, V. L., ROBERTSON, E. J., SECOMBES, C. J. und VAN WEST, P. (2008): New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* **16(1)**, 13-19.

PICKERING, A. D. (1993): Growth and stress in aquaculture. *Aquaculture* **111(1)**, 51-63.

PLOCH, S., CHOI, Y. J., ROST, C., SHIN, H. D., SCHILLING, E. und THINES, M. (2010): Evolution of diversity in Albugo is driven by high host specificity and multiple speciation events on closely related *Brassicaceae. Molecular Phylogenetics and Evolution* **57(2)**, 812-820.

PLUMB, J. A., SCHACHTE, J. H., GAINES, J. L., PELTIER, W. und CARROLL, B. (1974): *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society* **103(2)**, 358-361.

PLUMB, J. A. (1978): Epizootiology of channel catfish virus disease. *Marine Fisheries Review* **40(3)**, 26-29.

PODOLSKA, M. (2003): Infection of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992–1999: a statistical analysis using generalized linear models. *ICES Journal of Marine Science* **60(1)**, 85-93.

POSCHLOD, P. (2015): Geschichte der Kulturschaft: Entstehungsursachen und Steuerungsfaktoren der Entwicklung der Kulturlandschaft, Lebensraum- und Artenvielfalt in Mitteleuropa. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

POXTON, M. G. und ALLOUSE, S. B. (1982): Water quality criteria for marine fisheries. *Aquacultural Engineering* **1(3)**, 153.

PROTASOVA, E. N. (1977): Essentiels of Cestodology. Volume: VIII Botriocephali - Taenia - Helminthes of Fishes. Nauka, Moscow. S. 298.

PU, Z. Y., DOBOS, M., LIMSOWTIN, G. K. Y. und POWELL, I. B. (2002): Integrated polymerase chain reaction based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus. Journal of Applied Microbiology* **93(2)**, 353-361.

PUCKRIDGE, J. T., WALKER, K. F., LANGDON, J. S., ALEY, C. D. und EAKS, G. W. B. (1989): Mycotic dermatitis in a freshwater gizzard shad, the bony bream, *Nematalosa erebi* (Günther), in the River Murray, South Australia. *Journal of Fish Diseases* **12**, 205-221.

PUNT, A. (1941): Recherches sur quelques Nématodes Parasites de Poissons de la Mer du Nord. *Mémoires de musée Royal D'Histoire Naturelle de Belgique* **98**, 110.

PURSLEY, M. G. und WOLTERS, W. R. (1994): Effect of total water hardness and chloride on survival, growth, and feed conversion of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* **25(3)**, 448-453.

QUIGNARD, J. P. und DOUCHEMENT, C. L. (1991): Clupeidea, Anguillidae. In: HOESTLANDT, H. (ed.). The freshwater fishes of Europe. AULA-Verlag Wiesbaden. S. 89-126.

RASBAND, W. S. (o. J.): ImageJ. *U. S. National Institutes of Health*. Webseite abgerufen von: https://imagej.nih.gov/ij/. Stand:1997-2015.

REIMSCHUESSEL, R. (2008): General fish histopathology. In: EIRAS, J. C., SEGNER, H., WAHLI, T. und KAPOOR, D. G. (eds.). Fish diseases. Science Publishers, Enfield. S. 1-40.

REITE, O. B. und EVENSEN, O. (2006): Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology* **20(2)**, 192-208.

RENO, P., PHILIPPON-FRIED, M., NICHOLOSON, B. L. und SHERBURNE, S. (1978a): Piscine Erythrocytic Necrosis (PEN), a viral infection of the atlantic Cod and other Marine fishes. MFR Paper 1336. *Marine Fisheries Review* **40(10)**, 16-18.

RENO, P. W., PHILIPPON-FRIED, M., NICHOLSON, B. L. und SHERBURNE, S. W. (1978b): Ultrastructural studies of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* **35(1)**, 148-154.

RENO, P. W. (1998): Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health* **10(2)**, 160-171.

REYNOLDS, J. D., WEBB, T. J. und HAWKINS, L. A. (2005): Life history and ecological correlates of extinction risk in European freshwater fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62(4)**, 854-862.

RHODES, M. W., KATOR, H., KOTOB, S., VAN BERKUM, P., KAATTARI, I., VOGELBEIN, W., FLOYD, M. M., BUTLER, W. R., QUINN, F. D., OTTINGER, C. und SHOTTS, E. (2001): A unique *Mycobacterium* species isolated from an epizootic of striped bass (*Morone saxatilis*). *Emerging Infectious Disease* **7(5)**, 896-899.

RICHARDS, R. H. und PICKERING, A. D. (1979): Changes in serum parameters of *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* L.. *Journal of Fish Diseases* **2(3)**, 197-206.

RIEDE, K. (2004): Global register of migratory species: from global to regional scales: final report of the R&D-Projekt 808 05 081. *Federal Agency for Nature Conservation*, Bonn. Abgerufen von: https://d-nb.info/ 970973322/04.

RIMSTAD, E. und MJAALAND, S. (2002): Infectious salmon anemia virus: an orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon. *APMIS* **110(4)**, 273-282.

ROBERTS, R. J. (1993): Ulcerative dermal necrosis (UDN) in wild salmonids. *Fisheries Research* **17(1-2)**, 3-14.

ROBERTS, R. J. und PEARSON., M. D. (2005): Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28(7)**, 383-390.

ROBERTS, R. J. (2012): Fish Pathology, 4. Auflage. Wiley-Blackwell, Oxford.

ROCK, L. F. und NELSON, H. M. (1965): Channel catfish and gizzard shad mortality caused by *Aeromonas liquefaciens. The Progressive Fish-Culturist* **27(3)**, 138-141.

ROLLAND, J. B. (2004): Studies of factors affecting the epizootiology of infectious salmon anemia (ISA). Dissertation. Dept. of Biology, University of Bergen, Bergen.

ROSS, A. J., EARP, B. und WOOD, J. W. (1959): Mycobacterial infections in adult salmon and steelhead trout returning to the Columbia River Basin and other areas in 1957. Special Scientific Report - Fisheries No. 332. *United States Department of Interior, Fish and Wildlife Service*. Abgerufen von: https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/legacy-pdfs/SSRF332.pdf.

ROSTAGNO, C., PECILE, P. und STEFANO, P. L. (2013): Early *Lactococcus lactis* endocarditis after mitral valve repair: a case report and literature review. *Infection* **41(4)**, 897-899.

ROTHMANN, S. (1968): A bacterial Disease of the American shad (*Alosa sapidissima*). Dissertation, Oregon State University, Corvallis.

ROTTMANN, R. W., FRANCIS-FLOYD, R. und DURBOROW, R. (1992): The role of stress in fish disease. SRAC Publication No. 474. *Southern Regional Aquaculture Center*. Abgerufen von: https://appliedecology.cals.ncsu.edu/wp-content/uploads/474.pdf.

ROUGIER, T., LAMBERT, P., DROUINEAU, H., GIRARDIN, M., CASTELNAUD, G., CARRY, L., APRAHAMIAN, M., RIVOT, E. und ROCHARD, E. (2012): Collapse of Allis shad, *Alosa alosa*, in the Gironde system (southwest France): environmental change, fishing mortality, or Allee effect? *ICES Journal of Marine Science* **69(10)**, 1802-1811.

SABATIÉ, M.-R. (1993): Recherches sur l´Écologie et la Biologie des Aloses au Maroc (*Alosa alosa* Linné, 1758 et *Alosa fallax* LACEPEDE, 1803): Exploitation et Taxinomie des Populations atlantiques, Bioecologie des Aloses de l'Oued Sebou. Dissertation. Université de Bretagne Occidentale.

SAKANARI, J. A., REILLY, C. A. und MOSER, M. (1983): Tubercular lesions in Pacific coast populations of striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society* **112(4)**, 565-566.

SAKANARI, J. A. und MCKERROW, J. H. (1989): Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **2(3)**, 278-284.

SALGADO-MIRANDA, C. (2006): Infectious pancreatic necrosis: an emerging disease in Mexican trout culture. *Veterinaria Mexico* **37(4)**, 467-477.

