

Aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin

dem Institut für Mikrobiologie und Tierhygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

und dem Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

**Eignung des indirekten Immuno-Dotblot-Verfahrens
zum Nachweis von *Aeromonas salmonicida* in Forellengewebe**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Banneke
Tierärztin aus Essen

Berlin 1997
Journal-Nr. 2040

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG
DES FACHBEREICHES VETERINÄRMEDIZIN
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Hildebrandt
Zweiter Gutachter:	Univ. -Prof. Dr. W. Körting TiHo Hannover
Tag der Promotion:	25.4.1997

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.	Einleitung 8
2.	Literaturübersicht 10
2.1	<i>Aeromonas salmonicida</i> 10
2.1.1	Klassifizierung 10
2.1.2	Wirtsspektrum 11
2.1.3	Infektionsmodus und Übertragung 12
2.1.4	Virulenzfaktoren und Immunogenität 13
2.2	Erkrankungen durch <i>Aeromonas salmonicida</i> 15
2.2.1	Furunkulose 15
2.2.1.1	Verlaufsformen und Symptome 15
2.2.1.2	Therapie und Vorbeugung 17
2.2.2	Erkrankungen bei anderen Fischarten 18
2.3	Nachweisverfahren 19
2.3.1	Prädilektionsorgane 19
2.3.2	Kulturell-biochemischer Nachweis 19
2.3.3	Molekularbiologische Nachweisverfahren 21
2.3.4	Serologische Nachweisverfahren 21
2.3.5	Immuno-Dotblot 22
2.3.5.1	Methode 22
2.3.5.2	Anwendungsmöglichkeiten des Immuno-Dotblots und Vergleich mit anderen serologischen Verfahren 24
2.3.6	Einfluß von Hintergrundfärbung und Auftragungsvolumen auf Sensibilität und Spezifität des Immuno-Dotblots 26
2.3.6.1.	unspezifische Antikörper-Bindungen 26
2.3.6.2	endogene Peroxidasen 27
2.3.6.3	Gewebepigmente 28
2.3.6.4	Filtrierbarkeit 31
3.	Material und Methoden 32
3.1	Liste der Chemikalien, Geräte und Lösungen 32

3.2	Vorversuche	37
3.2.1	Bakterien	37
3.2.2	Gewebe	38
3.2.3	Immuno-Dotblot	39
3.2.4	Versuche zu allgemeinen Versuchsparametern	41
3.2.4.1	Filterierbarkeit und Färbbarkeit von <i>Aeromonas salmonicida</i>	41
3.2.4.2	Vorläufige Bestimmung der geeigneten Serum- und Konjugat-Konzentrationen	42
3.2.4.3	Unspezifische Reaktionen; Hintergrundfärbung	42
3.2.5	Gewebeaufbereitungsverfahren zur Peroxidase- Blockierung und Pigmentreduzierung	42
3.2.5.1	Erhitzen	43
3.2.5.2	Zentrifugieren	44
3.2.5.3	Trypsin-Zusatz zur Verbesserung der Filterierbarkeit	45
3.2.5.4	Pigmentbleichung und Peroxidaseblockierung durch Kaliumpermanganat / Oxalsäure	47
3.2.5.5	Blockierung der Peroxidase-Aktivität durch SDS	49
3.2.5.6	Pigmentbleichung / Peroxidase-Blockierung durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	50
3.2.5.7	Pigmentbleichung / Peroxidase-Blockierung mit einer Kombination von Permanganat und H ₂ O ₂	51
3.2.5.8	Zusammenwirken von Trypsin, Permanganat und H ₂ O ₂	51
3.2.6	Infektionsversuch I: Unterschiede zwischen in-vivo- und in-vitro-infizierten Geweben; Prüfung der Aufbereitungsverfahren	51
3.2.6.1	Infektionsverlauf, pathologisch-anatomische Befunde und bakteriologische Untersuchung	52
3.2.6.2	Immuno-Dotblot	53
3.2.6.2.1	Muskulatur	53
3.2.6.2.2	Kiemengewebe	54

3.2.6.2.2.1	Prüfung aller Inkubationsschritte auf Veränderung der Hintergrundfarbe	54
3.2.6.2.3	Herzgewebe	56
3.2.6.2.4	Lebergewebe	56
3.2.6.2.5	Nierengewebe	57
3.2.6.2.6	Milzgewebe	58
3.2.6.2.7	Darmgewebe	59
3.2.7	Infektionsversuch II: Unterscheidbarkeit septikämischer Infektionen	59
3.2.7.1	Infektionsverlauf	59
3.2.7.2	Immuno-Dotblot	60
3.2.8	Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität des Immuno-Dotblots	60
3.2.9	Immunfluoreszenz	61
3.2.9.1	Prüfung auf Eigenfluoreszenz und unspezifische Antikörper-Bindung	63
3.2.9.2	Ermittlung einer geeigneten Antiserum- und Konjugat-Konzentration	63
3.2.9.3	Kreuzreaktivität	63
3.3	Hauptversuch	64
3.3.1	Infektion mit <i>Aeromonas salmonicida</i>	64
3.3.2	Infektion mit <i>Yersinia ruckeri</i>	65
3.3.3	Pathologisch/anatomische und bakteriologische Untersuchung	65
3.3.4	Immuno-Dotblot	66
3.3.5	Immunfluoreszenz	67
4.	Ergebnisse	68
4.1	Vorversuche	68
4.1.1	Allgemeine Versuchsparameter	68
4.1.1.1	Filtrierbarkeit und Färbbarkeit von <i>Aeromonas salmonicida</i>	68

4.1.1.2	Vorläufige Bestimmung der geeigneten Serum- und Konjugat-Konzentrationen	69
4.1.1.3	Spezifitätskontrollen; Hintergrundfärbung	69
4.1.1.4	Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse	70
4.1.2	Gewebeaufbereitungsverfahren zur Peroxidaseblockierung und Hintergrundminimierung	71
4.1.2.1	Erhitzen	71
4.1.2.2	Zentrifugieren	72
4.1.2.3	Trypsin-Zusatz zur Verbesserung der Filtrierbarkeit	75
4.1.2.4	Pigmentbleichung / Peroxidaseblockierung durch Permanganat und Oxalsäure	76
4.1.2.5	Blockierung der Peroxidase-Aktivität durch SDS	80
4.1.2.6	Pigmentbleichung / Peroxidaseblockierung durch Wasserstoffperoxid	80
4.1.2.7	Pigmentbleichung / Peroxidaseblockierung durch eine Kombination von Permanganat und Peroxid	81
4.1.2.8	Wirkungen von Trypsin, Permanganat und Peroxid auf Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität	83
4.1.2.9	Zusammenfassung: Wirkung aller Gewebeaufbereitungs- methoden im Vergleich	84
4.1.3	Infektionsversuch I: Unterschiede zwischen in-vivo- und in-vitro-infizierten Geweben; Prüfung der Aufbereitungsverfahren	87
4.1.3.1	Infektionsverlauf, pathologisch-anatomische Befunde und bakteriologische Untersuchung	87
4.1.3.2	Immuno-Dotblot	88
4.1.3.2.1	Muskulatur	88
4.1.3.2.2	Kiemengewebe	89
4.1.3.2.2.1	Prüfung aller Inkubationsschritte auf Veränderung der Hintergrundfarbe	89
4.1.3.2.3	Herzgewebe	90
4.1.3.2.4	Lebergewebe	91

