

Bachforellensterben in Bayern

Auf den Spuren eines ungeklärten Phänomens



Tagungsband zum Symposium
im Bayerischen Landesamt für Umwelt,
Dienststelle Wielenbach

12. Juli 2013

Bachforellensterben in Bayern

Auf den Spuren eines ungeklärten Phänomens

Tagungsband zum Symposium
im Bayerischen Landesamt für Umwelt,
Dienststelle Wielenbach

12. Juli 2013

Impressum

Herausgeber

Landesfischereiverband Bayern e.V.
Pechdellerstraße 16
81545 München
Tel +49(0)89-64 27 26-0

Bayerisches Landesamt für Umwelt
Bgm.-Ulrich-Str.160
86179 Augsburg
Tel +49 (0)821-9071-0

Autor/en:

Themenblock I

Hanfland S. LFV Bayern, Lagerbauer B. & Ruppe J.
(ehemals LFV Bayern)
Born O., Fachberatung für das Fischereiwesen,
Bezirk Schwaben
Schwaiger J., Dembek G., Ferling H., Gerst M. & Scholz K.,
Bayerisches Landesamt für Umwelt, Dienststelle Wielenbach

Themenblock II

Köllner B., Winkler C., Fichtner D., Bergmann S. & Granzow H.,
Polster U., Friedrich Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut
für Tiergesundheit; Greifswald Insel Riems
Way K., Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture
Science, Weymouth, UK

Themenblock III

Paley R., Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture
Science, Weymouth, UK
Young M., Taeubert J.E., Pfaffl M.W., Geist J. & Kuehn R.,
Technische Universität München, Freising

Themenblock IV

Lahnsteiner F., Universität Salzburg & Haunschmid R.,
Bundesamt für Wasserwirtschaft, Scharfling
Mertens M., Life Science AG, Basel

Redaktion

Sebastian Hanfland (LFV Bayern e.V.)
Julia Schwaiger (LfU)

Grafische Gestaltung

Uhl + Massopust, Aalen

Druck

Gotteswinter und Aumeier GmbH, München

Papier

gedruckt auf FSC®-zertifiziertem Papier



Titel

Roggo, Michel/www.roggo.ch

Bildnachweis

S. 10 oben Wagner R.; S. 10 unten Hochwassernachrichtendienst Bayern; S. 11 natura2000.eea.europa.eu; S. 12 LfU; S. 13 Topographische Grunddaten: ATKIS®, DLM 1000, © Bundesamt für Kartographie und Geodäsie, 2006; S. 14 unten Roggo M.
Die übrigen Fotos und Abbildungen stammen von den jeweiligen Autoren.

Bezug

Landesfischereiverband Bayern e.V.
Pechdellerstraße 16
81545 München
Telefon +49 (0) 89 64 27 26-0
Email: poststelle@lfvbayern.de
www.lfvbayern.de

Das Projekt wurde vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit sowie im Rahmen der Arten- und Gewässerschutzprojekte des LFV Bayern e.V. aus Mitteln der Fischereiabgabe gefördert.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Weg und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Nachdruck und Wiedergabe, auch nur auszugsweise, nur mit Genehmigung des/der Herausgebers/Herausgeber.

© Landesfischereiverband Bayern e.V.
Bayerisches Landesamt für Umwelt
1. Auflage Juli 2013
Artikelnummer 000176, Auflagenhöhe 1.000 Stück

Inhalt

Editorial	5
Themenblock I:	
Bachforellensterben in Bayern – Verbreitungsgebiet und Eingrenzung der Ursachen	7
Was versteht man in Bayern unter dem Begriff »Bachforellensterben« und wo tritt es auf?	9
Fischereiliche Grundlagenerhebungen und Arbeitshypothesen zum Bachforellensterben in den ersten Projektjahren	16
Ursachenermittlung nach dem Ausschlussverfahren – Versuchsansätze an der Iller und anderen Gewässern	23
Themenblock II:	
Virologische, bakteriologische und immunologische Untersuchungen	37
Bakteriologische, virologische und immunologische Untersuchungen zur Ursache des Bachforellensterbens in voralpinen Flüssen Bayerns	39
Virological examination and analysis of tissue samples as part of the investigation into Bavarian brown trout mortalities	46
Themenblock III:	
Molekulargenetische Untersuchungen	53
Transcriptomanalysen im Kontext des Bachforellensterbens. Brown Trout Syndrome: A Transcriptomic Analysis	55
Metagenomic analysis of tissue samples as part of the investigation into Bavarian brown trout mortalities	61
Themenblock IV:	
Bachforellensterben in den Nachbarländern Österreich und Schweiz	73
Das Problem der Schwarzen Bachforelle (Proliferative Darkening Syndrome) in Österreich	75
Bachforellensterben in der Schweiz	77

Editorial

Seit rund 20 Jahren wird in voralpinen Fließgewässern Bayerns im Spätsommer ein Sterben von Bachforellen beobachtet. Betroffene Fische weisen im Endstadium typische klinische Symptome wie Apathie, Dunkelfärbung und Blutarmut sowie charakteristische Veränderungen der inneren Organe auf. Bisher gilt die Ursache des Phänomens als ungeklärt. Die Fischverluste sind erheblich und unter dem Aspekt eines nachhaltigen Arten- und Gewässerschutzes von großer Bedeutung.

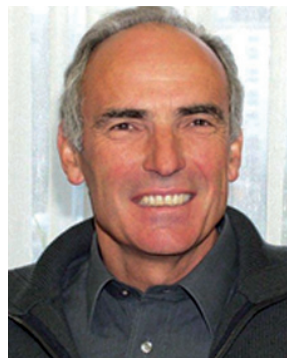
Das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) führt gemeinsam mit dem Projektpartner Landesfischereiverband Bayern e.V. seit dem Jahr 2000 umfangreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Ursache des Bachforellensterbens in Bayern durch. Die Studien wurden durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit sowie aus Mitteln der Fischereiabgabe gefördert. Schwer-

punkt der Untersuchungen war über den gesamten Untersuchungszeitraum die Iller bei Kempten. Alljährlich führte dort eine Exposition von Bachforellen im Spätsommer reproduzierbar zu einem Sterben der Tiere. Inzwischen wurde auch an anderen Gewässern in Bayern ein Bachforellensterben beobachtet.

Zur Ursachenermittlung wurden unterschiedlichste Untersuchungsstrategien verfolgt. Renommiertere Forschungseinrichtungen aus dem In- und Ausland waren an den Studien beteiligt. Im Rahmen der Wielenbacher Fachtagung werden die Untersuchungsergebnisse aus rund 10 Jahren Forschung präsentiert und diskutiert. Die Veranstaltung, deren Ziels es auch ist, das weitere Vorgehen auszuloten, richtet sich an die wissenschaftliche Fachwelt, an Vertreter der Fischerei sowie an Behörden und Ministerien.



Claus Kumutat
Präsident
Bayerisches Landesamt für Umwelt



Prof. Dr.-Ing. Albert Göttle
Präsident
Landesfischereiverband Bayern

Themenblock I:
Bachforellensterben in Bayern –
Verbreitungsgebiet und Eingrenzung
der Ursachen

Was versteht man in Bayern unter dem Begriff »Bachforellensterben« und wo tritt es auf?

Sebastian Hanfland¹, Bernhard Lagerbauer² und Jörg Ruppe²

¹ LFV Bayern, ² ehemals LFV Bayern

Zusammenfassung

Seit den 1980er Jahren wurden in der Rhithralregion einiger bayerischer kalkalpiner Flüsse immer wieder Bachforellensterben beobachtet, deren Ursache unklar war. Bekannt war lediglich, dass die Sterbephase in den Spätsommer und Früherbst fiel und ausschließlich Bachforellen betroffen waren. 1998 leitete der Landesfischereiverband Bayern ein Untersuchungsprogramm ein, das von 2000 bis 2011 in enger Kooperation mit dem Landesamt für Umwelt fortgeführt wurde. An stark vom Bachforellensterben betroffenen Gewässern wurden umfangreiche Expositionen mit Bach- und Regenbogenforellen (letztere als Kontrolle) sowie Laboruntersuchungen an diesen Fischen durchgeführt, aber auch chemisch-physikalische Daten des Flusswassers erhoben. Dabei wurde deutlich, dass keiner der untersuchten Parameter außerhalb des Toleranzbereichs für Bachforellen lag. Ebenso konnten eine Reihe bekannter Erreger als Ursache ausgeschlossen werden. Eine Intoxikation durch Gewässerunreinigung erscheint als alleinige Ursache nach derzeitiger Erkenntnis als sehr unwahrscheinlich. Die eigentliche Ursache konnte bislang nicht identifiziert werden. Die genannten Hälterungsversuche unter kontrollierten Bedingungen haben jedoch zahlreiche neue Erkenntnisse über die Symptomatik des Bachforellensterbens geliefert und das Krankheitsbild besser beschreiben lassen. Diese Ergebnisse haben uns zu der Überzeugung kommen lassen, dass es sich um ein eigenständiges Phänomen handelt.

Ein wesentliches Problem für die Ursachenforschung ist die schwierige Erfassung sterbender Bachforellen, insbesondere dort, wo die Bestände ohnehin schon stark dezimiert sind. Es gilt, das Bewusstsein für dieses Problem zu fördern, auch, um zu klären, ob es sich bei dem in österreichischen und schweizer Gewässern als »Schwarzforellensyndrom« bezeichneten Geschehen um dieselbe Erkrankung handelt.

Summary

In the 1980s, unexplained deaths of native brown trout were observed in the rhithral region of alpine Bavarian limestone rivers. At that time, it was only known that these deaths occurred in late summer or early autumn and that only brown trout were affected. In 1998, the Bavarian Fisheries Association (LFV Bayern) initiated investigations, which were then followed by laboratory and field studies from 2000 to 2011 as part of a joint project with the Bavarian Environment Agency (LfU).

On several rivers that are strongly affected by this »Lethal Brown Trout Phenomenon«, exposition experiments were carried out with brown and rainbow trout (the latter serving as control fish). The focus was put on the river Iller near Kempten. Fish were examined for pathologic symptoms and a panel of potential pathogens, and standard physico-chemical water parameters were monitored in parallel. These studies demonstrated that none of the recorded water parameters exceeded the tolerance range of brown trout. Further, potential fish pathogens could be ruled out as a cause. It is also unlikely that water contaminants are the (sole) cause. Thus, the actual origin of this disease remains unidentified. However, the aforementioned exposition experiments yielded many new details and insights. These results suggest that the »Lethal Brown Trout Phenomenon« is an autonomous phenomenon in its own right.

A major problem for the localization and causal research is the difficult monitoring of the disease in open rivers and the retrieval of dying fish for analytic purposes, especially where populations have already declined. It is important to draw more attention to this disease, also to clarify whether the »Black Trout Phenomenon« reported from Austria and Switzerland shares similarity with the phenomenon in Bavaria.

Die Merkmale in Kürze:

- Apathische, häufig dunkel verfärbte Bachforellen
- Nur Bachforellen sind betroffen
- Sekundärinfektionen mit fakultativ pathogenen Erregern können auftreten, sind aber nicht obligat
- In der Regel beschränkt auf das Hyporhithral kalkalpiner Flüsse wie Iller, Mangfall, Isar, Ammer
- Häufig beschränkt auf den Hauptfluss
- Sterbezeitraum Frühsommer bis Frühherbst
- Betrifft Wild- und Besatzfische aller Altersklassen
- Der Krankheit geht eine Mindest-Inkubationszeit von 3-4 Monaten im jeweiligen Flusswasser voraus



Abb. 1: Bachforelle *Salmo trutta*

tige Ursachen im Rahmen der amtlichen Aufklärung von Fischsterben ermittelt werden. Heute sind weitere Kriterien bekannt, die das Bachforellensterben von anderen Fischsterben unterscheiden lassen (siehe links).

Tragweite des Problems

Historie und Merkmale des Phänomens

In Bayern werden seit etwa 30 Jahren von Fischereiberechtigten Bachforellensterben ungeklärter Ursache an Fischereiverbände und -behörden herangetragen. Eine klare Abgrenzung dieser Sterbefälle von bekannten Krankheiten oder einem etwaigen Entgleiten chemisch/physikalischer Parameter war von Beginn an schwierig. Auffällig war aber, dass in solchen Fällen nur die Bachforelle (Abb. 1) betroffen war und das Sterbephänomen auf die klassische Äschenregion bzw. das Hyporhithral kalkalpiner Flüsse beschränkt und jahreszeitlich begrenzt war, und zwar von Spätsommer bis Frühherbst (Laggerbauer 2003).

Dieses Geschehen ist grundsätzlich zu unterscheiden von solchen Fischsterben, die nicht allein die Bachforelle betreffen, nicht auf die oben genannten Gewässerregionen oder Jahreszeiten beschränkt sind und deren vielfäl-

Durch das Bachforellensterben wurden Populationen dieser Art in vielen Gewässern der südbayerischen Äschenregion derart reduziert, dass dort keine arterhaltende Bestandsdichte mehr vorgefunden wird. Zwar waren die Bestände mancherorts durch Strukturverlust oder fischfressende Vögel vorgeschädigt, für andere Gewässer traf dies aber nicht in gleicher Weise zu. In den heute vom Bachforellensterben betroffenen Gewässern kommen bestenfalls noch Einzelfänge zustande, wobei unbekannt ist, ob es sich um überlebende oder um zugewanderte Bachforellen aus der oberliegenden Forellenregion (Metarhithral), bzw. aus den Nebengewässern handelt. Besatzmaßnahmen mit Bachforellen scheiterten in aller Regel. Mittlerweile wird zunehmend auf den Besatz mit Regenbogenforellen gesetzt, da der Besatz mit der Bachforelle in den betroffenen Gewässerstrecken nicht nachhaltig ist und nach der Überzeugung vieler Fischereivereine dem Tierschutz widerspricht.

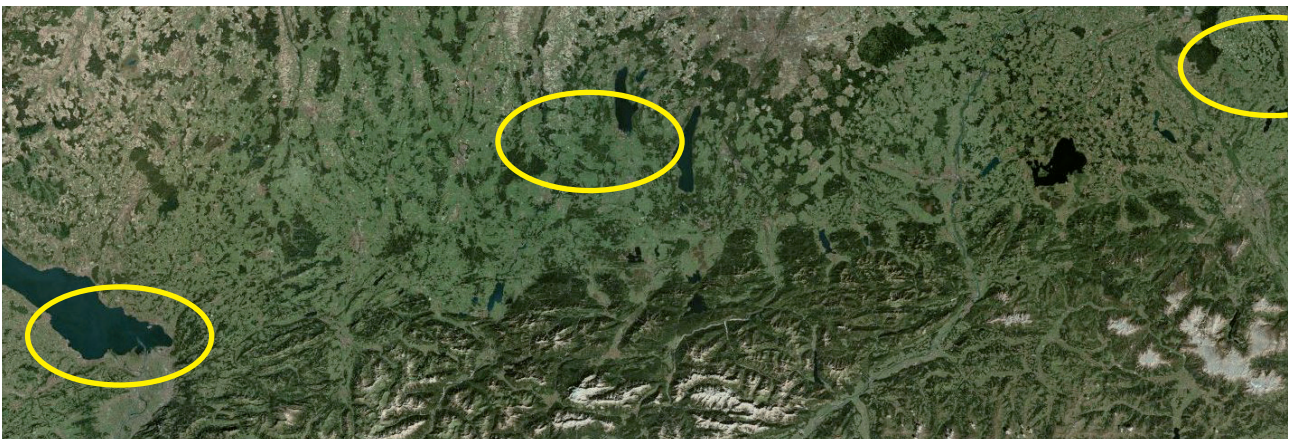


Abb. 2: Aus der Schweiz, Bayern und Österreich werden seit Jahren im südlichen voralpenraum ähnliche Sterben bei der Bachforelle geschildert

Das Forschungsprojekt »Bachforellensterben«

Nahezu zeitgleich mit den ersten ungeklärten Bachforellensterben in Bayern trafen ähnliche Meldungen aus den Nachbarländern Österreich, Schweiz und Liechtenstein (Abb. 2) ein (dort u.a. als »Schwarzforellensyndrom« bezeichnet). Auch hier traten die Sterben zur Spätsommerszeit auf, was zur Annahme führte, dass die Ursache in einer zu hohen Wassertemperatur und zu geringen Sauerstoffsättigung liegt.

Zumindest für die Ereignisse in Bayern schließen wir diese Ursachen aus, denn das ungeklärte Sterben trat auch bei Temperaturen unter 18 °C (Abb. 3), bei hoher Sauerstoffsättigung und ohne Nachweis bekannter Erreger auf. Die Datenlage reichte zum damaligen Zeitpunkt aber nicht aus, um diese und auch andere potenzielle Ursachen für das Sterbeereignis fundiert zu beurteilen.

Ein wesentliches Problem bei der Ursachenforschung für das Bachforellensterben ist, dass seine Beschreibung in der Mehrzahl aller Fälle nur auf Totfunde oder dem unnatürlichen Verhalten (Apathie, Verlust der Fluchtreaktion) und dem Erscheinungsbild (Dunkelfärbung, Exophthalmus) erkrankter Fische basiert. Eine solche Symptomatik tritt aber auch bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel der proliferativen Nierenerkrankung (PKD) auf. Eine klare Zuordnung erfordert also Laboruntersuchungen an einer ausreichend großen Zahl von Individuen, doch die Gewinnung von Probenmaterial wird schon allein durch das nur kurze saisonale Auftreten dieses Phänomens erschwert.

Bereits im Jahr 1998 nahm sich der Landesfischereiverband Bayern dieser Problematik an und begann damit, die betroffenen Gewässer zu charakterisieren.

Seit 2002 führen der Landesfischereiverband Bayern (LFV) und das Landesamt für Umwelt (LfU) im Rahmen eines Kooperationsprojekts eine intensive Ursachenforschung zum Bachforellensterben durch, unter anderem durch Expositionsversuche (Born & Schwaiger 2003; Lagerbauer, 2003). Die Ergebnisse dieses Projekts erlauben heute eine klare Beschreibung des Krankheitsbilds und seine Abgrenzung von anderen Erkrankungen. Damit ist es möglich, eine klare Definition des »Bachforellensterbens« in Bayern abzugeben und die Symptomatik mit jener aus den Nachbarländern zu vergleichen. Darüber hinaus wurde die Kartierung der betroffenen Gewässer, in welchen sterbende Bachforellen beobachtet und un-

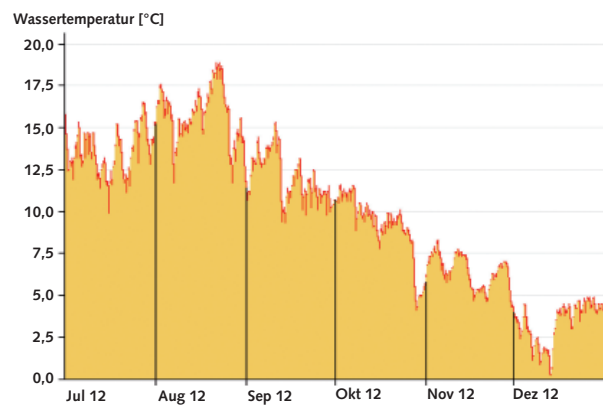


Abb. 3: Wassertemperatur an der Iller bei Kempten in der klassischen Zeit des Bachforellensterbens. Die Sterben treten trotz für Bachforellen optimaler Wassertemperaturen und hohen Sauerstoffkonzentrationen auf. (Quelle: www.hnd.bayern.de)

tersucht worden waren, fortgeführt (Born & Schwaiger 2003; Hanfland und Ruppe 2003, Ruff 2006).

Ziele der Teilprojekte

- Umfassende Datenerhebung über das Vorkommen des Bachforellensterbens und Untersuchung der betroffenen Fische
- Abgleich mit Gewässermerkmalen (Struktur, Fischregionen) und physikalisch/chemischen Parametern

Methodik

- Sammeln aller Meldungen von Fischereiberechtigten über ungeklärte Bachforellensterben
- Durchführung von Expositionsversuchen mit Bachforellen unterschiedlicher Altersgruppen an betroffenen Gewässern zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Elektrofischungen während der Sterbepériode
- Probengewinnung aus Bach- und Regenbogenforellen und Einsatz folgender Untersuchungsmethoden (siehe nachfolgende Vorträge):
 - Hämatologische Untersuchungen
 - Pathologisch-anatomische, histopathologische und parasitologische Untersuchungen
 - Biomarker-Analyse
 - Molekularbiologische Analysen
 - Genotypisierung
 - Bakteriologische und virologische Untersuchungen

- Langzeitmessung physikalisch/chemischer Parameter im Gewässer
 - Temperatur
 - pH
 - Leitfähigkeit
 - Sauerstoffgehalt
 - Stickstoffverbindungen
 - Trübung
- Erfassen der Strukturmerkmale und der Fischbiozöosen in betroffenen Gewässern

Auch das »Netzwerk Fischrückgang Schweiz« widmete sich in einem mehrere Millionen Franken teuren Projekt dieser Problematik (<http://www.fischnetz.ch>). Der Bachforellentrückgang in der Schweiz wurde im Ergebnisbericht des umfangreichen Projekts FischNetz u.a. maßgeblich auf PKD (proliferative kidney disease) zurückgeführt. Die Studie klärte jedoch nicht, ob das »Schwarzforellensyndrom« bei Fischen ohne PKD-Befund dem »Bachforellensterben« in Bayern entspricht.

Definition und pathologische Eingrenzung des Bachforellensterbens

Mangels einer klar identifizierten Ursache wird die Erkrankung auch heute noch rein phänomenologisch als »Bachforellensterben« oder »Schwarzforellensyndrom« bezeichnet, wobei – wie bereits erwähnt – noch zu klären sein wird, ob es sich um verschiedene Erkrankungen handelt.

Da jedoch vieles auf eine sehr ähnliche Symptomatik

hinweist, wäre eine einheitliche und griffige Begriffsfindung wünschenswert, nicht nur um eine grenzüberschreitende Wahrnehmung zu befördern, sondern auch, um die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit und der Fachwelt auf dieses Phänomen zu lenken.

Finden sich in Forellengewässern zwischen Ende Juli und Ende November apathische, meist auch dunkel verfärbte und rasch verendende Bachforellen, für deren Erkrankung keine schlüssige Erklärung gefunden werden kann, sollte untersucht werden, ob auch andere Kriterien für die Symptomatik des Bachforellensterbens zutreffen. Allerdings erlaubt nur eine gründliche veterinärmedizinische Untersuchung eine klare Beurteilung (Abb. 4).

Folgende weitere Befunde würden Hinweise auf das Bachforellensterben liefern: Typischer Weise findet sich kein mit der Erkrankung in Zusammenhang stehender Parasitenbefall, die chemisch-physikalischen Wasserparameter Sauerstoff, Temperatur und pH sind unauffällig, es liegt kein akuter Verdacht auf Einleitung fischtoxischer Stoffe vor; zudem ergeben die serologischen, virologischen, bakteriologischen und immunologischen Untersuchungsbefunde keine Hinweise auf das Vorliegen einer bisher bekannten Fischkrankheit. Zudem finden sich typischer Weise bestimmte klinische, hämatologische und histologische Veränderungen in den moribunden Fischen, die vom Bachforellensterben betroffen sind. Diese Symptome treten jedoch nicht immer in allen Fischen gleichzeitig oder mit gleicher Intensität auf. Zu nennen wären hier: Blutungen in der Leber; lymphozytäre Entspeicherung der Milz; Magenwandödeme; diffuse Einblutungen in die Darmwand; Ödeme (Aufweitungen peripherer Blutkapillaren) in



Abb. 4: Verendete »schwarze« Bachforelle vor der Sektion. Keine voreiligen Schlüsse, nur eine gründliche veterinärmedizinische Untersuchung erlaubt eine klare Beurteilung.

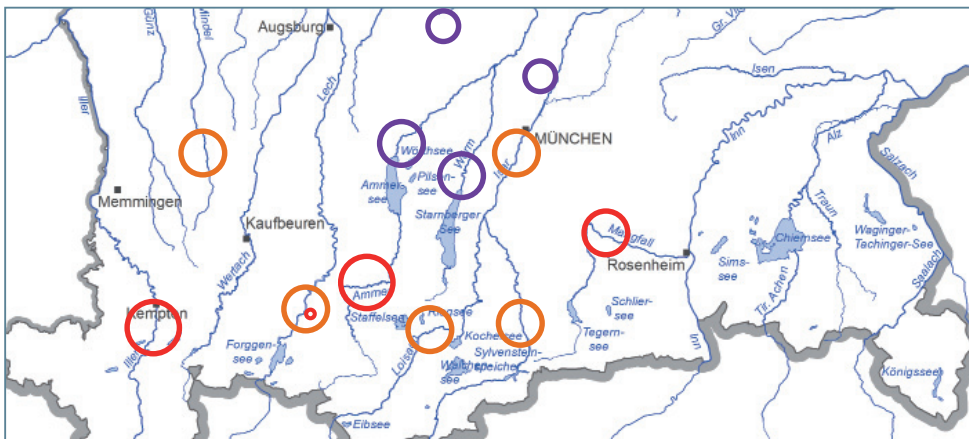


Abb. 5: Meldungen Bachforellensterben in Bayern;
 rot: BFS nachgewiesen,
 orange: BFS wahrscheinlich,
 lila: »Falschmeldungen«

den Kiemen; Abfall der Lymphozytenzahl und Zunahme der Heterophilen im Blut. Diese charakteristischen Symptome wurden erstmals am LfU, Wielenbach im Zuge der eingehenden Untersuchungen der letzten Jahre beschrieben (Schwaiger & Ferling 2003; Schwaiger et al., 2006).

Verbreitung des Bachforellensterbens in Bayern

Diagnostisch bestätigte Bachforellensterben sind heute aus folgenden Gewässern bekannt (Abb. 5): Ammer bei Peißenberg, Iller bei Kempten, Mangfall bei Bad Aibling/ Rosenheim und dem Premer Mühlbach, einem Ausleiter des oberen Lechs (Laggerbauer, 2003; Ruppe, 2005 & 2007). Die Expositionsversuche an Mangfall und Iller zeigten erhebliche Mortalität auf, übereinstimmend mit den Berichten der Fischereiberechtigten über hohe Verluste von wildlebenden Fischen (Laggerbauer, 2003).

An folgenden Gewässerstrecken spricht aufgrund heutiger Erkenntnisse vieles dafür, dass das Phänomen dort auftritt, gesichert ist dies jedoch nicht:

Isar bei Lengries und München, Flossach nordwestlich von Türkheim, Mindel im Landkreis Unterallgäu, Lech bei Apfeldorf, Lindach und Loisach bei Murnau.

Sicher auszuschließen ist das Bachforellensterben derzeit für die Würm (Ausleiter Starnberger See), die Amper (Ausleiter Ammersee), die Paar bei Mering, den Schleiferbach und die Moosach bei Freising (Ruppe, 2005).

Um Hinweise zu erhalten, welche Abschnitte in den jeweiligen Gewässern die größten Defizite im Bachforellenbestand aufweisen, wurden umfassende Fischbe-

standserhebungen durchgeführt. Demnach nimmt die Bachforellenpopulation in der Iller bis Fkm 131 linear ab, und ist stromabwärts davon vollends zusammengebrochen (Ruff 2006). Ähnliches wurde an der Ammer beobachtet, wo der Bachforellenbestand bei Böbing stromabwärts sprunghaft einbricht (Ruff, 2006). Nachfolgende Befischungen, die im Rahmen der Wasserrahmenrichtlinie vom LfU und dem Institut für Fischerei im durchgeführt wurden, wiesen im näheren Bereich Böbing bei Fkm 156 einen guten Bachforellenbestand nach. Die Bachforelle dominiert dort heute im Gegensatz zu früheren Untersuchungen und es sind alle Altersklassen vorhanden. Die Entwicklung in diesem dem Metarhithral zuzuordnenden Abschnitt wird von den Fischereiberechtigten bestätigt. Weiter stromab – im Bereich Peiting bei Fkm 150 (Hyporhithral) und nachfolgend – ist der Bestand, soweit überhaupt nachweisbar, allerdings nach wie vor marginal (Hanfland & Ruff 2008).

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass der Besatz mit Bachforellen im Einzugsgebiet der Untersuchungsstrecken die Ergebnisse überlagern kann. Weiterhin erschwert wird dies durch die Tatsache, dass für viele Fischereirechte keine lückenlose Dokumentation der Mengen, Größen und Herkunft von Besatzfischen vorliegt.

Stellt man die festgestellten Bachforellensterben und die Bestandsanalysen an diesem und anderen Gewässern gegenüber, dann lässt sich schlussfolgern, dass das Bachforellensterben vorrangig auf das Hyporhithral (Äschenregion) begrenzt ist, während die obere und untere Forellenregion (Epi- und Metarhithral), auch im kalkalpinen Gebiet, nicht betroffen ist. Seeausläufe wie Amper und Würm sind augenscheinlich nicht betroffen. Ebenso nicht klassische Kreideflüsse und -bäche wie z. B. die Moosach und Dorfen in den Landkreisen Freising und Erding.

Schwierigkeiten bzgl. der Eingrenzung der Verbreitung

Es ist nach wie vor schwierig, die Verbreitung des Bachforellensterbens klar einzugrenzen. Trotz nahezu flächendeckender Fischbestandserhebungen im Rahmen der WRRL ist an vielen Gewässern unklar, wo und in welchem Umfang das Sterben auftritt.

Man ist auf Meldungen der Fischereiberechtigten angewiesen. Allerdings hängt die Häufigkeit der Meldungen nicht nur vom Vorhandensein des Phänomens an sich, sondern auch von einer Reihe weiterer Faktoren ab. Je kleiner, klarer und ruhiger die betroffenen Fließgewässer sind, umso eher besteht die Wahrscheinlichkeit, dass in der kritischen Zeit zwischen Ende Juli und November auch kranke bzw. sterbende Fische gefunden werden. In trüben, schnellfließenden und/ oder tiefen Flüssen ist die Wahrscheinlichkeit, dass verendete Bachforellen gefunden werden, verhältnismäßig gering. Weiterhin spielt auch die Zahl fischfressender Vögel eine Rolle, welche verendende Fische rasch aus dem Gewässer entfernen.

Zudem hängen die Meldungen einerseits von der Begehungshäufigkeit der Gewässerstrecken ab, andererseits

aber natürlich auch von der Motivation der Fischer vor Ort. Über viele Jahre wurden Fische bereitwillig von eingebundenen Vereinen gemeldet und zur Untersuchung gebracht. Dies gestaltete sich mitunter aufwändig, da die Fische oft gegen Abend oder am Wochenende gefunden wurden. Der Lebendtransport zum Fischgesundheitsdienst und/oder zu den Labors des LfU in Wielenbach war oft nicht durchführbar, da den Fischern am Gewässer in aller Regel keine geeigneten Transportbehältnisse zur Verfügung stehen. Da bis dato kein wirksames Vorgehen gegen das Phänomen entwickelt werden konnte, ist es nachvollziehbar, dass auch die Motivation nachließ, beobachtete Fische zu melden.

Hinzu kommt, dass wegen des offensichtlichen Rückganges der Bachforellen in den betroffenen Strecken und des heute meist ausbleibenden Besatzes rein statistisch die Wahrscheinlichkeit gering ist, sterbende Bachforellen auch zu finden.

Folglich gehen bei zu niedrigen Bachforellenbeständen in den freien Gewässern auch keine Meldungen mehr ein. Daraus darf natürlich nicht der Umkehrschluss gezogen werden, dass das Syndrom nicht mehr aufträte.



Abb. 6: Wilde gesunde Bachforelle in natürlicher Umgebung, heute leider ein seltener Fund in vielen bayerischen Gewässern.

Hat die Bachforelle in Bayerns Alpenflüssen in der Äschenregion eine Zukunft?

Ob es sinnvoll ist, in den vom Bachforellensterben heimgesuchten Gewässern Bachforellenbesatz durchzuführen, ist eine vieldebattierte Frage, die nicht allein aus monetärer Sicht, sondern – wie eingangs erwähnt – auch aus naturschutz- und tierschutzfachlicher Sicht gestellt wird. Einerseits verdienen die Bemühungen vieler Fischereiberechtigter, die eingebrochenen Bestände durch Kompensationsbesatz aufrecht zu erhalten, durchaus Respekt. Andererseits muss konstatiert werden, dass diese Bemühungen fast uneingeschränkt erfolglos blieben. Eine wirkliche Lösung des Problems können Besatzmaßnahmen wahrscheinlich nicht bieten, solange die Ursache des Bachforellensterbens nicht identifiziert ist. Umso wichtiger erscheint es, die nicht davon belasteten Oberläufe und Seitengewässer als Reservoir für intakte Bachforellenbestände zu erhalten. Hier gilt es sorgfältig abzuwägen, ob an diesen Gewässern Besatz mit Bachforellen erforderlich ist, und, falls ja, in welcher Weise. Die vom LFV Bayern herausgegebene Broschüre »Fischbesatz in angelfischereilich genutzten Gewässern« (von Siemens, Hanfland & Braun 2012) bietet den Fischereiberechtigten hierzu Hilfestellung.

Wo sind Bachforellensterben zu melden?