SAMALECOS, C. (1986): Analysis of the structure of fish lymphocystis disease virions from skin tumours of *Pleuronectes*. *Archives of Virology* **91(1-2)**, 1-10.

SANTAMARINA, M. T., TOJO, J. L., GESTIDO, J. C., LEIRO, J. L., UBEIRA, F. M. und SANMARTIN, M. L. (1994): Experimental infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae). *Japanese Journal of Parasitology* **43(3)**, 187-192.

SANTOS, A. T., SASAL, P., VERNEAU, O. und LENFANT, P. (2005): A method to detect the parasitic nematodes from the family Anisakidae, in *Sardina pilchardus,* using specific primers of 18 S DNA gene. *European Food Research and Technology* **222(1-2)**, 71-77.

SAWYER, T. K., HNATH, J. G. und CONRAD, J. F. (1974): *Thecamoeba hoffmani* sp. n. (Amoebida: Thecamoebidae) from gills of fingerling salmonid fish. *The Journal of Parasitology* **60(4)**, 677-682.

SCHÄFER, J., BLANC, G., AUDRY, S., COSSA, D. und BOSSY, C. (2006): Mercury in the Lot–Garonne River system (France): Sources, fluxes and anthropogenic component. *Applied Geochemistry* **21(3)**, 515-527.

SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D. und FISCHER, W. (1985): Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov.. *Systematic and Applied Microbiology* **6(2)**, 183-195.

SCHMIDT-POSTHAUS, H., BREITENMOSER-WÖRSTEN, C., POSTHAUS, H., BACCIARINI, L. und BREITENMOSER, U. (2002): Causes of mortality in reintroduced eurasian lynx in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases* **38(1)**, 84-92.

SCHMIDT-POSTHAUS, H. und WAHLI, T. (2015): Host and environmental influences on development of disease. In: OKAMURA, B., GRUHL, A. und BARTHOLOMEW, J. L. (eds.). Myxozoan evolution, ecology and development. Springer International Publishing, Cham.

SCHUBERT, R. H. W. (1962): Zur Technik der Differenzierung von Vibrionen und Pseudomonaden mit dem Vibriostatikum O/129. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung 1* **184**, 560-561.

SCOTT, M. E. (1988): The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Conservation Biology* **2(1)**, 40-56.

SEDDON, P. J., ARMSTRONG, D. P. und MALONEY, R. F. (2007): Developing the science of reintroduction biology. *Conservation Biology* **21(2)**, 303-12.

SEGNER, H., SUNDH, H., BUCHMANN, K., DOUXFILS, J., SUNDELL, K. S., MATHIEU, C., RUANE, N., JUTFELT, F., TOFTEN, H. und VAUGHAN, L. (2011): Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry* **38(1)**, 85-105.

SEQME (o. J.). *SEQme s.r.o.* Webseite abgerufen von: https://www.seqme.eu/en/. Stand: 2012-2018.

SHERBURNE, S. W. (1977): Occurrence of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in the blood of the anadromous Alewife, *Alosa pseudoharengus*, from Maine coastal streams. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **34(1)**, 281-286.

SILVA, J. P., TOLAND, J., NOTTINGHAM, S., JONES, W., ELDRIDGE, J., HUDSON, T., HEPPNER, K., MCGLYNN, D. und THÉVIGNOT, C. (2015): LIFE and freshwater fish. *Publications Office of the European Union*, Luxembourg. Abgerufen von: http://ec.europa.eu/environment/life/publications/lifepublications/lifefocus/documents/fish.pdf.

SINDERMANN, C. J. (1984): Disease in marine aquaculture. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **37(1-4)**, 505-532.

SINGHAL, N., KUMAR, M., KANAUJIA, P. K. und VIRDI, J. S. (2015): MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6(Artikel 791)**, 1-6.

SINGHAL, R. N., JEET, S. und DAVIES, R. W. (1990): The effects of argulosis-saprolehniasis on the growth and production of *Cyprinus carpio*. *Hydrobiologia* **202(1-2)**, 27-31.

SITJÀ-BOBADILLA, A. und ALVAREZ PELLITERO, P. (2001): *Leptotheca sparidarum* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from cultured common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48(6)**, 627-639.

SKERRATT, L. F., BERGER, L., SPEARE, R., CASHINS, S., MCDONALD, K. R., PHILLOTT, A. D., HINES, H. B. und KENYON, N. (2007): Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* **4(2)**, 125-134.

SKRIWAN, C., FAJARDO, M., HAGELE, S., HORN, M., WAGNER, M., MICHEL, R., KROHNE, G., SCHLEICHER, M., HACKER, J. und STEINERT, M. (2002): Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *International Journal of Medical Microbiology* **291(8)**, 615-624.

SMAIL, D. A. und SNOW, M. (2011): Viral haemorrhagic septicaemia. In: WOO, P. T. K. und BRUNO, D. W. (eds.). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, baterial and fungal infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford. S. 110-142.

SMITH, K. F., SAX, D. F. und LAFFERTY, K. D. (2006): Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology* **20(5)**, 1349-1357.

SNIESZKO, S. F. (1974): The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* **6(2)**, 197-208.

SOORAE, P. S. (2011): Global Re-introduction Perspectives: 2011. More case studies from around the globe. *IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, Gland und Environment Agency-Abu Dhabi (UAE), Abu Dhabi*. Abgerufen von: https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2011-073.pdf.

SOSA, E. R., LANDSBERG, J. H., STEPHENSON, C. M., FORSTCHEN, A. B., VANDERSEA, M. W. und LITAKER, R. W. (2007): *Aphanomyces invadans* and ulcerative mycosis in estuarine and freshwater fish in Florida. *Journal of Aquatic Animal Health* **19(1)**, 14-26.

SPEARE, D. J. (1999): Nodular gill disease (amoebic gill infestation) in char, *Salvelinus alpinus. Journal of Comparative Pathology* **121(3)**, 277-282.

SPROSTON, N. G. (1946): A synopsis of the monogenetic trematodes. *The Transactions of the Zoological Society of London* **25(4)**, 185-600.

SREDL, M. J., AKINS, C. M., KING, A. D., SPRANKLE, T., JONES, T. R., RORABAUGH, J. C., JENNINGS, R. D., PAINTER, C. W., CHRISTMAN, M. R., CHRISTMAN, B. L., CRAWFORD, C., SERVOSS, J. M., KRUSE, C. G., BARNITZ, J. und TELLES, A. (2011): Re-introductions of Chiricahua leopard frogs in southwestern USA show promise, but highlight problematic threats and knowledge gaps. In: SOORAE, P. S. (ed.). Global Re-introduction Perspectives: 2011. More case studies from around the globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, Gland und Environment Agency-Abu Dhabi (UAE), Abu Dhabi. S. 85-90. Abgerufen von: https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2011-073.pdf.

ST-HILAIRE, S., RIBBLE, C. S., STEPHEN, C., ANDERSON, E., KURATH, G. und KENT, M. L. (2002): Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada. *Aquaculture* **212(1)**, 49-67.

STENCE, C. P., BALDWIN, M. W. und HORNE, A. N. (2017): American shad restoration in three Maryland rivers. F-57-R Segment 18 Progress Report. *Maryland Department of Natural Resources, Fishing and Boating Services*, Stevensville. Abgerufen von: https://dnr.maryland.gov/fisheries/Documents/F-57_American_Shad.pdf.

STEPHENS, E. B., NEWMAN, M. W., ZACHARY, A. L. und HETRICK, F. M. (1980): A viral aetiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *Journal of Fish Diseases* **3(5)**, 387-98.

STERUD, E., FORSETH, T., UGEDAL, O., POPPE, T. T., JØRGENSEN, A., BRUHEIM, T., FJELDSTAD, H. und MO, T. A. (2007): Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmona*e (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms* **77(3)**, 191-198.

STINE, C. B., KANE, A. S. und BAYA, A. M. (2010): Mycobacteria isolated from Chesapeake Bay fish. *Journal of Fish Diseases* **33(1)**, 39-46.