4.1.3.2.5	Nierengewebe	92
4.1.3.2.6	Milzgewebe	94
4.1.3.2.7	Darmgewebe	95
4.1.4	Infektionsversuch II:	
	Unterscheidbarkeit septikämischer Infektionen	96
4.1.4.1	Infektionsverlauf	96
4.1.4.2	Immuno-Dotblot	96
4.1.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse von Infektionsversuch I und II	97
4.1.5	Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität	98
4.1.6	Immunfluoreszenz	99
4.1.6.1	Prüfung auf Eigenfluoreszenz / unspezifische Antikörper-Bindung	99
4.1.6.2	Ermittlung einer geeigneten Antiserum- und Konjugat - Konzentration	100
4.1.6.3	Kreuzreaktivität	101
4.2	Hauptversuch	101
4.2.1	Infektion mit <i>Aeromonas salmonicida</i>	101
4.2.2	Infektion mit <i>Yersinia ruckeri</i>	102
4.2.3	Pathologisch/anatomische und bakteriologische Untersuchung	102
4.2.4	Immuno-Dotblot	102
4.2.4.1	Infektion mit <i>Aeromonas salmonicida</i>	102
4.2.4.2	Infektion mit <i>Yersinia ruckeri</i>	104
4.2.5	Immunfluoreszenz	111
5.	Diskussion	113
6.	Zusammenfassung	127
7.	Summary	129
8.	Literaturverzeichnis	131

Verzeichnis der Abkürzungen

A.	<i>Aeromonas</i>
Abb.	Abbildung
A.dest.	destilliertes Wasser
AEC	Amino-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
AS	Antiserum
BU	bakteriologische Untersuchung
°C	Grad Celsius
CBB	Coomassie-brilliant-blue agar; Coomassie-Brillant-Blau-Agar
CE	Carp erythrodermatitis; Karpfenerythrodermatitis
CoCl ₂	Kobaltchlorid
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
ECP	Extrazellulärprodukte
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FI	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung; Fliehkraft in der Zentrifuge
GARFITC	Goat-anti-rabbit-Fluorescein-Isothiocyanat; Ziege-anti-Kaninchen-Fluorescein-Isothiocyanat
GARPO	Goat-anti-rabbit-Peroxidase; Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ID	Immuno-Dotblot
IFAT	indirekte Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin
kbE	koloniebildende Einheiten
KG	Körpergewicht
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
LPS	Lipopolysaccharide

min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
NaOH	Natronlauge
NC	Nitrozellulose
NS	Normalserum
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
<i>Ps</i>	<i>Pseudomonas</i>
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	Sodium-Dodecylsulphonate; Natrium-Dodecylsulfonat
ssp	subspezies
TBS	Tris buffered saline; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-X	TBS-Triton X-100
TSA	Trypton-Soya-Agar
TTBS	TBS mit Tween 20
w/v	weight per volume; Gewichtsanteile pro Volumen
v/v	volume per volume; Volumenanteile pro Volumen
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>

1. Einleitung

Der Produktion von Fischen zur Ernährung kommt steigende Bedeutung zu, da weniger Energie pro Nahrungseinheit zu ihrer Erzeugung aufgewendet werden muß als bei landwirtschaftlichen Nutztieren (AUSTIN u. ALLEN-AUSTIN 1985). In der Bundesrepublik Deutschland betrug der Wert der Aquakulturproduktion 1992 rund 200 Millionen US-Dollar und rangierte europaweit damit an sechster Stelle hinter Norwegen, Frankreich, Italien, Spanien und Großbritannien (FAO 1994). Die Speisefischerzeugung der Binnenfischerei in Deutschland belief sich 1994 auf 44.500 Tonnen, hiervon waren mehr als 50 % Forellen (LUKOWICZ 1995).

Erkrankungen von lachsartigen Fischen (Salmoniden), zu denen die Forellen gehören, kommt damit in vielen Ländern eine so große wirtschaftliche Bedeutung zu, daß gesetzliche Regulationen für sie vorgesehen sind (EU-Direktive 91/67/EEC; Official Journal of the European Communities No L46/1 - L46/18).

Das Infektionsgeschehen bei Fischen resultiert in erheblich höherem Maße als bei Landtieren aus einer Interaktion zwischen Wirt, Pathogen und Umwelt (NEEDHAM u. RYNES 1992; SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995). Potentiell pathogene Bakterien können in den meisten Gewässertypen gefunden werden, und ihre Mehrzahl ist für einige Zeit zu einem vom Wirt unabhängigen Überleben befähigt. Erkrankungen treten aber in der Regel erst bei erhöhter Empfänglichkeit der Fische durch interne (Smoltifikation, Sexualreife) oder externe Stressoren (plötzliche Veränderungen der Wasserparameter, Handling) auf (BRUNO u. POPPE 1996).

Bakterielle Erkrankungen bei Fischen werden in der Mehrzahl durch Gram-negative Erreger verursacht (BRUNO u. POPPE 1996). Zu den wenigen als spezifisch fischpathogen eingeschätzten Spezies gehört *Aeromonas salmonicida*, der Erreger der Furunkulose (AUSTIN u. AUSTIN 1993a). Durch die bei Nutzsalmontiden in Aquakulturen auftretenden hohen Verluste kommt der Erkrankung weltweit erhebliche wirtschaftliche Bedeutung zu (ROBERTS u. SCHLOTFELDT 1985).

Eine *Aeromonas salmonicida*-Infektion kann nicht allein aufgrund der klinischen

Symptome diagnostiziert werden, da auch andere Erkrankungen durch Gram-negative Bakterien häufig einen septikämischen Verlauf ohne spezifische Merkmale nehmen (BRUNO u. POPPE 1996; SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995).

Die zur Verfügung stehenden Verfahren zur Identifizierung von *Aeromonas salmonicida* sind entweder sehr zeitaufwendig (kulturelle Erregeranzüchtung; BÖHM et al. 1986) oder setzen eine aufwendige technische Ausstattung voraus (Fluoreszenzmikroskop; ELISA-Reader).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob der von BERNOTH (1991) entwickelte, schnell und einfach durchzuführende indirekte Immuno-Dotblot für Kulturantigen auch den Nachweis von *Aeromonas salmonicida* direkt aus Geweben erkrankter Forellen ermöglicht. Ein solches Verfahren würde eine sichere, schnellere, einfache und preiswerte Diagnose erlauben.

Besonderes Augenmerk wurde dabei den Methoden zur Gewebeaufbereitung geschenkt, um die Sensibilität und Spezifität des Verfahrens für die verwendeten Antiseren zu optimieren.

2. Literaturübersicht

2.1 *Aeromonas salmonicida*

2.1.1 Klassifizierung

Aeromonas salmonicida (*A. salmonicida*) gehört zum Genus *Aeromonas* aus der Familie der Vibrionaceae, ist Gram-negativ, unbeweglich und fakultativ anaerob. Die Katalase- und Oxidasereaktionen sind positiv (POPOFF 1984; AUSTIN u. AUSTIN 1993a; BÖHM et al. 1986), es sind allerdings auch Oxidase-negative Stämme beschrieben worden (WIKLUND u. BYLUND 1991). Typische Isolate färben das Kulturmedium durch ein Tyrosin- oder Phenylalanin-abhängiges, wasserlösliches Pigment braun (GRIFFIN et al. 1953).

Die Einteilung von *A. salmonicida* in verschiedene Subtypen ist umstritten.