Die Ursachenforschung zum Bachforellensterben erfordert weiterhin, das Engagement der Fischereiberechtigten. Die Vorstände der Vereine sind aufgerufen, bei ihren Mitgliedern die Sensibilität für das Thema zu fördern und die Abläufe im und am Gewässer wachsam zu verfolgen. Weiterhin sollten Fälle von Bachforellensterben dem LFV gemeldet werden. Nach vorheriger Absprache können einzelne, betroffene Fische möglichst noch lebend bzw. frisch verendet auf Eis gelagert ohne Verzögerung zur weiteren Untersuchung an das LfU, Dienststelle Wielenbach gebracht werden.

Ausblick:

Die Diskussion der vielseitigen Beiträge der 4 Themenblöcke dieses Symposiums soll dazu beitragen, die Ursachen des Phänomens zu ermitteln. So lassen sich hoffentlich für die Praxis Wege zur Lösung des Problems ableiten.

Literatur

- Born O., Schwaiger J. et al., 2003. Bachforellensterben in Bayern. Vorträge zum Symposium in Wielenbach. Zwei Jahre Expositionsversuche an der Iller. Schriftenreihe des Landesfischereiverbands Bayern e.V.. Heft 9. München.
- Hanfland S. & Ruppe J., 2003. Bachforellensterben in Bayern. Vorträge zum Symposium in Wielenbach. Beobachtungen zum Verlauf des Bachforellensterbens in ausgewählten Fließgewässern. Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes Bayern e.V. . Heft 9. München.
- Hanfland S. & Ruff T., 2008. Projektbericht :Umsetzung Artenhilfsprogramm Äsche. Fischbestandsentwicklung an Ammer, Loisach, Iller und Isar unter der Berücksichtigung der Gänsesägervergrämung. Landesfischereiverband Bayern e.V. München.
- Laggerbauer B., 2003. Abschlussbericht zum Forschungsprojekt Bachforellensterben in Südbayern. Landesfischereiverband Bayern e.V. München.
- Ruff M., 2006. Bachforellensterben im bayerischen Voralpenraum. Kartierung und Erfassung potenzieller Eintrittswege von Schadstoffen, sowie Fischbestandserhebungen im Einzugsgebiet von Teilbereichen der Iller und Ammer. Diplomarbeit an der Technischen Universität München. Weihenstephan.
- Ruppe J., 2005. Weiterführende Untersuchungen zum Projekt »Bachforellensterben« 2005. Projekte 703 und 305. Projektbericht LFV Bayern. München.
- Ruppe J., 2007. Eingrenzung und Bestimmung der Ursachen des »Bachforellensterbens« 2006. Projekte 306, 704 und 706. Projektbericht LFV Bayern. München.
- Schwaiger, J. & Ferling, H., 2003. Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen. Bayerns Fischerei und Gewässer 9, 31–36
- Schwaiger J., Gerst M., Ferling H., Guillon N., & Mallow U., 2006. Bachforellensterben in Bayern. Abschlussbericht zu den Vorhaben 2002–2004. Forschungsvorhaben 73e 04010069. Landesamt für Umwelt. München.
- von Siemens, Hanfland S. & Braun M., 2012. Fischbesatz in angelfischereilich genutzten Gewässern. Broschüre des Landesfischereiverbandes Bayern e.V. München.

Fischereiliche Grundlagenerhebungen und Arbeitshypothesen zum Bachforellensterben in den ersten Projektjahren

Oliver Born
Fachberater für das Fischereiwesen im Bezirk Schwaben

Zusammenfassung

Durch die Initiative des LFV Bayern e.V. wurden in der Folge ab 1998 in einem Gemeinschaftsprojekt zwischen dem damaligen Landesamt für Wasserwirtschaft (heute LfU), Abteilung Gewässerökologische Forschung in Wielenbach, dem Fischgesundheitsdienst in Bayern e.V. in Grub und dem LFV Bayern Untersuchungen zum Bachforellensterben durchgeführt. Im Rahmen eines zentralen Versuchs konnten in einer eigens errichteten Versuchsanlage an der Iller bei Kempten über mehrere Jahre hinweg Fische gehalten, kontinuierlich beobachtet und für weitere veterinärmedizinische Studien zur Untersuchung physiologischer Veränderungen der Organe zur Verfügung gestellt werden. Es konnten zahlreiche Arbeitshypothesen zur Ursacheneingrenzung wissenschaftlich überprüft werden. Grundlagen über den Zeitpunkt des Bachforellensterbens, Artspezifität und not-

wendige Expositionszeiten konnten erarbeitet werden und lieferten die Grundlage für weitergehende Untersuchungen.

Summary

In 1998 the Bavarian Fisheries Association/Landesfischereiverband Bayern (LFV Bayern e.V.) started investigating a series of unclear brown trout mortalities. In subsequent years a joint venture was initiated including the Bavarian Environment Agency/Landesamt für Umwelt (LfU) (formerly: Bavarian Agency for Water Management/Landesamt für Wasserwirtschaft), in particular its department for freshwater ecological research, located in Wielenbach and the Bavarian Fish Health Service/Fischgesundheitsdienst in Bayern e.V. (FGD Bayern), located in Grub in order to further clarify these brown trout casualties. In the course of decisive experiments carried out in a specially constructed experimental station on the banks of the river Iller near the town of Kempten during several consecutive years fish could be kept under controlled conditions and monitored permanently. Samples could be taken at any time for further veterinary studies in order to investigate physiological changes in the blood and the tissues of the organs. Various hypotheses in terms of narrowing down the causes could be scientifically tested. Basic knowledge was acquired as to the temporal pattern of these brown trout mortalities, the time frame of the infection or intoxication process and the species specificity, thus presenting a sound basis for further investigations.



Abb. 1: Am Bachforellensterben verendete Fische in der Ramsach (Oktober 2002).

Einleitung

In der zweiten Hälfte der 1990er Jahre wurden umfangreiche Untersuchungen zur Untersuchung der Rückgangsursachen der Fischbestände in Bayern begonnen. Durch die bayernweite Sammlung und Aufarbeitung von Fangergebnissen der Angelfischerei konnte ein dramatischer und flächendeckender Einbruch der Fischbestände in den bayerischen Fließgewässern aufgezeigt werden. Im Zuge der weiteren Studien wurde deutlich, dass der Rückgang einzelner Arten oftmals nicht monokausal auf eine einzige Ursache zurückgeführt werden konnte, sondern dass artspezifische Faktoren in dem Wirkungsgefüge zahlreicher Auslöser und Ursachen eine entscheidende Rolle spielten. Durch die intensiven persönlichen Kontakte zu den Fischereiberechtigten – vor allem im Rahmen des Artenhilfsprogramms Äsche – wurden vermehrt Beobachtungen über sterbende Bachforellen aus unterschiedlichen Fließgewässern Südbayerns bekannt. Einige Fischer berichteten, dass das Sterben bereits seit vielen Jahren stattfindet. Unter Beachtung der Untersuchungen in der Schweiz, der Beobachtungen in Liechtenstein und der Schilderungen aus Österreich reifte die Gewissheit, dass es sich bei dem Phänomen um ein ernst zu nehmendes, über einzelne Gewässer hinausgehendes Problem handelt.

Durch die Initiative des LFV Bayern e. V. wurden in der Folge ab 1998 in einem Gemeinschaftsprojekt zwischen dem damaligen Landesamt für Wasserwirtschaft (heute LfU), Abteilung Gewässerökologische Forschung in Wienlbach, dem Fischgesundheitsdienst in Bayern e. V. in Grub und dem LFV Bayern Untersuchungen zum Bachforellensterben durchgeführt. In dieser Zeit war nicht gesichert nachgewiesen, ob auch andere Fischarten von dem Sterben betroffen waren. Auch innerhalb der Art Bachforelle war unklar, ob alle Größenklassen betroffen waren und ob ein Zusammenhang mit gewissen gene-

tischen Herkunft hergestellt werden kann. Offen war auch die Frage, ob das Sterben jährlich in einem ähnlichen Zeitfenster und synchron in allen betroffenen Gewässern stattfindet. In den ersten Projektjahren wurden unglaublich viele Hypothesen zu den auslösenden Faktoren des Sterbens in den Raum gestellt, die in den meisten Fällen nicht a priori ausgeschlossen werden konnten. Fokussiert wurde bei den Vermutungen von vielen z. B. auf: Einflüsse durch die Kläranlagen, Einleitung von Schad- oder Giftstoffen aus diffusen oder Punktquellen, Veränderungen in den chemischen Gewässerparametern, Verarmung der genetischen Variabilität durch Besatz, unbekannte Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Pilze), Veränderungen in der Land- oder Forstbewirtschaftung, Einflüsse der verstärkten UV-Strahlung, uvm.

Aus den Ergebnissen des LFV Bayern (2003) war abzuleiten, dass in den vom Bachforellensterben betroffenen Gewässern Bachforellen aller Altersklassen im Spätsommer bis zum Herbst sterbend beobachtet werden können. Auch die Ergebnisse der Elektrofischungen in der Iller und anderen Gewässern bestätigten dies (Ruff 2005). In der Iller nimmt der Bachforellenbestand kontinuierlich vom Oberlauf zum Mittellauf ab. Ab dem Übergang von der unteren Forellen- zur Äschenregion bei Blaichach (Strecke 30, Fkm 131,5) ist der Bachforellenbestand extrem gering bzw. als erloschen zu bezeichnen.

Sehr bald stellte sich heraus, dass der Fang von Bachforellen zu Untersuchungszwecken aus den betroffenen Gewässerstrecken kaum Ziel führend durchführbar war. Zum einen waren die Populationsdichten bereits extrem gering und zum anderen war es in der vermuteten Zeit des Bachforellensterbens kaum möglich, sichtbar betroffene und dunkel gefärbte Bachforellen lebend zu fangen. Zur Ermittlung und Eingrenzung potentieller auslösender Einflüsse wurde daher ein eigener Großversuch als aktives Monitoring durchgeführt.

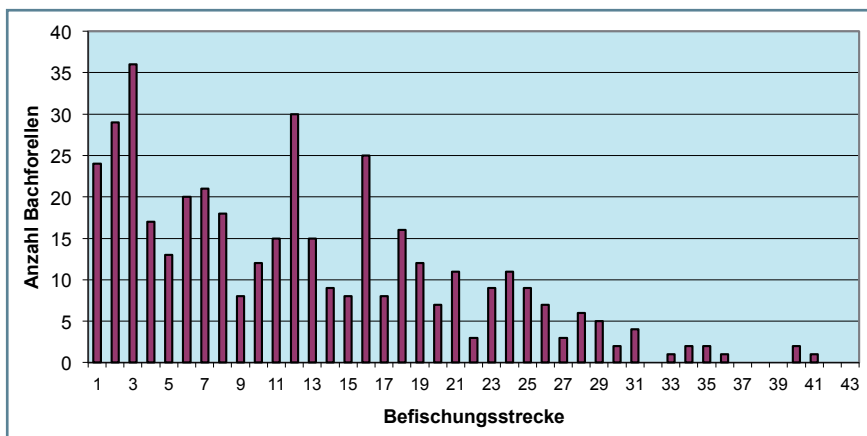


Abb. 2: Bachforellenfänge bei Elektrofischungen in der Iller 2005 von Fkm 147 (Strecke 1 stromauf Sonthofen) bis Fkm 125 (Strecke 43 bei Immenstadt)

Erstes Langzeitmonitoring an der Iller in Kempten (2000–2001)

Im Rahmen dieses Langzeitmonitorings in der Versuchsanlage an der Iller bei Kempten wurden über mehrere Jahre hinweg Fische gehalten, kontinuierlich beobachtet und für weitere veterinärmedizinische Studien zur Untersuchung physiologischer Veränderungen der Organe zur Verfügung gestellt. Es konnten zahlreiche Arbeitshypothesen zur Ursacheneingrenzung wissenschaftlich überprüft werden. Durch unterschiedliche Exposition der Tiere unter kontrollierten Versuchsbedingungen in Quell- und Illerwasser konnten die Verlusten während der Versuchsdurchführung kontinuierlich beobachtet und verglichen werden. Die zeitgleiche Haltung anderer typischer Illerfischarten und die Durchführung von Infektions- und Therapieversuchen wurden durch die Versuchsanlage erst möglich. Zusätzlich wurden umfangreiche histologische, bakteriologische, virologische und parasitologische Untersuchungen angestellt.

Ziel der Untersuchung war es, die möglichen negativen Einflüsse von Illerwasser auf die Fitness und Mortalität von Bachforellen zu überprüfen. Hierzu wurden über zwei Jahre hindurch (01.02.2000 bis zum 31.12.2001) entsprechende Versuche durchgeführt. Die Untersuchungen zur Fischgesundheit wurden von Dr. Schwaiger, Bayerisches Landesamt für Umwelt (ehemals Bay. Landesamt für Wasserwirtschaft) und Dr. Baath, Fachabteilung Fischgesundheit des Tiergesundheitsdienstes in Bayern e. V. in Grub übernommen. Die tägliche Kontrolle und Wartung der Versuchsanlage wurde von Mitgliedern des Fischereivereins Kempten e. V. sichergestellt.

Versuchsanordnung des Langzeitmonitorings

Der überdachte, damit vor direkter UV-Einstrahlung geschützte Raum, in unmittelbarer Nähe zur Iller lag in einer ehemaligen Fabrikhalle. Die Versuche wurden im Jahr 2000 in acht und im Jahr 2001 in zwölf großvolumigen Langstrombecken durchgeführt. Die Becken waren zum Teil durch Lochbleche in weitere Abteile unterteilt.

Das in der Halle zur Verfügung stehende Quellwasser wurde mit einem Gebläse mit Sauerstoff angereichert und durch den Durchlauf über einen speziellen Tropfkörper entgast. Als Versuchsfische für den Hauptversuch wurden 1- und 2-sömmrige Bachforellen gehalten. Die Besatzdichte betrug max. 250 1-sömmrige und 100 2-sömmrige



Abb. 3: Versuchsanlage Kempten (2000–2001).

Fische je Becken. Die Herkunft der Bachforellen verteilte sich auf vier unterschiedliche Fischzuchten. Es wurden Bachforellentypen bzw. Stämme, der Herkunft Seeforelle, Brown Trout, Wildfische (Rotgetupfte) und Mischlinge aus den Typen, eingesetzt. Darüber hinaus wurden die Arten Äsche, Nase, Barbe und Regenbogenforelle in kleineren Stückzahlen als Referenztiere gehalten. Insgesamt wurden bis zu 2000 Fische gleichzeitig in der Anlage gehalten. Erbrütungsversuche von Bachforelleneiern wurden mit sog. Firzlaß-Erbrütungsboxen durchgeführt. Die Erbrütungsboxen wurden in Brutrinnen eingesetzt. Eine Gruppe wurde mit Illerwasser versorgt, die Kontrollgruppe mit Quellwasser erbrütet.

Die tägliche Kontrolle wurde durch Mitglieder des Fischereivereins Kempten e. V. sichergestellt. Eine Fütterung der Versuchsfische mit Naturnahrung kam aufgrund langen Zeitdauer des Versuches nicht in Frage. Die Versuchsfische wurden mit handelsüblichen Fischfuttermitteln gefüttert. Bei der täglichen Kontrolle der Versuchsanlage wurde ein Tagesprotokoll erstellt. Verendete Fische wurden zur späteren Sektion vor Ort tiefgefroren verwahrt. Temperatur und pH-Wert wurden über dauerregistrierende Messeinrichtungen gemessen. Zusätzlich wurden begleitend vom WWA Kempten Beprobungen in der Iller oberhalb der Versuchsanlage durchgeführt. Wasserproben aus der Versuchsanlage wurden mehrmals vom Wasserlabor des FGD sowie vom WWA Kempten untersucht. Durch einen automatischen Probennehmer, der vom WWA Kempten zur Verfügung gestellt wurde, konnte sichergestellt werden, dass bei einem eventuell auftretenden Sterben und für den Fall einer stoßweisen Belastung in den Illerwasserbecken jederzeit entsprechende Wasserproben zur Analyse vorhanden waren. Der Probennehmer wurde so eingestellt, dass alle 10 Minuten eine Wasserprobe in eine zweistündige Mischprobe zugegeben wurde.

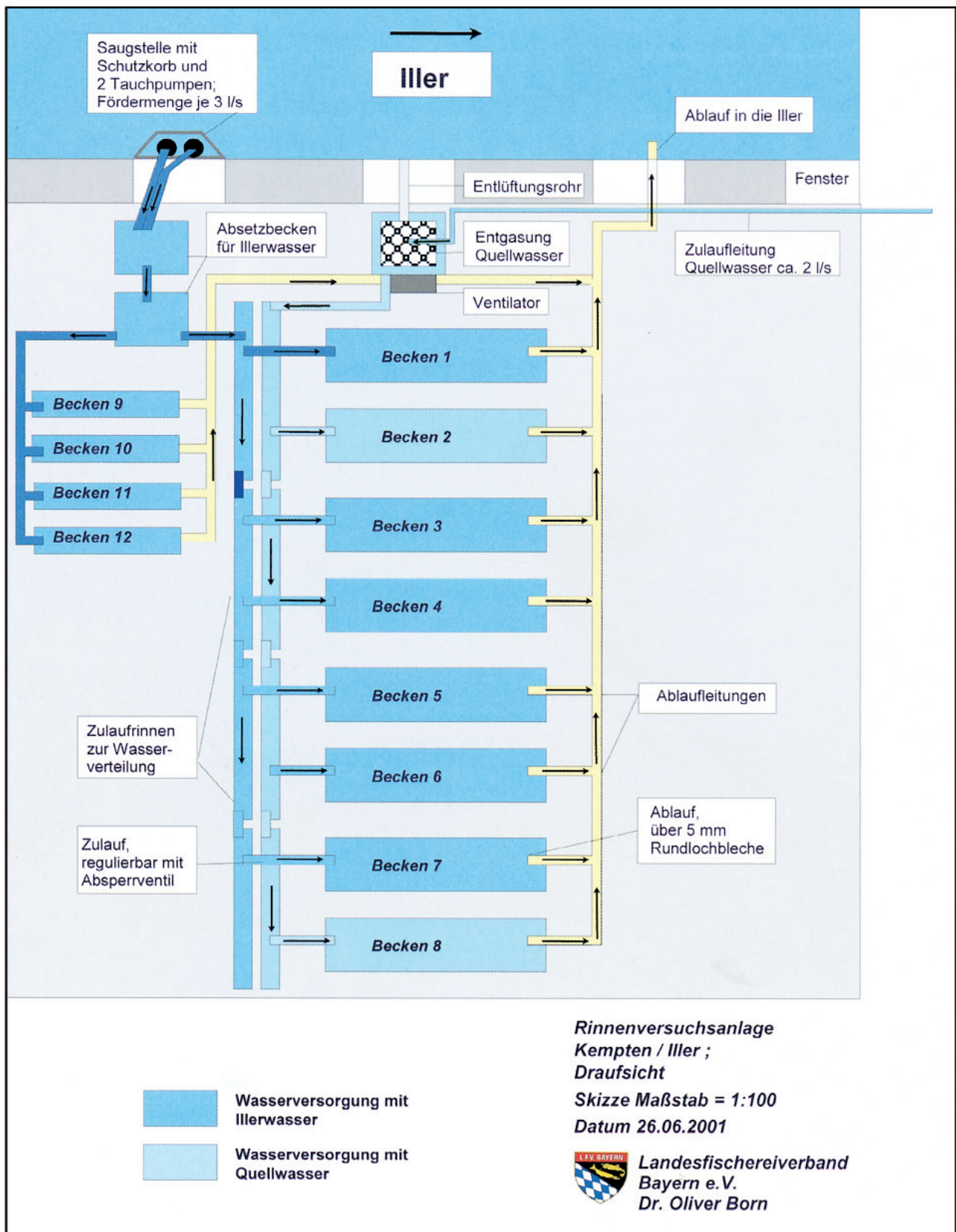


Abb. 4: Skizze der Versuchsanlage Kempten

Verlustraten in den Bachforellen-Versuchsbecken

Abbildung 4 gibt den Verlauf der Tagesverluste der Bachforellen in vier Versuchsbecken wieder. In den Illerwassergruppen sind im Laufe der Versuchsjahre 2000 und 2001 alle im Januar eingebrachten Bachforellen gestorben. Bis Ende August waren die Verluste sehr gering. Alle Illerwassergruppen zeigen ab Ende August die gleichen Symptome: keine Futteraufnahme, auffallendes Verhalten, kaum Schwimm- und Fluchtbewegungen, Dunkelfärbung.

Das Sterben dauert mehrere Wochen und wird auch von Phasen der Wassertrübung und erhöhter Wasserführung nicht aufgehalten. Die Verluste der Quellwasser-Gruppen waren mit 0 %–5 % sehr niedrig bzw. nicht vorhanden.

Trotz unterschiedlicher Besatzzeitpunkte (Besatz im Nov. 2000, April 2001, Mai 2001 und Juni 2001), in das Illerwasser, war der Beginn, die Dauer und der Verlauf des Sterbens in allen Gruppen absolut identisch. In keiner Versuchsgruppe überlebten Bachforellen, die vor dem 1. Juli in das Illerwasser gesetzt wurden. Das Umsetzen der Fische von Illerwasser in Quellwasser während der akuten Phase brachte keine Besserung mehr, auch diese Fische verstarben. Die Gruppe BF10/Iller wurde am 11.09.01 auf Quellwasserversorgung umgestellt. 100 % der Forellen starben im Quellwasser. Eine »Infektion« von Quellwasserfischen wurde aber in keinem Fall durch das Hinzusetzen von Fischen aus den Illerwasser nachgewiesen.

Das Sterben trat unabhängig von der Herkunft (Teich/Freiland/Fischzucht) und unabhängig von der genetischen Disposition (Seeforelle, Brown Trout, Wildform (Rotgetupfte)) in allen Gruppen gleich auf.

Fische, die im August ins Illerwasser gesetzt kamen, überlebten zunächst, starben jedoch z.T. im Dezember bzw. in der kritischen Phase im September des nächsten Jahres. Zu der Ausbildung einer »Immunität« kam es folglich nicht.

Das Sterben trat nur bei Bachforellen auf. In der Versuchseinrichtung gehaltene Nasen, Barben und Äschen zeigten keine Symptome. Die Verlustraten können als gering beurteilt werden. Im gleichen Becken gehaltene Regenbogenforellen zeigten in der kritischen Phase keinerlei Symptome. Bei den einsömmrigen und zweisömmrigen Äschen konnten nach einer Expositionszeit von ca. einem Jahr keine Hinweise auf eine erhöhte Mortalität der Fische im Illerwasser beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Schlupfrate und möglicher nega-

tiver Einflüsse des Illerwassers auf die Entwicklung und Fitness von Brütlings wurde ein early Life Test mit Bachforelleneiern durchgeführt. Im Illerwasser und im Quellwasser wurden jeweils 2000 Augenpunkteier erbrütet. Die Schlupfergebnisse können in beiden Versuchsanätzen als normal bezeichnet werden. Die Verlustraten waren mit 13 % im Illerwasser und 7 % im Quellwasser relativ niedrig.

Wassertemperatur, Sauerstoff, Leitfähigkeit und pH-Wert des Illerwassers erreichten während der Versuche nie den Grenzbereich für Salmoniden. Dies bestätigen auch die Messungen des WWA Kempten in der Iller. Das umfangreiche Messprogramm von Dr. Baars im Rahmen der Äschenuntersuchungen des LFV Bayern in den Jahren 1995–1997 bestätigt dieses Ergebnis. Die Freilanduntersuchungen in den übrigen Untersuchungsgewässern konnten ebenfalls keine Hinweise auf einen entscheidenden Einfluss der gewässerchemischen Grundparameter erbringen.

Aus dem Untersuchungsbericht des LfW (J. Schwaiger 2003) ergeben sich Hinweise auf schwere pathologische Veränderungen im Bereich der Organe. Die virologischen, bakteriologischen und histologischen Untersuchungen des FGD ergaben keinen konkreten Hinweis auf eine spezifische krankheitsbedingte Ursache, mit der man dem Sterben der Bachforellenbestände in bayerischen Gewässern erklären könnte.

Bewertung und Diskussion der Ergebnisse

Der Versuchsansatz und die Dokumentation der Mortalitäten der im Illerwasser gehaltenen Bachforellen erlauben in Verbindung mit den fundierten veterinärmedizinischen und wasserchemischen Untersuchungen weitergehende Aussagen zum Zeitpunkt und zum Verlauf des Sterbens. Zusätzlich zu den Haltungsvorsuchen wurde ein Early Life Test durchgeführt.

Die damaligen Ergebnisse der Freilanduntersuchungen und des aktiven Monitorings ließen keinen entscheidenden Einfluss nachfolgend aufgelisteter Einzelfaktoren auf das Bachforellensterben in den entsprechenden Fließgewässern, ungeachtet möglicher, bisher nicht erfassbarer Wechselwirkungen, erkennen:

- Veränderung der Grobstrukturen der Gewässern
- Reduzierung der Einleitung organischer Substanzen und damit »Nahrungsmangel«
- Konkurrenzsituation mit »besetzten Arten«

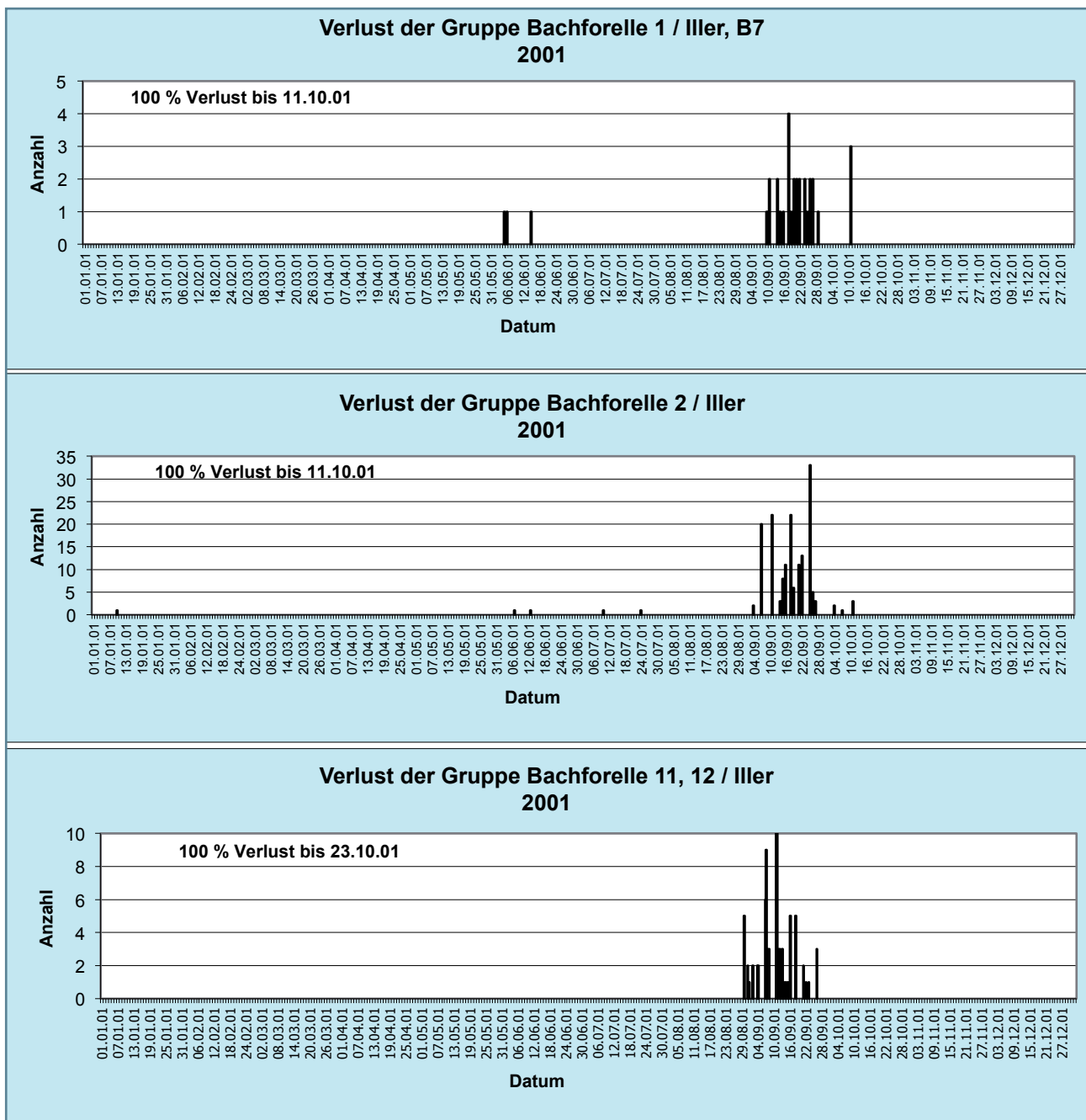


Abb. 5: Verlustraten der Bachforellen in den Illerwasser-Becken mit unterschiedlichen Besatzzeitpunkten im April, Mai und Juni 2001

- Genetische Verarmung bzw. Verfälschung durch Besatz
- Direkte UV-Strahlung
- Chemisch-physikalische Grundparameter.

Bei der Suche nach Krankheitserregern konnten in den ersten Jahren keine bekannten Viren oder Bakterien identifiziert werden, die für das Phänomen verantwortlich gemacht werden konnten. Auf der einen Seite sprach aus der damaligen Sicht einiges gegen eine solche »Krankheits-

these«: Während in den vom Hauptfluss frei durchwanderbaren Nebengewässern und in den Oberläufen betroffener Gewässer intakte Bachforellenpopulationen nachgewiesen wurden, starben die Fische im Herbst im Hauptgewässer. Eine Verbreitung des Sterbens in die Nebengewässer und in den Oberlauf war offenbar nicht möglich. Auf der anderen Seite deuteten viele Indizien der Pathologie darauf hin, dass möglicherweise ein bislang nicht bekannter Erreger für das Phänomen ursächlich war. Weiterhin fokussierte man nach den Untersuchungen in der Versuchsan-

lage an der Iller nach wie vor sehr stark auf fischtoxische Wasserinhaltsstoffe oder unbekannter Schadstoffe im Gewässer, die für die Auslösung des Sterbens verantwortlich sein könnten. Diskutiert wurden Einträge aus Land- und Forstwirtschaft, Kläranlagen, Mülldeponien und diffusen Quellen. Auch die Veralgung der Gewässer und die daraus resultierenden Veränderungen – pH-Wert, Sauerstoffübersättigung, Algentoxine – wurden weiter untersucht. Als relevante Stoffgruppen wurden z.B. Fällungshilfsmittel zur P-Fällung bzw. Schlammfällung diskutiert. Auch gewisse Inhaltsstoffe phosphatfreier Waschmittel werden in die Überlegungen einbezogen. Durch die Haltung von Bachforellen in Versuchsbecken im Nebenschluss von Gewässern hatten Untersuchungen von Schweizer Wissenschaftlern bereits erste Hinweise auf mögliche negative Einflüsse von Kläranlagen auf Fische geliefert (Fischnetz 1999). Nach weiteren Forschungen ließ sich dieser Ansatz jedoch nicht uneingeschränkt aufrechterhalten (Fischnetz 2000).

Die endokrine Wirkung unterschiedlicher Stoffgruppen wurde ebenfalls als eine potentielle Gefährdungsursache betrachtet. Nach den Ergebnissen der späteren, durch das LfU, Wielenbach durchgeführten Studien im Ablaufwasser der Kläranlage Thanners an der Iller scheinen jedoch sowohl endokrin wirksame Substanzen als auch weitere Stoffgruppen aus Kläranlagen als Ursache für das Bachforellensterben absolut unwahrscheinlich zu sein bzw. nicht in Frage zu kommen. Alle Hälterungsversuche und alle weiteren Analysen der Wasserinhaltsstoffe brachten keine brauchbaren Ergebnisse zur Erklärung des Bachforellensterbens. Auch eine vertiefte Analyse der Landnutzung im Einzugsgebiet brachte keine verwertbaren Hinweise auf mögliche ursächliche Zusammenhänge mit dem Bachforellensterben. Aus den Untersuchungen der ersten Jahre wurde deutlich, dass eine zielführende Ursachenforschung im Wesentlichen

über den Stoffwechsel der Bachforelle und weitergehende pathologische Untersuchungen im Rahmen verfeinerter aktiver Monitoringverfahren erfolgen musste.

Literatur

- Baars M., Born O. & Stein H., 2000. Charakterisierung der Äschenbestände in Bayern. Eine Untersuchung ausgewählter Populationen und ihrer Lebensräume. Bayerns Fischerei + Gewässer. Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes Bayern. Heft 5
- Friedl C., 1999. Fischfangrückgang in schweizerischen Fließgewässern. Mitteilung zur Fischerei Nr.63. BU-WAL
- Fischnetz 1999. 1. Fachseminar Fischnetz in Winterthur. In: Fischnetz – Info 1999, EAWAG
- Fischnetz 2000. Die 1. Teilprojektleiterkonferenz im Jahr 2000. In: Fischnetz – Info 2000, EAWAG, Schweiz
- LFV Bayern 2003. Bachforellensterben in Bayern, Schriftenreihe des LFV Bayern, Heft 9
- Ruff M., 2005. Bachforellensterben im bayerischen Voralpenraum, Untersuchungen zur Eingrenzung potentieller Schadfaktoren; Projektbericht TU-München
- Schmutz S., Kaufmann M., Vogel B. & Jungwirth M., 2000. Grundlagen zur Bewertung der Fischökologischen Funktionsfähigkeit von Fließgewässern. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt- und Wasserwirtschaft, Wasserwirtschaftskataster. Wien
- Stein H., Rottmann R., Kühn R., Gross R., Fuchs H., Hänfling B., Schlee P. & Born O., 2000. Genetische Differenzierung von Fischpopulationen bayerischer Gewässer. Sonderheft 4 der Schriftenreihe des Landesfischereiverbandes Bayern e. V.; 16S.