STRIDE, M. C., POLKINGHORNE, A., MILLER, T. L., GROFF, J. M., LAPATRA, S. E. und NOWAK, B. F. (2013): Molecular characterisation of '*Candidatus* Parilichlamydia carangidicola', a novel *Chlamydia*-like epitheliocystis agent in Yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes), and the proposal of a new family, '*Candidatus* Parilichlamydiaceae' fam. nov. (Order *Chlamydiales*). *Applied and Environmental Microbiology* **79(5)**, 1590-1597.

STRIDE, M. C., POLKINGHORNE, A. und NOWAK., B. F. (2014): Chlamydial infections of fish: diverse pathogens and emerging causes of disease in aquaculture species. *Veterinary Microbiology* **171(1)**, 258-266.

SURES, B., SIDDALL, R. und TARASCHEWSKI, H. (1999): Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitology Today* **15(1)**, 16-21.

SUZUKI, M., NAKAGAWA, Y., HARAYAMA, S. und YAMAMOTO, S. (2001): Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51(5)**, 1639-1652.

SVOBODOVÁ, Z., LLOYD, R., MÁCHOVÁ, J. und VYKUSOVÁ, B. (1993): Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper No. 54. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, Rome. Abgerufen von: http://www.fao.org/docrep/009/t1623e/t1623e00.htm.

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., POLESZCZUK, G., HŮDA, J., HAMÁČKOVÁ, J. und KROUPOVÁ, H. (2005): Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Veterinaria Brno* **74(1)**, 129-137.

TAKSDAL, T., DANNEVIG, B. H. und RIMSTAD, E. (2001): Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **21(5)**, 214-219.

TAPIE, N., MENACH, K. L., PASQUAUD, S., ELIE, P., DEVIER, M. H. und BUDZINSKI, H. (2011): PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* **83(2)**, 175-185.

TAVERNY, C. (1991): Pêche, Biologie, Écologie des Aloses dans le Systèm Gironde-Garonne-Dordogne: Contribution à la Connaissance de la dynamique des Population d'Aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax*) dans le Systèm Fluvio-Estuarien de la Gironde. Dissertation, Université de Bordeaux I, Bordeaux.

TAVERNY, C. und ELIE, P. (2001): Répartition Spatio-Temporelle de lLa Grande Alose *Alosa alosa* (Linné, 1766) et de L'alose Feinte *Alosa fallax* (Lacépède, 1803) dans le Golfe de Gascogne. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **(362-363)**, 803-821.

TENDEIRO, J. und VALDEZ, V. (1955): Helmintologia ictiólogica I. Alguns helmintes do sável, *Alosa alosa* (L.), das aguas portuguesas. Descricao de uma nova especie, *Mazocraes vileiai* n.sp. (*Trematoda, Monogenea*). *Bolm Cult. Guiné Port.* **10(37)**, 49-80.

TENGS, T. und RIMSTAD, E. (2017): Emerging pathogens in the fish farming industry and sequencing-based pathogen discovery. *Developmental & Comparative Immunology* **75**, 109-119.

THOEN, E., EVENSEN, O. und SKAAR, I. (2011): Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases* **34(8)**, 601-608.

THOMAS, N. J. und COLE, R. A. (1996): The risk of disease and threats to the wild population. *Endangered Species Update* **13(12)**, 23-27.

THORNE, E. und WILLIAMS, E. S. (1988): Disease and endangered species: the black-footed ferret as a recent example. *Conservation Biology* **2(1)**, 66-74.

THUNE, R. L., STANLEY, L. A. und COOPER, R. K. (1993): Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* **3**, 37-68.

TORANZO, A. E., BAYA, A. M., ROMALDE, J. L. und HETRICK, F. M. (1989): Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult Gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. *Journal of Fish Diseases* **12(5)**, 439-448.

TORANZO, A. E., MAGARIÑOS, B. und ROMALDE, J. L. (2005): A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246(1-4)**, 37-61.

TORTOLI, E. (2014): Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews* **27(4)**, 727-52.

TRANCART, T., ROCHETTE, S., ACOU, A., LASNE, E. und FEUNTEUN, E. (2014): Modeling marine shad distribution using data from French bycatch fishery surveys. *Marine Ecology Progress Series* **511**, 181-192.

UNWIN, M. J., KINNISON, M. T. und QUINN, T. P. (1999): Exceptions to semelparity: Postmaturation survival, morphology, and energetics of male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56(7)**, 1172-1181.

URAWA, S. und YAMAO, S. (1992): Scanning electron microscopy and pathogenicity of *Chilodonella piscicola* (Ciliophora) on juvenile salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* **4(3)**, 188-197.

VAN AS, J. G. und BASSON, L. (1989): A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichia) and a review of the taxonomic status of some fish ectoparasitic trichodinids. *Systematic Parasitology* **14(3)**, 157-179.

VAN BENEDEN, P. J. (1858): Memoire sur les vers intestinaux. Extrait supplement de comptes rendus des séances de l'Academie de Sciences. J.-B. Bailtière et Fils, Paris.

VAN DEN BERG, A. H., MCLAGGAN, D., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. und VAN WEST, P. (2013): The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews* **27(2)**, 33-42.

VAN WEST, P. (2006): *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* **20(3)**, 99-104.

VENDRELL, D., BALCAZAR, J. L., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I., GIRONES, O. und MUZQUIZ, J. L. (2006): *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **29(4)**, 177-98.

VIGGERS, K. L., LINDENMAYER, D. B. und SPRATT, D. M. (1993): The importance of disease in reintroduction programmes. *Wildlife Research* **20(5)**, 687-698.

VILLENA, A. J. (2003): Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13(1)**, 111-140.

WAGNER, D. und YOUNG, L. S. (2004): Nontuberculous mycobacterial infections: A clinical review. *Infection* **32(5)**, 257-270.

WALKER, P. D., FLIK, G. und BONGA, S. W. (2004): The biology of parasites from the genus *Argulus* and a review of the interactions with its host. In: WIEGERTJES, G. F. und FLIK, G. (eds.). Host-parasite interactions. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, Symposium of the Society for Experimental Biology 55. S. 107-129.

WALKER, P. J. und WINTON, J. R. (2010): Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research* **41(6)**, 51.

WALKER, S. F., BOSCH, J., JAMES, T. Y., LITVINTSEVA, A. P., VALLS, J. A. O., PIÑA, S., GARCÍA, G., ROSA, G. A., CUNNINGHAM, A. A., HOLE, S., GRIFFITHS, R. und FISHER, M. C. (2008): Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology* **18(18)**, R853-R854.

WALTZEK, T. B., KELLEY, G. O., ALFARO, M. E., KUROBE, T., DAVISON, A. J. und HEDRICK, R. P. (2009): Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Diseases of Aquatic Organisms* **84(3)**, 179-194.

WANG, P. C., LIN, Y. D., LIAW, L. L., CHERN, R. S. und CHEN, S. C. (2008): *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* also causes white muscle disease in farmed giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii. Diseases of Aquatic Organisms* **79(1)**, 9-17.

WEBB, S., GARMAN, G., MCININCH, S. und BROWN, B. (2002): Amoebae associated with ulcerative lesions of fish from tidal freshwater of the James River, Virginia. *Journal of Aquatic Animal Health* **14(1)**, 68-76.

WEBB, S. R., GARMAN, G. C., MCININCH, S. P., NERAD, T. A., PEGLAR, M. T., GILLEVET, P. M. und BROWN, B. L. (2005): Etiology of ulcerative lesions of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) from James River, Virginia. *Parasitology Research* **97(5)**, 358-366.

WELDON, C., DU PREEZ, L. H., HYATT, A. D., MULLER, R. und SPEARE, R. (2004): Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Disease* **10(12)**, 2100-2105.

WESSEL, Ø., OLSEN, C., RIMSTAD, E. und DAHLE, M. (2015): Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Veterinary Research* **46(26)**, 1-11.

WEST, G. (1990): Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Marine and Freshwater Research* **41(2)**, 199-222.

WHITMAN, K. A. (2004): Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures. Iowa State Press, Iowa.

WHITTINGTON, R. J., CROCKFORD, M., JORDAN, D. und JONES, B. (2008): Herpesvirus that caused epizootic mortality in 1995 and 1998 in pilchard, *Sardinops sagax neopilchardus* (Steindachner), in Australia is now endemic. *Journal of Fish Diseases* **31(2)**, 97-105.