Die offizielle Klassifizierung durch POPOFF (1984) sieht drei biochemisch unterscheidbare, aus Salmoniden isolierte Subspezies (ssp.) vor:

A. salmonicida ssp. *salmonicida* mit typischen und pigmentbildenden Stämmen, sowie *A. salmonicida* ssp. *achromogenes* und *A. salmonicida* ssp. *masoucida*, beide unpigmentiert. Karpfenisolate fanden hierbei keine Berücksichtigung (BÖHM et al. 1986). Eine vierte, von AUSTIN et al. (1989) vorgeschlagene Unterart, *A. salmonicida* ssp. *smithia*, wurde später zusätzlich aufgenommen (HOLT et al. 1994). Die Charakteristika der vier Subspezies und ihre Differenzierung beschreiben detailliert AUSTIN u. AUSTIN (1993a).

Eine abweichende, dem Wirtsfisch folgende Einteilung schlugen hingegen McCARTHY u. ROBERTS (1980) vor:

A. salmonicida ssp. *salmonicida* für typische Isolate aus Salmoniden,

A. salmonicida ssp. *achromogenes* für alle atypischen, biochemisch abweichenden Salmonidenisolate sowie

A. salmonicida ssp. *nova* für Isolate aus anderen Fischarten.

BELLAND u. TRUST (1988) unterstützten diese Gruppierung aufgrund von DNA:DNA-Hybridisierungsversuchen.

Eine ausführliche Darstellung der Klassifizierungsversuche findet sich bei McCARTHY

u. ROBERTS (1980) sowie bei AUSTIN u. AUSTIN (1993a).

Die langsamer wachsenden und auf komplexere Nährböden angewiesenen atypischen Isolate (AUSTIN 1993; BÖHM et al. 1986) gewinnen zunehmend an Bedeutung im Infektionsgeschehen (GROMAN et al. 1992). WICHARDT et al. (1989) berichteten über einen Rückgang der Infektionen mit typischen *A.salmonicida* in schwedischen Fischfarmen, während atypische und insbesondere unpigmentierte Stämme immer häufiger bei Seesaiblingen und Bachforellen zu Erkrankungen führten (v.a. Dermatitis, Verluste bis 30% je nach Altersklasse). Sie führten dies nicht zuletzt auf unterschiedliche Bekämpfungsmaßnahmen zurück (bei typischen Isolaten Keulung des Bestandes und Desinfektion, bei atypischen meist Antibiotika-Einsatz).

2.1.2 Wirtsspektrum

Nach der Erstisolierung und Beschreibung durch EMMERICH u. WEIBEL (1894) fand *A.salmonicida* große Beachtung. McCARTHY u. ROBERTS (1980) sowie AUSTIN u. AUSTIN (1993a) faßten die frühen Publikationen zusammen.

Für Furunkulose-Erkrankungen empfänglich sind Salmoniden aller Altersklassen, in besonderem Maße Bachforellen (*Salmo trutta fario*), See- und Bachsaiblinge (*Salvelinus alpinus*; *Salvelinus fontinalis*)(SCHLOTTFELDT u. ALDERMAN 1995) und Lachse (*Salmo salar* L., *Oncorhynchus* spp.). Regenbogenforellen (*Onkorhynchus mykiss*) gelten als weniger gefährdet (McCARTHY 1977a; CIPRIANO 1982a), was CIPRIANO u. HEARTWELL (1986) auf genetisch fixierte Unterschiede bei der Bildung eines unspezifisch bakterizid wirkenden Schleimpräzipitins zurückführten, während FREEDMAN (1991) die erhöhte Aktivität eines Serum-Makroglobulins verantwortlich machte.

Seit EVELYN (1971) erstmals *A.salmonicida*-Bakterien aus dem strikt marinen Schwertfisch (*Anoplopoma fimbria*) beschrieb, die sich nicht von lachspathogenen Isolaten unterschieden, sind eine Vielzahl weiterer Süß- und Seewasser-Fischarten als mögliche Wirte von *A.salmonicida* identifiziert worden: verschiedene Karpfenarten (BOOTSMA et al. 1977; BÖHM et al. 1986; AUSTIN 1993), Goldfische (*Carassius auratus*; MAWDESLEY-THOMAS 1969; BÖHM et al. 1986), Aale (*Anguilla* spp; IIDA et al.

1984; NOGA u. BERKHOFF 1990), Steinbutt (*Psetta maxima*; NOUGAYREDE et al. 1990) und Flundern (*Platichthys flesus*, WIKLUND u. BYGLUND 1991).

Auch die aus symptomlos infizierten Fischen weiterer Spezies isolierten *A.salmonicida* erwiesen sich zum Teil als hochgradig virulent für Salmoniden und führten zur Entwicklung typischer Krankheitsbilder; eine Überträgerrolle dieser Fische konnte demnach nicht ausgeschlossen werden (WIKLUND 1990; WHITTINGTON u. CULLIS 1988; WILLUMSEN 1990; BERNOTH u. KÖRTING 1992). HJELTNES et al. (1995) stellten bei einer Untersuchung über die Empfänglichkeit und Übertragungshäufigkeit von *A.salmonicida*-Infektionen bei Kabeljau (*Gadus morhua*), Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*) und Lippfischarten (*Labridae*) fest, daß eine *A.salmonicida*-Übertragung von Lachsen auf diese Arten möglich ist und zu Erkrankungen führen kann. Sie beschrieben dies aber als ein eher seltenes Ereignis, dem eine nur geringe Bedeutung bei der Übertragung der Furunkulose unter natürlichen Umständen zukäme. TREASURER u. LAIDLER (1994) beobachteten während eines natürlichen Furunkulose-Ausbruches bei Lachsen eine durch *A.salmonicida* verursachte Sterblichkeit bei Lippfischen, konnten bei Kohabitationsversuchen aber keine Infektionsübertragung nachweisen.

2.1.3 Infektionsmodus und Übertragung

Die Diskussion darüber, ob *A.salmonicida* sich über längere Zeit auch außerhalb von Fischen in der Umwelt behaupten kann, ist noch nicht abgeschlossen. Während einige Autoren *A.salmonicida* als obligat pathogenes Bakterium bezeichneten, das außerhalb seines Wirtes nur kurze Zeit überlebt (ROSE et al. 1990; NESE u. ENGER 1993), beschrieben MICHEL u. DUBOIS-DARNAUDPEYS (1980) eine lange Persistenz bei voller Virulenz. Eine zusammenfassende Darstellung älterer Untersuchungen und eigener grundlegender Arbeiten zu diesem Thema veröffentlichte McCARTHY (1977a).

Als Hauptübertragungsweg für *A.salmonicida* gilt zumeist eine horizontale Infektion über das Wasser, in dem ROSE et al. (1989b) einen sehr hohen Keimgehalt bei akuten Infektionen durch die starke Streuung aus erkrankten Fischen feststellten (10^5 bis 10^8 koloniebildende Einheiten (kbE) pro Fisch und Stunde). Die Eintrittspforte der Bakterien in den Fisch ist jedoch umstritten. Während HODGKINSON et al. (1987) und EFFENDI u.

AUSTIN (1995) die Aufnahme über intakte Haut und Kiemen als wahrscheinlichste Infektionsroute beschrieben, konnten SAKAI (1979) und CIPRIANO (1982a) Mortalitäten nur nach Verletzungen der Haut nachweisen.