Ursachenermittlung nach dem Ausschlussverfahren – Versuchsansätze an der Iller und anderen Gewässern

Julia Schwaiger, Ferling Hermann, Gunnar Dembek, Michael Gerst & Karin Scholz
Bayerisches Landesamt für Umwelt, Dienststelle Wielenbach

Zusammenfassung

Seit vielen Jahren wird in voralpinen Gewässern Bayerns ein Bachforellensterben beobachtet. Das Bayerische Landesamt für Umwelt und der Landesfischereiverband Bayern führen seit über 10 Jahren umfangreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Ursache durch. Untersuchungsschwerpunkt ist die Iller bei Kempten. Die bisherigen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: das Bachforellensterben findet alljährlich reproduzierbar im Spätsommer statt. Betroffene Fische zeigen im Endstadium der Erkrankung ausgeprägte klinische Symptome wie Dunkelfärbung, Apathie und stark erhöhte Atemfrequenzen. Neben einer ausgeprägten Anämie und Leukopenie treten auch charakteristische pathologische Veränderungen vorwiegend im Bereich von Leber, Milz, Magendarmtrakt und Kiemen auf. Die Mortalität liegt bei nahezu 100 %. Das Geschehen kann ausschließlich durch UV-Bestrahlung des Flusswassers verhindert werden. Umweltschadstoffe scheiden nach den bisherigen Erkenntnissen als Ursache ebenso aus wie bakterielle Erreger und Parasiten. Neben Bachforellen und Seeforellen sind gleichermaßen auch Hybriden (Tigerforellen) betroffen. Eine Übertragung der Erkrankung von Fisch zu Fisch ist unwahrscheinlich. Entscheidend für einen Ausbruch des Bachforellensterbens ist eine mindestens 4-wöchige Exposition in Flusswasser im Frühsommer. Auch nach anschließender Hälterung in Quellwasser ist der Krankheitsprozess in der Regel irreversibel. Ein Auftreten des Bachforellensterbens wird offensichtlich durch zusätzliche Faktoren wie erhöhte Wassertemperatur und eine allgemein erhöhte organische Belastung des Gewässers beschleunigt. Neben der Iller sind auch andere Gewässer in Bayern vom Bachforellensterben betroffen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist von einer viralen Genese der Erkrankung auszugehen. Allerdings steht ein entsprechender Virusnachweis noch aus.

Summary

Since many years, a dying of brown trout was observed in pre-alpine waters of Bavaria. For more than 10 years, the Bavarian Environment Agency and the Fisheries Association of Bavaria carry out extensive investigations to elucidate the cause. The study focuses mainly on the river Iller at Kempten. So far the results can be summarized as follows: the brown trout dying reproducibly takes place every year in late summer. In the final stage of the disease affected fish show pronounced clinical signs such as darkening, apathy, and highly increased respiratory rates. In addition to a pronounced anemia, and leucopenia, characteristic pathological changes occur mainly in the liver, spleen, gastrointestinal tract and gills. The mortality rate is almost 100 %. The event can only be prevented by UV radiation of the river water. According to previous findings, environmental pollutants, as well as bacterial pathogens and parasites can be excluded as causative agents. In addition to brown trout and lake trout, hybrids (tiger trout) are equally affected. A transfer of the disease from fish to fish is improbable. Crucial for an outbreak of brown trout dying is a minimum of 4-week exposure in river water in early summer. Even after subsequent transfer of exposed fish to spring water, the disease process is usually irreversible. The occurrence of brown trout dying is obviously accelerated by additional factors such as increased water temperature and a generally increased organic load of the water body. In addition to the Iller also other Bavarian rivers are affected by the dying of brown trout. At present a viral etiology of the disease is assumed. However, a corresponding virus detection is still missing.

Einleitung

Seit rund 20 Jahren wird in voralpinen Fließgewässern Bayerns im Spätsommer ein Sterben von Bachforellen beobachtet (Born, 2003; Hanfland, 2003). Ähnliche Phänomene werden auch aus den Nachbarländern Österreich (Haunschmid, 2003) und der Schweiz (Escher, 2003) gemeldet.

Das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) führt gemeinsam mit dem Projektpartner Landesfischereiverband Bayern e. V. (LFV) seit dem Jahr 2002 umfangreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Ursache des Bachforellensterbens in Bayern durch.

Schwerpunkt der Untersuchungen war über den gesamten Untersuchungszeitraum die Iller im Stadtgebiet Kempten. Alljährlich führte hier eine Exposition von Bachforellen in Illerwasser im Spätsommer reproduzierbar zu einem Sterben der Tiere. Im Finalstadium der Erkrankung weisen die Tiere typische Symptome wie Apathie, Dunkelfärbung, erhöhte Atemfrequenz, Blutarmut und charakteristische Veränderungen im Bereich von Leber, Milz, Magen-Darm-Trakt und Kiemen auf (Schwaiger & Ferling, 2003). Aquarienversuche 2003 und 2004 auf dem Gelände der Allgäuer Überlandwerke (AÜW) in Kempten, bei denen Bachforellen über Monate dem Illerwasser entweder nativ oder nach Vorschaltung unterschiedlicher Filtersysteme (Basalt/Quarzsand; Aktivkohle; UV-Bestrahlung) ausgesetzt wurden, ergaben, dass ausschließlich eine UV-Behandlung des Illerwassers ein Bachforellensterben verhindern konnte. Chemisch-analytische Rückstandsuntersuchungen an exponierten Fischen, Filtermaterialien und Flusssedimenten lieferten keine Hinweise auf eine chemische Ursache des Fischsterbens. Eine ursprüngliche Hypothese, dass Kläranlageneinleitungen in ursächlichem Zusammenhang mit dem Bachforellensterben stehen, wurde ebenfalls widerlegt. Aufgrund der bis einschließlich 2005 ermittelten Untersuchungsergebnisse, wurde das Vorliegen einer Infektionskrankheit als Ursache immer wahrscheinlicher. Basierend auf den Erkenntnissen der Vorjahre, wurden in den Jahren 2008 und 2009 weitere Expositionsversuche an der Iller zur Ermittlung der Ursache durchgeführt. Zudem wurden auch andere bayerische Gewässer in die Untersuchungen miteinbezogen. Neben den am LfU durchgeführten Untersuchungen wurden andere Forschungseinrichtungen mit der Bearbeitung spezieller Fragestellungen beauftragt. Im Einzelnen wurde folgende Teilprojekte an Dritte vergeben:

- Bakteriologische, virologische und immunologische Untersuchungen zur Ursache des Bachforellensterbens in voralpinen Flüssen Bayerns: Friedrich Löffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems
- Genexpressionsanalysen: Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW), Technische Universität München (TUM)
- Virological examination and analysis of samples as part of an investigation into Bavarian Brown Trout mortalities: Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth, UK
- Metagenomic analysis of organ samples from the Bavarian brown trout disease study: Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth, UK

Untersuchungsansätze 2008 und 2009

Untersuchungen an der Iller 2008 – Versuchstationen in Kempten/AÜW, Thanners, Blaichach und Rubi

Ermittlung zur Ausbreitung des Bachforellensterbens an der Iller in der Fläche

Um die Region einzugrenzen, in der ein Bachforellensterben auftritt, wurden an vier verschiedenen Standorten (Kempten/AÜW, Flkm. 108,5; Thanners, Flkm. 123,5; Blaichach, Flkm. 134; Rubi, Flkm. 146) im Verlauf der Iller von Mai bis Dezember 2008 insgesamt 300 Bachforellen nativem Illerwasser ausgesetzt und hinsichtlich des Auftretens klinischer Krankheitssymptome beobachtet. Die Fischhaltung erfolgte in mit Illerwasser gespeisten Aquarien, die in Containern aufgestellt waren (Abb. 1). In Kempten waren die Aquarien in einem Gebäude der AÜW untergebracht. An allen Standorten wurde das Verhalten der Fische permanent mit WebCams überwacht, um ein Einsetzen des Bachforellensterbens sofort zu registrieren. Als Kontrollgruppe wurden gleichaltrige Geschwistertiere in der Versuchsanlage Wielenbach des LfU in Quellwasser gehalten.

Ermittlung eines Einflusses chemisch-physikalischer Wasserparameter auf das Krankheitsgeschehen

Die beschriebenen Versuchstationen waren jeweils mit einem Online-Messsystem (IQ-Sensornet, Fa. WTW) zur kontinuierlichen Erfassung chemisch-physikalischer Para-



Abb. 1: Container mit Versuchsanlage am Standort Rubi

meter (T°C, pH, O₂, Leitfähigkeit, Trübung) ausgestattet, um deren möglichen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen bzw. einen zwischen den Standorten diskriminierenden Faktor zu erfassen.

Weitere Untersuchungen an der Iller am Standort AÜW in Kempten 2008

Am Standort AÜW/Kempten wurden zusätzlich zur Aquarienhaltung im Außenbereich 7 Langstromrinnen aufgestellt, die kontinuierlich von Illerwasser durchströmt wurden. In diesen Expositionseinheiten wurden insgesamt 1330 Bachforellen und andere, verwandte Fischarten zur Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen exponiert (Abb. 2).

Erfassung der minimalen Expositionsdauer

Um Hinweise auf die für die Auslösung des Bachforellensterbens minimal notwendige Expositionsdauer in Illerwasser zu erhalten, wurde ein Teil der Bachforellen vom Expositionsstandort AÜW/Kempten nach unterschiedlichen Expositionszeiten (2, 4, 6 und 8 Wochen) in die mit Quellwasser gespeiste Quarantänestation der Dienststelle Wielenbach, LfU, überführt und dort im Hinblick auf das Einsetzen typischer Krankheitssymptome beobachtet.

Überprüfung der Übertragbarkeit auf andere Fischarten

In diesem Untersuchungsansatz wurden neben Bachforellen auch Seeforellen, Hybridformen (Tigerforellen, Elsässer Saiblinge) sowie Bachsaiblinge und Regenbogenforellen in Illerwasser exponiert. Dieser Versuch diente der Abklärung, inwieweit auch andere Salmoniden von dem Krankheitsgeschehen betroffen sein können.

Ermittlung/Ausschluss einer Beteiligung bakterieller Erreger

Um eine mögliche Beteiligung bakterieller Erreger indirekt nachzuweisen, wurde ein Bachforellenskollektiv während der Versuchsphase einmal monatlich einer Behandlung mit einem Breitbandantibiotikum (Baytril® 2,5 %; 0,4 ml/kg Körpergewicht) unterzogen. Bei einer weiteren Bachforellengruppe erfolgte einen Monat vor Versuchsbeginn eine Vakzinierung gegen Aeromonaden mit dem Impfstoff AquaVac™ Furovac (0,1 ml/Fisch). Im Falle einer bakteriellen Ursache des Bachforellensterbens, sollte durch diese Behandlungen ein Krankheitsausbruch verhindert werden.



Abb. 2: Langstromrinnen auf dem Gelände der AÜW/Kempton

Untersuchungen an Iller und Premer Mühlbach 2009

2009 wurden am Standort AÜW/Kempton Bachforellen und Regenbogenforellen in Langstromrinnen dem Illerwasser ausgesetzt. Die Expositionsdauer betrug bei einer Gruppe von Fischen 2 Wochen, für die übrigen Tiere 5 Wochen. Im Anschluss an die Exposition wurden die Fische auf insgesamt 7 Quellwasser-gespeiste Aquarien aufgeteilt und zur Abklärung verschiedener Fragestellungen unter Quarantänebedingungen bis zum Auftreten des Bachforellensterbens weiter gehalten. Die unterschiedlichen Versuchsansätze sind in Tab. 1 dargestellt. In 6 Aquarien wurde das Quellwasser den sommerlichen Temperaturverhältnissen an der Iller angepasst und entsprechend erwärmt. In einem Becken wurde die Temperatur des Quellwassers konstant bei 10°C gehalten.

Kontrollfische wurden ausschließlich Quellwasser ausgesetzt bzw. mit zuvor Iller-exponierten Bach- und Regenbogenforellen vergesellschaftet, um die Möglichkeit einer Krankheitsübertragung zu prüfen (Infektionsversuch 1 und 2). Des Weiteren wurden 31 Bachforellen, die bereits im Versuchsjahr 2008 eine Illerwasser-Exposition überlebt hatten, ein zweites Mal für 5 Wochen dem Illerwasser ausgesetzt und anschließend in Quellwasser gehalten.

Zudem wurden 30 Bachforellen, die zunächst für 8 Wochen dem Premer Mühlbach bei Prem-Lechbruck ausgesetzt waren und anschließend in einem weiteren, mit erwärmtem Quellwasser gespeisten Aquarium gehalten wurden, in die Untersuchungen miteinbezogen. Weitere 85 Individuen wurden dauerhaft in Wasser des Premer Mühlbaches gehalten.

Probenahmen und Probenaufbereitung für weiterführende Untersuchungen an Fischen

Die Fische aller Versuchsansätze wurden solange in den Expositionseinrichtungen gehalten bis die für das Bachforellensterben typischen, klinischen Symptome auftraten. Die Mortalitätsraten in allen Versuchs- und Kontrollbecken wurden kontinuierlich protokolliert. Fische mit klinischen Symptomen wurden unverzüglich aus den Expositionseinrichtungen entnommen. Nach Betäubung der Tiere mit MS 222 (Tricainmethansulfonat 100 mg/L) erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung hämatolo-

Aquarium	Expositionsdauer/ Flusswasser	Expositionsbedingungen/ Wielenbacher Quellwasser	Fischart und Anzahl
	Iller		
1	2 Wochen	Quellwasser erwärmt	30 BF
2	5 Wochen	Quellwasser erwärmt	103 BF
3	5 Wochen	Quellwasser 10°C	35 BF
4	5 Wochen	Quellwasser erwärmt	43 BF+20 BF (K), IV 1
5	5 Wochen	Quellwasser erwärmt	84 RF+20 BF (K), IV 2
6	5 Wochen	Quellwasser erwärmt	31 BF (Überlebende aus 2008)
7	–	Quellwasser erwärmt	67 BF Kontrollgruppe
	Premer Mühlbach		
8	8 Wochen	Quellwasser erwärmt	30 BF
	Dauerexposition		85 BF

Tab. 1: Expositionsdauer, Versuchsbedingungen sowie Art und Anzahl der Versuchsfische

BF: Bachforellen; RF: Regenbogenforellen; K: ausschließlich Quellwasser ausgesetzte Kontrolltiere; IV: Infektionsversuch

gischer Parameter. Nach anschließender Tötung, die in tiefer Narkose durch Genickschnitt erfolgte, wurden die Fische einer vollständigen Sektion unterzogen. Der Ernährungszustand sowie auftretende pathologisch-anatomische Organveränderungen wurden beurteilt und ein etwaiger Parasitenbefall protokolliert. Anschließend wurden Organproben für weiterführende histopathologische Untersuchungen histotechnisch aufbereitet. Zudem wurde umfangreiches Probenmaterial für bakteriologische, virologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert und an die verschiedenen Untersuchungsstellen (FLI, TUM, CEFAS) weitergeleitet.

Ergebnisse 2008/2009

Ergebnisse der Untersuchungen an der Iller 2008 – Versuchsstationen in Kempten/AÜW, Thanners, Blaichach und Rubi

Auftreten des Bachforellensterbens an der Iller in der Fläche

Die Expositionsversuche an den vier Versuchsstandorten zwischen Kempten und dem Illerursprung ermöglichten eine klare Eingrenzung der vom Bachforellensterben betroffenen Illerregion. An den Standorten AÜW/Kempten, Thanners und Blaichach wurde mit einer Mortalitätsrate von 100 % bzw. 96 % ein umfangreiches Bachforellensterben beobachtet. Allerdings fand das Fischsterben zeitlich versetzt statt (Abb. 3). Das Sterben begann am

25.08.2008 zunächst am Standort AÜW/Kempten, dicht gefolgt vom Standort Thanners (27.08.2008), während es im Bereich Blaichach erst ca. 3 Wochen später einsetzte (18.09.2008). Die Versuchsfische vom Standort Rubi sowie die Kontrollgruppe in Wielenbach waren vom Bachforellensterben nicht betroffen.

Hämatologische Untersuchungsergebnisse

Wie bereits beschrieben, wurden aus jedem Expositionsversuch mindestens 10 Fische hämatologisch untersucht. Exemplarisch sollen hier die an Fischen aus den verschiedenen Versuchs-Stationen an der Iller ermittelten und für das Bachforellensterben charakteristischen Blutveränderungen aufgezeigt werden. Wie in Abb. 4 dargestellt, waren bei vom Bachforellensterben betroffenen Fischen i.d.R. geringere Hämoglobin- und Hämatokritwerte als bei Kontrolltieren und Bachforellen vom Standort Rubi nachweisbar. Die Gesamtzahl der Erythrozyten war bei Fischen der Standorte Thanners und AÜW/Kempten signifikant reduziert. Auch eine Abnahme der Gesamtleukozytenzahl war zu verzeichnen (Abb. 5). Die Auswertung des weißen Differentialblutbildes ergab eine relative Abnahme des prozentualen Anteils von Lymphozyten (Lymphopenie) zugunsten einer Zunahme heterophiler Granulozyten sowie in der Regel eine deutliche Linksverschiebung (Zunahme stabkerniger gegenüber segmentkerniger Granulozyten) bei vom Bachforellensterben betroffenen Fischen. Auffällig war, dass auch bei Fischen vom Standort Rubi bereits eine, wenn auch geringere, Lymphopenie zu beobachten war. Generell wiesen er-

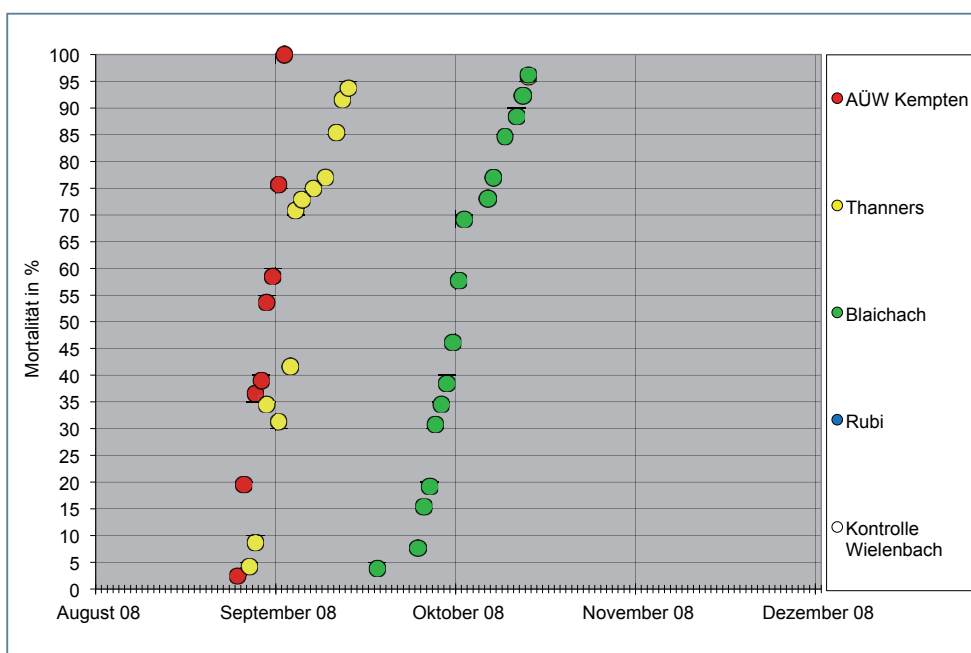


Abb. 3: Mortalität (%) bei Bachforellen an den verschiedenen Versuchsstandorten an der Iller sowie in der Kontrollgruppe

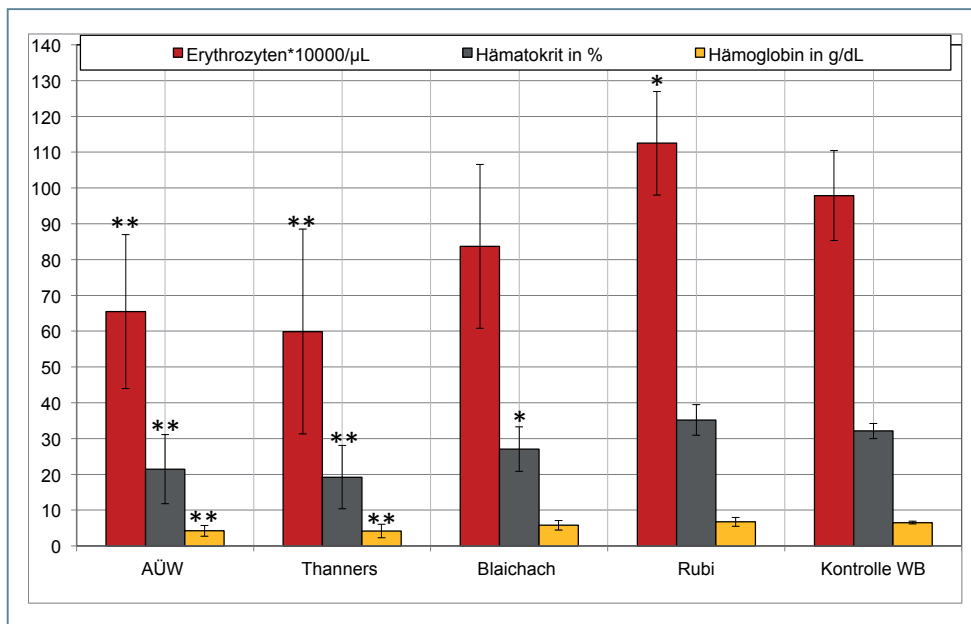


Abb. 4: Hämatologische Veränderungen bei Bachforellen an den verschiedenen Versuchsstandorten an der Iller sowie in der Kontrollgruppe: Gesamterythrozytenzahl (Million/μL), Hämatokrit (%), Hämoglobingehalt (g/dL); * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

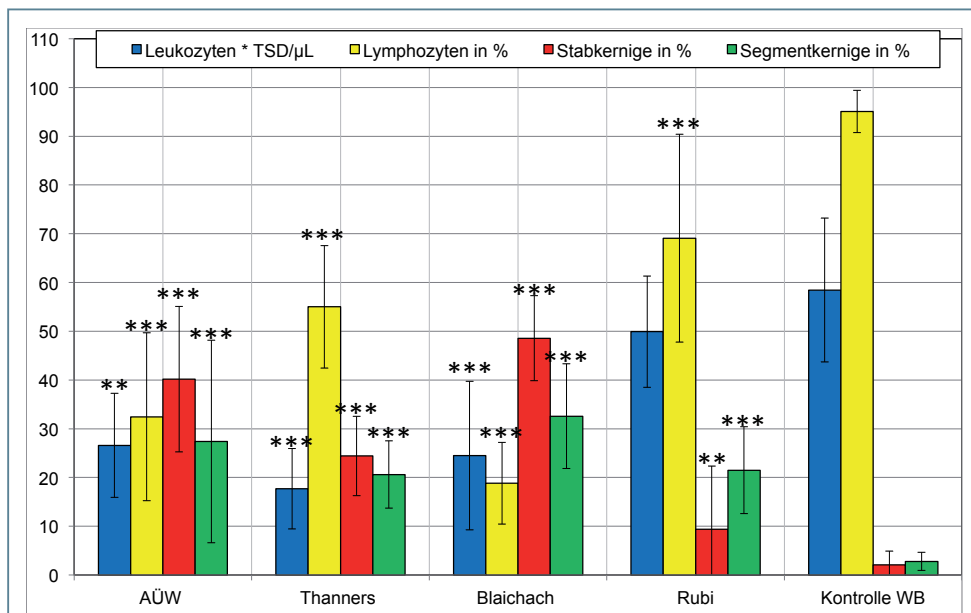


Abb. 5: Hämatologische Veränderungen bei Bachforellen an den verschiedenen Versuchsstandorten an der Iller-sowie in der Kontrollgruppe: Gesamtleukozytenzahl (Tausend/μL), Lymphozyten (%), heterophile Granulozyten (Anteil stabkerniger und segmentkerniger Granulozyten in %); ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

krankte Bachforellen gegenüber Kontrolltieren einen z. T. massiven Abbau von Erythrozyten und eine Zunahme von Erythrozytenvorstufen auf. Auch an den Leukozyten wurden degenerative Veränderungen festgestellt.

Pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde

Nahezu alle vom Bachforellensterben betroffenen Fische aus den verschiedenen Versuchsansätzen wurden pathologisch-anatomisch und parasitologisch untersucht. Insgesamt mindestens 10 Tiere pro Gruppe wurden einer pathologisch-histologischen Untersuchung zugeführt. Exemplarisch sollen hier die an Fischen aus den Expositionsversuchen an den verschiedenen Versuchsstandorten der Iller ermittelten und

für das Bachforellensterben typischen Veränderungen dargestellt werden. Folgende pathologisch-anatomische Befunde waren typisch für vom Bachforellensterben betroffene Fische: blasse, anämische Kiemen; gelbliche Verfärbung und petechiale Blutungen der Leber; Milzvergrößerung; katarhalische Entzündung des Magen-Darm-Traktes und Aszites (Abb. 6). Die parasitologische Untersuchung ergab keine von den Kontrollfischen abweichenden Befunde. Die histopathologischen Kardinalsymptome umfassten massive Blutungen, Zellnekrosen und Erythrophagie in der Leber, eine lymphozytäre Entspeicherung der Milz sowie eine Ödematisierung der Magenwand und im Bereich des respiratorischen Kiemenepithels. In den Abb. 7 bis 10 sind die wichtigsten histopathologischen Befunde dargestellt.



Abb. 6: Pathologisch-anatomisches Erscheinungsbild. Auffällig sind die blassen Kiemen, Blutungen in der Leber, Vergrößerung der Milz sowie ödematöse/entzündliche Veränderungen des Magen-Darm-Traktes

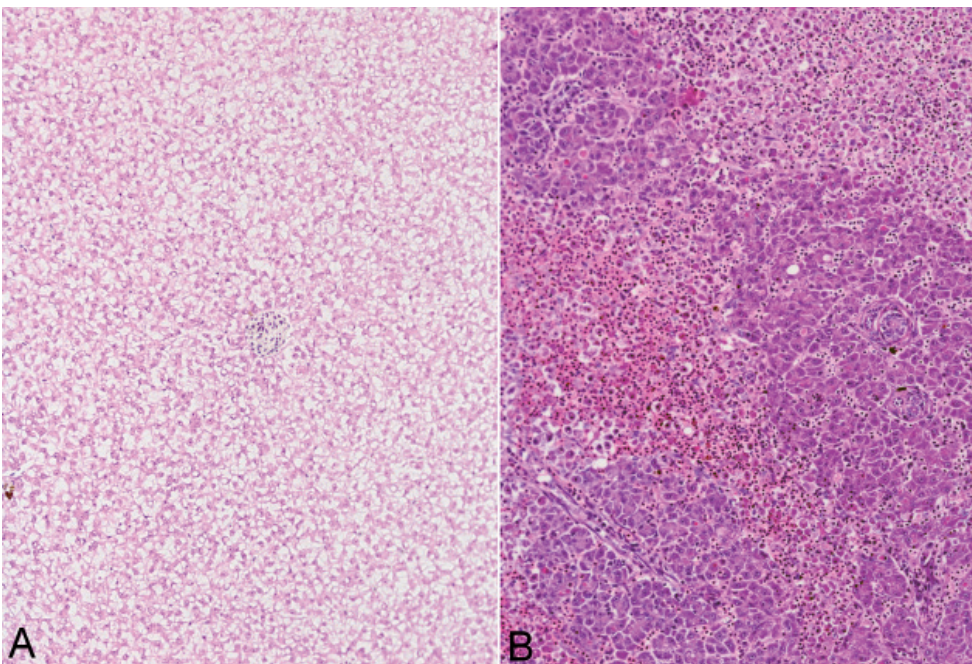


Abb. 7: Lebergewebe von Bachforellen. (A) Kontrolle: ohne pathologische Veränderungen; (B) nach Illerwasser-Exposition: Blutungen, Erythrophagie, Zellnekrosen; Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Primärvergrößerung 100 x

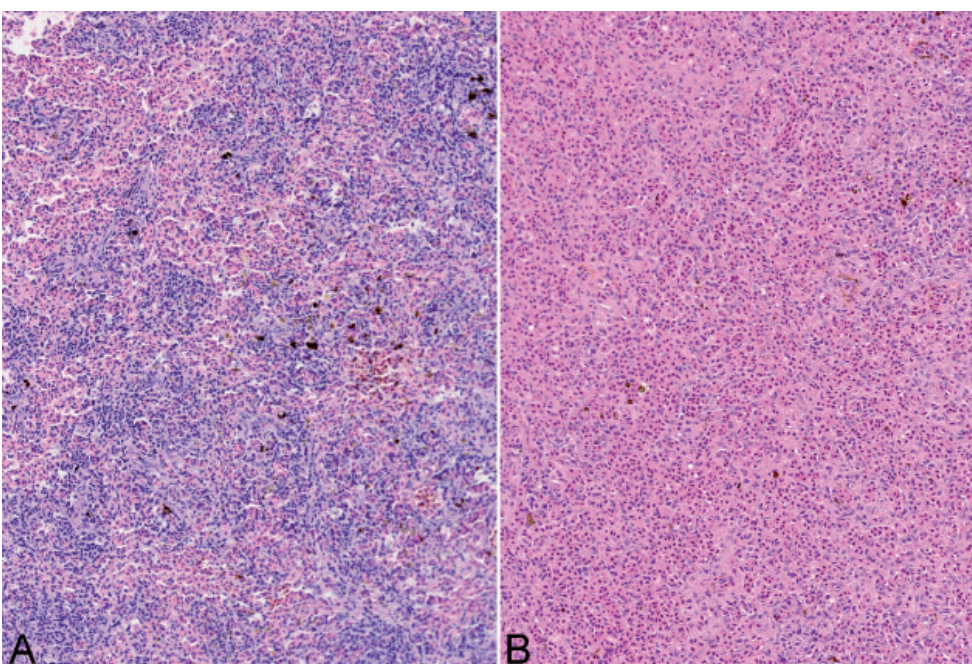


Abb. 8: Milzgewebe von Bachforellen. (A) Kontrolle: ohne pathologische Veränderungen; (B) nach Illerwasser-Exposition: lymphozytäre Entspeicherung; Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Primärvergrößerung 100 x

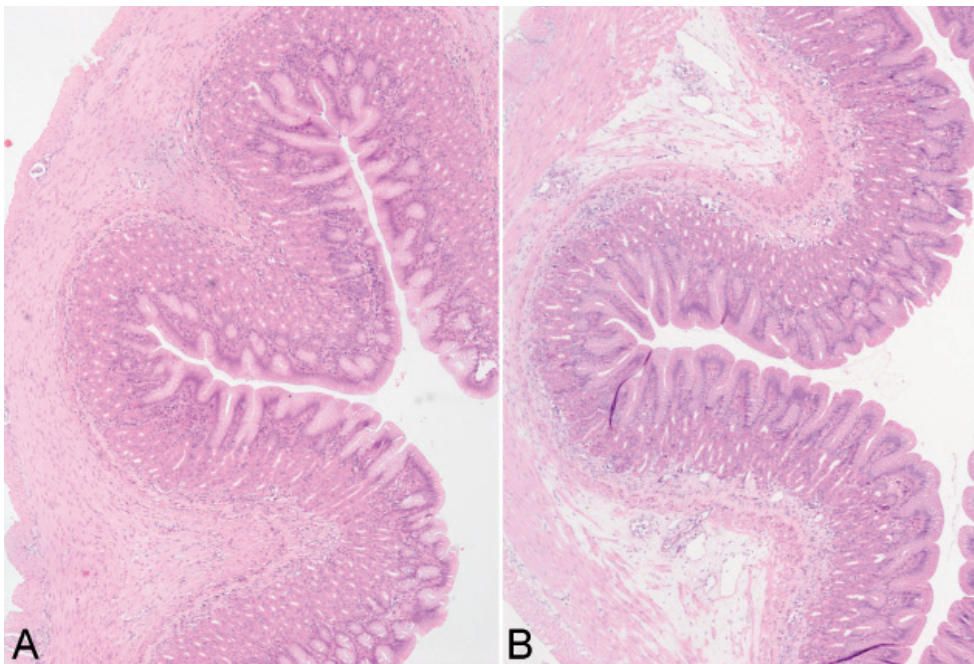


Abb. 9: Magenwand von Bachforellen. (A) Kontrolle: ohne pathologische Veränderungen; (B) nach Illerwasser-Exposition: massive Ödematisierung; Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Primärvergrößerung 40 x

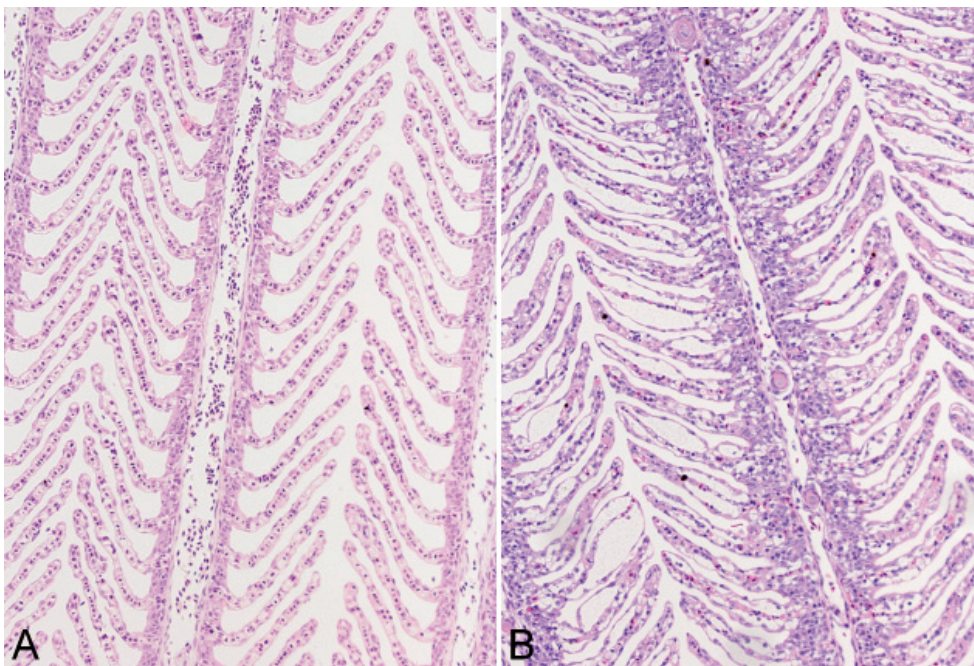


Abb. 10: Kiemengewebe von Bachforellen. (A) Kontrolle: ohne pathologische Veränderungen; (B) nach Illerwasser-Exposition: Ödematisierung des respiratorischen Epithels; Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Primärvergrößerung 100 x

Einfluss chemisch-physikalischer Wasserparameter

Von den chemisch-physikalischen Messdaten des Illerwassers wiesen nur die Wassertemperaturen Unterschiede zwischen den 4 Versuchsstandorten auf. Wie in Abb. 11 dargestellt, nahm im Versuchszeitraum der

prozentuale Anteil niedriger Wassertemperaturbereiche vom Standort Rubi flussabwärts bis zum Standort AÜW/Kempton kontinuierlich ab, während der Anteil hoher Wassertemperaturen flussabwärts im gleichen Zeitraum zunahm. Das Quellwasser in Wielenbach wies die höchsten Wassertemperaturen auf.