WIIK-NIELSEN, C. R., LØVOLL, M., SANDLUND, N., FALLER, R., WIIK-NIELSEN, J. und BANG JENSEN, B. (2012): First detection of piscine reovirus (PRV) in marine fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* **97(3)**, 255-258.

WILLEMSE, J. J. (1968): Helminth and sporozoan parasites of fishes in the Netherlands. *Bulletin Zoologisch Museum University of Amsterdam* **1(8)**, 83-87.

WOLF, K., GRAVELL, M. und MALSBERGER, R. G. (1966): Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science* **151(3713)**, 1004-1005.

WOLF, K. und MANN, J. A. (1980): Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro* **16(2)**, 168-179.

WOLF, K. (1988): Viral erythrocytic necrosis. In. Fish viruses and fish viral diseases. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca. S. 389-398.

WOO, P. T. K. (2006): Fish diseases and disorders. Volume 1: Protozoan and metazoan infections., 2. Auflage. CABI Publishing, Wallingford.

WOOD, H. F., JACOBS, K. und MCCARTY, M. (1955): *Streptococcus lactis* isolated from a patient with subacute bacterial endocarditis. *The American Journal of Medicine* **18(2)**, 345-347.

WOOD, J. W. und ORDAL, E. J. (1958): Tuberculosis in Pacific salmon and steelhead trout. Dissertation, University of Washington, Washington.

WOODFORD, M. H. und ROSSITER, P. B. (1994): Disease risks associated with wildlife translocation projects. In: OLNEY, P. J., MACE, G. und FEISTNER, A. (eds.). Creative Conservation - Interactive management of wild and captive animals. Springer, Dordrecht. S. 178-200.

WOODFORD, M. H. (2001): Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release into the Wild. *IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group, Gland, the Office International des Epizooties (OIE), Paris, Care for the Wild, Vereinigtes Königreich, und der European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Schweiz.* Abgerufen von: http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1032&context=zoonoticspub.

WÜNNEMANN, H., HOLZER, A. S., PECKOVÁ, H., BARTOŠOVÁ–SOJKOVÁ, P., ESKENS, U. und LIERZ, M. (2016): Repatriation of an old fish host as an opportunity for myxozoan parasite diversity: The example of the allis shad, *Alosa alosa* (Clupeidae) in the Rhine. *Parasites & Vectors* **9(505)**.

YAMAGUTI, S. (1968): Systema helminthum. IV. Monogena and Aspidocotylea. J. Wiley, New York. S. 699.

YAMAGUTI, S. (1971): Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Part 1. Keigaku, Tokyo. S. 1074.

YOKOYAMA, H., OGAWA, K. und WAKABAYASHI, H. (1990): Light and electron microscopic studies on the development of *Hoferellus carassii* (Myxosporea), the causative organism of kidney enlargement disease of goldfish. *Fish Pathology* **25 (3)**, 149-156.

YOKOYAMA, H., OGAWA, K. und WAKABAYASHI, H. (1993): Involvement of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Annelida) in the transmission of *Hoferellus carassii* (Myxosporea: Myxozoa), the causative agent of kidney enlargement disease (KED) of goldfish *Carassius auratus. Gyobyo Kenkyu* **28(3)**, 135-139.

YOKOYAMA, H. und URAWA, S. (1997): Fluorescent labelling of actinospores for determining the portals of entry into fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **30(3)**, 165-169.

YOSHINAGA, T., OGAWA, K. und WAKABAYASHI, H. (1987): Experimental life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. *Fish Pathology* **22(4)**, 243-251.

ZAMBONINO, J. L. I., CAHU, C. L. und PERES, A. (1997): Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of Nutrition* **127(4)**, 608-614.

ZERIHUN, M. A., BERG, V., LYCHE, J. L., COLQUHOUN, D. J. und POPPE, T. T. (2011): *Mycobacterium salmoniphilum* infection in burbot *Lota lota. Diseases of Aquatic Organisms* **95(1)**, 57-64.

10 ANHANG

Anhang I: Literaturverzeichnis über Infektionserreger bei Maifischen

Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen
A: Auge, D: Darm, H: Haut, K: Kiemen, L: Leibeshöhle, M: Magen, Mh: Maulhöhle, Ö: Ösophagus, P: Pylorusanhänge

Taxon	Organ	Parasit	Fundort	Referenz
Crustacea (Krebstiere)	K	*Clavellisa emarginata* (Krøyer, 1837)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
			Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
			Gironde-Garonne-Dordogne, Frankreich	(TAVERNY 1991)
			Nordsee	(BOXSHALL 1974)
		Nicht identifizierter Copepode der Gattung *Ergasilus*	Flüsse der Westiberischen Halbinsel	(BAO et al. 2015b)
		Lernaea cyprinacea (Linnaeus, 1758)	Guadiana, Spanien	(PÉRES-BOTE 2005)
		Lernaeeniscus encrasicoli (Turton, 1807)	Europa	(KABATA 1979, MARKEVICH 1956) *
		Ceratothoa italica (Schioedte & Meinert, 1883)	Flüsse der Westiberischen Halbinsel	(BAO et al. 2015b)
	K, Mh	*Cymothoidae* sp.	Fluss Minho, Spanien	(MOTA et al. 2015)
	K	*Anilocra physodes* (Linnaeus, 1758)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)

* zitiert in APRAHAMIN et al. (2003)

Fortsetzung der Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen A: Auge, D: Darm, H: Haut, K: Kiemen, L: Leibeshöhle, M: Magen, Mh: Maulhöhle, Ö: Ösophagus, P: Pylorusanhänge

Taxon	Organ	Parasit	Fundort	Referenz
Monogenea (Hakensaugwürmer)	K	*Mazocraes alosae* (Hermann, 1782) syn.: *Octobothrium lanceolatum*	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2016, GÉRARD et al. 2017)
			Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
		Mazocraes alosae (Hermann, 1782) syn.: *Octobothrium lanceolatum*	Französische Küste	(TAVERNY 1991)
			Severn, Wye, Plymouth, England	(FINLAYSON 1981)
			Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
			Keine Angabe	(SPROSTON 1946, VAN BENEDEN 1858, YAMAGUTI 1968)*
		Mazocraes harengi (Beneden & Hesse, 1863)	Plymouth, England	(APRAHAMIAN et al. 2003)
		Mazocraes vilelai (Tendeiro & Valdez, 1955)	Tejo, Guadiana, Portugal	(TENDEIRO und VALDEZ 1955)
Cestoda (Bandwürmer)	D	*Eubothrium fragile* (Rudolphi, 1802)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
			Nord- und Ostsee & Irische See	(JOYEUX und BAER 1936)*
	P	*Eubothrium fragile* (Rudolphi, 1802)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
			Europa	(APRAHAMIAN et al. 2003)
			Keine Angabe	(PROTASOVA 1977)*
			Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
		Scolex pleuronectis syn. *Scolex Polymorphus* (Rudolphi, 1802)	Holland	(WILLEMSE 1968)*

* zitiert in APRAHAMIN et al. (2003)

Fortsetzung der Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen A: Auge, D: Darm, H: Haut, K: Kiemen, L: Leibeshöhle, M: Magen, Mh: Maulhöhle, Ö: Ösophagus, P: Pylorusanhänge

Taxon	Organ	Parasit	Fundort	Referenz
Trematoda (Saugwürmer)	Ö	*Hemiurus appendiculatus* (Rudolphi, 1802)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
	M	Familie *Hemiuridae*	Fluss Sebou, Marokko	(SABATIÉ 1993)
		Hemiurus appendiculatus (Rudolphi, 1802)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
			Flüsse der Westiberischen Halbinsel	(BAO et al. 2015b)
			Gironde-Garonne-Dordogne, Frankreich	(TAVERNY 1991)
	D	*Hemiurus appendiculatus* (Rudolphi, 1802)	Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
			Gironde-Garonne-Dordogne, Frankreich	(TAVERNY 1991)
			Europa	(YAMAGUTI 1971)*
			Keine Angabe	(DAWES 1947)*
			Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
	D	*Hemiurus luehei* (Odhner, 1905) syn.: *Pronopyge ocreata* (Rudolphi 1802)	Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
	Ö, M	*Parahemiurus merus* (Linton, 1910)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
	D	*Pronoprymna ventricosa* (Rudolphi, 1919)	Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
			Belgische Küste, Rhein bei Basel und Keltische See	(BRAY und GIBSON 1980)