Es besteht auch die Möglichkeit einer oralen Infektion (SAKAI 1979) durch Aufnahme stark belasteten Gewebes toter Fische (ROSE et al. 1989b) oder im Wasser kontaminierter Futterpartikel (ENGER et al. 1992). ROBERTS (1989) postulierte Darmläsionen als ersten Manifestationsort von Furunkulose-Infektionen. Daneben erwogen NESE u. ENGER (1993) eine Übertragung durch Fischläuse und Plankton. Eine vertikale Transmission von *A.salmonicida* wird derzeit ausgeschlossen (BULLOCK u. STUCKEY 1987).

2.1.4 Virulenzfaktoren und Immunogenität

Für *A.salmonicida* sind eine Vielzahl von Virulenzfaktoren beschrieben worden, deren Bedeutung für das Infektionsgeschehen noch nicht abschließend geklärt ist (ELLIS et al. 1988).

Wohl am besten untersucht wurde das sogenannte A-Protein. Es ist auf der gesamten Bakterienoberfläche tetragonal gruppiert, etwa 50 Kilodalton schwer und mit der äußeren Zellmembran über die O-Ketten der Lipopolysaccharide (LPS) verbunden (BELLAND u. TRUST 1987). EVENBERG et al. (1985) beschrieben ein Modell der Zelloberfläche von *A.salmonicida*.

Die A-Proteine aller bislang untersuchten typischen und atypischen Stämme sind antigene-tisch eng verwandt (EVENBERG et al. 1985). Die genetische Grundlage des Proteins (vapA-Gen) findet sich bei allen Wildtyp-Isolaten und Teile davon sind hochgradig konserviert (BELLAND u. TRUST 1987). NOONAN u. TRUST (1995) faßten die genetischen Expressions- und Regulationsmechanismen des A-Proteins und seiner Sekretion zusammen. Eine Kultivierung bei höheren Temperaturen (30 °C) kann durch Deletion im Gen zum Verlust der Proteinexpression führen (BELLAND u. TRUST 1987). Ebenso verhalten sich die Transkriptionsrate und die Stabilität der mRNA temperaturabhängig (Optimum bei 15 °C; CHU et al. 1993).

Den Zusammenhang zwischen A-Protein, Autoagglutination und Virulenz der Bakterien beschrieben erstmals UDEY u. FRYER (1978). Das A-Protein bindet Wirtseiweiße auf der

Bakterienoberfläche und blockiert so die Immunantwort des Wirtes (Maskierung von immunogenen Epitopen und Adhäsion an Makrophagen zur intrazellulären Infektion) (BEVERIDGE 1994; OLIVIER et al. 1986). Daneben spielt das A-Protein wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Anheftung von *A.salmonicida* an Wirtszellen (TRUST et al. 1983), der Erhöhung der Eisenverfügbarkeit im Wirt (KAY et al. 1985) sowie der Lysisvermeidung durch Komplement (MUNN et al. 1982) und Makrophagen (SAKAI u. KIMURA 1985). Sein Vorhandensein führt zu einer erhöhten Hydrophobizität und Autoaggregation der Zellen (CIPRIANO u. BERTOLINI 1988) und lässt sich bei Anzucht auf Coomassie-Brilliant-Blue-Agar durch die dunkelblaue Koloniefarbe leicht nachweisen (MARKWARDT et al. 1989).

Im Hinblick auf die Bedeutung des A-Proteins als Virulenzfaktor stellten ISHIGURO et al. (1981) bei Isolaten nach erhöhter Inkubationstemperatur einen simultanen Verlust von A-Protein und Virulenz fest. CIPRIANO u. BERTOLINI (1988) fanden bei virulenten und avirulenten Isolaten keinen Unterschied im LPS- oder Proteinstilb außer dem Vorhandensein des A-Proteins. Allerdings sind auch A-Protein-positive, avirulente Isolate beschrieben worden (OLIVIER 1990), ebenso wie A-Protein-negative, virulente Stämme (BERNTH 1990a).

Ebenso wenig ist die Rolle des A-Proteins bei der Immunisierung von Fischen abschließend geklärt. McCARTHY et al. (1983) wiesen in ihrer Studie die grundlegende Bedeutung des A-Proteins für die Immunogenität von *A.salmonicida*-Impfstoffen nach. Bakterinen (abgetötete ganze Zellen) von A-negativen Isolaten führten zwar zu hohen Agglutinationstitern im Serum von Kaninchen und Fischen, wahrscheinlich zurückzuführen auf das enthaltene LPS, erzeugten jedoch weder passiven noch aktiven Schutz. OLIVIER et al. (1985) betonten ebenfalls die Notwendigkeit von A-Protein für eine Vakzine-Wirksamkeit.

CIPRIANO (1982b) hingegen konnte eine gleichstarke passive Immunisierung bei Übertragung von Antiseren gegen A-Protein-positive wie -negative Isolate erreichen.

THORNTON et al. (1994) erzielten erfolgreiche Immunisierungen mit Lebendvakzinen von A-Protein-negativen Mutanten und beschrieben die Möglichkeit von noch nicht näher bekannten, nur *in-vivo* exprimierten Antigenen, die für einen Impfschutz entscheidend sein

könnten. In der Untersuchung von THUVANDER et al. (1993) sicherte ein hoher Antikörpertiter gegen A-Protein nicht das individuelle Überleben des jeweiligen Fisches.

Bei einer Vielzahl von Isolaten sind auch die LPS-Moleküle an der Bakterienoberfläche als strukturell ähnlich und immunologisch kreuzreagierend beschrieben worden (CHART et al. 1984). Den derzeitigen Erkenntnisstand über die genetischen Grundlagen und Zusammenhänge von A-Protein und LPS sowie die Aussichten auf erfolgversprechende Vakzinen geben TRUST et al. (1996) wieder.

Eine weitere oberflächenassoziierte Komponente als möglichen Virulenzfaktor und Vakzinekandidaten sahen HIRST u. ELLIS (1994) in Eisen-regulierten Proteinen (IROMPs) von *A.salmonicida*. Die exakte Rolle anderer Virulenzfaktoren (Hämolyse, Proteasen, Glycero-Phospholipid-Cholesterol-Acyltransferase GCAT) ist zur Zeit noch unklar (NOONAN u. TRUST 1995). Verschiedene Extrazellulärprodukte (ECP) und ihre Einsetzbarkeit für Vakzinen beschrieben ELLIS (1991) und ELLIS et al. (1992).

2.2 Erkrankungen durch *Aeromonas salmonicida*

2.2.1 Furunkulose

2.2.1.1 Verlaufsformen und Symptome

Als Furunkulose wird meist die durch typische und atypische Isolate von *A.salmonicida* hervorgerufene Erkrankung von Salmoniden bezeichnet. Die Geschichte und Ausbreitung von *A.salmonicida* bei Salmoniden beschrieben McCARTHY u. ROBERTS (1980) sowie AUSTIN u. AUSTIN (1993a). Eine ausführliche Darstellung der klinischen, pathologischen und histologischen Veränderungen, die bei einer Furunkulose-Infektion auftreten können, findet sich bei McCARTHY u. ROBERTS (1980) und FRERICHS u. ROBERTS (1989). Die Mortalitätsrate erreicht bei Fingerlingen 50%, sonst 30% (SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995).

Die Furunkulose der Salmoniden tritt in verschiedenen Verlaufsformen auf, die von der Pathogenität des infizierenden Stammes, dem Alter der Fische sowie von Umweltfaktoren abhängen (FRERICHS u. ROBERTS 1989).