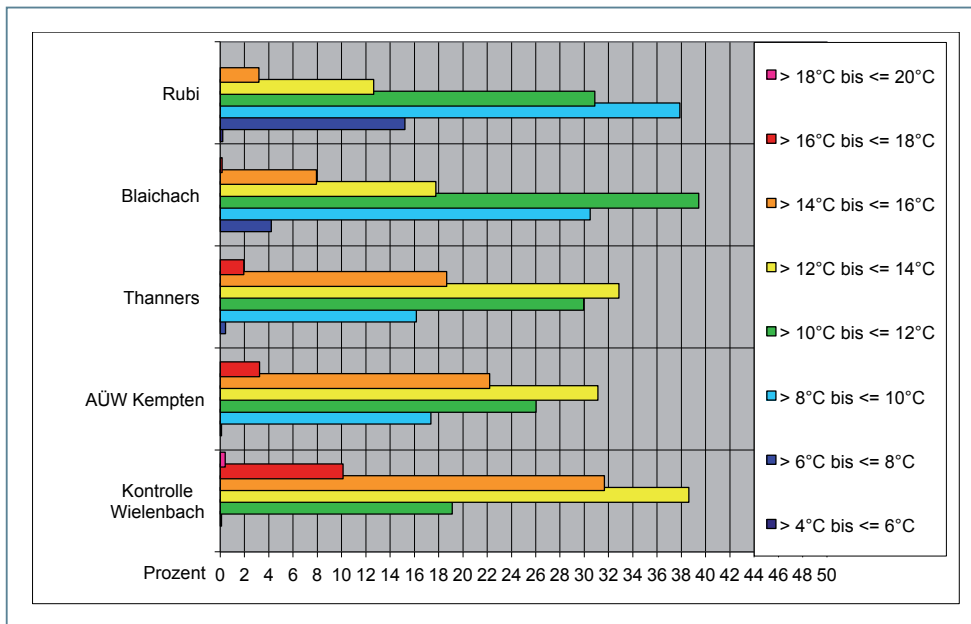


Abb. 11: Temperaturverteilung an den Versuchsstandorten

Ergebnisse der Untersuchungen an der Iller am Standort AÜW in Kempten 2008

Minimale Expositionsdauer

Die Untersuchungen zeigten, dass eine 4-wöchige Exposition von Bachforellen in Illerwasser von Mitte Mai bis Mitte Juni ausreicht, um während der anschließenden Hälterung in Wielenbacher Quellwasser im August ein Bachforellensterben auszulösen. Die Mortalitätsraten

nach 4-, 6- und 8-wöchiger Exposition in Illerwasser betrugen zwischen 97 % und 100 %. Von den Tieren, die für 2 Wochen Illerwasser ausgesetzt wurden, waren nur 7 % vom Bachforellensterben betroffen. Auffällig war, dass das Sterben bei Bachforellen, die nach der Illerwasser-Exposition in Wielenbacher Quellwasser gehalten wurden, um 5 Tage früher einsetzte als bei Individuen, die dauerhaft in Illerwasser am Standort AÜW/Kempten verblieben (Abb. 12).

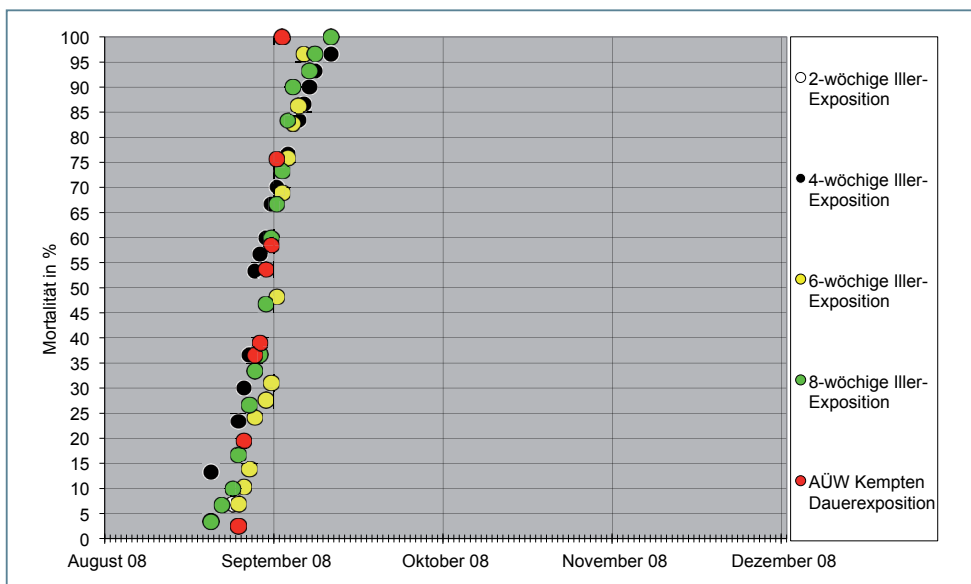


Abb. 12: Mortalität (%) bei Bachforellen nach 2-, 4-, 6- und 8-wöchiger Exposition in Illerwasser und anschließender Hälterung in Wielenbacher Quellwasser sowie nach Dauerexposition am Standort AÜW/Kempten

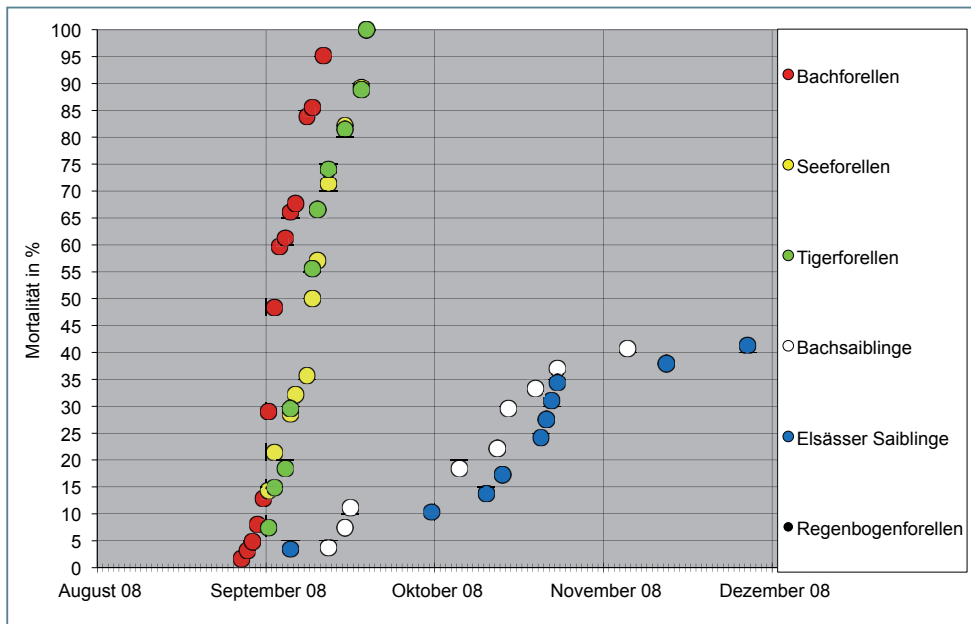


Abb. 13: Mortalität (%) bei Bachforellen und verwandten Fischarten nach Exposition in Illerwasser am Standort AÜW/Kempton

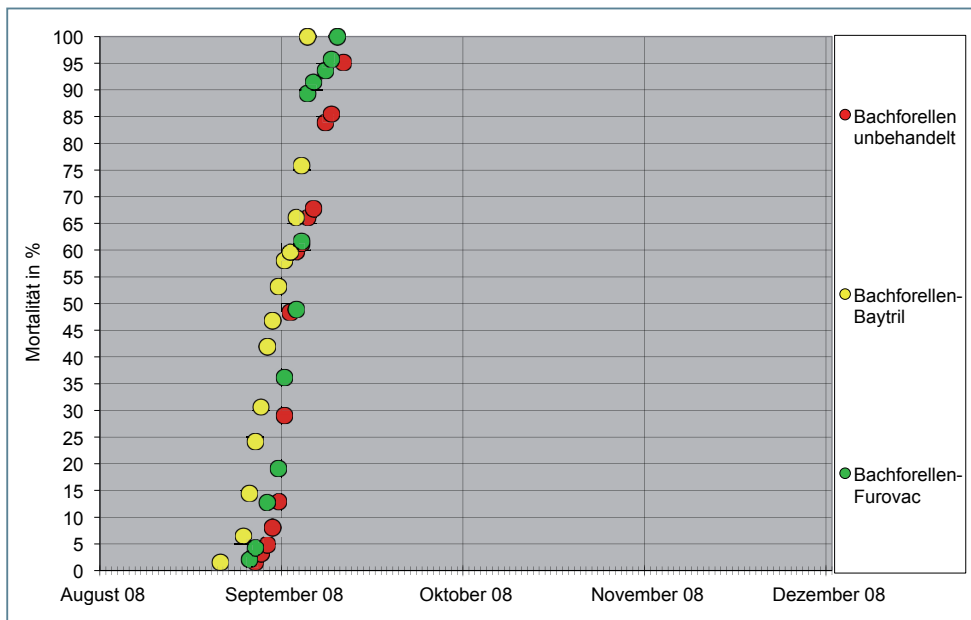


Abb. 14: Mortalität (%) bei antibiotisch behandelten (0,4 ml Baytril/kg/Monat), vakzinieren (0,1 ml Furovac/Fisch) sowie unbehandelten Bachforellen nach Exposition in Illerwasser am Standort AÜW/Kempton

Übertragbarkeit auf andere Fischarten

Bei Bachforellen, Seeforellen (beide: *Salmo trutta*) und Tigerforellen (*Salmo trutta* x *Salvelinus fontinalis*) trat das Bachforellensterben mit einer Mortalitätsrate zwischen 95 und 100 % auf. Bei Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) sowie Elsässer Saiblingen (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus alpinus*) lag die Mortalität bei 41 %. Das Sterben begann jedoch gegenüber den Bachforellen zeitversetzt im September und zog sich bis Ende November hin. Regenbogenforellen waren von dem Krankheitsgeschehen nicht betroffen (Abb. 13).

Beteiligung bakterieller Erreger

Weder eine wiederholte Behandlung mit einem Breitbandantibiotikum noch eine gegen Aeromonaden ge-

richtete prophylaktische Impfbehandlung konnten den Ausbruch eines Bachforellensterbens verhindern. In beiden Versuchsansätzen betrug die Mortalität 100 %. Auch eine Verzögerung des Sterbeverlaufs wurde nicht beobachtet (Abb. 14). In Auftrag gegebene bakteriologische Untersuchungen ergaben keinen Nachweis eines fischpathogenen Erregers.

Langstromrinnen an der Iller und am Premer Mühlbach 2009 – Ergebnisse

Auch im Versuchsjahr 2009 blieb nach einer 2-wöchigen Exposition in Illerwasser ein Bachforellensterben aus, während die Mortalitätsrate nach 5-wöchiger Illerwasser-Exposition und anschließender Hälterung in

erwärmtem Wielenbacher Quellwasser bei 100 % lag (Abb. 15). Eine Haltung in erwärmtem wie auch in 10°C-kühlem Quellwasser führte ebenfalls zu einer 100 %igen Mortalität. Allerdings trat das Bachforellensterben bei Fischen aus dem, mit kühlem Quellwasser gespeisten Becken, mit einer Verzögerung von etwa 4 Wochen auf (Abb. 16). Gesunde Bachforellen aus der Kontrollgruppe, die gemeinsam mit zuvor Illerwasser-exponierten Bachforellen (Infektionsversuch 1) bzw. Regenbogenforellen (Infektionsversuch 2) in Quellwasser gehalten wurden, entwickelten keinerlei Krankheitssymptome (Abb. 17). Von den Bachforellen, die im Versuchsjahr 2008 bereits eine Illerwasser-Exposition überlebt hatten, trat ein Bachforellensterben nur bei

65 % der Tiere auf. 35 % der Fische überlebten auch diese Illerwasser-Exposition ohne Krankheitssymptome (Abb. 18).

Neben den verschiedenen Versuchsansätzen an der Iller, wurde im Jahr 2009 zusätzlich eine Exposition von Bachforellen am Premer Mühlbach durchgeführt. Sowohl nach 8-wöchiger Exposition und anschließender Haltung in Wielenbacher Quellwasser als auch bei Dauerexposition in diesem Gewässer betrug die Mortalität nahezu 100 % (Abb. 19). Das Bachforellensterben bei Fischen aus dem Premer Mühlbach setzte fast zeitgleich mit dem Sterben von Illerwasser-exponierten Individuen ein.

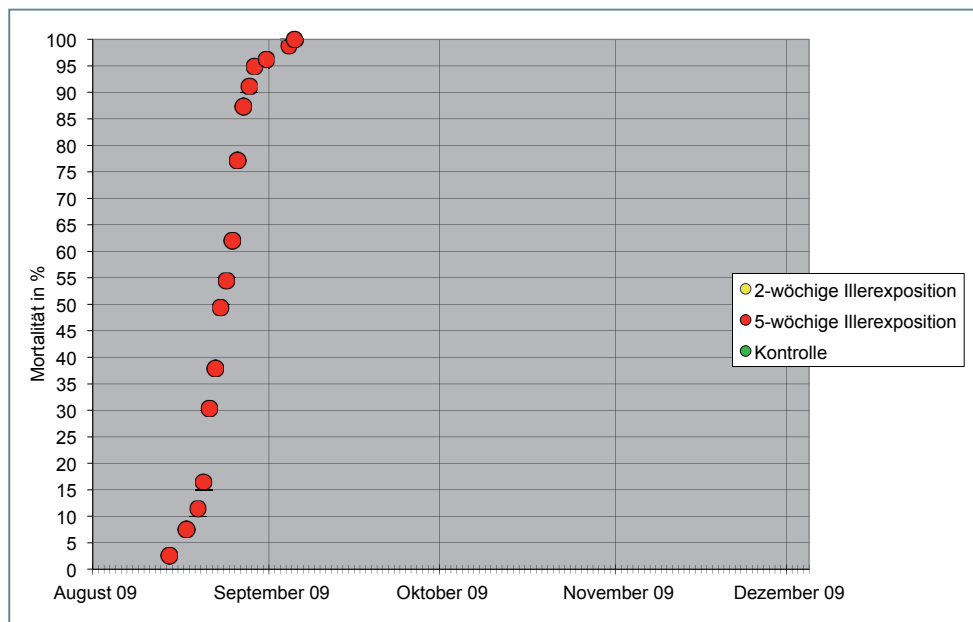


Abb. 15: Mortalität (%) bei Bachforellen nach 2- und 5-wöchiger Illerwasser-Exposition am Standort AÜW/Kempton und anschließender Haltung in erwärmtem Wielenbacher Quellwasser sowie bei Kontrolltieren

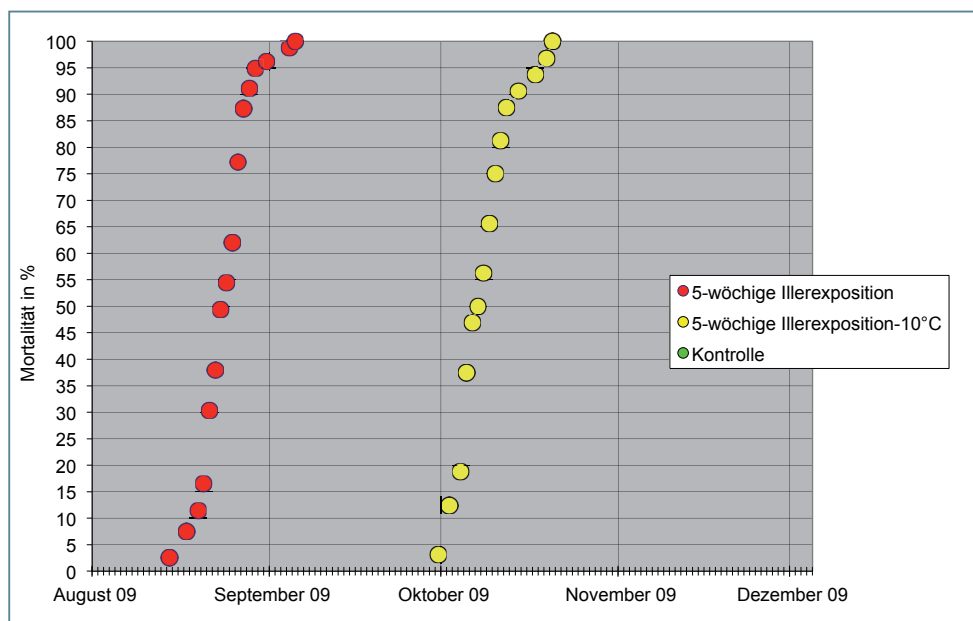


Abb. 16: Mortalität (%) bei Bachforellen nach 5-wöchiger Illerwasser-Exposition am Standort AÜW/Kempton und anschließender Haltung in erwärmtem bzw. 10°C-kühlem Wielenbacher Quellwasser sowie bei Kontrolltieren

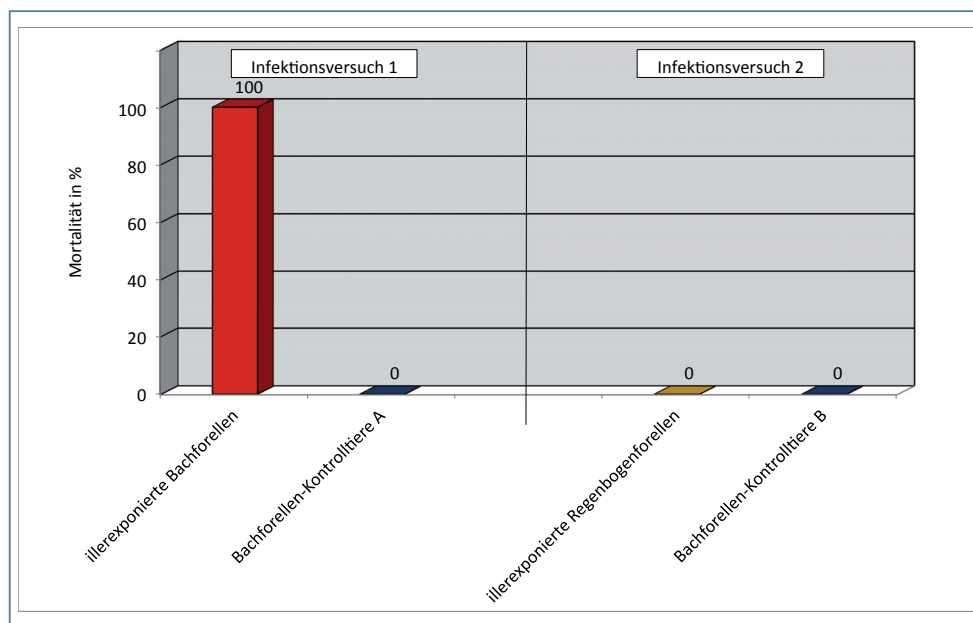


Abb. 17: Mortalität (%) bei Bachforellen nach Kohabitation von Kontrolltieren mit zuvor für 5 Wochen in Illerwasser am Standort AÜW/Kempten gehaltenen Bachforellen (Infektionsversuch 1) bzw. Regenbogenforellen (Infektionsversuch 2)

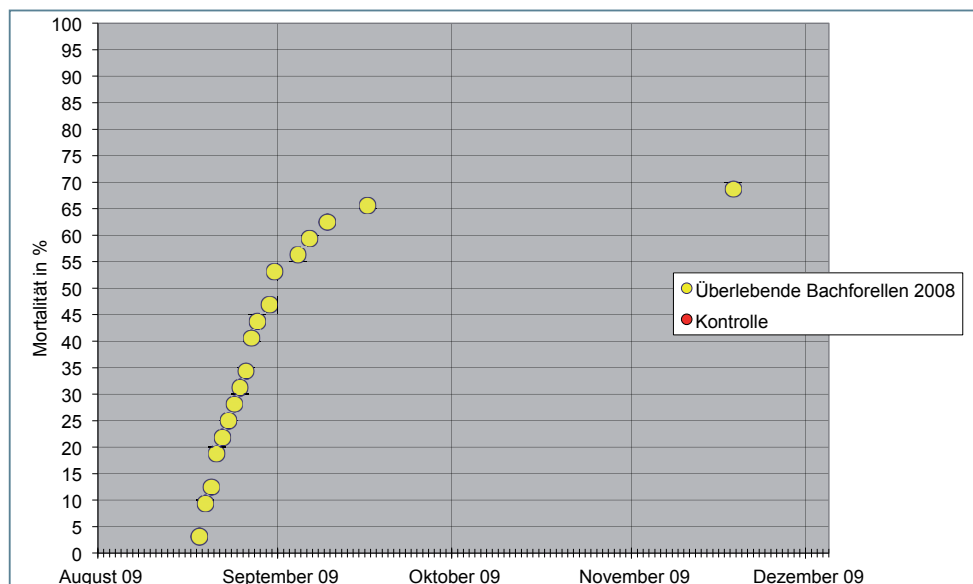


Abb. 18: Überlebende Bachforellen aus Expositionsversuchen 2008; Mortalität (%) bei Bachforellen nach erneuter, 5-wöchiger Illerwasser-Exposition (AÜW/Kempten) und anschließender Hälterung in erwärmtem Wielenbacher Quellwasser sowie bei Kontrolltieren

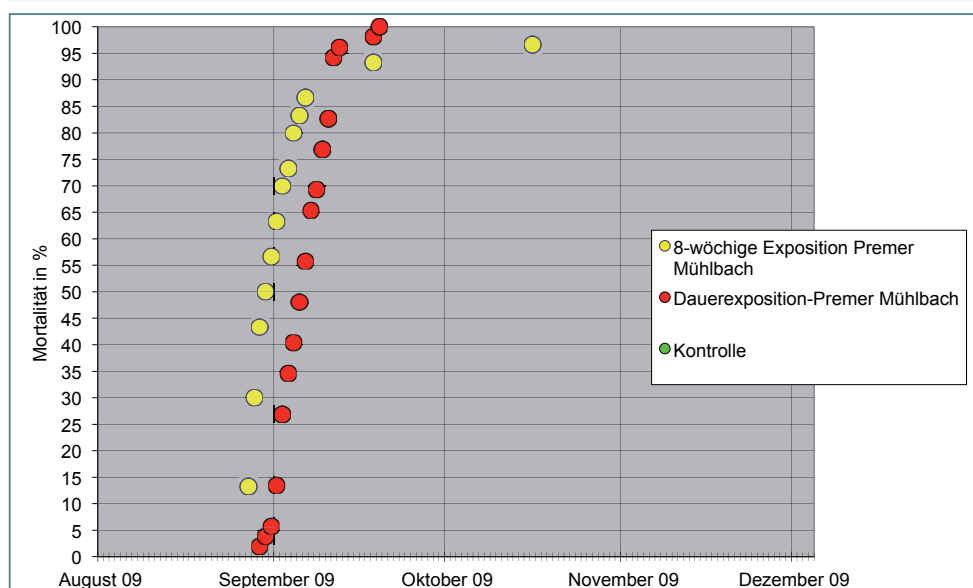


Abb. 19: Mortalität (%) bei Bachforellen nach 8-wöchiger Exposition am Premier Mühlbach und anschließender Hälterung in erwärmtem Wielenbacher Quellwasser bzw. nach Dauerexposition am Premier Mühlbach sowie bei Kontrolltieren

Diskussion

Seit rund 20 Jahren wird in voralpinen Fließgewässern Bayerns im Spätsommer ein Sterben von Bachforellen ungeklärter Ursache beobachtet. Seit 2002 bearbeitet das LfU gemeinsam mit dem Projektpartner LFV Bayern diese Thematik. In diesem Zeitraum wurden insgesamt rund 5500 Bachforellen und andere Salmoniden zur Abklärung unterschiedlicher Fragestellungen eingesetzt.

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst das Krankheitsbild mit den typischen hämatologischen, pathologisch-anatomischen und histopathologischen Kardinalsymptomen beschrieben. In der Folge bestand die Untersuchungsstrategie darin, nach dem Ausschlussverfahren der Ursache für das Bachforellensterben näher zu kommen. Die bis einschließlich 2005 erhobenen Befunde wurden in zwei Untersuchungsberichten zusammengefasst und sind unter http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/forschung_und_projekte/bachforellensterben/projektbeschreibung/index.htm abrufbar.

Schwerpunkt der Untersuchungen war über den gesamten Untersuchungszeitraum die Iller bei Kempten. Alljährlich führte dort eine Exposition von Bachforellen reproduzierbar zu einem Sterben von nahezu 100 % der Tiere. Der anfängliche Verdacht, dass ev. chemische Substanzen z. B. aus Kläranlageneinleitungen für das Fischsterben verantwortlich sein könnten, wurde widerlegt. Die Tatsache, dass ausschließlich eine UV-Bestrahlung von Illerwasser ein Sterben von Bachforellen verhindern konnte sowie Symptomatik und Verlauf der Erkrankung sprachen für eine infektiöse Ursache.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde 2008 und 2009 eine Vielzahl von Versuchsansätzen realisiert, deren Ergebnisse sich wie folgt zusammenfassen lassen.

Anhand der Ergebnisse aus den an 4 Standorten zwischen Kempten und dem Illerursprung bei Rubi durchgeführten Expositionsversuchen lässt sich die vom Bachforellensterben betroffene Gewässerstrecke örtlich eingrenzen. Während im Oberlauf der Iller im Bereich von Rubi kein Bachforellensterben zu beobachten war, trat an den Versuchsstandorten Blaichach, Thanners und AÜW/Kempten in großem Umfang ein Bachforellensterben auf. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus fischereilichen Erhebungen des LFV e. V., denen zufolge der Bachforellenbestand der Iller ab Blaichach flussabwärts deutlich dezimiert ist. Unterschiede zwischen den 4 Standorten hinsichtlich chemisch-physikalischer Parameter beschränkten sich auf die Wassertemperaturen. Diese lagen am Standort AÜW/Kempten am höchsten und nahmen bis zum Standort

Rubi kontinuierlich ab. Je höher die Wassertemperatur der Iller, desto früher wurde ein Bachforellensterben beobachtet. Entsprechend trat das Bachforellensterben als erstes am Standort AÜW/Kempten auf, gefolgt von den Standorten Thanners und Blaichach. Am Standort Rubi, wo die niedrigsten Wassertemperaturen gemessen wurden, fand kein Bachforellensterben statt. Weitere Versuchsansätze wiesen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der Wassertemperatur und dem Zeitpunkt des Auftretens des Bachforellensterbens hin. So trat die Erkrankung bei Bachforellen, die nach Illerwasser-Exposition in erwärmtem Quellwasser gehalten wurden, um 1 Monat früher auf als bei in 10 °C-kühlem Quellwasser gehaltenen Individuen. Für das Ausbleiben eines Bachforellensterbens am Standort Rubi sind verschiedene Gründe denkbar. (1) Der das Bachforellensterben verursachende Faktor ist nicht vorhanden. (2) Ein vorhandener infektiöser Erreger ist – z. B. bedingt durch niedrige Wassertemperaturen – nicht virulent. (3) Es fehlt ein entscheidender Faktor im Gewässer zur Übertragung der Erkrankung, z. B. ein obligater Zwischenwirt. Eine begleitende Bestimmung von Makrozoobenthos ergab im Gewässerverlauf neben dem Auftreten von Insekten flussabwärts vermehrt hololimnische Arten, die ev. als Infektionsträger fungieren können (unveröffentlichte Daten). (4) Die organische Belastung ist am Standort Rubi gegenüber den flussabwärts gelegenen Untersuchungsstellen sehr gering. Hierfür sprechen die Ergebnisse aus der Bestimmung des Saprobienindex, denen zufolge eine deutliche Zunahme des Belastungszustandes der Iller ab dem Standort Blaichach flussabwärts zu beobachten war (unveröffentlichte Daten). (5) Aufgrund der vergleichsweise günstigen Umweltbedingungen am Standort Rubi sind die Bachforellen gesundheitlich stabiler/resistenter gegenüber einem schädigenden Faktor als an den anderen, flussabwärts gelegenen Standorten.

Weitere Untersuchungsansätze dienten dazu, das Krankheitsgeschehen noch näher zu charakterisieren bzw. dessen mögliche Ursache einzugrenzen. Nachdem bakteriologische Untersuchungen keinen Erregernachweis erbrachten, wurden zum weiteren Ausschluss einer bakteriellen Ätiologie der Erkrankung 2 Bachforellengruppen dem Illerwasser ausgesetzt, von denen eine Gruppe regelmäßig antibiotisch behandelt, die andere gegen Aeromonaden vakziniert wurde. Trotz der Behandlungen trat in beiden Fischgruppen ein Bachforellensterben auf, sodass eine bakterielle Ursache hierfür eher unwahrscheinlich ist. Im Gegensatz dazu wurde in Österreich, wo seit einigen Jahren unter der Bezeichnung »Proliferative

Darkening Syndrom« ein Bachforellensterben mit vergleichbarer Symptomatik beobachtet wird (Haunschmid, 2003), eine bakterielle Septikämie als Ursache ermittelt. Nähere Infos hierzu finden sich unter <http://www.baw-igf.at/cms/content/view/138/329/lang.de/>.

Des Weiteren ergaben die aktuellen Untersuchungen, dass genetisch gleichartige Fischarten wie Seeforellen oder Hybridformen wie Tigerforellen in gleichem Ausmaß wie Bachforellen von dem Krankheitsgeschehen betroffen sind. Bei Bachsaiblingen und Elsässer Saiblingen traten Mortalitäten zeitlich verzögert und in geringerem Umfang auf, während Regenbogenforellen nicht erkrankten. Somit besteht offensichtlich eine genetische Disposition für die Erkrankung.