* zitiert in APRAHAMIN et al. (2003)

Fortsetzung der Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen A: Auge, D: Darm, H: Haut, K: Kiemen, L: Leibeshöhle, M: Magen, Mh: Maulhöhle, Ö: Ösophagus, P: Pylorusanhänge

Taxon	Organ	Parasit	Fundort	Referenz
Trematoda (Saug-würmer)	A	*Diplostomum gasterostei* (Williams, 1966)	Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
		Diplostomum spathaceum (Rudolphi, 1819)	Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
Nematoda (Rund-würmer)	L	*Anisakis* sp.	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
		Anisakis simplex sensu stricto (Rudolphi, 1809)	Flüsse der West-iberischen Halb-insel	(BAO et al. 2015a)
		Anisakis pegreffii (Campana-Rouget & Biocca, 1955)	Fluss Minho, Spanien	(MOTA et al. 2015)
			Flüsse der West-iberischen Halb-insel	(BAO et al. 2015a)
	M, D	*Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) syn. *Thynnascaris aduncum* (Rudolphi) syn. *Contracaecum aduncum* (Rudolphi, 1802)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)
			Flüsse der West-iberischen Halb-insel	(BAO et al. 2015b)
			Fluss Minho, Spanien	(MOTA et al. 2015)
			Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
			Gironde-Garonne-Dordogne, Frank-reich	(TAVERNY 1991)
			Fluss Tejo, Portugal	(ALMAÇA 1988)
			Nord See	(PUNT 1941)*
			Ostsee	(MARKOWSKI 1937)*
			Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*

* zitiert in APRAHAMIN et al. (2003)

Fortsetzung der Tabelle 18: Literaturverzeichnis zu Parasiten bei Maifischen A: Auge, D: Darm, H: Haut, K: Kiemen, L: Leibeshöhle, M: Magen, Mh: Maulhöhle, Ö: Ösophagus, P: Pylorusanhänge

Taxon	Organ	Parasit	Fundort	Referenz
Nematoda (Rundwürmer)	M, D	*Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802)	Keine Angabe	(APRAHAMIAN et al. 2003)
		Hysterothylacium osculatum (Rudolphi)	Fluss Barrow, Waterford Ästuar, Irland	(DOHERTY und MCCARTHY 2002)
		Agamonema capsularia (Rudolphi, 1802)	Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
Acanthocephala (Kratzwürmer)	D	*Rhadinorhynchus pristis* (Rudolphi, 1802) syn. *Echinorhynchus subulatus* (Zeder, 1803) syn. *Echinorhynchus alosae* (Herman, 1782)	Flüsse der Westiberischen Halbinsel	(BAO et al. 2015b)
			Fluss Minho, Spanien	(MOTA et al. 2015)
			Rhein, Schweiz	(FATIO 1890)*
		Pomphorhynchus tereticollis (Rudolphi, 1809)	Keine Angaben	(GOLVAN 1969)*
Petromyzontidae (Neunaugen)	H	*Petromyzon marinus* (Linnaeus, 1758)	Nordost-Atlantik und angrenzende Flusssysteme	(GÉRARD et al. 2017)

* zitiert in APRAHAMIN et al. (2003)

Anhang II: Koordinaten der Fangorte der verwendeten Maifische

Tabelle 19: Koordinaten der Fangorte in der Studie verwendeter Maifische

Fangorte			Koordinaten
Land	**Fluss**	**Stadt**	
Frankreich	Garonne	Golfech	44° 06′ 33″ N, 0° 51′ 14″ O
	Dordogne	Tuilières	44° 50′ 42″ N 0° 37′ 59″ E
Deutschland	Rhein	Speyer	49° 24' 19,20" N; 8° 29' 40,25" E
		Rees	51° 45' 18,00" N; 6° 23' 36,30" E
		Philippsburg	49° 4’ 9,3” N; 8° 25’ 55,2” E
		Landeshafen Wörth	49° 4′ 44″ N; 8° 18′ 34,5″ E
		Ladenburg	49° 28' 34,80" N; 8° 35' 9,52" E
		Urmitz	50° 25' 9,93" N; 7° 31' 9,49" E
		Kalkar Grieth	51°47'00,9"N 6°19'15,5"E

Anhang III: Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

III. I Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

III.I.I Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die bakteriologische Untersuchung

Anzucht

Impfschlinge, 1µm, weiß	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Biochemische Untersuchung

Bactident® Oxidase	Merck KGaA, Darmstadt
ID-ase (Katalase)	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Remel RapID™ NF PLUS System	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
API 20NE	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
API Rapid ID 32E	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
API ID 32 Staph	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
API ID 32 Strep	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

Gram-Färbung

NaCl-Lösung ad us. vet.	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garben
Grams´s Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt
Lugol´sche Lösung	RAL Diagnostics, Martillac, Frankreich
Ethanol absolut, AnalaR Nomapur®	VWR International GmbH, Darmstadt
Karbolfuchsinlösung	Merck KGaA, Darmstadt

MALDI-TOF MS

Ethanol absolut	VWR International GmbH, Darmstadt
Formic acid $\geq$ 95 %	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV®	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

Bruker Matrix HCCA, portioned	Bruker Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen

III.I.II Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die mykologische Untersuchung

Impfschlinge, 1µm, weiß	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Lactophenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt

III.I.III Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die virologische Untersuchung

Anzucht:

Minimum Essential Medium Nr. 4g

Bestandteil pro Liter	
9,53 g MEM (Earles´ Salze)	Life Technologies Corp., Darmstadt
10 mM HEPES	
10 % fetales Kälberserum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
2,2 g $NaHCO_3$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
10 mL NEA	Biochrom GmbH, Berlin
120 mg Na-Pyruvat	Merck KGaA, Darmstadt
pH -Wert 7,2 einstellen	

Minimum Essential Medium Nr. 5

Bestandteil pro Liter	
5,32 g MEM Eagle (Hank's Salze)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
4,76 g MEM (Earles´ Salze)	Life Technologies Corp., Darmstadt
10 % fetales bovines Serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
1,25 g $NaHCO_3$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
10 mL NEA	Biochrom GmbH, Berlin
120 mg Na-Pyruvat	Merck KGaA, Darmstadt
pH -Wert 7,2 einstellen	

Minimum Essential Medium Nr. 8e

Bestandteil pro 500 mL Flasche	
500 mL Leibovitz-Flüssigmedium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
10 % fetales bovines Serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin (200mM)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
pH 7,1, Osmolalität: 300 mOsmol	

Minimum Essential Medium Nr. 21

Bestandteil pro Liter	
10,63 g MEM Eagle (Hank's Salze)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
10 % fetales bovines Serum	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
0,85 $NaHCO_3$	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
pH 7,2 einstellen	

Sonstiges

Enrofloxacin 100 mg/mL Injektionslösung für Rinder und Schweine	Bayer HealthCare AG, Leverkusen

Verbrauchsmaterialien

Siliciumdioxid (Seesand)	Sulpeco Inc., Bellefonte, USA
Falcon™ Tissue Culture Treated Flasks	Corning Inc., New York, USA
Millex-GV, syringe-driven filter unit, 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt
Corning® Costar® cell culture plates, flat bottom	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
PS-Röhrchen, steril, 12 mL, Stehrand	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster
Cryo.s™	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster

Molekularbiologie:

Transport der Organproben

RNA*later*®	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

Isolierung

3 mm Metallkugeln	Qiagen GmbH, Hilden
5 mm Metallkugel	Qiagen GmbH, Hilden
PBS-Dulbecco	Biochrom-AG, Berlin
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Ethanol ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Rotipuran® ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
2-Propanol Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

DEPC-Wasser-Herstellung

200 mL Aqua tridest und 200 µL Diethylpyrocarbonat werden über Nacht bei 37 °C in einem abgedeckten Gefäß gerührt. Nachfolgend wird die Lösung 3 x bei 120 °C 10 min autoklaviert und in sterile 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert.