Die perakute Form, die vor allem bei Fingerlingen vorkommt und mit meist hohen Verlusten einhergeht, bleibt nahezu symptomlos, es zeigen sich lediglich die für eine perakute Septikämie typischen pathologischen Veränderungen (McCARTHY u. ROBERTS 1980).

Auch beim akuten Verlauf können äußerliche Anzeichen einer Infektion fehlen (BRUNO u. POPPE 1996). Häufig werden jedoch die Symptome einer akuten bakteriellen Septikämie beobachtet (Dunkelfärbung, Lethargie, Rötung der Flossenbasis; Hämorrhagien der Viszera, Aufhellung des Lebergewebes, Milzschwellung, Erweichung der Niere)(BRUNO u. POPPE 1996). Der Tod tritt typischerweise innerhalb von zwei bis drei Tagen ein (McCarthy u. ROBERTS 1980). Die akute Erkrankung stellt die häufigste Form bei wachsenden und adulten Fischen dar (AUSTIN u. AUSTIN 1993a).

Weder die perakute noch die akute Verlaufsform lassen sich klinisch oder histopathologisch von Septikämien durch andere Gram-negative Erreger unterscheiden (FRERICHS u. ROBERTS 1989).

Die namensgebenden Furunkel, nekrotisch ulzerierende Veränderungen der Haut und Muskulatur (McCARTHY u. ROBERTS 1980), finden sich manchmal bei der akuten Form, überwiegend aber bei der subakuten oder chronischen Erkrankung älterer Fische (FRERICHS u. ROBERTS 1989). Sie sind jedoch kein diagnostisches Charakteristikum (BRUNO u. POPPE 1996). Alle beobachteten Veränderungen bei der subakuten Verlaufsform stellten FERGUSON u. McCARTHY (1978) umfassend dar.

Über die klinischen Symptome einer Infektion bei Frischwasser-Lachsen berichtete SHEPPARD (1992), die Histopathologie beschrieb BRUNO (1986).

Eine weitere Form der *A.salmonicida*-Infektionen stellt die streßinduzierbare oder asymptotische Furunkulose dar (O'GRADY u. SMITH 1992). Dabei gelten die betroffenen, latent infizierten Fische (Carrier) als eine wichtige Übertragungs- und Ausbreitungsmöglichkeit für den Erreger (McCARTHY 1977a; McCARTHY u. ROBERTS 1980).

Eine manifeste Erkrankung kann bei Carriern durch die Einwirkung von Stressoren wie erhöhter Wassertemperatur zum Ausbruch kommen (SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995). Diesen Umstand macht sich ein Nachweisverfahren zunutze, bei dem infektionsverdächtige Fische nach Injektion mit immunsuppressiven Kortikoiden einer erhöhten Wassertemperatur ausgesetzt werden. Befinden sich Carrier in der Versuchsgruppe, kommt es bei ihnen meist zu einer akuten Erkrankung, die einen erfolgreichen kulturellen Erreger-nachweis ermöglicht (BULLOCK u. STUCKEY 1975; McCARTHY 1977a).

2.2.1.2 Therapie und Vorbeugung

Aufgrund des multifaktoriellen Krankheitsgeschehens beim Fisch besitzt die Haltungsoptimierung sowohl bei Behandlung wie Prävention eine besondere Bedeutung (NEEDHAM u. RYNES 1992). Insbesondere die Minimierung von Streßfaktoren kann Morbiditäts- und Mortalitätsraten reduzieren (McCARTHY u. ROBERTS 1980; SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995) und unter Umständen die Verluste soweit senken, daß ohne eine Behandlung wirtschaftlich gearbeitet werden kann (MITCHELL 1992).

In den vergangenen Jahrzehnten fand eine Vielzahl inhibitorischer Substanzen zur Kontrolle von *A.salmonicida*-Infektionen erfolgreich Anwendung (AUSTIN u. AUSTIN 1993a). Allerdings traten in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen auf (SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995), die auch innerhalb einer Haltungsguppe von Fischen variierten, so daß mehrere Isolate auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit untersucht werden sollten (OLIVIER 1992; SUTHERLANDS u. INGLIS 1992).

Zur Zeit sind in der Bundesrepublik Deutschland für die Anwendung bei Nutzfischen lediglich drei Trimethoprim-Sulfadoxin-Kombinationen sowie ein Kombinationsmittel für Kiemenerkrankungen (enthält Chlortetrazyklin) zugelassen (Stand 30.1.1996; Arzneimittelabteilung des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin).

Bei Carriern ließ sich dagegen der latente Infektionsstatus durch eine Antibiotika-Behandlung nicht beseitigen (McCARTHY 1977a). Es wurden aber Möglichkeiten einer

Badbehandlung mit Quinolonen (O'GRADY u. SMITH 1992) oder konkurrierenden, inhibitorisch wirkenden *Pseudomonas fluoreszenz*-Stämmen diskutiert (SMITH u. DAVEY 1993).

Den ersten Vakzinierungsversuchen von DUFF (1942) folgten zahlreiche Bemühungen, feldtaugliche Impfstoffe gegen *A.salmonicida* zu entwickeln (RODGERS u. AUSTIN 1985; HASTINGS 1988; AUSTIN u. AUSTIN 1993a). Bisher fanden meist abgetötete ganze Bakterien als Impfstoffe Verwendung, bei denen eine unsachgemäße Herstellung allerdings zu einer virulenten Infektion führen kann (OLIVIER 1992). Nach Feldversuchen (SCHLOTFELDT et al. 1989) wurde auch in Deutschland eine Vakzine aus abgetöteten Zellen zur Tauchbad-Immunsierung von Salmoniden und Karpfenartigen zugelassen und empfohlen (SCHLOTFELDT 1991), zur Zeit nach ernüchternden Erfahrungen jedoch nicht mehr angewendet (M. MOOS, Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Langen; persönliche Mitteilung 1996).

CIPRIANO (1982b) betonte, daß eine protektive Wirkung nicht durch zelluläre Antigene, sondern nur durch Extrazellulärprodukte zu erreichen sei.

Andere Autoren beschrieben die Möglichkeit, attenuierte Lebendimpfstoffe zu verwenden (THORNTON et al. 1992; McINTOSH u. AUSTIN 1993; THORNTON et al. 1994), wobei jedoch die Gefahr einer Rückmutation (THORNTON et al. 1992) oder Virulenzergangung durch Plasmidübertragung besteht (NOONAN u. TRUST 1995).

Weitere Verfahren zur Verbesserung des Immunstatus stellen Immunostimulantien (NIKL et al. 1992) oder die prophylaktische und therapeutische Verabreichung von Hyperimmunsereen dar (TURGEON u. ELAZHARY 1992).

2.2.2 Erkrankungen bei anderen Fischarten

Bei Nicht-Salmoniden ruft *A.salmonicida* meist Veränderungen der Haut und Flossen hervor mit gelegentlicher Verbreitung in innere Organe (Steinbutt, NOUGAYREDE et al. 1990; Hechte, WIKLUND 1990; japanische und amerikanische Aale, IIDA et al. 1984; NOGA u. BERKHOFF 1990; Cypriniden, AUSTIN 1993).