Zudem wurde ermittelt, dass eine einmonatige Exposition in Illerwasser von Mitte Mai bis Mitte Juni auch bei anschließender Hälterung in Quellwasser ausreichend ist, um im Spätsommer fast zeitgleich mit dauerexponierten Fischen ein Bachforellensterben auszulösen. Damit ist bewiesen, dass der Kontakt mit dem schädigenden Faktor im Illerwasser stattfindet. Eine Kohabitation von Illerwasser-exponierten Bach- und Regenbogenforellen mit gesunden, ausschließlich Quellwasser ausgesetzten Bachforellen führte zu keiner Übertragung der Erkrankung. Von Bedeutung ist, dass einzelne Bachforellen, die eine Illerwasser-Exposition überlebt haben, bei einer erneuten Exposition im darauf folgenden Jahr nicht mehr erkrankten. Es ist nicht auszuschließen, dass hier immunologische Mechanismen ev. im Sinne einer Immunitätsausbildung greifen. Für eine antigene Stimulation bzw. die Auseinandersetzung mit einem Erreger sprechen auch die Untersuchungsergebnisse der Projektpartner vom Friedrich Löffler-Institut (FLI) sowie der TUM.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist aufgrund der vorliegenden Datenlage eine virale Genese der Erkrankung wahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, dass die Tiere aufgrund einer hochgradigen Anämie und einem dadurch bedingten Sauerstoffmangel verenden. Als Ursache für die Anämie kommen folgende Möglichkeiten in Betracht. (1) Sie beruht auf einer direkten Schädigung der Erythrozyten (z. B. viral bedingte erhöhte Hämolyse). (2) Sie ist die Folge umfangreicher Blutungen im Bereich der inneren Organe (z. B. durch Permeabilitäts-erhöhung der Blutgefäße). Von pathogenetischer Bedeutung ist sicher auch die, im Verlauf der Erkrankung auftretende Degeneration von Leukozyten und die vermutlich hieraus resultierende Leukopenie/Lymphopenie. Auch dieser Befund lässt auf einen viralen Infekt bzw.

das Vorliegen einer Immunsuppression mit nachfolgender Virusinfektion schließen.

Der Verlauf des Bachforellensterbens wird offensichtlich durch zusätzliche Faktoren wie erhöhte Wassertemperaturen und organische Belastung des Gewässers beschleunigt. Nach erfolgtem Kontakt von Bachforellen mit dem verantwortlichen Faktor/Erreger im Frühsommer ist die Erkrankung in der Regel irreversibel und endet letal.

Neben der Ursachenermittlung wurde auch der Frage nach der Verbreitung des Bachforellensterbens in anderen Gewässern Südbayerns nachgegangen. Neben dem bereits vor einigen Jahren erbrachten Nachweis in Iller, Ammer und Mangfall (Hanfland & Ruppe, 2003) wurde i. R. der aktuellen Expositionsversuche ein vergleichbares Geschehen auch im Premer Mühlbach bei Lechbruck beobachtet. Darüber hinaus wurde nach Exposition von Bachforellen in der Floßach im Mindelgebiet durch die Fachberatung für Fischerei des Bezirks Schwaben im Jahr 2008 erstmals auch für ein Niedrigungsgewässer das Auftreten des Bachforellensterbens bestätigt. In beiden Fällen wiesen die untersuchten Fische die für das Bachforellensterben typischen Krankheitssymptome auf und verendeten fast zeitgleich mit den Bachforellen am Standort AÜW/Kempton an der Iller. Somit wurde der Beweis erbracht, dass es sich beim Bachforellensterben nicht um ein lokales, auf die Iller beschränktes Schaderignis handelt, sondern dass eine Reihe von Gewässern in Südbayern hiervon betroffen ist. Die Fischverluste sind erheblich und unter dem Aspekt eines nachhaltigen Arten- und Gewässerschutzes von großer Bedeutung.

Literatur

- Born O., 2003. Zwei Jahre Expositionsversuche an der Iller: Erkenntnisse zum Phänomen des Bachforellensterbens. *Bayerns Fischerei und Gewässer* 9, 15–25
- Escher M., 2003. Das »Schwarzforellensyndrom« in der Schweiz. *Bayerns Fischerei und Gewässer* 9, 51–58
- Hanfland S. & Ruppe J., 2003. Beobachtungen zum Verlauf des Bachforellensterbens in ausgewählten Fließgewässern. *Bayerns Fischerei und Gewässer* 9, 8–14
- Haunschmid R., 2003. »Schwarze Bachforelle«: Bisherige Erfahrungen in Österreich. *Bayerns Fischerei und Gewässer* 9, 62–69
- Schwaiger J. & Ferling H., 2003. Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen. *Bayerns Fischerei und Gewässer* 9, 31–36

Themenblock II:
Virologische, bakteriologische
und immunologische Untersuchungen

Bakteriologische, virologische und immunologische Untersuchungen zur Ursache des Bachforellensterbens in voralpinen Flüssen Bayerns

Bernd Köllner¹, Claudia Winkler¹, Dieter Fichtner², Sven Bergmann², Harald Granzow², Ulf Polster²

Friedrich Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, ¹ Institut für Immunologie;

² Institut für Infektionsmedizin Greifswald-Insel Riems

Zusammenfassung

In zwei Untersuchungsgängen wurden Ursachen für das Bachforellensterben mittels virologischen, bakteriologischen und immunologischen Methoden untersucht.

Im 1. Untersuchungszyklus konnten in Probenmaterial aus einem Expositionsversuch 2004 keine bei Salmoniden häufig isolierten viralen bzw. bakteriellen Krankheitserreger direkt nachgewiesen werden. Histopathologisch wurden massive entzündliche, teils nekrotische Schädigung der Nieren, ein nahezu vollständiger Glykogenverlust und Degenerationen von Hepatozyten in der Leber, starke Lymphozytendepletion vor allem von B-Zellen in der Milz sowie aktivierte (MHCII+++)-Entzündungszellen in allen untersuchten Organen gefunden. Eine orale Gabe von Organmaterial erkrankter auf gesunde Bachforellen löste eine vergleichbar Klinik ohne Anämie oder Leukopenie und ohne Mortalität aus. Im Ergebnis wurde als Ursache für das Bachforellensterben ein bisher unbekannter, sich sehr langsam vermehrender Infektionserreger oder eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes mit nachfolgender erhöhter Empfänglichkeit gegen schwach oder fakultativ pathogene Erreger angenommen.

Im 2. Untersuchungszyklus wurde aus einem Expositionsversuch 2006 kontinuierlich Organproben von 3 Gruppen 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Exposition, sowie mit Beginn des Sterbens genommen: (a) Bachforellen in ungefiltertem Illerwasser exponiert, (b) Bachforellen in UV-bestrahltem Illerwasser exponiert und (c) Bachforellen in Quellwasser gehalten. In einem Übertragungsversuch wurde Organmaterial erkrankter Tiere mehrfach auf gesunde Bachforellen oral bzw. über Bad übertragen. Anschließend wurde Organmaterial der Bachforellen aus beiden Versuchen vergleichend unter-

sucht. Im Ergebnis ist eine virale Genese der Erkrankung sehr wahrscheinlich auszuschließen. Allerdings ist Erkrankung, jedenfalls das klinische Bild, übertragbar. Klinische und histopathologische Veränderungen beginnen zwischen der 8. und 12. Woche. Sie äußern sich in zunehmenden, entzündlich-degenerativen Veränderungen in Niere, Kopfniere, Thymus und Milz. Bei Illerwasser exponierten Bachforellen endet dieser Prozess in einer lymphozytären Depletion in der Milz, starker Leukopenie und Anämie. In der Immunreaktion sind zwei Phasen unterscheidbar: (a) eine initiale Aktivierung von T-Lymphozyten NK-Zellen und Makrophagen und (b) ab der 12. Expositionswoche ein Reparaturversuch starker Leukozytenverluste. Aus der Niere erkrankter Bachforellen konnte ein Bakterium isoliert werden, welches zur Familie der Pseudomonaden gehört. Die biologischen Eigenschaften des isolierten *Pseudomonas spec.* und seiner sezernierten Proteine (Erythrozytenlyse, polyklonale Aktivierung von B-Lymphozyten) würden einen Teil der beobachteten Klinik und Histopathologie erklären. Ob dieser Erreger ursächlich für oder nur in die Erkrankung einbezogen ist konnte abschließend nicht geklärt werden. Ausgehend von den Daten wurde ein Pathogenesemodell entwickelt.

Summary

Possible reasons for the brown trout syndrome were investigated using virological, bacteriological and immunological methods.

In the first investigation cycle no viral or bacterial pathogens could be detected in samples from an exposure trial preformed in 2004 at river Iller. In all investigated organs a high percentage of activated inflammatory cells

(MHC II+++)) were detectable. Furthermore, massive inflammatory and necrotic degradation in the kidney, a nearly complete loss of glycogen and degenerations of hepatocytes in the liver as well as a strong depletion of lymphocytes especially B-cells in spleen were found. Additionally an oral application of organ material from diseased to healthy trout induced clinical signs comparable to those described for brown trout syndrome. Therefore, it was assumed that brown trout syndrome is caused by an infection with a yet unknown, slowly growing/replicating pathogen presumably combined with a disturbance of the physiological balance resulting in a increased susceptibility for low or facultative virulent pathogens.

In the second investigation cycle samples were taken after 4, 8 and 12 weeks exposure in river Iller as well as during mortality period from three exposure groups: (a) exposure to unfiltered Iller water (b) exposure to UV-treated Iller water and (c) exposure to spring water. Secondly, organ material of diseased, moribund trout from an exposure trial 2005 was applied several times orally or by bath exposure to healthy brown trout. Organ samples from exposed and applied trout were investigated using virological, bacteriological and immunological methods with following results: The involvement of viral pathogens is nearly excluded. However, the infectiousness of the disease at least of the clinical signs was shown the second time. Clinical and histopathological processes appear between 8 to 12 weeks post exposure or application detectable as increasing inflammatory, degenerative alteration in kidney, liver, thymus and spleen. In Iller water exposed trout these processes end up with strong leucopenia and anemia. In the immune response an initial activation of T-lymphocytes, NK-cells and macrophages can be distinguished from a restoration process starting around 12 weeks post exposure to compensate the strong leucopenia.

In this trial a bacterium for the genus *Pseudomonas* could be isolated from kidney of diseased trout from both river water exposed and organ material applied trout. The biological characteristics of this *Pseudomonas* and of secreted bacterial proteins (induces lysis of erythrocytes, polyclonal activation of B-lymphocytes) fits in part to the observed clinical and histopathological alteration on diseased brown trout. However it could not finally be proved whether this pathogen is causative for or just involved in brown trout syndrome. Taken together all data a model of pathogenesis of brown trout syndrome was developed.

Problemstellung:

Seit über 10 Jahren wird in Bayern, Österreich und der Schweiz, vorwiegend im Spätsommer, ein »Bachforellensterben« in freien Fließgewässern beobachtet. In einem relativ engen Zeitfenster von 4 Wochen (August/September) verenden 70–100 % der gesamten Population eines Gewässersystems. Die Bachforelle als Leitfischart der Forellenregion ist dadurch in zahlreichen Gewässern zur aussterbenden Art geworden.

Die klinischen Symptome sind prägnant: Schwarzfärbung, Apathie, Abmagerung Schnappatmung, schließlich Tod innerhalb weniger Stunden. Histopathologisch zeigen sich Blutungen in inneren Organen (Leber, Niere, Milz, Magen-Darmtrakt), Zellnekrosen und Entzündungsherde in Niere und Leber sowie lymphozytäre Depletionen in der Milz. Das Finalstadium ist von einer starken Anämie und Leukopenie geprägt (Schwaiger J. & Ferling H., 2003. Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen. Symposiumsband »Bachforellensterben in Bayern«, Hrsg. Landesfischereiverband Bayern e. V.).

Bisherige Untersuchungen im Bayerischen Landesamt für Umwelt deuten darauf hin, dass Faktoren im Gewässer selbst (z. B. chemische, chemisch-physikalische oder biologische Faktoren) eine entscheidende Rolle bei der Erkrankung spielen. In den Jahren 2003 und 2004 wurden Expositionsversuche mit Bachforellen an einem Fließgewässer (Iller bei Kempten) unter Vorschaltung verschiedener Filtersysteme, einzeln oder in Kombination, durchgeführt. Quarzsandfilter sollten Schwebstoffe eliminieren, Aktivkohlefilter lösliche Chemikalien binden, eine UV-Bestrahlung des Wassers infektiöser Erreger inaktivieren. Lediglich die UV-Bestrahlung verhinderte das Bachforellensterben, was auf UV inaktivierte Infektionserreger und/oder, UV-sensitive chemische Noxen, hindeutet. Die Spezifität der Erkrankung, Regenbogenforellen oder Äschen sind nicht betroffen, sprechen eher für eine infektiöse Ursache bzw. eine durch chemische Noxen verursachte Immunsuppression mit nachfolgender erhöhter Empfindlichkeit gegenüber fakultativ pathogenen Erregern. Die Einschränkung auf die warmen Sommermonate deutet zudem auf eine temperaturabhängige oder saisonal abhängige Ursache hin.

Am FLI sollten Proben aus einem Expositionsversuch an der Iller mittels virologischer, bakteriologischer und immunologischer Methoden untersucht werden, um:

- einen möglichen Infektionserreger zu isolieren,
- in Europa vorkommende bekannte Infektionserreger als Ursache auszuschließen, sowie

- eine mögliche Schädigung des Immunsystems zu charakterisieren.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Erkrankung durch Verabreichung von Organmaterial erkrankter Bachforellen auf gesunde Bachforellen übertragen werden kann.

Untersuchungsergebnisse

Im Folgenden werden die Untersuchungsmethoden nur sehr kurz beschrieben. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungsgänge 2005 und 2006 sind nacheinander dargestellt.

Untersuchungen 2005

In diesem Untersuchungsgang wurden Proben aus moribunden Bachforellen nach Exposition mit Illerwasser (2004) sowie aus einem Übertragungsversuch (2005) vergleichend untersucht.

Virologische Untersuchungen

Organmaterial von Bachforellen wurde auf 8 verschiedene potentiell Virus-empfindliche Zelllinien, verimpft und nach mehreren Passagen auf mikroskopisch und elektronenmikroskopisch auf viral bedingte zytopathische Effekte (CPE) untersucht. Die Zellkulturen zeigten weder morphologische Veränderungen noch waren virale Partikel nachweisbar. Auch mittels Virusspezifischer monoklonaler Antikörper konnten keine viralen Proteine nachgewiesen werden. Virale RNA/DNA war weder in der RTPCR/RT-PCR noch mittels »nested-PCR« nachweisbar (Tab. 1).

Bakteriologische Untersuchungen

Organmaterial von Bachforellen wurde auf Selektivnährböden inkubiert. In histologischen Schnitten wurde mittels Gram-Färbung nach Bakterien gesucht. Außerdem wurde nach bakterieller DNA (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio spec.*, *R. salmoninarum*) in allen Organanreigungen gesucht. In den untersuchten Proben konnten keine bakteriellen Krankheitserreger nachgewiesen werden. In Europa verbreitet vorkommende »klassische« Salmoniden-spezifischen Bakterien scheiden als Ursache für das Bachforellensterben aus.

Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Kryostat- und Paraffinschnitte wurden von allen Organen angefertigt und histologisch gefärbt. Außerdem wurden immunhistologische Untersuchungen mit Leukozyten spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die bekannten pathomorphologischen Veränderungen in den Organen moribunder Bachforellen wurden bestätigt. Es zeigten sich massive entzündliche, teils nekrotische Schädigungen der Nieren, ein nahezu vollständiger Glykogenverlust in der Leber gepaart mit einer Degeneration von Hepatozyten und eine starke Lymphozytendepletion vor allem von B-Zellen in der Milz. Darüber hinaus war in allen Organen ein hoher Prozentsatz von MHC II positiven Entzündungszellen nachweisbar. Jede der gefunden histopathologischen Veränderungen allein hätte den Tod der Tiere verursachen können (Tab. 2).

Die im Endstadium der Erkrankung beschriebene Anämie und Leukopenie ist sehr wahrscheinlich durch eine Verbrauchskoagulopathie in Folge massiver Schädigungen in der Leber und den Nieren verursacht. Der re-

Virus	RNA aus	RT-PCR für virales Protein, Größe des amplifizierten Produktes	nested PCR	Ergebnis
VHSV	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	G-Gen, 697 bp N-Gen, 878 bp	G-Gen 444 bp	negativ
IHN	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	G-Gen, 682 bp N-Gen, 310 bp	G-Gen 549 bp	negativ
IPNV	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	VP 2-NS-Gen, 226 bp	n. d.	negativ
ISAV	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	Gen (Segment 8), 155 bp	n. d.	negativ
SDV	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	Genom, 306 bp	n. d.	negativ
EHN	Niere, Leber, Kopfnieren, Kieme	Kapsidprotein-Gen, 580bp	n. d.	negativ

Tab. 1: Übersicht über die Versuche zum Nachweis viraler Genome in den Organproben

Organ	Schädigung	Tod durch
Leber	Glykogenverlust Hepatozytendegeneration	Verhungern Stoffwechselstörung, Vergiftung
Nieren	nekrotische Degenerationen	Exkretionsstörung
Milz	Lymphozytendepletion	Ausfall von Immunfunktionen

Tab. 2: Mögliche Ursachen, die ausgehend von den gefundenen histopathologischen Veränderungen in Organen moribunder Forellen, zum Tode der erkrankten Bachforellen führen können

sultierende starke Verlust von Erythrozyten in der Blutzirkulation bewirkt einen massiven Sauerstoffmangel im Gesamtorganismus mit nachfolgendem Erstickungstod.

Übertragungsversuch

Organanreibungsmaterial moribunder Bachforellen aus dem Expositionsversuch wurde an gesunde Bachforellen oral (feste Bestandteile) und per Bad (flüssige Bestandteile) appliziert und insgesamt 15 Wochen beobachtet. Eine Kontrollgruppe wurde in einem zweiten Aquarium unter gleichen Bedingungen gehalten. An drei Zeitpunkten wurden jeweils 5 belastete Forellen und 3 Kontrollforellen getötet und Organe für unterschiedliche Analysen entnommen.

Die Erkrankung lässt sich durch Verabreichung von Organmaterial toter Bachforellen übertragen. Die Klinik (Apathie, keine Nahrungsaufnahme, Gewichtsverlust;

Abb. 1) gleicht der beim Bachforellensterben beobachteten. Allerdings überlebten alle Forellen. Die histopathologischen Veränderungen in Leber, Nieren und Milz gleichen den oben beschriebenen Befunden. Im Darm wurde zusätzlich eine Schädigung des Epithels und eine bisher unbekannte partikuläre Aggregation in den Becherzellen nachgewiesen (Abb. 2). Die bei moribunden Forellen aus dem Expositionsversuch beobachtete Anämie und Leukopenie wurde im Übertragungsversuch nicht gefunden. Es gelang nach Übertragung der Erkrankung aber nicht, einen viralen oder bakteriellen Erreger zu isolieren.

Immunologische Untersuchungen

Das mRNA Muster bestätigt die Aktivierung des Immunsystems mit starker Entzündungsreaktion in Niere Leber und Darm. Zusätzlich sind Marker der zellulären Immunantwort



Abb. 1: (a) Bachforellen, oral und per Bad mit Organmaterial aus dem Expositionsversuch belastet (b) unbelastete Bachforellen (gleicher Maßstab).

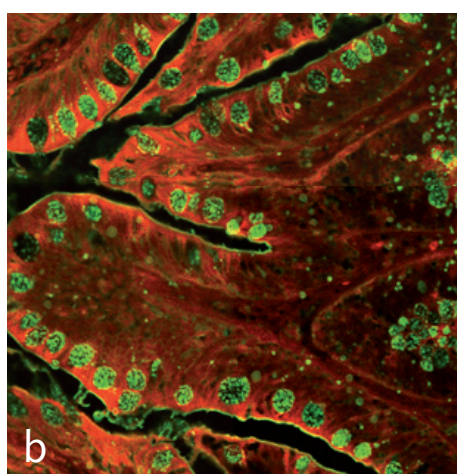
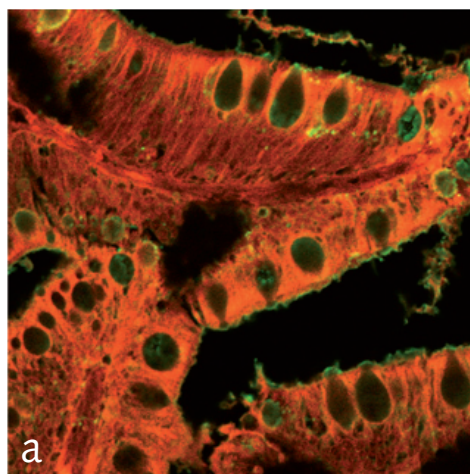


Abb. 2: Expression von MHC II. im Darm von gesunden (a) und erkrankten (b) Bachforellen. Die Natur der partikulären MHC II + Strukturen in den Becherzellen bei kranken Bachforellen ist vollkommen unklar.

stark erhöht (TNF α , NKEF), was auf Reaktionen gegen virale Pathogene oder gegen modifizierte körpereigene Zellen (z. B. durch toxische Einflüsse) hindeutet (Abb. 3).

Untersuchungen 2006

In diesem Untersuchungsgang wurde Organproben von Bachforellen aus zwei Versuchsansätzen mit der oben beschriebenen Methodik untersucht: (1) einem Expositionsversuch 2005 an der Iller bei Kempten, und (2) einem Übertragungsversuch 2006 bei denen Bachforellen mehrfach mit Organmaterial moribunder Bachforellen oral oder per Bad infiziert wurden. Die Ergebnisse der infektiologischen und immunologischen Untersuchungen sind nachfolgend zusammengefasst.

Virologische Untersuchungen.

Die Proben wurden analog zu den Untersuchungen 2005 aufbereitet. Ein Nachweis von viralen Pathogenen gelang nicht, so dass eine Beteiligung von viralen Pathogenen an der Erkrankung sehr wahrscheinlich auszuschließen ist.

Bakteriologische Untersuchungen.

Die Proben aus beiden Versuchen wurden analog zu der Methodik 2005 untersucht. Zusätzlich wurden Blindpassagen über verschiedene Selektivnährmedien durchgeführt. Eine Nachweis »klassischer« Salmoniden-spezifischen Pathogene (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Vibrio spec.*, *R. salmoninarum*) konnte nicht geführt werden.

Aus der Niere von erkrankten Bachforellen im Übertragungsversuch und nachfolgend auch aus Organmaterial von erkrankten Forellen aus dem Expositionsversuch konnte in den Blindpassagen ein Bakterium isoliert werden, welches zur Familie der Pseudomonaden gehört. Die biologischen Eigenschaften des isolierten *Pseudomonas spec.* und seiner sezernierten Proteine (Proliferation und Nekrose von Fibroblasten, Erythrozytenlyse Abb. 4) würden einen Teil der beobachteten Klinik und Histopathologie erklären. Ob dieser Erreger ursächlich für oder nur in die Erkrankung einbezogen ist, muss in weiteren Untersuchungen eingehend geprüft werden. Insbesondere muss in einem Reinfektionsversuch die Virulenz und Pathogenität des Bakteriums bestätigt werden.

Histologische und immunhistologische Untersuchungen

Die Proben wurden wie in den Untersuchungen 2005 vorbereitet. Die histopathologische Veränderungen in Organen von exponierten und artifiziell belasteten Bachforellen beginnen zwischen der 8. und 12. Woche p.exp. Sie äußern sich in zunehmenden, entzündlich-degenerativen Veränderungen in Niere, Kopfnieren, Thymus und

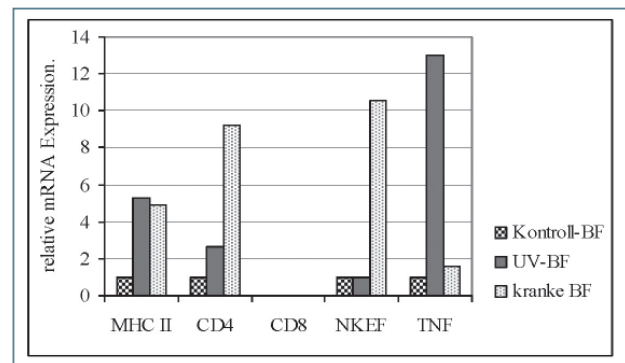


Abb. 3: mRNA Profil in Kopfnieren und Milz von Bachforellen, bestimmt mittels qRT-PCR

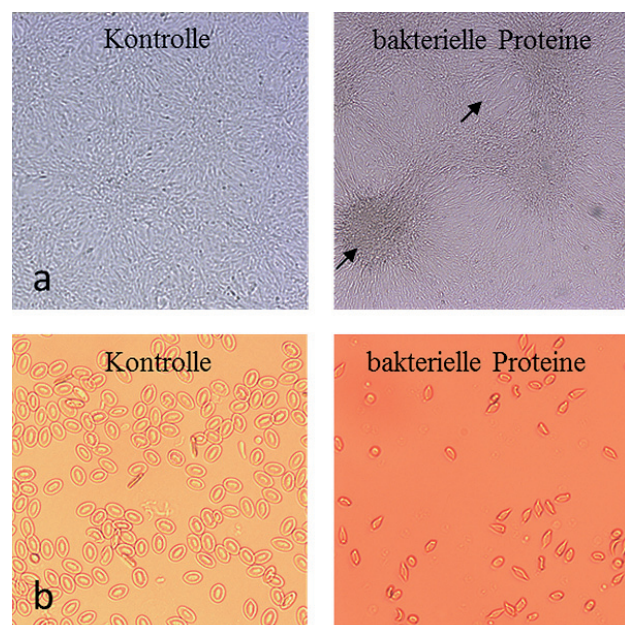


Abb. 4: Wirkung sezernierter bakterieller Proteine des isolierten *Pseudomonas spec.* auf

(a) RTG2-Zellen – Extreme Proliferation und Nekrose. ↗

(b) Bachforellenerthrozyten – starke Hämolyse war nach 2h Inkubation

Milz. Bei mit Illerwasser exponierten Bachforellen endet dieser Prozess in einer lymphozytären Depletion in der Milz, starker Leukopenie und Anämie (Abb. 5).

Übertragungsversuch

In diesem Übertragungsversuch wurden Bachforellen mehrfach oral bzw. per Bad mit Organmaterial moribunder Forellen aus dem Expositionsversuch belastet. Die Beobachtung und Probennahme erstreckte sich insgesamt über 16 Wochen. Die Erkrankung ist übertragbar. Die ausgelöste Klinik entspricht der bei Illerwasser exponierten Forellen. Die ein- bzw. viermalige Übertragung führte jedoch nicht zu einer Anämie und Leukopenie und

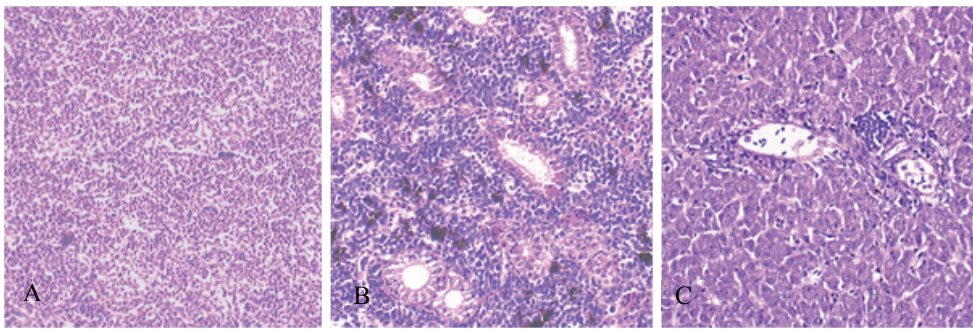


Abb. 5: Milz- (A), Nieren- (B) und Lebergewebe (C) von moribunden Forellen mit massiven histopathologischen Veränderungen.

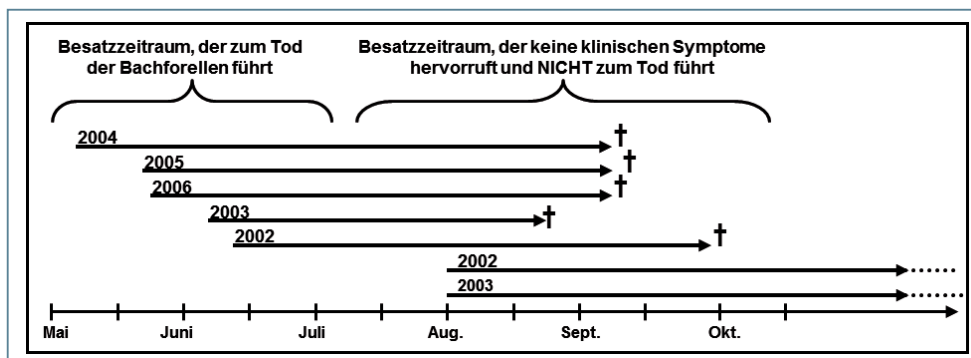


Abb. 6: Zusammenstellung der Besatzzeitpunkte und dem Auftreten erste Todesfälle aus den Expositionsversuchen der Jahre 2002–2006

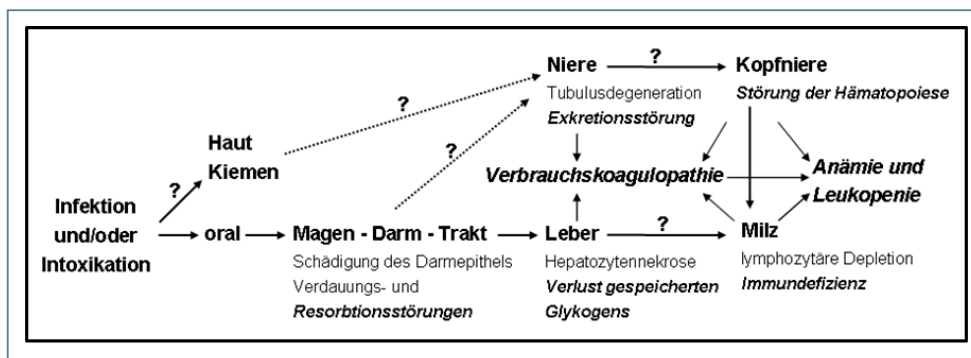


Abb. 7: Pathogenesemodell ausgehend von den histopathologischen Befunden bei moribunden Forellen aus der Iller und bei erkrankten Forellen aus dem Übertragungsversuch. Kursiv hervorgehoben sind Störungen physiologischer Funktionen.

damit auch nicht zum Tod der infizierten Forellen. Die daraus resultierende Frage nach der Dosisabhängigkeit der Krankheitsübertragung ist in weiteren Versuchen zu klären.

Immunologische Untersuchungen

Aus Organmaterial wurde die mRNA isoliert und in einer qRT-PCR die Expression verschiedener immunregulatorischer Moleküle untersucht. In der Immunreaktion sind zwei Phasen unterscheidbar (a) eine initiale Aktivierung von T-Lymphozyten (TCRb), NK-Zellen (CD56) und Makrophagen (TNFa) und (b) ab der 12. Expositionswoche ein Expressionsmuster von Zytokinen (IL12, NKeF und IFNg), das auf einen Reparaturversuch starker Leukozytenverluste hinweist.

Schlussfolgerungen

Als Ursache für das Bachforellensterben muss ein bisher unbekannter, sich wahrscheinlich sehr langsam vermehrender Infektionserreger oder eine multifaktorielle Ursache, d.h. eine Störung des physiologischen Gleichgewichtes z.B. durch toxische Substanzen, mit nachfolgender erhöhter Empfindlichkeit gegen schwach oder fakultativ pathogene Erreger, angenommen werden.

Die in einem Umsetzversuch 2006 in der Versuchsanlage an der Iller beobachtete Mortalität belegt, dass eine vierwöchige Exposition, innerhalb eines Zeitraumes von Anfang Mai bis Ende Juni, für die Krankheitsauslösung 12–14 Wochen später ausreichend ist. (Abb. 6) In dieser Zeit ist eine der Ursachen in einer krankheitsauslösenden Dosis im Flusswasser vorhanden.

Ausgehend von den Befunden bei den moribunden Forellen aus dem Expositionsversuch und den Befunden

bei den Forellen aus dem Übertragungsversuch ist dabei folgende Kausalkette denkbar (Abb. 7):

Für eine Infektion mit einem unbekannten, sehr langsam replizierenden Erreger sprechen:

- die Speziesspezifität
- die Übertragbarkeit mittels Organmaterial auf gesunde Forellen
- die lange Expositionszeit bis zum Ausbruch der klinischen Symptome
- die Inaktivierung des krankmachenden Agens durch UV-Bestrahlung und
- die pathologischen Veränderungen im Magen/Darm-Trakt sowie Leber und Niere

Die starke Anämie und Leukopenie, die bei moribunden Bachforellen wiederholt beobachtet wurde, ist sehr wahrscheinlich auf massive Gerinnungsstörungen im Finalstadium der Erkrankung zurückzuführen (Abb. 7). Eine hämatotrophe oder leukotrophe Infektion ist daher eher unwahrscheinlich. Die Übertragung durch orale Applikation von Organmaterial deutet auf eine mögliche Eintrittspforte für einen bisher unbekannten Erreger im Darm hin (Abb. 7).

Für eine multifaktorielle Ursache sprechen die lange Expositionszeit bis zum Ausbruch der klinischen Symptome, die Begrenzung auf eine Jahreszeit der eher chronische Verlauf, der auf eine lang anhaltende Exposition mit einer UV-sensitiven Noxe in sehr geringen Dosen schließen lässt.

Außerdem kann bisher eine toxische Schädigung z. B. der Blutgerinnung, der Hämatopoiese und/oder des Immunsystems durch eine nicht charakterisierte Noxe, die möglicherweise erst nach Metabolisierung toxisch wirkt, nicht ausgeschlossen werden.

Anmerkung: Dieses Manuskript basiert auf zwei sehr ausführlichen Untersuchungsberichten zu den durchgeführten Untersuchungen. Die jeweiligen pdf-Dateien können beim Verfasser angefordert werden.

Literatur

Schwaiger J. & Ferling H., 2003. Pathologie und Immunstatus betroffener Bachforellenpopulationen. Bayerns Fischerei und Gewässer 9, 31–36.