Mastermix DNA-Viren

GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Colorless GoTaq® Flexi buffer	Promega GmbH, Mannheim
$MgCl_2$	Promega GmbH, Mannheim
Deoxynucleotide Triphophates (dNTP´s)	Promega GmbH, Mannheim

Primer

OBL-3	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
OBL-4	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
CyHVpol-2F	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
CyHVpol-2R	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
CyHVpol-2Fn	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin

CyHVpol-2Rn	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin

Mastermix RNA-Viren

QIAgen OneStep RT-PCR Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
Q-Solution	Qiagen GmbH, Hilden
Rnasin	Qiagen GmbH, Hilden
Enzym Mix	Qiagen GmbH, Hilden
Deoxynucleotide Triphophates (dNTP´s)	Promega GmbH, Mannheim

Primer

IPN-1F	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
IPN-1R	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
ISA-1F	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
ISA-2R	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
VG-1F	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
VD-3R	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
VD-5	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
IG-1F	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
ID-2R	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
ID-4	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Ba-1F	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin
Ba-1R	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	Life Technologies Corp., Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
6x DNA Loading Buffer	VWR International GmbH, Darmstadt
DNA-Leiter, 100 bp, peqGOLD	VWR International GmbH, Darmstadt

TAE-Puffer

20 mL TAE-50x: bestehend aus:	
UltraPure ™ Tris	Life Technologies Corp., Darmstadt

Essigsäure 99,8 %	Life Technologies Corp., Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
980 mL Aqua dest.	Eigene Herstellung vom Friedrich-Loeffler-Institut

Verbrauchsmaterialien

Filter Tip Universal 10-1000µL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
PP-PCR-Gefäß, NAT., 0,2 mL, Dünnwandig	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Strip Tubes and Caps, 0.1mL	Qiagen GmbH, Hilden

Blutausstriche:

Giemsa-Färbung

Giemsas Azur Eosin-Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt
Tritisol® Puffer-Konzentrat für Puffer-Lösung nach WEISE, pH 6,8	Merck KGaA, Darmstadt
EmsureTM Methanol zur Analyse	VWR International GmbH, Darmstadt

III.I.IV Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die parasitologische Untersuchung

Bestimmung Morphologie *Myxozoa:*

Aqua dest.	Herstellung an JLU
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
SafeSeal Micro Tubes, 1,5 mL	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht

Externe Digestionsmethode:

Ethanol 70 % (verd. Ethanol ≥99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
37 %ige HCL, reinst	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Analysensiebe, Maschenweite 300 µm	Retsch GmbH, Haan
Analysensiebe, Maschenweite 25 µm	Retsch GmbH, Haan
Sedimentationskammern für Lichtmikroskopie	Eigenherstellung aus Hannover 9,5x4x1 cm Einlassung 0,5 cm tief

Herstellung einer Pepsin-Lösung

10 g Pepsin 2000 FIP-U/g	Robert Kind GmbH
8,5 g NaCl ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

1000 mL Leitungswasser

Mischen bis zur Entstehung einer homogenen Lösung

Verbrauchsmaterialien

Gewebekulturschalen, steril, 60,0/15 + 145/20 mm, mit Nocken	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
100 mL Urinbecher mit Schraubverschluss	Tierärztebedarf Lehnicke GmbH, Schortens
Pasteur Capillary Pipettes, short size, 150 mm	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
PP-Röhrchen, steril, 15 mL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Blutausstriche:

Giemsa-Färbung

Siehe Anhang III.I.III

III.I.V Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die histologische Untersuchung

Embedding cassette	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Surgipath® Paraplast	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Ethanol ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Xylol (Isomere), rein	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Rezeptur Formaldehyd-Lösung 5 % für 1 L

143 mL Formaldehyd-Lösung 35 %	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
857 mL demineralisiertes Wasser	

Bouin-Entfärber

1,6 L 99 % Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
20 Tropfen Ammoniak-Lösung 25 %	Merck KGaA, Darmstadt
320 mL entmineralisiertes Wasser	Eigene Herstellung am Landesbetrieb Hessisches Landeslabor

Färbungen

Eosin gelblich	Merck KGaA, Darmstadt
Ziehl-Neelsens Karbolfuchsinlösung	Merck KGaA, Darmstadt
3 % HCL- Alkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Löfflers Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt
1% NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Kongorot, reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylinlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Giemsas-Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Pyrogallol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt
0,5 % Perjodsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Schiffsches Reagenz	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig
Kaliumdisulfit	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Na-(K)disulfitlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumtetraborat, granuliert, trocken	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze

Hämatoxylinlösung (auf 1 L)

1 g Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
0,2 g Natriumiodid	Merck KGaA, Darmstadt

50 g chem. reines Kaliumaluminium-sulfat (Kalialaun)	Merck KGaA, Darmstadt
50 g Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
1 g Zitronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

Saures Hämalaun nach Mayer (auf 1 L)

1 g Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
0,2 g Natriumiodid	Merck KGaA, Darmstadt
50 g chem. reines Kaliumaluminium-sulfat (Kalialaun)	Merck KGaA, Darmstadt
50 g Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
1 g Zitronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

Kernechtrotlösung

0,1 g Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt
100 mL 5 %iger Aluminiumsulfatlösung	Merck KGaA, Darmstadt

Eindeckmittel

Xylene substitute mountant	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt

III.I.VI Sonstige Reagenzien, Medikamente und Verbrauchsmaterialien

Paraffin, viscous	Merck KGaA, Darmstadt
AHK Spiritus	Walter Schmidt Chemie GmbH, Berlin
Immersionsöl	Merck KGaA, Darmstadt
Entellan® New	Merck KGaA, Darmstadt
MS 222 (3-Aminobenzoesäure-ethylester Methansulfonat)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Heparin-Natrium	Rotexmedica GmbH, Trittau
AESCULAP® Skalpellklingen Cutfix, Fig. 10	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Objektträger, gebrauchsfertig, gereinigt	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
BD Discaridit™ II 2 mL Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fine-Ject 21Gx5/8	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Roti® Store Cryoröhrchen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

III.II Nähr- und Selektivmedien

Columbia-Agar-Fertigplatte mit 5 % Schafblut	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Gassner-Nährboden-Fertigplatten	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
O/F-Medium	Merck KGaA, Darmstadt
Kimmig-Agar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Hitchens-Agar

In 1 L Aqua dest. werden folgende Zutaten gelöst:

5 g Fleischextrakt trocken für die Mikrobiologie	Merck KGaA, Darmstadt
20 g Pepton aus Fleisch, pankreatisch verdaut, granuliert, für die Mikrobiologie	Merck KGaA, Darmstadt
2 g Kaliumnitrat für die Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
1,3 Agar-Agar bakteriologisch, hochreine Qualität, für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Die Zutaten werden im Dampftopf gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt mittels:

NaOH Plätzchen, rein	Merck KGaA, Darmstadt
HCL 32 %	Merck KGaA, Darmstadt

Anschließend werden jeweils 5-6 mL in ein Reagenzröhrchen abgefüllt und 15 min bei 121 °C autoklaviert und im Kühlschrank gelagert.

Modifizierter Shieh-Agar

Zu 1 L destilliertem Wasser werden zugegeben:

1 g D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
5 g Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
0,01 g Na-Acetat, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
0,1 Na-Pyruvat	VWR International GmbH, Darmstadt
0,01 g Citrit acid	VWR International GmbH, Darmstadt
0,5 g Hefe-Extrakt-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
0,01 g Bariumchlorid x 2H2O	VWR International GmbH, Darmstadt
0,1 g di-Kaliumhydrogenphosphat > 99 % wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
0,3 g Analar Normapus Magnesium-sulfat x 7 H2O	VWR International GmbH, Darmstadt
0,0067 g Calcium Chloride Dihydrat (in 20 mL Aqua dest. gelöst)	VWR International GmbH, Darmstadt
0,001 g Eisen(II)-Sulfat-Hydrat x 7 H2O (in 2 mL NaOH gelöst)	VWR International GmbH, Darmstadt
0,05 g Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
11 g Agar-Agar	Merck KGaA, Darmstadt

Herstellung: Die Zutaten werden im Dampftopf vollständig gelöst, in Flaschen abgefüllt, 15 min bei 121 °C autoklaviert und in Platten gegossen. Diese werden vakuumiert und im Kühlschrank gelagert.