Ein fest umschriebenes Krankheitsbild besteht bei Karpfen in Form der Karpfen-

erythrodermatitis (CE)(BOOTSMA et al. 1977), die durch Ulzerationen an der Körperseite gekennzeichnet ist. Diese Ulzera heilen entweder ab oder führen durch eine systemische Infektion zum Tod des Tieres (McCARTHY u. ROBERTS 1980).

Daneben tritt bei Cypriniden, insbesondere beim Goldfisch, eine als Ulcer Disease bezeichnete Erkrankung auf (MAWDESLEY-THOMAS 1969; SHOTTS et al. 1980), für die tiefere und ausgedehntere Ulzera und früher eintretende Veränderungen der inneren Organe als bei der CE charakteristisch sind (McCARTHY u. ROBERTS 1980).

2.3 Nachweisverfahren

2.3.1 Prädilektionsorgane

Hauptnachweisorgan für *A.salmonicida* bei manifest erkrankten Fischen ist neben Hautveränderungen die Niere (McCARTHY u. ROBERTS 1980; BÖHM et al. 1986; FRERICHS u. ROBERTS 1989; AUSTIN u. AUSTIN 1993a). DALY u. STEVENSON (1985) betonten jedoch die Notwendigkeit, weitere innere Organe (Herz, Leber, Milz) bakteriologisch zu untersuchen, da nach ihren Ergebnissen 45% der Fische nur in einem dieser Gewebe, nicht aber in der Niere positive Befunde aufwiesen.

Andere Autoren beschrieben die Darmschleimhaut als erfolgreiches Nachweisorgan für latent infizierte Fische (MARKWARDT et al. 1989; ROSE et al. 1989a; HINEY et al. 1994). Daneben wurde Kiemengewebe als einer der ersten Manifestationsorte genannt (BRUNO 1986; BRUNO et al. 1986; BENEDIKTSDOTTIR u. HELGASON 1990). Die Untersuchung von Schleimproben bietet die Möglichkeit einer nichtinvasiven Diagnose (CIPRIANO et al. 1992; TESKA u. CIPRIANO 1993; HINEY et al. 1994; CIPRIANO et al. 1996).

2.3.2 Kulturell-biochemischer Nachweis

Typische *A.salmonicida*-Stämme wachsen in der Regel leicht auf nichtselektiven Standardnährmedien (Trypton-Soya-Agar TSA; Brain-Heart-Infusion-Agar BHIA)(AUSTIN u. AUSTIN 1993a). BERNOTH u. ARTZ (1989) beschrieben aber Isolate, die zunächst nicht auf einem TSA-Medium angezüchtet werden konnten.

Bei 20°C zeigen sich nach zwei Tagen kleine, runde, erhabene, durchscheinende, gelblich-weiße Kolonien (FRERICHS u. ROBERTS 1989) mit einem dunkelbraun pigmentierten Hof.

Allerdings sezernieren auch einige andere *Aeromonas*-Spezies ein solches Pigment, und bei *A.salmonicida* kann die Pigmentierung verzögert oder durch Begleitkeime unterdrückt sein (McCARTHY u. ROBERTS 1980). Auf Coomassie-Brilliant-Blue-Agar (CBB) bilden Isolate mit einem A-layer (A-Protein plus LPS) dunkelblaue Kolonien, wodurch sich das Medium nach MARKWARDT et al. (1989) und BERNOTH (1990a) zum Screening von bakteriellen Isolaten eignet. TESKA u. CIPRIANO (1993) wiesen allerdings auf die nichtselektive Natur des Nährbodens hin und beschrieben eine Vielzahl von Bakterien, die aufgrund ihres Oberflächenproteins ebenfalls blaue Kolonien auf CBB bilden.

Atypische Isolate wachsen besser oder ausschließlich auf hämhaltigen Nährmedien (BÖHM et al. 1986; ISHIGURO et al. 1986) und entwickeln sichtbare Kolonien erst nach längerer Inkubationszeit (AUSTIN 1993).

Die kulturelle Erregerisolierung wird bis heute als Diagnosemethode bevorzugt, da sie gleichzeitig eine Resistenzuntersuchung der Isolate gestattet (SCHLOTTFELDT u. ALDERMAN 1995; BÖHM et al. 1986). Das Fehlen eines Selektivmediums für *A.salmonicida* stellt allerdings eine Schwierigkeit dar (HIRVELÄ-KOSKI et al. 1988), da das Bakterium in gemischten Kulturen sehr schnell von der Begleitflora überwachsen (MORGAN et al. 1993) und die Pigmentproduktion als Charakterisierungsmerkmal z.T. unterdrückt wird (McCARTHY 1977a). Zudem dauert ein kultureller Nachweis schon bei den schneller wachsenden typischen Isolaten aufgrund der notwendigen biochemischen Identifizierung sechs bis zehn Tage (BÖHM et al. 1986). Die im Verhältnis zu anderen Methoden geringere Sensitivität (BÖHM et al. 1986) erlaubt darüber hinaus keine Diagnose von Carriern (McCARTHY 1977a). DALY u. STEVENSON (1985) empfahlen eine Voranreicherung der Bakterien durch Inkubation von Nierengewebe in Nährlösung, wodurch sich bei Carrierfischen die Nachweisrate verdoppelte. HIRVELÄ-KOSKI et al. (1988) wiesen allerdings auf die dadurch bedingte Verlängerung des Nachweises und die erhöhte Gefahr eines Überwachsens mit Kontaminanten hin.

2.3.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Vielversprechende Ansätze für einen molekularbiologischen Nachweis insbesondere bei niedrigen Keimzahlen von *A.salmonicida* bieten die Entwicklung einer spezifischen DNA-Sonde (HINEY et al. 1992) sowie verschiedener Primer-Sequenzen aus dem A-Proteingenen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (GUSTAFSON et al. 1992). HØIE et al. (1996) benutzten die PCR zum Nachweis von Antigen in Nieren- und Milzgeweben von vakzinierten Forellen.

2.3.4 Serologische Nachweisverfahren

Mit Ausnahme der von KLONTZ u. ANDERSON (1968) publizierten Befunde ist *A.salmonicida* als serologisch homogen beschrieben worden. Unterschiedliche Serovaren konnten trotz weit auseinander liegender Isolationsorte nicht festgestellt werden (McCARTHY u. RAWLE 1975; Übersicht bei McCARTHY u. ROBERTS 1980; BERNOTH u. BÖHM 1988; BERNOTH et al. 1993). Dadurch bieten sich serologische Verfahren zum Nachweis von *A.salmonicida* an. Sie sind meist schneller abzuschließen als kulturelle Nachweise und haben häufig den Vorteil einer höheren Sensitivität.

Die Verlässlichkeit der jeweiligen Methode hängt jedoch weitgehend von der Spezifität des verwendeten Antikörpers ab. Standardisierte Antiseren oder monoklonale Antikörper sind ebenso wie kommerzielle Diagnostikkits nur gegen wenige fischpathogene Bakterien erhältlich. SCHILL et al. (1989) geben eine umfassende Darstellung der Geschichte, Anwendung und Probleme serologischer Verfahren zur Diagnose von Fischkrankheiten, insbesondere von *A.salmonicida*.

In den siebziger Jahren wurde eine Reihe von serologischen Verfahren entwickelt, die erstmals auch den Nachweis autoagglutinierender *A.salmonicida*-Isolate, z.T. direkt aus Fischgeweben, erlaubten (Latexagglutination: McCARTHY 1975 und McCARTHY 1977b; Hämagglutinationstest: McCARTHY u. RAWLE 1975; Tusche-Immunfärbung: McCARTHY u. WHITEHEAD 1977).