Virological examination and analysis of tissue samples as part of the investigation into Bavarian brown trout mortalities

Keith Way

Center for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, Weymouth, UK

Zusammenfassung

Virologische Untersuchungen von Gewebeproben zur Aufklärung der Ursachen des Bachforellensterbens

Die virologischen Untersuchungen durch die CEFAS Aquatic Animal Health Group umfassten Zellkulturbasierte Isolierungsansätze, molekularvirologische und transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analysen. Das zur Verfügung gestellte Probenmaterial beinhaltete Gewebeproben von 4 klinisch erkrankten Bachforellen und einem Bachsaibling sowie von einer gesunden Regenbogenforelle. Die untersuchten Proben umfassten Gewebe von Leber, Niere, Milz, Darm, Pylorusfortsätzen, Herz, Gehirn und Kiemen. Zur Virusisolation wurden Kulturen von 7 Fischzelllinien, darunter 4 Zelllinien von Salmoniden, mit Homogenaten der Gewebeproben beimpft und bei 11 und 15 °C inkubiert. Zur Virenerkennung wurden PCR-basierte Verfahren mit generischen Primern verwendet, die eher auf die Erkennung von 9 verschiedenen Virus Familien oder Unterfamilien als auf den Nachweis spezifischer viraler Erreger abzielten. Zehn Gewebeproben mit pathologisch-histologischen Veränderungen wurden für ultrastrukturelle Untersuchung durch TEM ausgewählt.

Eine Blindpassage der zum Virusnachweis beimpften Zellkulturen ergab in keiner der verwendeten Zelllinien Hinweise auf einen viralen Erreger. Mit Hilfe von »nested« oder »semi-nested« PCR-Verfahren wurden keine, für europäische Süßwasser- oder marine Fischarten pathogenen Viren nachgewiesen. Obwohl die histologischen und ultrastrukturellen Veränderungen für eine virale Erkrankung sprechen, wurden mittels TEM keine viralen Partikel in den Proben nachgewiesen.

Summary

Virological examination and analysis of tissue samples as part of an investigation into brown trout mortalities.

A virological examination was conducted by the CEFAS Aquatic Animal Health group that included, cell culture isolation, molecular virology analysis and transmission electron microscopy (TEM). The samples submitted for testing included tissues taken from clinically diseased brown trout (x4) and brook trout (x1) and one healthy rainbow trout. The tissue samples examined included liver, kidney, spleen, intestine, pyloric caeca, heart, brain and gills. For the virus isolation tests, cultures of 7 fish cell lines, including 4 derived from salmonid species, were inoculated with tissue homogenates and incubated at 11 and 15 °C. For virus detection, PCR-based assays with generic primers were used to target 9 different virus families or sub-families rather than specific viral pathogens. Ten tissue samples with areas of interesting pathology were identified through histology for ultrastructural examination by TEM.

There was no evidence of a viral-agent in any cell line following blind passage of cell cultures inoculated for virus isolation. No fish viruses from families known to be pathogenic for European freshwater or marine fish species were detected by nested or semi-nested PCR assays. Although virus-like pathology was evident from histological and ultrastructural examination no viral particles were seen within the samples examined by TEM.

Background

The virological examination and analysis was requested by the Bavarian LfU Aquatic Toxicology and Pathology laboratory, Wielenbach, Germany, as part of their investigation into brown trout mortalities in two sub-alpine rivers in Bavaria.

The investigations suggested by the Aquatic Animal Health group at Cefas, to the Bavarian LfU, were designed to expand on the tests carried out at the Friedrich Loeffler Institute, Insel Riems and test different parameters. In particular the range of tissue samples was expanded to include intestine, pyloric caeca, heart, brain and gill tissue. For the virus isolation tests the inoculated cell cultures were incubated at 11 and 15 °C. For virus detection, PCR-based assays with generic primers were used to target different virus families or sub-families rather than specific viral pathogens. Electron microscopy examination had not been included in previous studies and this was also included in the Cefas investigation.

The samples submitted for testing included tissues taken from four moribund brown trout (BF21, BF22, BF23 & BF25), 1 moribund brook trout (BS5) and one healthy cohabited rainbow trout (RF23). The organ tissue samples tested included liver, kidney, spleen, intestine (foregut, mid-gut, rectum, pyloric caeca), heart, brain and gills.

The examination and analysis consisted of 3 modules: **Module 1**, cell culture isolation; **Module 2**, molecular virology analysis and **Module 3**, electron microscope examination.

Module 1 : Cell culture isolation

Materials & Methods

Tissue samples were homogenised, on a bed of crushed ice, using a pestle & mortar with sterile sand. The homogenates were re-suspended in virus transport medium (Glasgow MEM supplemented with 10 % new-born calf serum, 2 mM L-glutamine and 1 % antibiotic + antimycotic solution), clarified at 2000x g for 20 min., and inoculated onto the cell lines, listed in Table 1, at dilutions of 1/100 and 1/1000 w/v. The tissue homogenates tested included, liver, spleen, brain, intestine and a pool of kidney, heart & gill tissue. The cells were incubated at 11 °C and 15 °C and the duration of incubation, before the cells were sub-cultured, varied from 7–14 days depending on the cell line.

All production of cell cultures at the Cefas Weymouth laboratory is accredited to UKAS ISO 17025 quality assurance standards. This includes regular testing for mycoplasma infection and weekly or monthly susceptibility tests, depending on the frequency of use, with the important fish viruses.

Results

From 6 fish, 30 different samples were tested on 7 different cell lines.

The majority of the cell cultures received the full 1/100 tissue homogenate inocula (1 ml/well for 24-well multi-dishes). Where the amount of tissue submitted, when diluted to 1/100, was not sufficient to provide a full inoculum a lesser volume was absorbed on the cell monolayers for 2 hours. After this time 1 ml of fresh culture medium was added to the wells to restore the correct incubation volume.

Cell line	Culture medium	Growth temperatures (°C)	Reference
AS (Atlantic Salmon)	L-15	25	J.Fish.Res.Board Can. (1973) 30 p913
BF-2 (Bluegill fibroblasts)	GMEM	25	Science (1966) 151 p1004
CCB (Common carp brain)	EMEM	25	Bull.Eur.Ass.Fish Pathol. (1999) 19 p221
CHSE-214 (Chinook salmon embryo)	L-15	20	In Vitro (1984) 20 p671
FHM (Fat-head minnow)	EMEM	25	Annals NY Acad.Sci. (1965) 126 p555
RTG-2 (Rainbow trout gonad)	L-15	20	Science (1962) 135 p1065
SHK (Salmon head kidney)	L-15	20	J.Gen.Virol. (1995) 76 p1353

Tab. 1: Cell lines used in the virus isolation tests

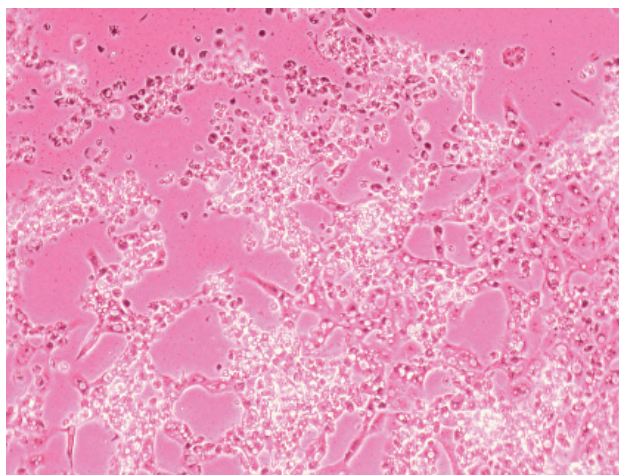


Fig. 1: Toxic effect seen on CHSE cells at 11°C, inoculated with liver tissue homogenate from BF21.

Cytotoxic effects were observed on cell monolayers inoculated with 1/100 dilutions of the kidney, heart & gill (KHG) homogenate pool and liver and intestine homogenates. Cytopathic effects (cpe) were also observed at the 1/1000 dilution on some cell monolayers but were not observed consistently across all fish tissue samples. In particular, cpe was seen on the AS-6 cell monolayers inoculated with the KHG pool at 1/1000 dilution and incubated at 11 °C. A cpe was also seen on the SHK cell monolayers inoculated with 1/1000 dilutions of a number of the different tissue homogenates at 11 °C and 15 °C. However, the cpe did not re-appear following blind pas-

sage (sub-culture) of the monolayers at 1/10 and 1/100 dilutions.

For the majority of the cell lines, any cpe that was seen in the original inoculated cultures did not re-appear after blind passage. An exception was liver tissue from 3 trout (BF 21, 22 & 23) where a cpe appeared on CHSE cells at 11 °C after a blind passage (see Fig. 1). However, the cpe did not re-appear following a second blind passage of the monolayers and incubation for a further 7 days.

In summary, following blind passage of the inoculated cell cultures, there was no evidence of a viral-agent in any cell line.

Module 2: Molecular virology analysis

Materials & Methods

A 1:10 w/v homogenate of the tissue samples was prepared by adding 100mg tissue in transport media to lysing matrix D tubes and processing in a FastPrep homogeniser. The tissue homogenates tested included, liver, spleen, brain, intestine and a pool of kidney, heart & gill tissue.

Total nucleic acid was extracted from 50 ml of each tissue homogenate (5 mg tissue) using an EZ1 Virus mini kit and the QIAGEN BioRobot® EZ1. The extracts were then analysed by PCR-based assays using generic primers for different virus families and sub-families. The virus families targeted are listed in column 1 of Table 2.

Virus or Virus family & PCR Type	1st round primer name	2nd round primer name
ISA Generic	ISAV GEN REV ISA GEN FOR	ISAV GEN FOR INT (forward) ISAV GEN REV INT (reverse)
Salmonid alphavirus	Alphavirus Gen F Alphavirus Gen R	Alphavirus Gen F int. Alphavirus Gen R int.
Cyprinid herpesvirus	CyHV R (reverse) CyHV F (forward)	F int (forward) R Int (reverse)
Vesicular generic	Ves Gen 1 Ves Gen 2	Ves Gen 1 Ves Gen 4
Novirhabdovirus Generic	NoviRev EXT NoviFor EXT	NoviRev EXT For INT
Aquabirnavirus	BirnaREXT BirnaFEXT	BirnaFINT BirnaRINT
Iridovirus Generic (Ranavirus)	GenIridoFext2 GenIridoRext2	GenIridoFint2 GenIridoRint2
Iridovirus Generic (Megalocytivirus)	GenIridoRext4 GenIridoFext4	GenIridoFint4 GenIridoRint4
Betanodavirus	SJNNV -R3 SJNNV -F2	RGNNV 1 RGNNV 2

Tab. 2: Details of virus families tested by PCR or RT-PCR and primer names.

Reverse transcription

Prior to reverse transcription (RT), 4 µl of the nucleic acid extracts were incubated at 80°C for 10 minutes with 1 µl random hexadeoxynucleotide primers. The RT reaction was performed at 37°C for 1 hour in a 20 µl volume consisting of 4 µl of 5x M-MLV RT reaction buffer, 1 µl of 25 mM dNTPs, 0.5 µg random hexadeoxynucleotides, 200 units M-MLV reverse transcriptase, 40 units Rnasein®, 8 µl of molecular grade water and 4 µl of the total RNA extracted.

PCR

PCR reactions were performed in a 50 µl reaction volume containing 1x Go Taq PCR buffer containing 2.5 mM MgCl₂, 1.0 mM dNTPs mix, 100 pmol each primer, 2.5 units of Go Taq polymerase and 2.5 µl reverse transcription product. The reaction mix was overlaid with mineral oil and subjected to 35 temperature cycles of: 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C, followed by a final extension step of 10 min at 72°C.

PCR using primers targeting the DNA viruses was performed as above using 2.5 µl of the total nucleic acid extraction in place of the RT product. Nested and semi-nested PCR assays were performed as above using 2.5 µl of the first round RT PCR or PCR products as a template.

Electrophoresis and sequencing

Amplified products were electrophoresed in a 2 % (w/v) agarose/TAE gel containing 1.0 mg/ml ethidium bromide, and visualised under UV irradiation. PCR products were purified using the Freeze N' Squeeze DNA purification system and both DNA strands were sequenced using the appropriate reverse and forward primers and the ABI PRISM™ dye terminator cycle sequencing system. Sequencing reactions were analysed on an ABI 3100 genetic analyser using Sequencher software. Confirmation of the sequence was completed by BLAST search (<http://www.ebi.ac.uk/blast/index.html>).

Results

From 6 fish, 30 different samples were tested with 9 different PCR assays, including a second round nested or semi-nested reaction for each one. PCR products were visualised on agarose gels and, for most of the PCR assays, general smearing and non-specific products were observed. This is a common observation when using highly degenerative primers and is often more evident in the absence of target sequences in the sample.

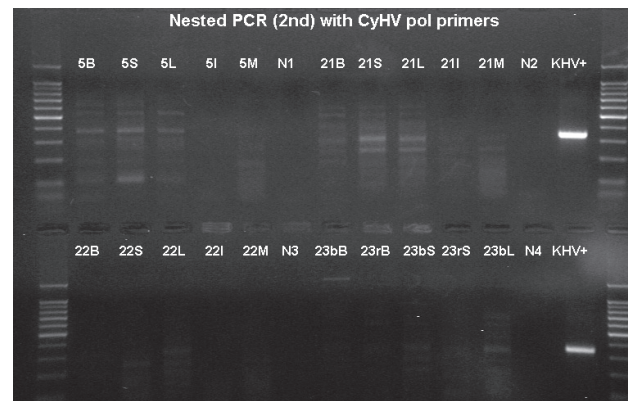


Fig. 2: Cyprinid herpesvirus PCR assay images

All samples were negative for the common orthomyxovirus (ISAV), Vesiculoviruses, Novirhabdoviruses, Aquabirnaviruses, Iridoviruses (ranavirus and megalocytivirus), Betanodaviruses and Salmonid alphavirus by nested or semi-nested PCR assays.

Products of the appropriate size were observed in the cyprinid herpes virus assay (see Fig. 2). All of the putative CyHV products were excised and sequenced. The BLAST search indicated that the sequences were carp specific and therefore the samples were also negative for cyprinid herpes virus.

Module 3: Examination by transmission electron microscopy

Materials & Methods

Samples in glutaraldehyde fixative were submitted to the Cefas laboratory for examination by transmission electron microscopy (TEM). Histology slides, submitted from the same tissue samples, were also examined. Tissues included for preliminary examination included kidney, liver, spleen, pyloric caeca, heart, brain and gill. Tissue samples of interest were identified and material from these fish was processed for electron microscopy.

A total of ten samples were identified through the histology to be suitable for TEM examination. Two blocks were processed and sectioned for each sample, a total of 20 samples. Semi-thin sections from each block were examined and areas of specific interest for ultrastructural examination identified. Ten of these blocks were ultra-thin sectioned and stained for examination by TEM.

TEM Method

Glutaraldehyde-fixed tissue samples were rinsed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) and post-fixed for

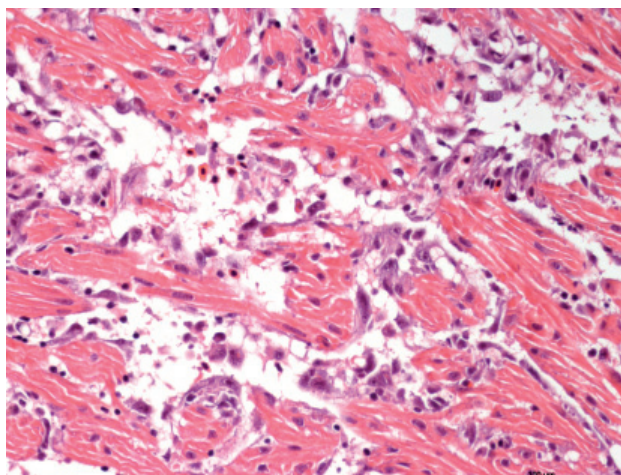


Fig. 3: Heart tissue from trout BF21 showing generalised myositis.

1 h in 1 % osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Specimens were washed in three changes of 0.1 M sodium cacodylate buffer before dehydration through a graded acetone series. Specimens were embedded in Agar 100 epoxy and polymerised overnight, in an oven, at 60°C. Semi-thin (1–2 µm) sections were stained with Toluidine Blue for viewing with a light microscope to identify suitable target areas.

Ultrathin sections (70–90 nm) of target areas were mounted on uncoated copper grids and stained with 2 % aqueous uranyl acetate and Reynolds' lead citrate. Grids were examined using a JEOL JEM 1210 transmission electron microscope and digital images captured using a Gatan Erlangshen ES500W camera and Gatan Digital Micrograph™ software.

Results

Histology

Heart tissue examined from BF21 showed generalised myositis with diffuse necrosis mostly seen in the ventricle (see Fig. 3). Myositis was also observed in BF25 and necrosis of the lining cells, possibly fixed histiocytes, was also observed. Multifocal splenic necrosis was observed in BF21 and BF25. Vacuolation of gill epithelial cells with moderate to minimal cell sloughing was seen in BF21. Liver tissue examined from BF21 showed multiple focal necrosis with haemorrhaging. Also, some melanomacrophage cell involvement and hepatocyte necrosis was present. Small to moderate sized eosinophilic inclusions seen in the cytoplasm of the hepatocytes were thought to possibly be phagocytosed red blood cells. Diffuse hepatocellular necrosis was also seen in BF22. In BS5 sloughed

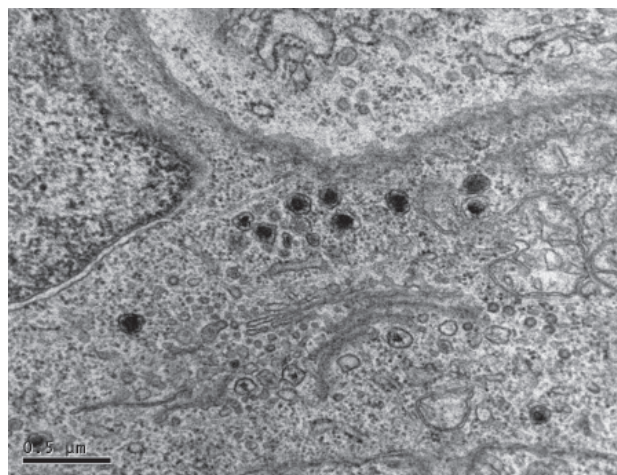


Fig. 4: BF22 Gill - VLP's seen within tissue in large numbers accumulated within the cytoplasm of a few cells.

cells were seen within blood vessels that were degenerate in nature and considered to be endothelial cells, hepatocytes or both.

Ultrastructural analysis

Areas of necrosis were evident in heart tissue. Virus-like particles (VLP's) were seen distributed throughout the heart muscle of BF25. VLP's consisted of membrane bound particles with an electron dense centre. Upon closer examination and measurement VLP's varied in shape and size (120nm–180nm). These particles were also seen, but in fewer numbers, in heart and liver tissue from BF23 and liver and spleen tissue from BF21. In gill tissue from BF22 the particles were seen within tissue in large numbers accumulated within the cytoplasm of a few cells (Fig. 4).

Upon closer examination of these VLP's and taking measurement and size of the structures into consideration it is unlikely that these particles are of viral origin. These structures are likely to be a normal cellular structure, possibly peroxisomes. No other viral particles or VLP's were seen within the samples examined.

Discussion

The pathology observed in a range of tissues is indicative of infectious disease. The multi-focal necrosis observed in the different organs suggests a microbial infection and most likely a viral infection. However, no bacteria were seen associated with the tissue pathology. This does not rule out a cryptic bacterial infection, (e.g. a *Flavobacterium* sp. infection) but inflammation is likely to be evi-

dent in a bacterial infection and this was not consistently seen in the submitted specimens. Involvement of a bacterial toxin was thought unlikely since hepatic and renal pathology would be expected to be more generalised.

No virus was isolated in cell culture or detected by PCR. There are a number of possible explanations for this and at present a viral aetiology cannot be ruled out. If involved, a virus may only have been present in the tissues sampled at very low levels. It may belong to a virus family not seen before in fish or may have a high specificity for brown trout cells and is not able to infect a range of fish cells. It is also possible that the virus is non-culturable, as is seen with some small RNA viruses. How-

ever, no evidence was seen in the samples provided by TEM, although it should be noted that not all tissues were examined.

If the virus is very host-specific then further investigations of viral aetiology could include inoculation of primary cell cultures derived from brown trout tissues. The virus may be present at high levels at the very early disease stage before clinical signs are evident. So, extensive sampling of an affected brown trout population should be carried out to include fish showing very early disease signs and fish without disease signs. If the disease can be transmitted in co-habitation experiments this provides a good opportunity for extensive and sequential sampling.

Themenblock III: Molekulargenetische Untersuchungen

Transcriptomanalysen im Kontext des Bachforellensterbens. Brown Trout Syndrome: A Transcriptomic Analysis

Marc Young¹, Jens-Eike Taeubert², Michael W. Pfaffl³, Juergen Geist² & Ralph Kuehn¹

¹ Unit of Molecular Zoology, Chair of Zoology, Department of Animal Science, Technische Universität München

² Aquatic Systems Biology Unit, Department of Ecology and Ecosystem Management, Technische Universität München

³ Physiology Weihenstephan, Department of Animal Sciences, Centre of Life and Food Sciences, Technical University of Munich

Zusammenfassung

Das Bachforellensterben (englisch Brown Trout Syndrome, BTS) bedroht den Fortbestand von *Salmo trutta* in den betroffenen voralpinen Flüssen Europas. Um nachzuweisen, dass dieses Phänomen von einem noch nicht identifizierten pathogenen Organismus hervorgerufen wird, wurden Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt. Hierzu wurden je Woche Zwei-Kanal-Microarrayanalysen zur Identifikation hochregulierter Immungene und immunoassoziierter Gene während des Auftretens des Phänomens über eine Dauer von 15 Wochen hinweg durchgeführt. Bei diesen Analysen wurden die Unterschiede in der hepatischen Genexpression zwischen BTS-kontaminiertem Wasser ausgesetzten Bachforellen (Experimentgruppe) und solchen, die in nichtkontaminiertem Wasser gehalten wurden (Kontrollgruppe), erarbeitet. Dabei wurde bei 384 bekannten Merkmalen (Microarray-spots) einmal oder mehrmals eine signifikant unterschiedliche Regulierung festgestellt ($p < 0.001$). Hierarchische Clusteranalysen ergaben, dass jede Woche mit Ausnahme der ersten Woche auf einer der drei pathologischen Phasen des Bachforellensterbens gruppieren (Priming- und subklinische Phase, klinische Phase und Sterbephase). Alle drei BTS-relevanten Phasen zeigten eine Hochregulation von Merkmalen, die mit dem Interferon-Signalweg assoziiert sind, was auf eine chronische virale Infektion hinweist. In der Sterbephase waren vor allem Akut-Phasen Proteine (APPs) hochreguliert, die auf Gewebsschädigungen (Infektionen) reagieren und somit zeigen, dass die Akut-Phasenantwort hauptsächlich zu diesem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes auftritt. Die am deutlichsten hochregulierten APPs waren Komponenten des Komplementsystems, was auf eine sekundäre bakterielle Infektion hin-

weist. Insgesamt unterstützt die Hochregulation der durch die Microarrays analysierten Gene die Hypothese, dass das Bachforellensterben durch ein virales Pathogen, der eine sekundäre bakterielle Infektion folgt, verursacht wird.

Summary

The brown trout syndrome (BTS), thought to be most likely caused by a yet unidentified pathogenic organism, is threatening the continued existence of *Salmo trutta* in BTS-affected pre-alpine rivers of Europe. To substantiate that BTS is caused by a pathogenic organism, BTS was investigated on the molecular level. Weekly direct two-channel microarray analyses were performed to identify up-regulated immune and immune-related genes during the progression of the phenomenon over a 15 week time period. These analyses compared differences in hepatic gene expression between *Salmo trutta* exposed to BTS-contaminated water (treatment) and non-contaminated water (reference). Overall, 384 known features were found to be differentially regulated ($p < 0.001$) one or more times. Hierarchical clustering analysis revealed that each week, with the exception of week 1, matched to one of the three pathological phases (priming & sub-clinical, clinical and mortality) of BTS. All three BTS relevant phases exhibited up-regulation of features involved in the Interferon (IFN) pathway, which suggests that BTS is a chronic viral infection. In the final phase (mortality phase) up-regulation of acute phase proteins (APPs) indicates that acute phase response occurs before and during the brown trout populations decrease. The most prominently up-regulated APPs are components of the complement systems, indicating a

secondary bacterial infection. Overall, the up-regulated immune response genes identified through the microarray analyses support the hypothesis that BTS is caused by a viral pathogen, followed by a secondary bacterial infection.

Research Focus

This study was focused on gene expression profiling as a diagnostic approach for discerning the causal factor(s) responsible for Brown trout syndrome (BTS). The core objective of this study was to characterize the dynamic progression of the immune response over the course of the disease on the molecular level by identifying the immune response components and pathways which are activated during the progression of BTS, as well as the temporal manner in which they are activated in, in order to gain a better understanding of the underlying pathology of this phenomenon and thereby deduce potential causes for this phenomenon.

Materials and methods

Experimental setup and liver extraction

Brown trout (*Salmo trutta f. fario*), originated from 'Fischereilicher Lehr- und Beispielbetrieb Salgen', Germany (570 specimens), were maintained in holding tanks (aquaria) at two locations (Kempten and Rubi; River Iller) between the 29th of May and the 5th of September 2008 (total of 15 weeks). To minimize the introduction of a bias due to other bacterial infections, fish were initially treated with Baytril® (0,4 ml per kg body weight) on the 4th of June 2008. Fish were fed twice a week with Ecolife 16, 3 mm (Biomar).

Five hundred *Salmo trutta* were exposed to water from the river Iller at one location (Kempten) where BTS was previously described, and another 70 *Salmo trutta* were maintained at the Rubi (a location of the river Iller where BTS was not observed), as a BTS-free control group.

On a weekly basis (for a total of 15 weeks), starting on the 29th of May 2008, 3 individuals from Kempten (treatment) and Rubi (reference) were sacrificed for dissecting the liver tissue, which was immediately stored in liquid nitrogen in order to minimize stress levels and disruption of gene expression patterns by the sampling process.

Microarray Analyses

Three microarray hybridizations of the three biological replicates from each week (Two Channel Microarray; Treat-

ment vs. Reference) were performed using cGRASP microarrays (32K Microarray composed of 33696 cDNA elements (features)) (1). In each case, one of the three microarrays for every week included a dye switch in order to reduce dye-label bias. Thus, a total of 45 microarrays (3 microarrays per week for 15 weeks) were used in this experiment.

Liver samples were individually homogenized using the MagN lyser (Roche) followed by RNA extraction with a Qiazol kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. All samples were measured for their RNA concentration using Nanodrop (PeqLab) and the RNA quality was checked using a 2100 Bioanalyzer (Agilent). Total RNA was reverse-transcribed using Transcriptase Superscript III (Invitrogen) along with the Array 50 system (Version2, Genisphere) according to the manufacturer's instructions. The microarray hybridization was performed according to the manufacturer's recommendations. All microarrays were digitalized using a Genepix 4000 Scanner (Axon) in combination with GenePix Pro 6 software (Molecular Devices).

The statistical analysis of the microarray image analysis output files were carried out in the R computing environment (R x64, Version 2.15.2 on Microsoft Windows 8) using the Linear model for Microarray data package (Limma, 3.14.3 (2)) with background correction and normalization within and between microarrays. Features were considered significant differentially regulated at $p < 0.001$.

Hierarchical clustering with bootstrapping was performed on the datasets in R using the pvclust package in order to include the measure of uncertainty within the hierarchical cluster analysis (3). The microarray approach was used to separate the different stages of the pathological progression and to identify highly significant regulated genes during BTS progression.

Single RT-qPCR-Analyses

In order to validate the microarray results, 3 features (Glutathione S-transferase, MHC class I Antigen, Chemokine ligand 19, which were found to be significantly regulated ($p < 0.001$) on the microarray, as well as 1 reference feature (60S ribosomal protein L28) which was not significantly regulated ($p < 0.001$) in any of the 15 weeks, were selected for single reverse transcription quantitative PCR (single RT-qPCR) analysis. Specifically, the comparative Ct (Delta Delta Ct) method of relative quantification was used to quantify regulation of gene transcripts.

Results and Discussion of Microarray and single RT-qPCR Analyses

A total of 384 known microarray spots (features; includes replicates of identical genes using different probe sequences), accounting for 138 unique genes, were found to be significant differentially regulated ($p < 0.001$) one or more times over the 15 weeks. The single RT-qPCR of the three genes confirmed the results of the microarray analyses, by revealing the same expression patterns, however with higher log-fold change values.

The results of the hierarchical cluster analysis indicate the categorization of the 15 weeks into 4 phases (as indicated by the rectangles in Fig. 1) and are summarized in Table 1. The first phase, which occurred in week 1, is named the Bacterial Infection phase, and is most likely a consequence of transferring the brown trout into their experimental exposure tanks (acclimatization stress). It is therefore not considered for the BTS progression. However, the other 3 phases (Priming & Sub-clinical phase, Clinical phase and Mortality phase) discerned through the hierarchical cluster analysis roughly matches the clin-

ico-pathological progression profile of BTS previously established by the Friedrich Loeffler Institute (4).

Figure 2 depicts a potential disease progression model based on up-regulated immune genes from Brown trout exposed to BTS-contaminated water. During the first phase (Priming & Sub-clinical phase) up-regulation of the Barrier-to-autointegration factor (BAF), a known virus response gene (5) which is part of the IFN-pathway (6) was observed in liver tissue, and suggests that an acute viral infection is present. However the fact that only a single gene (BAF) is found up-regulated during the entire sub-clinical phase (total of 7 weeks) indicates that the liver is not the primary site of infection.

Phases	Weeks
Bacterial Infection phase	1
Priming & Subclinical phase	2–9
Clinical phase	10–12
Mortality phase	13–15

Tab. 1: Phases based on the results of the hierarchical cluster analyses

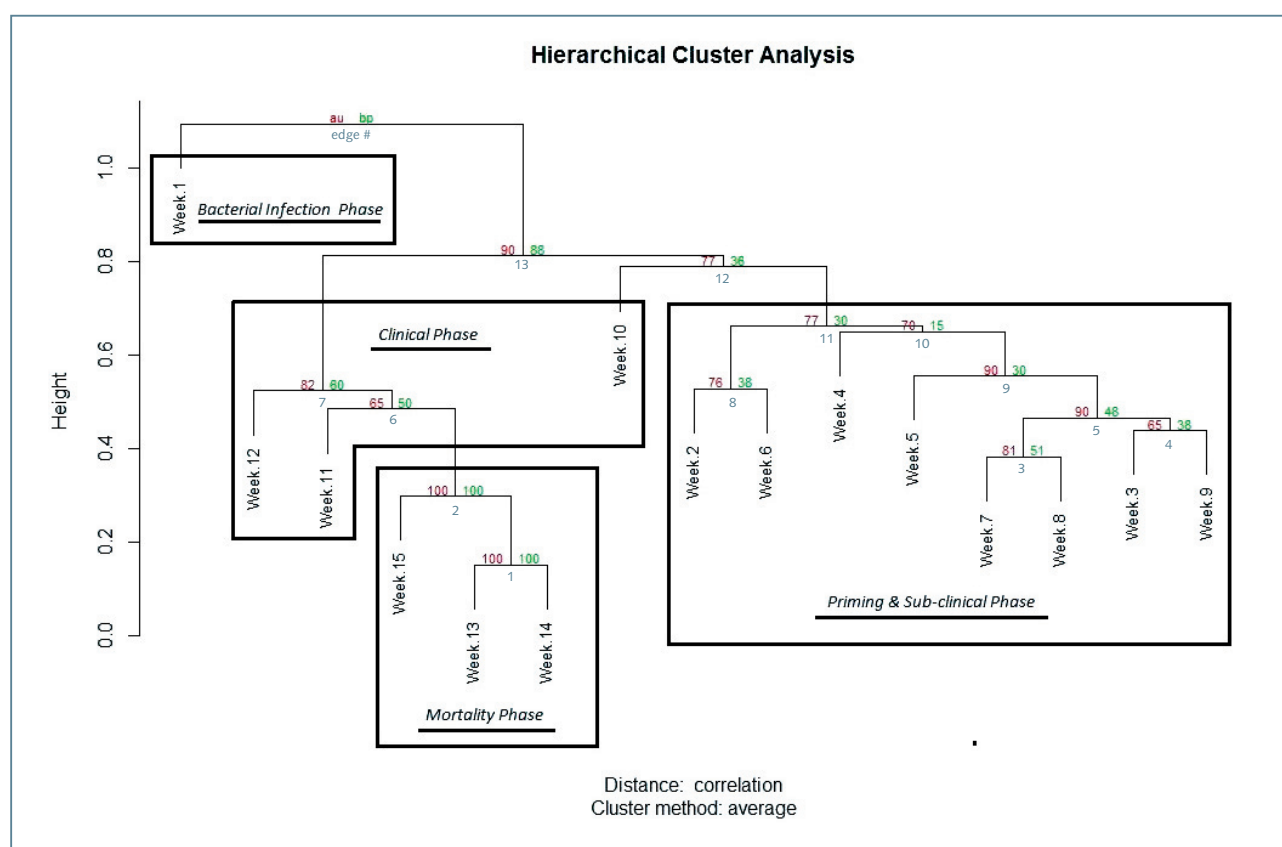


Fig. 1: Results of the hierarchical cluster analysis based on the 384 known features to be differentially regulated ($p < 0.001$) one or more times over the 15 weeks of the experiment. The overlaid rectangles identify the 4 different phases which are discernible.