Zuckeranreicherung (Gasbildung) auf 1 L Aqua dest.

In 1 L Aqua dest. werden folgende Zutaten gelöst:

25 g CM0067 Nutrient Broth No. 2	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Anschließend werden

5g D (+) Glukose, wasserfrei >99,5 %, cellpure®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

und 5 mL einer 1,5 %igen Lösung von Bromthymolblau in Ethanol zugesetzt.

Bromthymolblau Blue indicator ACS	Merck KGaA, Darmstadt
Ensure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Ethanol absolute zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt

Der pH-Wert wird auf 7,5 eingestellt. In Reagenzröhrchen werden Durham-Röhrchen eingesetzt und 5-6 mL der herstellten Lösung eingefüllt. Abschließend werden die Reagenzröhrchen 15 min bei 121 °C autoklaviert und im Kühlschrank

gelagert.

Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum *O/129*

Müller-Hinton-Blutagar auf 1 L Aqua dest.	
38 g CM 0337 Müller-Hinton Agar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Schafsblut, defibriniert	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
DD14 O129 10 µg	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
DD15 O129 150 µg	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

III.III Liste der bei den Untersuchungen verwendeten Geräte

Pipetten

Eppendorf Research® 1000µL, 200 µL, 100µL, 20 µL,10µL	Eppendorf AG, Hamburg

Geräte für die Durchführung der bakteriologischen Untersuchung

FIREboy eco	Integra Bioscience AG, Zizers
Brutschrank BB 6060	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Brutschrank Model BK 8	Dipl. Ing. W. EHRET GmbH, Emmendingen
MALDI-TOF MS Biotyper Version V 3.3.1.0	Bruker Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen
Autoklav FVS 2	Fedegari GmbH, München

Geräte für die Durchführung der virologischen Untersuchung (Anzucht)

CO_2 Incubator MCO-19A/C	Panasonic Biomedical Sales Europe BV, Etten Leur, Niederlande
CO_2 Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermoschrank	Tintometer GmbH, Lovibond Water Testing, Dortmund
Nikon Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Nikon ELWD 0,3 / 0075	Nikon GmbH, Düsseldorf

Geräte für die Durchführung der virologischen Untersuchung (PCR)

TissueLyser II	Qiagen GmbH, Hilden
Nano Drop Lite Spectrophotometer	VWR International GmbH, Darmstadt
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg

Geräte für die Durchführung der Agarose - Gelelektrophorese

BioRad Power PAC 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer	Von Kreutz Labortechnik, Reiskirchen
UltraBright Large Format UV Transilluminator	Biostep, Burkhardtsdorf
Piper FK 7512 – IQ – IR	Biostep, Burkhardtsdorf

Geräte für die Durchführung der parasitologischen Untersuchung

Canon Powershot A 460	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
IKA-COMBIMAG REO	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
IKAMAG® EOA 5	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
IKA MAG EDA5	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kunststoff-Wasserbad	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Kombinierte Heizstäbe mit Pumpe, Extraanfertigung	Janke+Kunkel IKA-WERK Labortechnik, Staufen

Geräte für die Durchführung der histologische Untersuchung

Tissue-Tek ® VIP™ SJr	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Paraffindispensierer Model 2088	SLEE Medical, Mainz
Rotationsmikrotom RM 2255	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Brutschrank B6	Heraeus instruments GmbH, Hanau

Geräte für die Durchführung der Wasserwert-Messung

PCE-PHD-1	PCE Instruments, Meschede
PCETestr 35 Multiparameter	Eutech Instruments Europe B.V., PC Landsmeer, Niederlande

Mikroskope und Kameras

Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena
Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Jena
Binocular Leica Wild MBB	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Leica DM 2500	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
DIALUX 20 EB	Esselte Leitz GmbH & Co KG, Stuttgart
Plympus BH-2	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Leica DM RB	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Leica MC 170 HD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Model SC30	Olympus soft imaging solutions GmbH, Münster

Vortex-Schüttler

Lab – Dancer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Vortexer RS-VA 10	Phoenix instrument, Garbsen

Werkbank

DNA-Workstation	UniEquip GmbH, Planegg
Biologische Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Laborabzug Model ENAS 1200	Wesemann GmbH, Syke
Systemkanal 165/93 mm	Wesemann GmbH, Syke

Zentrifugen

Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Eppendorf Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
Microzentrifuge	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Rotofix 32 A	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

Waagen

MC 1 Laboratury LC 620 S	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius portable PT600	Sartorius AG, Göttingen
Spider 1 S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
GB 1501	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

III.IV Software

MALDI-TOF MS

Bruker Biotyper 3.1 software flexcontrol	Bruker Corporation, Billerica, USA

Histologie

CellSens Dimension	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Leica Application Suite V4	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Virologie

NIS – Elements 3.22.00 (Build 710)	Nikon GmbH, Düsseldorf

Anhang IV: Färbeprotokolle

Gram-Färbung

Mit einer sterilen Impföse wurde wenig 24 h altes Koloniematerial von der Agarplatte abgenommen und in einem sterilen NaCl-Tropfen auf einem Objektträger verteilt. Nach Lufttrocknung erfolgt eine kurze Fixierung in der Bunsenbrennerflamme. Unter der Färbebank wurden die Objektträger zunächst 2 min mit Kristallviolett gefärbt, anschließend Färbelösungsreste durch Schrägstellen der Objektträger entfernt und danach 10 s mit Lugol'scher Lösung gespült. Anschließend wurden die Objektträger wieder horizontal gestellt und 1 min mit Lugol'scher Lösung behandelt. Danach wurden die Objektträger 10 s mit Ethanol gespült, vollständig mit Ethanol bedeckt und dieses 30s einwirken gelassen. Nach 10 s Wasserspülung wurde mit verdünnter Karbolfuchsin-Lösung (1:5 verdünnt mit Aqua dest.) gegengefärbt. Die Objektträger wurden danach erneut mit Wasser abgespült und bei Raumluft getrocknet.

Giemsa-Färbung

Zunächst wird eine 7 % Giemsa-Lösung bestehend aus 7 mL Giemsas Azur Eosin-Methylenblau und 93 mL Puffer-Lösung pH 6,8 (Tritisol®) hergestellt. Die Blutausstriche wurden für 5 min mit 100 % Methanol fixiert und danach mit frisch angesetzter, 7 %iger Giemsas Färbelösung für 20 min gefärbt. Anschließend erfolgte wiederholt eine ein minütige Spülung mit pH 6,8 Puffer-Lösung und eine Trocknung bei Raumluft.

Anhang V: Verwendete Zelllinien

Tabelle 20: Übersicht der in der Studie verwendeten Zelllinien

Name	Ursprung Zellen	Nachweis	Referenz
BF-2 (Bluegill Sunfish Fibroblast) Sonnenbarsch (*Lepomis macrochirus*)	Schwanzstiel, Fibroblasten	IPNV, VHSV, LCDV, TEV (Tadpole Oedema Virus)	(WOLF et al. 1966)
CHSE (Chinook Salmon Embryo) Königslachs (*Oncorhynchus tshawytscha*)	Embryo	IHNV, VHSV, IPNV, Frühlingsviramie der Karpfen (SVCP), Viren von Salmoniden, Perciden und Heringsartigen	falsche CHSE-214, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), line no 314
CCB (Common Carp Brain) Karpfen (*Cyprinus carpio*)	Gehirn	KHV	(NEUKIRCH et al. 1999)
EK-1 (Eel Kidney) Aal (*Anguillidae*)	Niere	Verschiedenste Viren aus dem marinen Milieu	(CHEN und KOU 1988)
EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) Amerikanische Elritze (*Pimephales promelas*)	Epitheliale Zellen, Haut	IPNV, IHNV, VHSV, SVCP, EHNV (Large-Mouth Bass Virus)	(FIJAN et al. 1983)
FHM (Fat Head Minnow) Amerikanische Elritze (*Pimephales promelas*)	Epitheliale Zellen, Bindegewebe und Muskulatur	IPNV, Vesikulare Stomatitis (Glasgow und Orsay (Indiana)	(GRAVELL und MALSBERGER 1965)
RT/F (erhalten als RTG-2) Blauer Sonnenbarsch (*Lepomis marcochirus*)	Fibroblasten, Gonaden inkl. Ovar und Hoden	IPNV, Egtved virus und Arboviruses (EEE, VEE), Viren von Salmoniden, Perciden und Heringsartigen	Falsche RTG-2, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), line no. 88
SAF-1 (*Sparus Aurata* Fin) Goldbrasse (*Sparus aurata*)	Schwanzflosse	LCDV, IHNV,VHSV; Rhabdoviren	(BEJAR et al. 2005)