Die direkte oder indirekte Immunfluoreszenz-Technik (IFAT) stellt die am häufigsten beim Fisch angewendete serologische Methode dar (SCHILL et al. 1989) und wird für

A. salmonicida empfohlen (SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995). Sie kann den Erreger direkt im Gewebe nachweisen und erlaubt eine morphologische Beurteilung der Bakterien (ANDERSON 1990). Die IFAT ist schnell durchzuführen und weist eine zweifach (FUHRMANN 1983; BÖHM et al. 1986) oder dreifach (WIEDEMANN 1981) höhere Empfindlichkeit auf als die kulturelle Erregerisolierung. GRIFFITHS et al. (1991) gaben an, daß bei Verwendung von Gewebehomogenaten eine höhere Nachweisrate zu erzielen sei als bei Abklatschpräparaten.

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) hingegen ermöglicht eine quantitative Auswertung und kann hochgradig automatisiert werden, so daß sich innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Befunde erheben lassen. SMITH (1981) paßte die Methode für den Direktnachweis von *A. salmonicida* in Nierengewebe an und erreichte bei hoher Spezifität eine hundertfach höhere Empfindlichkeit als mit der Latexagglutination. AUSTIN et al. (1986) entwickelten einen Schnelltest mit einem monoklonalen Antikörper, der aber keinen Eingang in die Praxis fand (AUSTIN u. AUSTIN 1993a). STANISLAWSKI (1989), ROSE et al. (1989a) sowie ADAMS u. THOMPSON (1990) stellten hochsensitive Modifikationen des Verfahrens vor.

BERNOTH (1990b) benutzte den ELISA zur Identifizierung von Kulturantigenen. Die Diagnose konnte durch Wegfall der biochemischen Identifizierung beschleunigt werden, gleichzeitig bestand aber auch die Möglichkeit zur Durchführung einer Resistenzprüfung. HINEY et al. (1994) testeten schließlich einen kommerziellen ELISA-Kit zur Untersuchung von Carrierfischen, der dem kulturellen Erregernachweis überlegen war.

2.3.5 Immuno-Dotblot

2.3.5.1 Methode

SCHILL et al. (1989) beschrieben den Immuno-Dotblot als den einfachsten Festphasen-Immunoassay. Dabei wird das zu bestimmende Antigen an Nitrozellulose-Membranen (NC) gebunden (HAWKES et al. 1982), die neben einer großen Oberfläche (BLOCK 1988) den Vorteil einer sehr hohen Protein-Bindungskapazität besitzen (McALLISTER u. SCHILL 1986).

Noch freie Bindungsstellen der NC müssen danach mit einem inerten Protein besetzt werden, um eine spätere unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern (AMBROSIUS u. LUPPA 1987b). Die besten Resultate erzielten McALLISTER u. SCHILL (1986) mit einer dreiprozentigen Gelatinelösung.

Bei dem durch einen Multiplikationseffekt empfindlicheren indirekten Verfahren (AMBROSIUS u. LUPPA 1987a) wird die Membran anschließend mit dem ersten, antigenspezifischen Antikörper inkubiert, meist für eine Stunde (BLOCK 1988). Durch Zusatz eines zweiten Antikörpers, der gegen das IgG der Tierart des ersten Antikörpers gerichtet ist, entsteht ein Immunkomplex. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, dessen Substratumsetzung die immunologische Färbung abschließt. Zumeist findet Meerrettich-Peroxidase Verwendung (AMBROSIUS u. LUPPA 1987b), deren Hämatinanteil an Wasserstoffperoxid bindet und zu seiner Zerlegung in Wasser und Sauerstoff führt (NAISH et al. 1989).

Eine andere Möglichkeit der Darstellung des Immunkomplexes besteht im Zusatz eines löslichen Peroxidase-Antiperoxidase-Komplexes (PAP) als drittem Schritt (AMBROSIUS u. LUPPA 1987b). Bei vergleichbarer Sensitivität ist dieses Verfahren allerdings langwieriger und komplizierter als die indirekte Methode (SAKAI et al. 1987) und weist eine geringere Spezifität auf (HEYDERMAN 1979).

Die Anwesenheit des Immunkomplexes an der Bindungsstelle wird durch die Peroxidase-katalysierte Umsetzung eines Substrates, des Chromogens, sichtbar gemacht. Es fungiert als Elektronendonator, der mit Peroxidase zunächst einen Enzym-Substrat-Komplex bildet, oxidiert wird und dadurch die kontinuierliche Wasserstoffperoxid-Umsetzung ermöglicht (NAISH et al. 1989). Diaminobenzidin (DAB; 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), eingeführt von GRAHAM u. KARNOVSKY (1966), ist das meistverwendete Chromogen für Peroxidase (ROMEIS 1989; S. 253). Es bildet ein in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlösliches braunes Endprodukt, dessen Farbintensität aufgrund seiner Polymerisation durch den Zusatz von Metallsalzen verstärkt werden kann (z.B. Kobaltchlorid, blau in seiner entstehenden wasserfreien Form; SCHRÖTER et al. 1969) (LEWIS et al. 1983; ROMEIS 1989; S. 253).

Weitere mögliche Substrate sind 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; GRAHAM et al. 1965), das allerdings im Gegensatz zu DAB verblaßt, sowie 4-Chloronaphthol, das zum Abdif-

fundieren von der Präzipitationsstelle neigt (NAISH et al. 1989).

Die Farbintensität an der Reaktionsstelle entspricht der vorhandenen Antigenmenge, so daß auch bei der Ablesung mit bloßem Auge eine semiquantitative Auswertung möglich ist (BERNOTH et al. 1993). Mit Hilfe eines Densitometers lassen sich quantitative Bestimmungen durchführen (HAWKES et al. 1982; HSU et al. 1989; SZALAI et al. 1994).

Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wird die Membran gewaschen, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. Dabei bewirken Tris-gepufferte Lösungen eine bessere Hintergrundreduzierung als andere Puffer. Der Zusatz von Tween 20 kann hier, ebenso wie bei der Blockierlösung, unspezifische Wechselwirkungen unterdrücken helfen (BATTEIGER et al. 1982).

Mit Hilfe eines Mikrofiltrationsgerätes läßt sich die Auftragungsmenge erheblich vergrößern [von 1 µl wie bei Cipriano et al. (1985) auf mehrere hundert Mikroliter pro Feld wie bei BERNOTH et al. (1993)], da NC aufgrund ihrer Porenstruktur als Filter wirkt (BLOCK 1988). Gleichzeitig können mehr Proben auf einer Membran mit größerer Exaktheit aufgetragen werden, wodurch auch höhere Probenzahlen rationell und kostensparend zu untersuchen sind (VEERMAN et al. 1990; TAMPLIN et al. 1991).

Darüber hinaus erlaubt der indirekte Immuno-Dotblot höhere Antiserumverdünnungen als andere Methoden (AINSWORTH et al. 1986; VEERMAN et al. 1990), womit meist eine größere Spezifität des Nachweises einhergeht.