After the disease reached the second phase (Clinical phase) the BAF maintains its up-regulated status. In addition, the transcription of NLRC5 (NLRC5), which is a member of the nucleotide-binding oligomerization (Nod)-like receptor (NLR) family, is also up-regulated. NLRs function as intracellular pathogen recognition receptors (PRR) of the innate immune system and a direct link between signaling events triggered by viral infection and transcriptional regulation of NLRC 5 have been established (7). Furthermore, it has been demonstrated that NLRC5 is involved in interferon (IFN)-dependent antiviral immune response by activating interferon stimulated response elements (ISRE), IFN-gamma activation sequence (GAS) and through up-regulation of anti-viral target genes (7). Thus, up-regulation of NLRC5 at this point (Clinical phase) potentially indicates that the viral infection is disseminated from its original point of initially infected tissue to the liver, resulting in the promotion of

an anti-viral state within the liver through up-regulation of the IFN-pathway.

This anti-viral state is maintained throughout the final phase (Mortality phase) through the up-regulation of the interferon regulatory factor 1 (IRF-1), which belongs to a family of transcription factors that regulate the transcription of ISRE (8). Furthermore, at this late point during BTS, the liver mounts an acute phase response (APR). The most notable acute phase proteins (APP) found to be up-regulated are members of the complement system (C1q subcomponent subunit C precursor, mannose-binding protein C precursor & complement component C6 precursor). As the APR is part of the non-specific innate immune response, it is not clear if the APR occurs in response to the viral infection or if it is the result of an innate immune response to a secondary infection. The fact that the APR usually occurs as part of the early-defense system of the innate immune response suggests that it is a consequence of secondary infection.

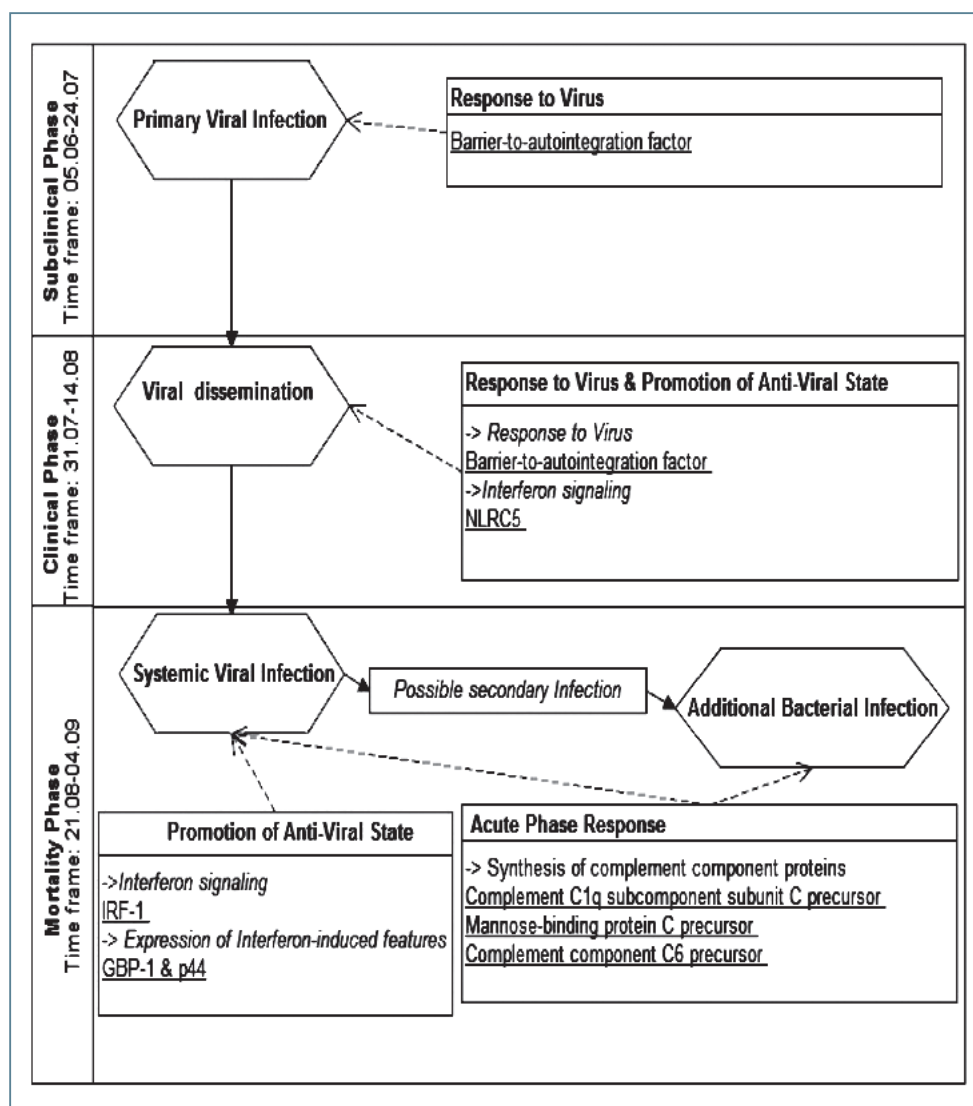


Fig. 2: A potential disease process model based on immune genes that were found to be up-regulated by Brown trout exposed to BTS-contaminated water

Conclusion

The results from the microarray experiment reveal that interferon (IFN) pathways are activated early and their intensity increases during BTS, suggesting that the IFN pathways play the most important role during the immune response. As the IFN pathways elicit distinct antiviral effects, up-regulation of genes involved in these IFN pathways throughout the phenomenon suggests that a viral infection is the underlying cause/driver of BTS. However, a strong acute phase response (APR) by the liver is also observed during the final weeks of BTS which indicates that an intense innate immune response is triggered shortly before mortality of brown trout occurs. This may suggest that BTS is a result of a multi-pathogen disease process. A first pathogen, possibly a virus, could be responsible for eliciting the IFN immune response pathways in the early stages of BTS, without prompting an APR by

the liver. As such, a primary viral infection may weaken the brown trout leaving them vulnerable to secondary infections by other pathogens, especially if the viral infection becomes chronic. A secondary infection could then be responsible for the observed APR during the late stage of BTS. Furthermore, several of the acute phase proteins (APP) up-regulated during the late APR indicate that the secondary infection could be of a bacterial nature.

Although microarray technology is rapidly developing there still remain limitations when large numbers of genes are simultaneously measured for their expression levels, especially in terms of sensitivity. Therefore, the results attained from the microarray experiment have served as a »stepping stone« for identifying biomarkers relevant for BTS which can be used in reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments, a much more sensitive technique for measuring gene expression levels (Table 2).

Biomarker	Indicator for
C-C motif chemokine 19 precursor	Inflammation
CC chemokine	Inflammation
MHC class I antigen	Presentation of endogenous antigens (intracellular pathogen)
Beta-2-microglobulin precursor	Presentation of endogenous antigens (intracellular pathogen)
MHC class II antigen (A-K chain)	Presentation of exogenous antigens (extracellular pathogen)
HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain precursor	Presentation of exogenous antigens (extracellular pathogen)
Protein NLRC5	Intracellular pattern recognition receptor (virus)
Interferon regulatory factor 1	Transcriptional regulator: IFN and IFN-inducible genes (virus)
Barrier-to-autointegration factor	Interferon-induced gene (virus)
Interferon-induced protein 44	Interferon-induced gene (virus)
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase precursor (PRGP)	Intracellular pattern recognition receptor (bacteria)
Complement C1q subcomponent subunit C precursor	First component of the serum complement system (complement activation)
Mannose-binding protein C precursor	Pattern recognition receptor (microorganisms)
Complement component C6 precursor	Constituent of the membrane attack complex (MAC)
Complement component C7 precursor	Constituent of the membrane attack complex (MAC)
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor	Critical for B-cell development
Ig kappa chain V-IV region B17 precursor	Expression of Immunoglobulin by mature B-cell (Plasma cell)
Plastin-2	T-cell activation

Tab. 2: List of identified biomarkers relevant for BTS.

This approach will allow to more clearly defining the dynamics of the immune response during BTS. Furthermore, by applying BTS-relevant biomarkers to all majorly affected organs (spleen, kidney, liver, gills, gastro-intestinal tract), those organs which elicit strong anti-viral/anti-bacterial immune responses, as well as the dynamic in which these anti-viral/anti-bacterial immune response spread through the organism during disease progression will be identified. This will pin-point the initial site of infection(s) and will improve our understanding of the BTS-pathology. Knowledge of the initial infection site(s) and the progression of the disease are crucial for the isolation and determination of the pathogen(s) which are responsible for BTS.

Literature

1. Koop BF., von Schalburg KR., Leong J., Walker N., Lieph R., Cooper GA., et al, 2008. A salmonid EST genomic study: genes, duplications, phylogeny and microarrays. *BMC genomics*: 545.
2. Smyth GK., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*: Article3.
3. Suzuki R., Shimodaira H., 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 1540–2.
4. Köllner B., Winkler C., Fichtner D., Bergman S., Klopffleisch R., Granzow H., 2006. Bakteriologische, virologische und immunologische Untersuchungen zur Ursache des Bachforellensterbens in voralpinen Flüssen Bayerns.: Friedrich Loeffler Institute.
5. Jorgensen HB., Sorensen P., Cooper GA., Lorenzen E., Lorenzen N., Hansen MH., et al., 2011. General and family-specific gene expression responses to viral hemorrhagic septicaemia virus infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol*: 1046–58.
6. Martin SA., Mohanty BP., Cash P., Houlihan DF., Seccombe CJ., 2007. Proteome analysis of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) cell line SHK-1 following recombinant IFN-gamma stimulation. *Proteomics*: 2275–86.
7. Kuenzel S., Till A., Winkler M., Hasler R., Lipinski S., Jung S., et al., 2010. The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 184(4):1990–2000.
8. Paun A, Pitha PM., 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie*: 744–53.

Metagenomic analysis of tissue samples as part of the investigation into Bavarian brown trout mortalities

Richard Paley

Center for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, Weymouth, UK

Zusammenfassung

Metagenomanalyse von Gewebeproben im Rahmen der Untersuchungen zum Bachforellensterben in Bayern

In dieser Untersuchung der CEFAS Aquatic Animal Health Gruppe kam, gekoppelt an eine next-generation Sequenzierung (454-technologie), ein »metagenomics«-Ansatz zum Einsatz, um in betroffenen Bachforellen ein Screening auf mikrobiologische Pathogene durchzuführen. Für den Fall, dass kein spezifisches Pathogen nachgewiesen werden konnte, war es Ziel, Einblicke in die aktiven Wirts-Gene erkrankter Fische und damit Hinweise auf die mögliche Entstehung der Erkrankung zu erhalten.

Die verwendete Methode beinhaltete eine RNA-Extraktion aus nicht betroffenen Referenz- und erkrankten Bachforellen. Mittels Random-Amplifikation und subtraktiver Hybridisierung wurde cDNA generiert, um Erreger-Gene und im erkrankten Fisch potenziell hochregulierte Wirtsgene anzureichern. Die cDNA wurde einer Hochdurchsatz-Sequenzierung (454-Technologie) unterzogen und die generierten Sequenzdaten analysiert. Die Proben umfassten Pools von 4 verschiedenen Geweben die zu 7 unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden und die von Bachforellen vor der Exposition (Zeitpunkt 1) bis hin zu erkrankten Bachforellen (Zeitpunkt 7) reichten.

Aus den erzeugten Rohdaten, erfolgte eine de novo DNA-Sequenz Montage unter Verwendung des Newbler 2.6 Software-Pakets und der CLC Genomics Workbench Software. Nach BLAST-Analyse der Sequenzen wurden die Ergebnisse in MEGAN (Metagenome Analyser) Version 3.9 für Metagenomanalyse importiert. MEGAN wies die Sequenzen anhand der taxonomischen Datenbank des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) einem Taxon zu. Die zugeordneten Sequenzen wurden anschließend mit individuellen Sequenzen eines bestimmten Taxon verglichen.

Eine Analyse der Gene Ontology wurde auch für die BlastX Zuordnungen aller Proben mittels der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome-Datenbank (KEGG)-Funktion und innerhalb der letzten aktualisierten Version von MEGAN (ver 4.69.4) durchgeführt.

Es gab eine Reihe von Sequenzen in den Proben die verschiedenen viralen Taxa zuzuordnen waren. Eine große Zahl zeigte Homologie zu Retroviren oder Herpesviren, aber eine tiefer gehende Analyse dieser viralen Sequenzen hat gezeigt, dass eine große Zahl eher Bachforellen Homologe verschiedener Salmoniden Wirts-Gene waren. Es ist nicht gelungen, anhand einer Analyse der Gene Ontology der Wirts-Gene in der Stichprobe, eine Aktivierung von Immungenen und »Pathogen-Response-Genen« einschließlich Virus-induzierter Gene zu identifizieren, die auf eine virale Infektion hin deuten könnten. Allerdings ist noch eine kleine Anzahl viraler Sequenzen von Interesse, die für weitere Untersuchungen geeignet wären. Es handelt sich hierbei um Sequenzen die eine Homologie zum Schwimmblasen-Sarkom-Virus der atlantischen Lachse, und zu anguilliden und equinen Herpesviren aufweisen.

Summary

Metagenomic analysis of tissue samples as part of the investigation into Bavarian brown trout mortalities.

In this investigation the Cefas Aquatic Animal Health group used a metagenomics approach coupled to next-generation (454) sequencing to screen for microbial pathogens in the affected brown trout. In the event that a specific pathogen could not be detected, we aimed to provide insights into the active host genes in the diseased fish and provide clues to the potential origins of the disease problem.

The method used included extraction of RNA from unaffected (control) brown trout and from diseased brown trout. cDNA was generated using a random amplification and subtractive hybridization followed to enrich for pathogen genes and for potentially up-regulated host genes in the diseased fish. The cDNA was subjected to high throughput, 454 sequencing and the generated sequence data analysed. Samples comprised 4 tissue type pools taken from 7 timepoints ranging from pre-exposed trout (timepoint 1) to clinically affected fish (timepoint 7).

From the raw data generated, *de novo* DNA sequence assembly was performed using the Newbler 2.6 software package and also using CLC Genomics Workbench software. After BLAST analysis of the sequences the results were imported into MEGAN (MEtaGenome ANalyser) version 3.9 for metagenomic analysis. MEGAN assigned the sequences to a taxon using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) taxonomic database. The assigned sequences were then interrogated by viewing the individual sequence comparisons for a particular taxon. Gene ontology analysis was also performed on the BlastX assignments for all samples using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG) function, within the recent upgraded version of MEGAN (ver 4.69.4).

There were a number of sequences assigned to various viral taxa across the samples. A large number showed homology to retroviruses or herpesviruses, but a more in-depth analysis of these viral sequences has indicated that a large number were more likely to be brown trout homologs of various salmonid host genes. Analysis of the gene ontology of the host genes identified in the sample set has similarly failed to identify immune gene activation and pathogen response genes, including virus induced genes, which might indicate a viral infection. However, there remain a small number of viral sequences of interest that would be suitable for further investigation. These are sequences showing homology to atlantic salmon swim bladder sarcoma virus, and to Anguillid and equid herpesvirus.

Background

Metagenomics is an approach used to study microbial activity in a sample by analysing the nucleotide sequence content. Researchers from the Central Science Laboratory, UK exploited a metagenomics approach coupled to "next-generation" or "454 sequencing" to identify and characterize a cucumovirus infecting an ornamental plant host (Adams *et al.*, 2009).

In this study we used a similar approach to that of Adams *et al.*, (2009) to screen for microbial pathogens in the diseased brown trout. In the event that a specific pathogen could not be detected, we aimed to provide insights into the active host genes in the diseased fish and provide clues to the potential origins of the disease problem.

The method included extraction of RNA from unaffected (control) brown trout and from diseased brown trout. Then cDNA was generated using a random amplification and subtractive hybridization used to enrich for pathogen genes and for any up-regulated host genes in the diseased fish. The cDNA was then subjected to high throughput, next generation sequencing (NGS) and the generated sequence data analysed.

The first study was initially divided into 2 modules, each divided into 2 sub-modules. A further second study was termed module 3.

Module 1a: To subject 14 selected tissue pools to RNA extraction, cDNA synthesis and subtractive hybridisation (SH) in one group. The 14 pools of tissue consisted of 2 different pools of organs dissected from 5 exposed brown trout from 6 sampling points and 2 organ pools from 5 un-exposed brown trout. The organ pools were: pool A – liver, kidney and spleen and pool B – gastrointestinal tract including pyloric caeca.

Module 1b: To subject a further 14 tissue pools from the exposed and un-exposed trout sampled above to RNA extraction, cDNA synthesis and SH in a second group. The organ pools were: pool C – brain and pool D – gills and separated blood cells.

Module 2a: To perform library generation, sequencing and analysis on SH products generated from pools A & B from sampling point 7 (overtly diseased trout).

Module 2b: To perform library generation, sequencing and analysis on SH products generated from pools C & D from sampling point 7 (overtly diseased trout).

Module 3: Metagenomic analysis of subtracted cDNA generated from tissue samples from four earlier time points (2,3,4 & 5) in the disease progression in brown trout. To perform library generation, sequencing and analysis on SH products generated from combined tissue pools A & B and pools C & D from each time point.

Materials & Methods

Samples

Twenty eight tubes containing 1g of pooled organs were received in the laboratory on the 9th October 2009. Sam-

ples comprised 4 tissue type pools (A–D) taken from 7 timepoints ranging from pre-exposed trout (timepoint 1) to clinically affected fish (timepoint 7).

RNA isolation & cDNA synthesis

Tissue was homogenised in Trizol reagent using a Fast-Prep-24 machine and RNA was extracted from 1 ml of homogenate as per manufacturer's instructions. The RNA was re-suspended in RNase free water and contaminating DNA was removed by digestion with RQ-DNase. The RNA was cleaned by phenol chloroform extraction, precipitated and then washed in 70 % ethanol and re-suspended in 50 µl aliquots. The RNA quantity and quality was assessed by Nanodrop spectrophotometry.

First strand cDNA was synthesised from the RNA (5 µg of each sample) with a reverse transcriptase using both Tag-dT (tagged oligo-dT, a short sequence of deoxy-thymine nucleotides) and Tag-random primer to prime the synthesis in separate 20 µl reactions for 1h at 42 °C. Tag1 was used for pools A and C and Tag 2 for pools B and D. RNA was removed by incubation with RNase H at 37 °C for 1h.

Second strand cDNA was synthesised by PCR amplification with a DNA polymerase using the oligo-dTs and random primed first strand cDNA, combined in one 50 µl reaction, for each tissue type pool.

Subtractive hybridisation

Subtractive hybridisation was performed on each tissue type (pools A–D) by mixing amplified cDNA for pre-exposed trout samples (biotin labelled) with cDNA from exposed trout samples (unlabelled) in the ratio of 10:1 in a final volume of 50 µl.

The cDNA mixes were denatured at 95° then hybridised at 65 °C overnight and biotin-labelled, hybridised cDNA removed by binding to Streptavidin dynabeads and a magnet used to collect the beads. The beads were then washed and the washes, containing subtracted cDNA, collected, precipitated with ethanol and then digested with S1 nuclease for 30 min at 37 °C to remove any single stranded DNA.

Subtracted cDNA was then amplified using the appropriate Tag primer, cleaned with a PCR clean up kit and quantified by spectrophotometry. For module 3, the amplified subtracted cDNA samples were thawed from –80 °C cryostorage and then cleaned and quantified.

Sequencing and analysis

Tagged and subtracted cDNA from pools A and B were combined and pools C and D were similarly combined. In the first study (**Module 2**) the two, time point 7, samples were sent to the Centre for Advanced Genomics, Liverpool University for next generation sequencing on a GSFLX Genome Sequencer (454 Sequencing, Roche). From the sequence read data generated, *de novo* assembly was performed at Liverpool using Newbler (454 Sequencing) and contiguous sequence data returned to Cefas. The raw sequence data was also processed using CLC Genomics Workbench software at Cefas and using slightly different parameters *de novo* assembly resulted in the generation of further contiguous sequences (contigs).

In the second study (**Module 3**), the 8 samples, from time points 2,3,4 & 5, were sent to the Food and Environmental Research Agency (Fera) for next generation 454 sequencing on a GSFLX Genome Sequencer. Each sample was further tagged with one of 8 unique multiplex identifiers (MID) before pooled multiplexed sequencing was undertaken on a 454 sequencing (whole) plate. From the raw data generated, *de novo* DNA sequence assembly was performed at Fera using the Newbler 2.6 software package.

In both modules, Blast analysis was performed at Fera, on the contigs and singletons dataset for each TAG or MID/TAG combination using BlastN and BlastX against the GenBank database. The results of the Blast analysis of the sequences were imported into MEGAN (MEtaGenome ANalyser) version 3.9 for metagenomic analysis. Analysis was performed on the Tag separated pools and on the combined pool. MEGAN used the blast analysis results and assigned sequences to a taxon using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) taxonomic database. The assigned sequences could then be interrogated by viewing the individual sequence comparisons for a particular taxon.

To test and confirm the validity of the process of analysis an *in silico* spiking experiment was performed in which 7 known herpes or rhabdovirus viral sequences were added to the list of contigs generated in pool A prior to blast and Megan analysis. The spiked sequences appeared in a separate branch of the Megan analysis tree indicating the process used for analysis is suitable to identify potential pathogen sequences within the dataset if they are present (see Figure 1).

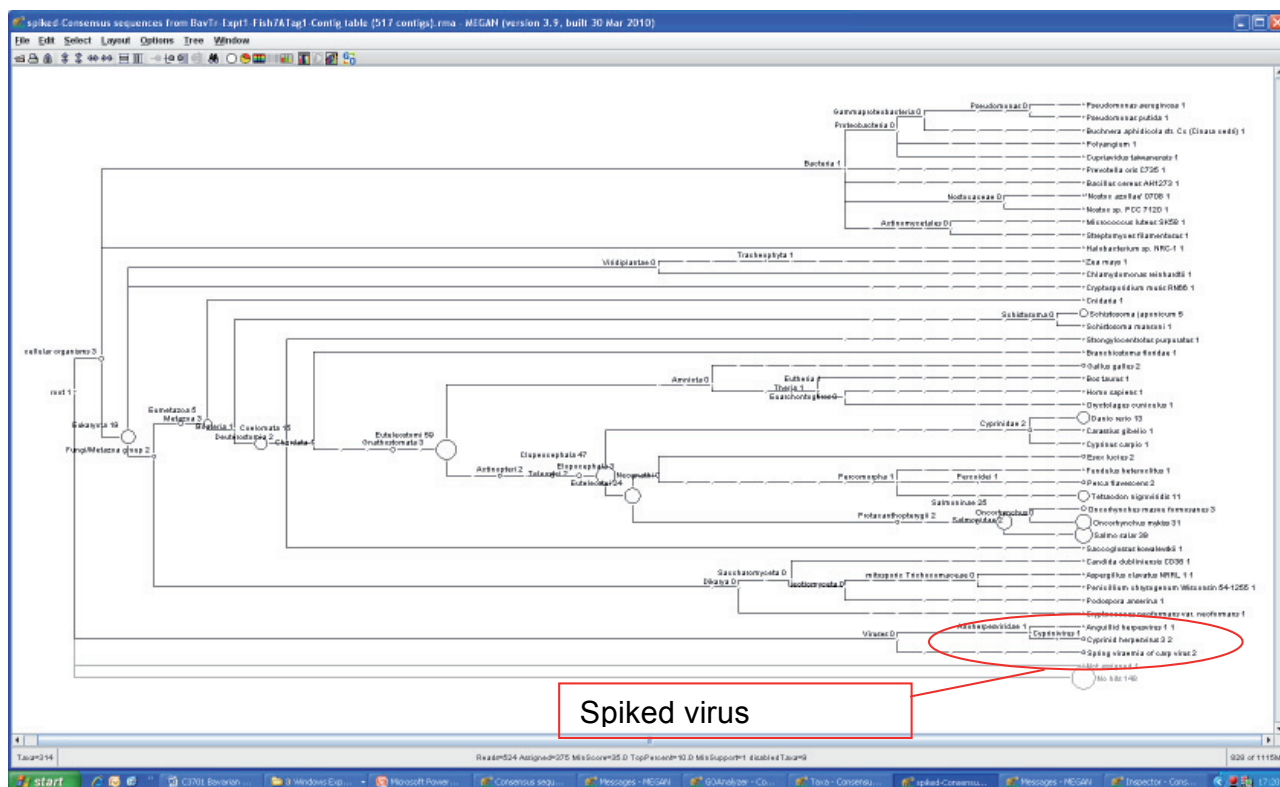


Fig. 1: Screen shot of Megan analysis on in silico spiked pool A of time point 7. The in silico added viral sequences have been identified and grouped in the analysis tree.

Results

In Module 2 a total of 152064 sequence reads were generated from the cDNA libraries from the tissue pools at sample point 7. Consisting of 42812 reads from tissue pool A, 48224 reads from pool B, 28304 reads from pool C and 32724 reads from pool D. From these a total of 710 contiguous sequences (contigs) covering a total of 334,510 base pairs (bp) was returned to Cefas. The shortest contig was 27bp and the longest contig 2,232bp and the average contig length was 471bp. The raw sequence data was also processed using CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Denmark) software at Cefas. Using slightly different parameters de novo assembly resulted in the generation of 2055 contigs, or 517, 493, 492 and 548 contigs for pools A–D respectively.

In Module 3 a total of 977832 sequence reads were generated from the tissue pools at sample points 2,3,4 and 5. A total of 13 files (raw and annotated data and blast results files), for each sample point/tissue pool combination, were returned to Cefas comprising over 10GB data. Table 1 provides a summary of the contiguous sequences (contigs) and single reads present after *de*

novo assembly for each sample point and tissue pool sequenced in Module 3.

From time point 7 no significant pathogen sequences were apparent within the output analyses. Approximately 35 % (736 of 2055) of the contigs from the pooled samples were not assigned to any taxon (no hits in the databases). The largest majority of the contigs were assigned homology to fish genes mostly salmonid species but contigs also showed homology to *Danio rerio* and *Tetraodon nigroviridans* (model organisms). A large number of single contigs were assigned to various bacterial and parasite taxa but in most cases the level of homology was relatively low and over a short section of sequence only.

As was the case with the sequences which formed contigs, the majority of the non assembled reads were assigned homology to salmonid and other fish species. A large number of other taxa were represented with the majority only being represented by 1 sequence read.

Taxa with a large number of reads assigned to them in the analysis (range 177–1197 reads) include: *Brugia malayi* (a nematode worm), *Trichomonas vaginalis* (a flagellated protozoan), *Plasmodium yoelli* (a parasitic protist) and *Chlamydomonas reinhardtii* (a green algae). For

Sample point,tissue pool* & tag	Reads	Contigs	Single reads	Sample point,tissue pool* & tag	Reads	Contigs	Single reads
2A Tag 1	31,616	176	2073	4A Tag 1	83,791	349	5550
2B Tag 2	79,147	327	4359	4B Tag 2	40,184	244	3743
2C Tag 1	48,180	305	7950	4C Tag 1	54,894	437	7159
2D Tag 2	80,176	431	7113	4D Tag 2	58,803	278	3558
3A Tag 1	27,339	136	2118	5A Tag 1	53,176	278	5141
3B Tag 2	58,185	232	2779	5B Tag 2	64,945	354	3616
3C Tag 1	34,082	230	4174	5C Tag 1	49,197	379	7967
3D Tag 2	74,548	333	4610	5D Tag 2	139,569	391	5575

Tab. 1: Summary of the contiguous sequences (contigs) and single reads present after de novo assembly for each sample point and tissue pool sequenced in Module 3 (Tissue pool A = liver/spleen/kidney, B = intestine/pyloric caecae, C = brain, D = gills/blood).*

B. malayi and *P. yoelii* the homology of sequence reads, showing good length, ranges from 33 % to 86 %.

From the analyses of time point 7, a significant number of contigs (11 of 2055) showed high homology (up to 86 % amino acid identity) to various schistosomes, indicating the possible presence of uncharacterised schistosomes in the brown trout. Similarly, from the analyses of the 4 earlier time points, a significant number of sequences, both non assembled reads (singletons) and contigs showed strong homology to schistosomes (91 sequences after BlastN analysis and 422 sequences after BlastX analysis). A proportion of these sequences were re-analysed and further interrogated in the BlastN program and were found to show stronger homology to various salmonid genes, indicating they are likely brown trout homologues to host genes rather than schistosome derived.

In the non assembled read analysis from time point 7, using the BlastX database comparison, 34,716 reads were assigned to a taxon, whilst 9735 showed no identity to any published sequences. Fifteen sequence reads were assigned homology to various virus taxa. In all cases however, the homology was either low or over short regions or both. The greatest amino acid identity was 68 % but over only 22 residues and maximum length was 80 amino acid residues but with only 33 % identity. These assignments are therefore unlikely to be true significant hits.

Gene ontology analysis

The contigs and non assembled reads in both studies were also interrogated at the level of gene ontologies

(GOs) within Megan, a means of standardising the representation of gene and gene product properties across species and databases. Within the GO Analyzer the sequences are initially assigned to three main domains – biological processes, cellular components and molecular function, then further categorised into related sub-domains.

GO analysis was also performed on the BlastX assignments for contigs and singleton read files for all samples using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG) function within the recent upgraded version of Megan (ver 4.69.4).

GO analysis of data from both studies indicated the largest grouping was associated with the ribosome complex followed by metabolic pathways and oxidative phosphorylation. The KEGG analysis also indicated that a number of genes associated with Huntington's, Parkinson's and Alzheimer's disease were in the data set however ubiquinone and cytochrome-c oxidases were the main related genes and these are present in many ontology groupings. A significant number of complement and coagulation cascade genes were highlighted in data from both studies, possibly a real response to the haemorrhaging seen in the diseased trout.

Figure 2 shows a screen shot of KEGG analysis on a combined sample dataset. Numbers in brackets beside each pathway indicates the number of reads assigned to each pathway. The pathway diagram is provided in the window to the right and reads are assigned to individual components of the pathway. Components coloured green have reads assigned to them, the darker green the more reads assigned.

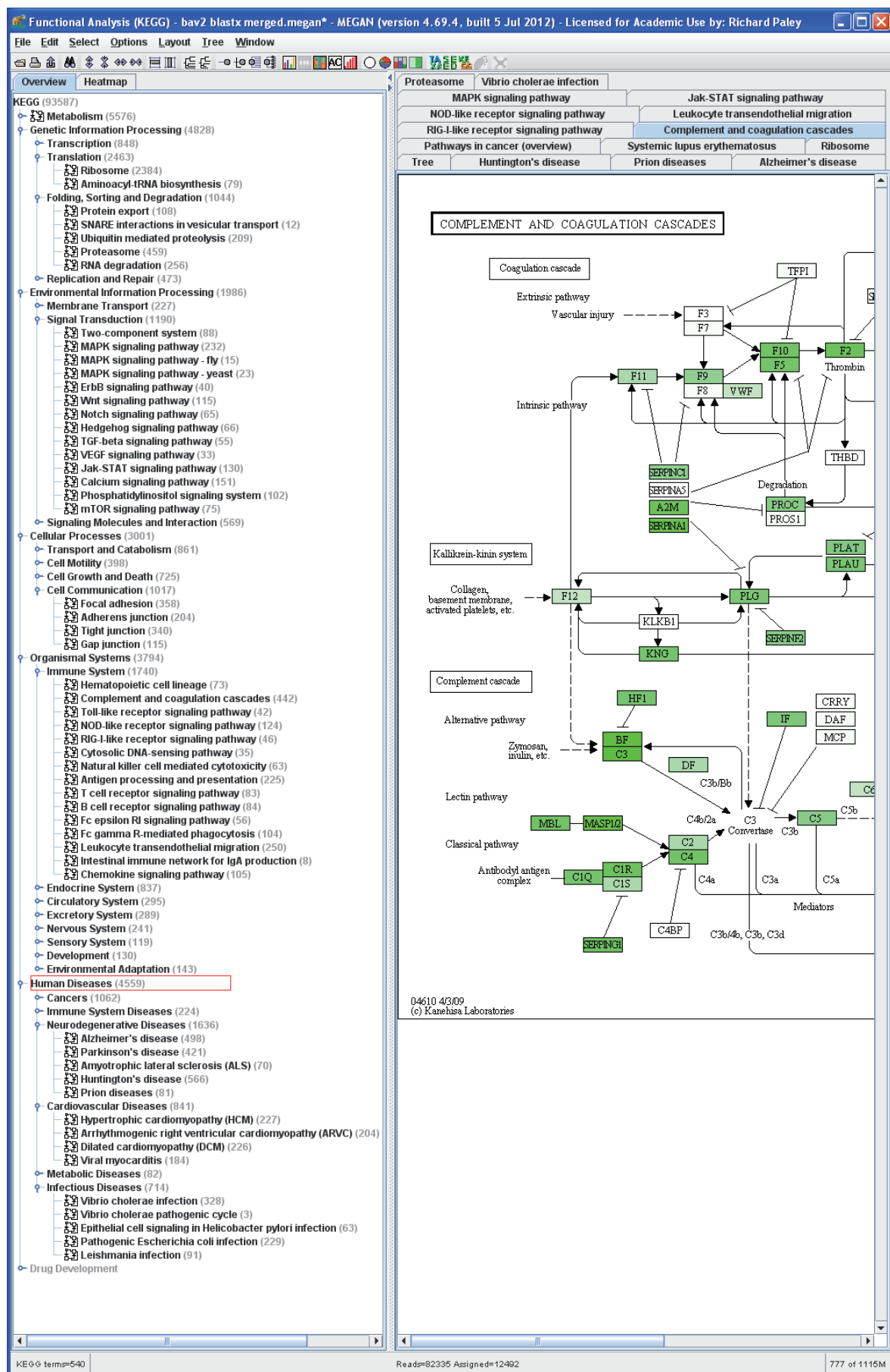


Fig. 2: Screen shot depicting example of gene ontology analysis using KEGG

Analysis of sequences showing viral homology

There were a number of sequences assigned to various viral taxa across the samples. Figure 3 depicts these assignments graphically in a Megan phylogram generated from a merged file incorporating the BlastX results for all of the samples across all time points (see also table 2, supplementary).