Tabelle 21: Handling der in der Studie verwendeten Zelllinien

Name	Handling	Medium für geschlossene Flasche	Medium für offene Platte
FHM	Umsetzrate 1:4 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 21 (- CO_2)	Med. Nr. 5 (+ 5 % CO_2)
RT/F	Umsetzrate 1:4, 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 5 (- CO_2)	Med. Nr. 5 (+ 5 % CO_2)
EPC	Umsetzrate 1:4, 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 5 (- CO_2)	Med. Nr. 5 (+ 5 % CO_2)
BF-2	Umsetzrate 1:4, 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 21 (- CO_2)	Med. Nr. 5 (+ 5 % CO_2)
EK-1	Umsetzrate 1:4, 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 8e (- CO_2)	Med. Nr. 8e (- CO_2)
CCB	Umsetzrate 1:4 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 4g (+ 5 % CO_2)	Med. Nr. 5 (+ 5 % CO_2)
CHSE	Umsetzrate 1:3 24h bei 26°C, danach 20°C	MEM Nr. 8e (- CO_2)	Med. Nr. 8e (- CO_2)
SAF-1	Umsetzrate 1:4-1:6, 24h bei 26°C, danach 20°	MEM Nr. 5 (+ 5 % CO_2)	MEM Nr. 5 (+ 5 % CO_2)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Michael Lierz möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material, Literatur und Möglichkeit zur externen Probennahme und Probenaufarbeitung sowie ganz besonders für die jederzeit gewährte Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie die konstruktiven Kritiken herzlich danken.

Dr. Andreas Scharbert möchte ich für die Unterstützung des Forschungsvorhabens und die Einbindung in das LIFE+-Maifischprojekt mit Bereitstellung von Maifischen zur Untersuchung herzlich danken.

Besonderer Dank gilt ebenso Dr. Ulrich Eskens für die Anleitung bei der zeitintensiven histologischen Auswertung, seine Hilfestellung bei der histopathologischen Diagnosestellung und seinen zahl- und hilfreichen Ratschlägen bei diversen Fragestellungen. Mein Dank gilt auch Kristina Dersch und Sivia Hopfinger für die Anfertigung der histologischen Schnitte. Vielen Dank auch an Dr. Tobias Eisenberg für die Anzucht und Sequenzierung der Mykobakterien.

Mein großer Dank gilt Dr. Astrid S. Holzer für die parasitologische Aufarbeitung des myxozoischen Parasiten mit der Beschreibung der neuen Spezies *Hoferellus alosae* sp. nov. und die jederzeit sehr gute Zusammenarbeit. Hana Pecková und Dr. Pavla Bartošová-Sojková möchte ich ebenfalls für ihre Mitarbeit bei der Beschreibung der neuen Spezies *Hoferellus alosae* sp. nov. danken.

Großer Dank gebührt auch Prof. Dr. Christa Ewers für die Möglichkeit, die bakteriologischen Untersuchungen im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen sowie für ihre Unterstützung bei bakteriologischen Fragestellungen. Gleichermaßen möchte ich Dr. Ellen Prenger-Berninghoff für ihre Hilfestellung und Unterstützung bei zahlreichen bakteriologischen Fragestellungen danken. Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Werner Herbst für die Sequenzierungen des 16S rRNA Gens bedanken. Sonja Kutscher, Julita Blumöhr, Jutta Böhme and Birgit Schmidt gilt mein Dank für ihre Anleitung bei der Durchführung der MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Ebenfalls großen Dank möchte ich an Dr. Sven Bergmann richten für die Möglichkeit, die virologischen Untersuchungen im Institut für Infektionsmedizin des Friedrich-Loeffler-Institutes durchzuführen, für seine fachliche Anleitung bei der virologischen Untersuchung sowie seine Gastfreundschaft bei meinen Aufenthalten auf der Insel Riems. Außerdem möchte ich Frau Irina Werner für die Vorbereitung der verwendeten Zellkulturen sowie für ihre Anleitung zum praktischen Arbeiten mit diesen danken. Dr. Heike Schütze möchte ich für die Möglichkeit danken, die Nukleotid-Konzentrationsmessungen bei ihr im Labor durchzuführen.

Mein großer Dank gilt ebenso Prof. Dr. Taubert und Prof. Dr. Carlos Hermosilla für die Möglichkeit, die parasitologische Untersuchung der Muskulatur im Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität durchzuführen, ihre fachliche Unterstützung und Ihre Hilfestellung bei der Identifizierung der Parasiteneier. Gleichfalls möchte ich Malin Lange für die praktische Einweisung in die Digestionsmethode danken.

Dr. Jörg Rau und Dr. Matthias Contzen möchte ich für die weiterführenden Untersuchungen der Aeromaden und Mykobakterien danken. Weiterhin möchte ich meinen Dank an Prof. Dr. Markus Thines für die ITS- und *cox*2-Sequenzierung zur Identifikation von *Saprolegnia parasitica* richten. Besonders danken möchte ich auch Dr. Joachim Nilz für die Unterstützung bei der Projektplanung und seinen praktischen Anregungen zur Probennahme.

Großen Dank möchte ich gleichfalls an David Clavé für seine Unterstützung bei meiner Probennahme in der Maifischprojektanlage in Bruch, Frankreich, seine vortreffliche Gastfreundschaft und für den guten Informationsaustausch auch aus der Ferne richten. Dem Projektteam in Bruch sowie den jeweiligen französischen Studenten (2012-2014) möchte ich für die praktische Unterstützung bei der Probennahme und ihre Gastfreundschaft danken. Dem Projektteam aus der Maifischzuchtanlage in Aßlar, bestehend aus Dr. Patrick Schubert, Ulrike Steinweg, Walter Fricke, Joachim Krauß, Elena Verba, Lukas Bischoff, Heinz-Dieter Eckhardt und Johanna Heinrich möchte ich für die Bereitstellung von Maifischen und Informationen danken.

Den (ehemaligen) Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische möchte ich für die vielen gemeinsam miteinander verbrachten, oft heiteren Stunden sowie die Übernahme meiner Verpflichtungen an der Klinik in meiner Abwesenheit zu Probennahme und Probenaufarbeitung danken. Besonders danken möchte ich Christine Lange für Ihre Unterstützung der Probennahme juveniler Maifische in Landau. Ebenso möchte ich Dr. Dirk Enderlein für seine Unterstützung bei virologischen Fragestellungen sowie für seine konstruktiven Anregungen zum Exposé und zum Manuskript herzlich danken. Großer Dank gilt außerdem Frau Antoinette Huhn für die jederzeit gewährte Hilfe in der bakteriologischen Diagnostik.

Schließlich möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern danken für ihren jahrelang, in allen Lebenslagen gewährten Rat, Unterstützung, Rückhalt und Finanzierung und die dadurch meine Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Meiner Mutter Dr. Christine Wünnemann und meiner Tante Martina Schäflein möchte für Ihre Anmerkungen zum Manuskript herzlich danken. Ganz besonderen Dank auch an meinen Freund Dr. Florian Schrader dafür, dass er mich durch die schwierigen Phasen der Entstehung dieser Arbeit begleitet und mich während dieser Zeit in jeglicher Weise, unter anderem durch zahlreiche konstruktive Anmerkungen zum Manuskript, unterstützt hat. Christopher Sadler möchte ich für die Zeichnung des Coverbilds danken.

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Aussagen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Dießen, den 21.03.2018 Hannah Wünnemann

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6745-8

Abbildung Cover: © Christopher Sadler