A consistent theme in the viral assignments was the presence of sequences showing homology to various herpes viruses (25 in total) with 14 hits showing homology to cyprinid herpesvirus 3 (Koi herpesvirus). The level of identity varied and there were a number of sequences that showed only homology in obvious repeat regions and/or across short regions of sequence. However, some homologies were more robust and were further investigated.

A significant number of hits showing homology to various retroviruses were also observed. These included a single read in the time point 2 gills and blood sample and a single read in the time point 4 viscera sample showing strong homology (82 % and 91 % identity at the nucleotide and protein levels respectively) to sequence from Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus (see Fig 4). Sequences showing homology to seven other retroviruses were observed (see Fig 3) with the greater proportion (34 sequences) showing low homology (26–43 %), but over reasonable lengths (up to 110 amino acids), to human immunodeficiency virus 1. Three of these sequences are contigs comprising very large numbers of reads (11, 688 and 9213) and it would appear that the larger part of these sequence hits are seen in the samples from gills/blood.

Contig assembly was performed on the de-multiplexed sequences for each sample separately. Further work was required to extract the relevant reads for each suitable virus homology hit from each time point and compare them against each other. This enabled the establishment of any identity or groupings across the samples and generated more or larger contigs, that were then further analysed.

In summary, of the 39 reads initially showing homology to retroviruses, on BlastN re-analysis, 32 showed homology to salmonid genes, 6 gave no significant hit and 1 read reproduced the strong homology to atlantic salmon swim bladder sarcoma virus (ASSBV). Of the 20 extracted reads initially showing homology to herpes viruses on BlastN re-analysis, 5 showed homology to salmonid genes, 12 gave no significant hit and 3 retained significant homology to Anguillid, equid and suid herpesviruses

respectively. The significance of these hits to ASSBV and the 3 herpesviruses remains to be determined, as all are present in limited number of reads and relatively short length. One might expect to see significantly more reads and significantly greater length if these were truly representative of a replicating virus causing pathology. These are however the most valid targets for design of PCR primers and PCR analysis of exposed and un-exposed fish to determine if the sequences are consistently associated with the disease in a number of fish.

Finally, the presence of unusually large contigs in the sample reads might indicate RNA based viral genome. Thus, using CLC genomics, the reads for each of the 16 samples were assessed for the length of the longest contig. Table 1 indicates the size of the largest contigs for each sample. None were of significant length over what might be expected for vertebrate cellular gene transcripts however all were re analysed by comparison against the databases using BlastX and BlastN and all were found to show high homology to various salmonid genes.

Discussion and recommended further work

Metagenomic analysis of subtracted cDNA from time point 7 (clinically affected trout) did not provide clear evidence of viral infection. It is possible that a pathogen that induces pathological changes and disease is cleared from, or is no longer detectable in, the host by the time disease signs are evident. This has been described in salmonid alphavirus infection (see McLoughlin & Graham, 2007 for review). So, analysis of tissues from earlier time points was suggested as the next step to identify the aetiology of the disease.

A more in-depth analysis of the various sequences showing homology to retro- and herpes- viruses has indicated that a large number were more likely to be brown trout homologs of various salmonid host genes. There remain a small number of sequences of interest that would be suitable for further investigation. These are sequences showing homology to atlantic salmon swim bladder sarcoma virus, and to Anguillid and equid herpes viruses.

Unfortunately the biology of the herpes and retroviruses indicates that these fragments may well be residual integrated genome from an historical infection or even an ancient evolutionary integration. Their relevance however, is relatively simple to test by standard or real time PCR of affected and naïve animals.

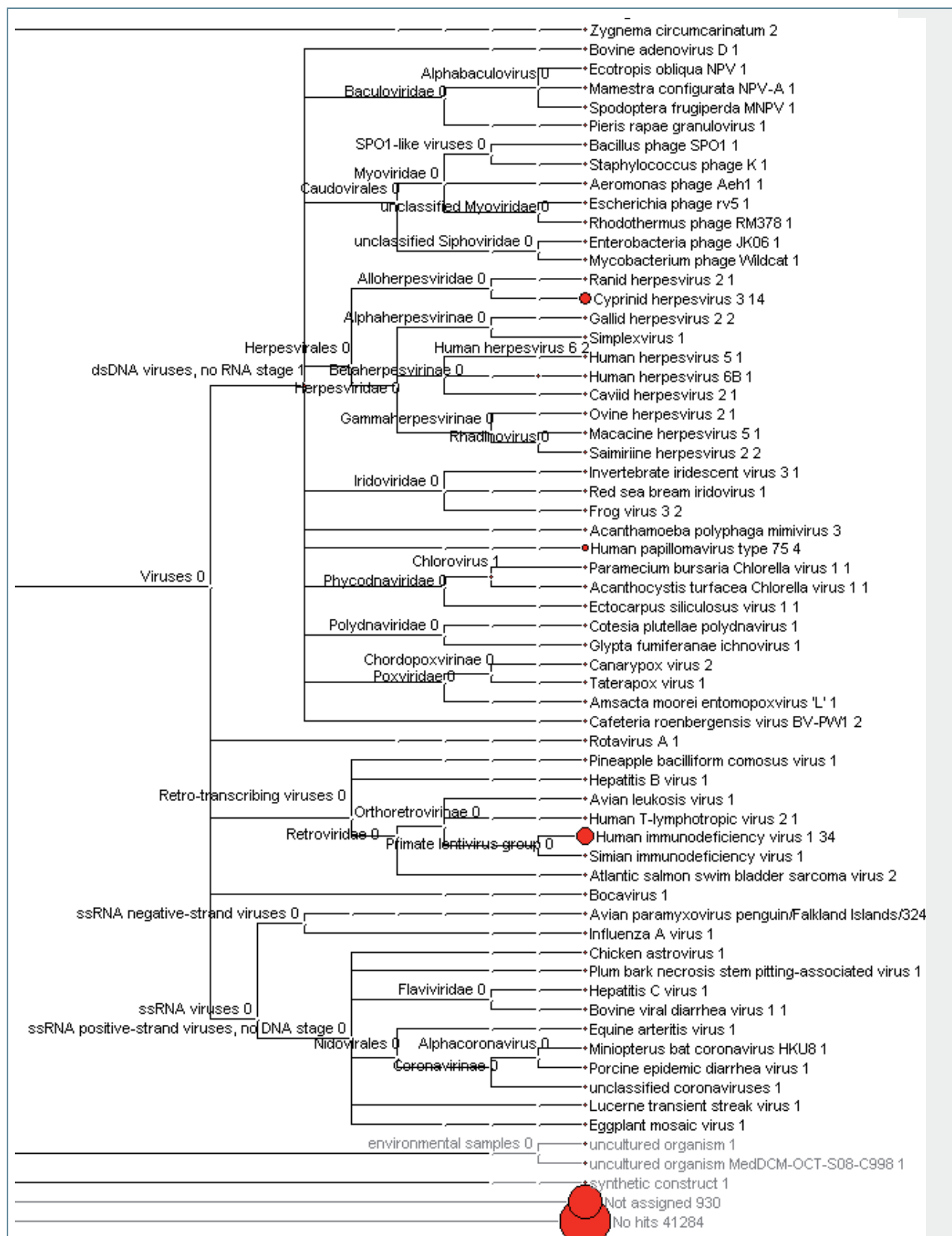


Fig. 3: Phylogram showing assignment to virus taxa on a BlastX analysis of contigs and single reads from combined time-points data.

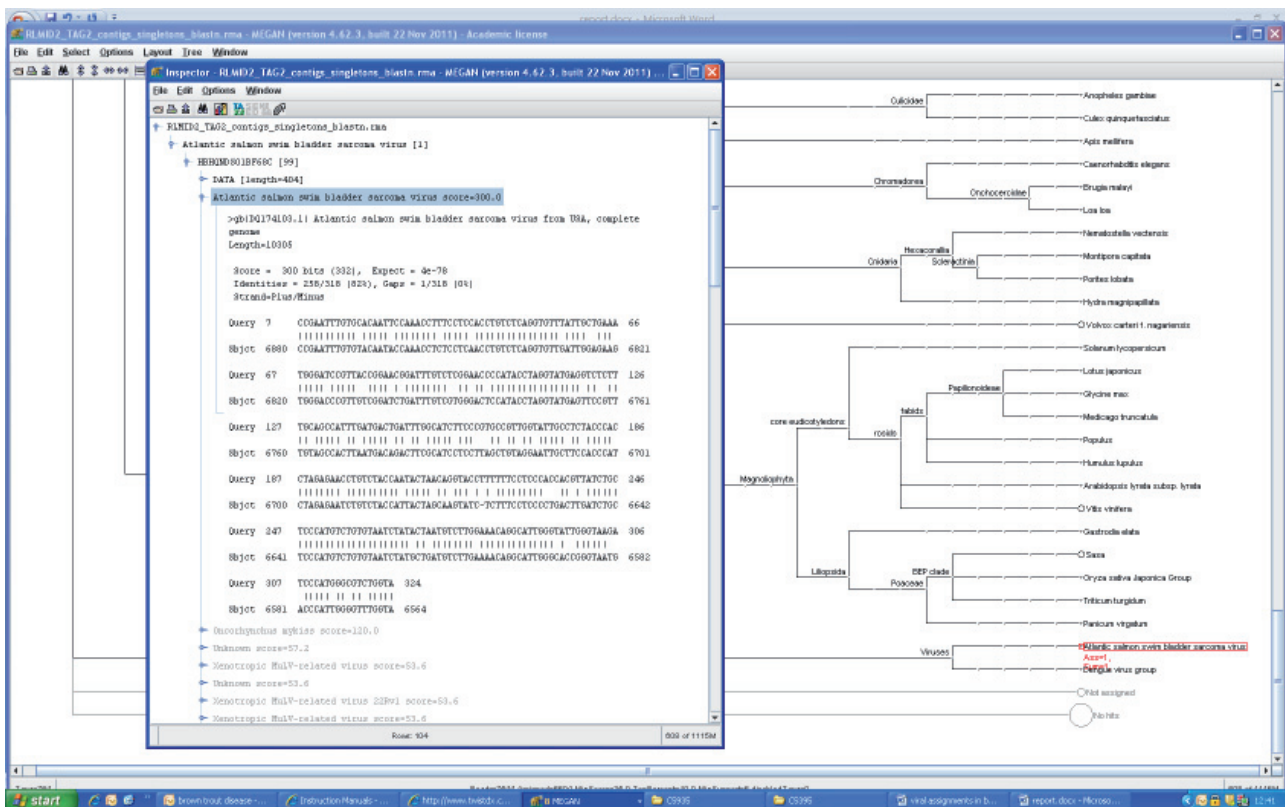


Fig. 4: Screen shot for individual sequence comparison view for singleton read showing 82 % homology at the nucleotide level to Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus

Analysis of the gene ontology of the host genes identified in the sample set has similarly failed to identify immune gene activation and pathogen response genes which might indicate a viral infection, such as interferon, interferon stimulated genes (ISG), Mx, STAT-1 or virus induced genes (VIG).

The extent of the analysis of non assembled, single reads, which is very time-consuming, was governed by the time available in the project. In a study of the aetiological agent causing heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in salmon, a single read of 265bp from over 100000 reads generated by NGS of affected heart RNA showed 49 % amino acid similarity to a mammalian orthoreovirus. Subsequent qPCR analysis of control and affected animals and further NGS sequencing of heavily infected material led to the majority of the novel reovirus genome being sequenced and strong as-

sociation with the disease was demonstrated (Palacios *et al.*, 2010).

Further work might include design of specific PCR assays from the sequences that showed most homology to viruses including Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus, HIV-1, and cyprinid herpesviruses.

Given appropriate funding more extensive gene ontology analysis including input from expert immunologists is recommended. Cefas is currently developing bioinformatics links with relevant groups to enable this development and hope to be in a position to offer this in the near future.

Both the discipline of metagenomic analysis and the worlds sequence databases continue to develop at a rapid pace. It would be appropriate to re-analyse this data at some point in the future as new methods in bioinformatics are developed and as the genome databases increase in complexity.

Identifiers	Sample	BlastN % identity and homolog	Details: read type and length of region of homology	BlastX % identity and homolog	Details: read type and length of region of homology
MID1 TAG1	2A (liv/ spl/kid)	None assigned	–	37 % Red sea bream iridovirus	1 singleton, 57 aa
MID1 TAG2	2B (int/ pyl-caec)	None assigned	–	39 % Ranid herpes virus 2 84 % Cyprinid herpes virus 3 29 % Canary pox virus 54 % Cafeteria roenbergensis virus BV-PW1 36 % Human T lymphotropic virus 1 43 % Human immunodeficiency virus 1 52 % Eggplant mosaic virus	Singleton, 42 aa 6 singletons, repeat region, 18–29 aa Singleton, 70 aa Singleton, 58 aa, repeat region Singleton, 44 aa Singleton, 49 aa Singleton, 27 aa
MID2 TAG1	2C (brain)	75 % Anguillid herpes virus 1 79 % Callitrichine herpes virus 3 (NW monkey) 83 % Equid herpes virus 2	Contig (7 reads), 174bp Singleton, 90 bp Singleton, 93 bp	45 % Human herpesvirus 5 52 % Human papillomavirus type 75 36 % Cotesia plutellae polydnavirus 60 % Cyprinid herpesvirus 3 41 % Paramecium bursaria Chlorella virus 1 45 % Gallid herpesvirus 2 52 % Simian immunodeficiency virus 43 % Invertebrate iridescent virus 3 31 % Acanthamoeba polyphaga mimivirus 33 % Porcine epidemic diarrhea virus 32 % Saimiriine herpesvirus 2 41 % Bovine viral diarrhea virus 1 43 % Human immunodeficiency virus 1 38 % Rhodothermus phage RM378 43 % Lucerne transient streak virus	Singleton, 40 aa Singleton, 33 aa Singleton, 57 aa Singleton, 25 aa Singleton, 32 aa Singleton, 40 aa Singleton, 27 aa Singleton, 42 aa Singleton, 59 aa Singleton, 82 aa Singleton, 61 aa Singleton, 49 aa Singleton, 38 aa Singleton, 43 aa Singleton, 54 aa
MID2 TAG2	2D (gills/ blood)	82 % Atlantic salmon swimbladder sarcoma virus 89 % denge virus 3	Singleton, 318 bp Singleton, 42 bp	27 % Avian leukosis virus 32–43 % Human immunodeficiency vir 1 91 % Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus 40 % Chicken astrovirus 32 % Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	Singleton, 53 aa 8 Singletons, 42–63 aa Singleton, 74 aa Singleton, 48 aa Singleton, 80 aa
MID3 TAG1	3A (liv/ spl/kid)	None assigned	–	–	–
MID3 TAG2	3B (int/ pyl-caec)	None assigned	–	53 % Cyprinid herpes virus 3 52 % human immunodeficiency virus 1	Singleton, 53 aa – repeats Singleton, 29 aa
MID4 TAG1	3C (brain)	87 % Paramecium bursaria chlorella virus	Singleton, 44 bp	49 % Acanthamoeba polyphaga mimivirus 40 % Glypta fumiferanae ichnovirus 26 % Human immunodeficiency virus 1	Singleton, 31 aa Singleton, 48 aa Contig (11 reads), 110 aa
MID4 TAG2	3D (gills/ blood)	None assigned	–	34 % Bovine adenovirus D 49 % Mamestra configurata NPV-A 70 % Cyprinid herpesvirus 3 37 % Ectocarpus siliculosus virus 1 29–29 % Human immunodeficiency vir 1 67 % Influenza A virus	Singleton, 78 aa Singleton, 29 aa Contig (12 reads), 23 aa Singleton, 47 aa 4 singletons, 35–66 aa Singleton, 21 aa
MID5 TAG1	4A (liv/ spl/kid)	72 % Chlorella virus	Singleton, 128 bp	43 % Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus	Singleton, 33aa
MID5 TAG2	4B (int/ pyl-caec)	86 % hepatitis C virus	Singleton, 34 bp	45 % Rotavirus A 32+38 % Human immunodeficiency virus 1	Singleton, 34 aa 2 singletons, 61 + 43 aa
MID6 TAG1	4C (brain)	75 % Pieris rapae granulovirus 77 % Suid herpesvirus 1 81 % Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus 78 % Torque teno sus virus 2 96 % Norovirus genogroup 2	Singleton, 103 bp Singleton, 133 bp Singleton, 47 bp Singleton, 74 bp Singleton, 74 bp	32 % Amsacta moorei entomopoxvirus ,L' 52 % Macacine herpesvirus 5 53 % Human papillomavirus type 75 63 % Simplexvirus (cercopithecine herpesvirus 2 38 % Spodoptera frugiperda MNPV	Singleton, 50 aa 2 Singletons, 27 aa Singleton, 33 aa Singleton, 34 aa Singleton, 24 aa Singleton, 56 aa

MID6 TAG2	4D (gills/ blood)	None assigned	–	84 % Human herpesvirus 6 37 % Canarypox virus 52 % Taterapox virus 43 % Hepatitis B virus 35 % + 37 % Human immunodeficiency virus 1 33 % Bocavirus (bovine parvovirus 1) 28 % Equine arteritis virus 46 % unclassified coronaviruses	Singleton, 25 aa, repeat region Singleton, 44 aa Singleton, 56 aa, repeat region Singleton, 40 aa 1 singleton, 41aa + 1 contig (9213 reads), 61 aa Singleton, 76 aa Singleton, 76 aa Singleton, 33 aa
MID7 TAG1	5A (liv/ spl/kid)	83 % Macacine herpesvirus 5 75 % Cowpox virus	Singleton, 51 bp Singleton, 91 bp	52+64 % Cyprinid herpesvirus 3 49 % Caviid herpesvirus 2 38 % Acanthamoeba polyphaga mimivirus 56 % Cafeteria roenbergensis virus BV-PW1 43 % Pineapple bacilliform comosus virus 37 % Avian paramyxovirus penguin/Falklands	2 Singletons, 35+25 aa, repeats Singleton, 31 aa Singleton, 54 aa Singleton, 56 aa Singleton, 47 aa Singleton, 38 aa
MID7 TAG2	5B (int/ pyl-caec)	None assigned	–	53 + 80 % Cyprinid herpesvirus 3 44 % Ovine herpesvirus 2 46 % Saimiriine herpesvirus 2	2 Singletons, 47 + 25 aa Singleton, 44 aa Singleton, 33 aa
MID8 TAG1	5C (brain)	75 % Anguillid herpesvirus 1 75 % Granada virus	Singleton, 176 bp Singleton, 206 bp, repeat region	40 % Gallid herpesvirus 2 77 % Human herpesvirus 6B 55 % Frog virus 3 50 % Human papillomavirus type 75 46 % Human immunodeficiency virus 1	Singleton, 40 aa Singleton, 17 aa Singleton, 33 aa, repeat region Singleton, 30 aa Singleton, 35 aa
MID8 TAG2	5D (gills/ blood)	None assigned	–	39 % Ecotropis obliqua NPV 28 % Pieris rapae granulovirus 67 % Cyprinid herpesvirus 3 48 % Frog virus 3 27 % Acanthocystis turfacea Chlorella virus 1 30 % Human immunodeficiency virus 1 29–38 % Human immunodeficiency vir 1 37 % Hepatitis C virus 28 % Miniopterus bat coronavirus HKU8	Singleton, 39 aa Singleton, 61 aa Singleton, 30 aa, repeat region Singleton, 23 aa, repeat region Singleton, 117 aa Contig (688 reads), 75 aa 12 Singletons, 54–88 aa Singleton, 47 aa Singleton, 51 aa

Tab. 2: Megan assignments to virus taxa for brown trout metagenome sequence data. Assignments with strongest support are highlighted in bold and blue.

Literature

Adams I. P., Glover R. H., Monger W. A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., Samuitiene M. & Boonham N., 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10, 1364–3703.

McLoughlin M. F. & Graham D. A., 2007. Alphavirus infections in salmonids – a review. *J Fish Dis* 30:511–531.

Palacios G., Lovoll M., Tengs T., Hornig M., Hutchison S., 2010. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS ONE* 5(7):e11487.doi:10.1371/journal.pone.0011487.

Themenblock IV:
Bachforellensterben in den Nachbarländern
Österreich und Schweiz

Das Problem der Schwarzen Bachforelle (Proliferative Darkening Syndrome) in Österreich

Franz Lahnsteiner¹, Reinhard Haunschmid²

¹ Universität Salzburg, Abteilung für organismische Biologie

² Bundesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde, Scharfling

Zusammenfassung

Der Vortrag gibt eine Zusammenfassung über das Auftreten des als »Schwarze Bachforelle Phänomen« oder »proliverative darkening syndrom« bezeichneten Bachforellensterbens in Österreich und präsentiert die Ergebnisse der Untersuchungen, die zu diesem Thema durchgeführt wurden.

Das Bachforellensterben tritt hauptsächlich im Spätsommer und Herbst während der Niedrigwasserphasen auf und zwar sowohl in Besatzstrecken als auch in reproduktiven Beständen. Die betroffenen Gewässer sind typische Salmonidengewässer und bieten grundsätzlich gute Bedingungen für Bachforellen. Die betroffenen Bachforellen stellen die Futtersaufnahme ein, weisen stark verminderte Schwimm- und Fluchtbewegungen auf und die charakteristische Schwarzfärbung.

An betroffenen Bachforellen wurden Untersuchungen durchgeführt, um pathophysiologische Veränderungen zu erfassen. Im peripheren Blut waren die Anzahl der Granulozyten und Lymphozyten sowie die Lysozymaktivität und die Immunglobulinkonzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erniedrigt. In weiterer Folge nahm auch die Anzahl und osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen ab. In der Milz und in der Kopfniere war die Anzahl der Hämoblasten und normalen Erythroblasten erniedrigt, die Anzahl der atypischen Erythroblasten erhöht. Im hämatopoetischen Gewebe der Niere und in der Leber konnte eine Anhäufung von Makrophagen und nekrotisches Gewebe festgestellt werden. Alle betroffenen Bachforellen wiesen auch starken Bakterienbefall von mehreren Arten aus den Linien Proteobacteria, Actinobacteria und Gram-positive Bakterien auf.

Mögliche Ursachen für die beobachteten Veränderungen

werden diskutiert. Dies sind Stressbelastung im Allgemeinen, physikalische Faktoren wie starke Temperaturschwankungen und/oder UVB Belastung und chemische Faktoren (Umweltgifte).

Summary

Late summer brown trout mortality (»Schwarzen Bachforelle phenomenon« or »proliverative darkening syndrom«) in Austrian prealpine river systems

Since several years severe brown trout mortality is reported for different river systems of Austria which is termed »Schwarze Bachforelle phenomenon« or »proliverative darkening syndrom«. The present lecture gives an overview about the occurrence of this kind of brown trout mortality and summarizes the results of the research activities performed on this topic.

In Austria, brown trout mortality is mainly observed in late summer and fall during low-water periods in stocked as well as in reproductive populations. The affected water systems are typical salmonid rivers and generally offer good conditions for brown trout. The affected fish stop feeding, become lethargic, lack escape reactions, and reveal a black coloration.

Investigations were performed on affected brown trout to define pathophysiological changes associated with this kind of mortality. In the peripheral blood of affected brown trout, the number of granulocytes, lymphocytes, and the activity of lysozym and the concentration of immunoglobulin were significantly decreased in comparison to the control groups. Also the number and osmotic resistance of red blood cells was decreased. In the spleen and in the head kidney, the number of haemoblasts and of normal erythroblasts was

decreased, while the number of atypical erythroblasts was increased. In the hematopoietic tissue of the kidney and of the liver accumulation of macrophages and necrotic tissue was observed. All affected brown trout were also heavily infected with species of proteobacte-

ria, actinobacteria and gram-positive bacteria. Possible causes for the observed changes are discussed. These are stress in general, physical factors such as temperature variations and/or UVB exposure and chemical factors (environmental toxins).

Bachforellensterben in der Schweiz

Marion Mertens
Life Science AG, Basel

Zusammenfassung

Ein im Jahr 1999 durchgeführter Hälterungsversuch am Mühlbach, Kanton St. Gallen, ergab das aus der Iller und anderen Bayerischen Gewässern bekannte Bild: Fast alle im Bachwasser gehälterten Forellen starben innerhalb von zwei Wochen im September, wohingegen die in Trinkwasser gehaltene Kontrollgruppe überlebte. Eine Wiederholung des Versuchs im Jahr 2005 ergab jedoch keinen Befund. Eine nachträgliche Auswertung von Gewebeproben aus dem Jahr 1999 belegt mit grosser Wahrscheinlichkeit, dass das Bachforellensterben 1999 auf die gleiche Ursache wie in Bayern zurückzuführen ist. Die Gewebeproben aus dem Jahr 2005 lieferten dagegen keinen entsprechenden Befund. Bachforellenbesatz und Kontrollabfischungen durch den Kanton St. Gallen nach 2005 legen den Schluss nahe, dass auch in den Folgejahren kein entsprechendes Forellensterben aufgetreten ist.

Summary

In 1999, an exposure experiment with brown was carried out at the Mühlbach, canton St. Gallen. The result was similar to the ones obtained at the Iller and other Bavarian rivers: Almost all caged trouts died within a period of two weeks in september, whereas the control group caged in tap water survived. Though, the repetition of the experiment in 2005 didn't show any positive result. The retrospective analysis of tissue samples from 1999 makes it highly probable, that the decease of brown trout in 1999 can be attributed to the same cause as in Bavaria. On the contrary, tissue samples from 2005 don't show this result. Results from brown trout stocking and outfishing by the canton St. Gallen after 2005 lead to the con-

clusion that in the years thereafter there weren't any further brown trout decease incidents as well.

Anlass der Untersuchungen

An Bächen oder kleineren Flüssen im Einzugsgebiet des Schweizer Alpenrheins, die naturräumlich für Bachforellen geeignet wären, wurden Ende der 1990er Jahre keine oder fast keine Bachforellen mehr gefangen. Ausserdem wurden von Fischern dunkel verfärbte, sterbende Bachforellen gesichtet. PKD trat entweder gar nicht auf oder konnte die Verluste in der beobachteten Höhe nicht erklären. Daraufhin wurden in den Jahren 1999 und 2005 an einem Seitengewässer des Alpenrheins, dem Mühlbach im Kanton St. Gallen, Expositionsversuche mit Bachforellen und Regenbogenforellen durchgeführt.

Projektträger

Im Jahr 1999 erfolgten die Untersuchungen im Rahmen des Fischnetz Teilprojekts »Gesundheitszustand der Fische im Rheintal«, die histologische Probenahme wurde durch das Zentrum für Fischerei und Wildtiermedizin (FIWI) in Bern durchgeführt. 2005 kam es zu einer Kooperation zwischen dem Landesamt für Umwelt (Projektleitung Julia Schwaiger), dem Landesfischereiverband Bayern und dem Fischnetz-Nachfolgeprojekt Fischnetz+ (Marion Mertens). Der Versuchsaufbau wurde durch das Amt für Jagd und Fischerei St. Gallen (Roland Riederer) durchgeführt. Die tierärztliche Betreuung, die histopathologische Probenahme sowie die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Michael Gerst, unter Mithilfe von Constanze Römer und Hermann Ferling.



Abb. 1: Versuchsaufbau im Jahr 2005

Versuchsaufbau 1999 und 2005

1999 wurden auf dem Gelände der Abwasserreinigungsanlage Wartau vier Becken aufgestellt. Ein Kontrollbecken wurde mit Trinkwasser gespeist, die anderen drei Becken mit Wasser aus dem Mühlbach. Von diesen drei Becken wurde ein Becken mit vorgeschaltetem Sandfilter betrieben und ein weiteres Becken mit vorgeschaltetem Aktivkohlefilter. Ab Mitte Juni 1999 bis Anfang Dezember wurden in jedem Becken 50 Bachforellen gehältert.

2005 wurde der Versuch mit einem vereinfachten Versuchsaufbau wiederholt: In einem Becken wurden 60 Bachforellen gehältert (Alter 1+, mittleres Gewicht 240 g), in einem weiteren Becken 60 Regenbogenforellen gleichen Alters und gleicher Grösse.

Histopathologische Auswertungen

Die 1999 vom FIWI genommenen Gewebeproben wurden im Rahmen des Versuchs 2005 nochmals hinsichtlich »Schwarzes Forellensyndrom« ausgewertet, wobei hier die in Bayern gemachten Erfahrungen in die Auswertung mit einflossen: Die Gewebeproben wurden bei 400-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop untersucht. 2005 wurden am Schluss des Versuchs abermals Gewebeproben entnommen und ausgewertet. Ausserdem wurden an drei Terminen hämatologische Blutparameter erhoben.

Ergebnisse 1999 und 2005

Die Ergebnisse des Jahres 1999 waren ebenso schlicht wie beeindruckend: Fast alle Bachforellen in den mit

Mühlbachwasser gespeisten Becken starben schwallartig zwischen dem 10. und 24. September 1999. Dagegen überlebten die Bachforellen in dem mit Trinkwasser gefüllten Becken.

Im Jahr 2005 gab es zwar allgemeine Probleme bei der Forellenhälterung durch Befall mit diversen Parasiten, ein Massensterben im Spätsommer konnte jedoch keinesfalls beobachtet werden.

Die histopathologischen Auswertungen von Proben aus dem Jahr 2005 ergaben ebenfalls keinen Befund (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu ergab die nachträgliche Auswertung der Gewebeproben aus dem Jahr 1999 ein für das Bachforellensterben typischen Befund.

Wir gehen daher davon aus, dass das in Bayern beobachtete Bachforellensterben zumindest im Jahr 1999 am Alpenrhein ebenfalls aufgetreten ist. Der erneute Versuch im Jahr 2005 zeigt jedoch, dass dieses Phänomen keinesfalls stetig jedes Jahr auftritt.

Bachforellenbestände nach 2005

Um abschätzen zu können, ob das Bachforellensterben in den Folgejahren wieder auftritt oder nicht, wurden vom Amt für Jagd und Fischerei St. Gallen jedes Jahr im Frühling Bachforellen in den Mühlbach eingesetzt und im Herbst nach der infrage kommenden Zeitspanne eine Kontrollabfischung durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnte in keinem weiteren Jahr eine verdächtig erscheinende Sterblichkeit von Bachforellen beobachtet werden. Es muss jedoch betont werden, dass nur ein Bruchteil der Schweizerischen Gewässer im Alpenrhodental einem systematischen Monitoring unterzogen wird. Sollte das Bachforellensterben an anderen Gewässern abschnittsweise auftreten, wird dies vermutlich unentdeckt bleiben. Die allgemein unbefriedigende Situation der Fischerei im Alpenrhein selbst ist vor allem auf die seit Jahren anhaltende Schwall-Sunk-Problematik zurückzuführen.

Literatur

Michael Gerst, Constanze Römer, Hermann Ferling, Julia Schwaiger (Projektleitung): Studie zum Auftreten des Bachforellensterbens im Mühlbach, Kanton St. Gallen, Schweiz. Abschlussbericht des Bayerischen Landesamtes für Umwelt, Mai 2006, 41 S.

Organ	Befunde	Mühlbach 1999	Mühlbach 2005
Kiemen	epitheliale Hyperplasie	+	+
	dezente Epithelablösung	+	+
	Teleangiektasien	+	–
Niere	interstitielle Aktivierung	+	–
	Hyperämie/Blutung	+	–
	Zellnekrosen	+	+
	Glomerulopathien	+	–
	tubuläre Konglomerate	+	–
	Sphaerospora truttae	+	+
	hyaline Tubulusdegeneration	+	+
Leber	peribiliäre/perivaskuläre Infiltrate	+	+
	Glykogenentspeicherung	+	+
	Leberzellnekrose	+	–
	Blutung	+	–
MDT	Magenwandödem	kein Präparat	–
	Blutung	kein Präparat	–
Milz	lymphozytäre Entspeicherung	kein Präparat	–
Parasiten	Apiosoma	kein Präparat	+
	Trichodina	kein Präparat	+
	Gyrodactylus	kein Präparat	+

Tab. 1: Vergleich histopathologischer Befunde der Untersuchungsjahre 1999 und 2005
(Pathognostische Befunde blau hervorgehoben).