2.3.5.2 Anwendungsmöglichkeiten des Immuno-Dotblots und Vergleich mit anderen serologischen Verfahren

HAWKES et al. (1982), die das Immuno-Dotblot-Verfahren zum Antikörper-Screening von Seren entwickelten, sahen im Vergleich zum ELISA als besonderen Vorteil die geringe Antigen-Mindestmenge und die bessere Ablesbarkeit aufgrund des weißen Hintergrundes an. Da an NC-Membranen eine Vielzahl von Substanzen hafteten (lösliche Proteine, Nukleinsäuren, Membranen, verschiedene Organellen, Pilze, Protozoen, Bakte-

rien, Viren), sagten sie eine breite Anwendbarkeit der Methode voraus.

CIPRIANO et al. (1985) verwendeten einen kommerziellen Immuno-Dotblot-Assay zum Nachweis von *Vibrio anguillarum*-Antigen aus Kulturen und betonten die Einfachheit und die niedrigen Kosten im Vergleich zu einem ELISA. Der von ihnen beschriebene Test war einhundertmal empfindlicher als die IFAT und der kulturelle Nachweis. SAKAI et al. (1986) verglichen die Empfindlichkeit eines PAP-Immuno-Dotblots mit IFAT und Agglutinationsmethoden zum Nachweis von *A. salmonicida*. Dabei war die PAP geringfügig empfindlicher als die IFAT und den beiden Agglutinationen deutlich überlegen, leider verzichteten die Autoren aber auf eine ausführliche Darstellung ihrer Verfahrensweise.

GUPTA et al. (1990) beschrieben einen modifizierten Immuno-Dotblot zum Nachweis eines Virusantikörpers in Schafen, der empfindlicher, schneller und einfacher zu handhaben war als der ebenfalls untersuchte ELISA.

SONG et al. (1992) verglichen die Sensitivität eines indirekten oder Avidin-Biotin-Peroxidase-abhängigen Immuno-Dotblots mit dem jeweiligen ELISA. Dabei erwiesen sich beide Immuno-Dotblots als jeweils um eine Zehnerpotenz empfindlicher. Unter Berücksichtigung von Sensibilität, Reproduzierbarkeit, Zahl der benötigten Schritte, Hintergrundfärbung, Ablesbarkeit, Zeit- und technischem Aufwand befanden sie das indirekte Verfahren als optimal zum Nachweis von *Vibrio*-Antigen.

BERNOTH (1991) entwickelte ein Protokoll für einen indirekten Immuno-Dotblot zur schnellen Identifizierung von *A. salmonicida*-Zellen in Kultur. Dabei stellte sich heraus, daß zur vollständigen Blockierung freier Bindungsstellen auf der NC-Membran eine Übernacht-Inkubation in Gelatinelösung notwendig war. Das von ihr benutzte Outer-membrane-Protein-Antiserum wies in umfangreichen Tests mit nur wenigen Isolaten anderer Bakterienarten eine geringe Kreuzreaktivität auf. BERNOTH et al. (1993) benutzten das gleiche Verfahren zum Nachweis von *A. salmonicida* und *Yersinia ruckeri* aus Wasserproben mit Mischkulturen.

NESE u. ENGER (1993) verwendeten NC-Membranen ebenfalls zur Identifizierung von *A. salmonicida*-Kulturantigen.

Weiterhin wurde ein Immuno-Dotblot eingesetzt zum Nachweis von *Mycobacterium bovis* (VEERMAN et al. 1990) und ruminanten Mycobakterien (POUMARAT et al. 1991), *Vibrio cholerae* (NISHIKAWA et al. 1990) und *Vibrio vulnificus* aus Umweltproben (TAMPLIN et al. 1991), verschiedenen fischpathogenen Viren (McALLISTER u. SCHILL 1986; HSU et al. 1989; ROSS et al. 1991; RISTOW et al. 1991; NADALA et al. 1992) sowie Antikörpern gegen *A.salmonicida* im Fischschleim (CIPRIANO 1986).

2.3.6 Einfluß von Hintergrundfärbung und Auftragungsvolumen auf Sensitivität und Spezifität des Immuno-Dotblots

Neben der Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität der jeweils verwendeten Antikörper hängt die Nachweisrate eines serologischen Verfahrens vom maximal applizierbaren Volumen pro Untersuchungseinheit ab (Feld in der IFAT, Plattenvertiefung im ELISA, Membran-spot im Immuno-Dotblot). Daneben beeinflussen die Ablesbarkeit einer positiven Reaktion und die Sicherheit bei der Unterscheidung von negativen Proben die Anwendbarkeit eines Testsystems.

2.3.6.1 unspezifische Antikörper-Bindungen

Eines der häufigsten Probleme serologischer Antigennachweise aus Geweben besteht in einer Hintergrundfärbung (NAISH et al. 1989), die die Ablesung einer positiven Reaktion erschwert. Diese Hintergrundfärbung kann unter anderem als unerwünschtes Nebenprodukt der immunologischen Komplexbildung durch Adsorption der Antikörper an das Trägermedium entstehen, was sich durch exzessives Blockieren freier Bindungsstellen verhindern läßt (BERNOTH 1991), oder durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Gewebekomponenten und Antikörpern. Das Mitführen von Gewebekontrollen, die kein oder ein indifferentes Antigen enthalten, und die Verwendung eines unspezifischen Kontrollserums geben Auskunft über das Vorliegen einer solchen Wechselwirkung (AMBROSIUS u. LUPPA 1987a; AMBROSIUS u. LUPPA 1987b), die durch Absättigung der Gewebekomplexbindungsstellen mit inertem Protein und Inkubation mit Detergenzien oder modifizierten Puffern beseitigt werden kann (NAISH et al. 1989; ROMEIS 1989, S. 261).

2.3.6.2 endogene Peroxidasen

Gewebeigene Enzyme und Moleküle, die die gleiche Reaktion katalysieren wie das zur Markierung des Immunkomplexes benutzte Enzym, tragen ebenfalls zur Hintergrundfarbe bei.

Meerrettich-Peroxidase als Konjugatenzym wird häufig benutzt, da es aufgrund seiner geringen Größe kein Bindungshemmnis für den Antikörper darstellt, stabil und preiswert ist (BOURNE 1983). Eine Vielzahl von Geweben enthält jedoch Enzyme mit Peroxidase-Aktivität (rote und weiße Blutzellen, Peroxisomen der Leber, Katalasen in Leber und Niere u.a.; HEYDERMAN 1979; AMBROSIUS u. LUPPA 1987b; NAISH et al. 1989) oder Moleküle, die aufgrund einer Hämgruppe eine als pseudoperoxidatisch bezeichnete Aktivität besitzen (Hämoglobin, Myoglobin, Zytochrome; ROMEIS 1989; S. 420).

Alle diese Substanzen weisen eine im weiteren als Peroxidase-Aktivität bezeichnete Fähigkeit zur Umsetzung des Chromogens auf, die sich von einer positiven Reaktion durch Anwesenheit des Immunkomplexes höchstens anhand der Reaktionsstärke und mithin der Farbintensität unterscheiden läßt.

Da schwache positive Reaktionen hierdurch schlecht abzulesen sind, steigt entweder die Gefahr falsch positiver Befunde, oder die Nachweisgrenze des Testes muß heraufgesetzt werden. Die Inkubation von Gewebeproben nur mit der Chromogenlösung gibt durch eine Umwandlung in das Reaktionsprodukt (bei DAB kombiniert mit Kobaltchlorid resultiert eine blaue Färbung) Aufschluß über den Gehalt an endogener Peroxidase-Aktivität (AMBROSIUS u. LUPPA 1987c).

Eine Blockierung dieser endogenen Peroxidase-Aktivität erscheint daher sinnvoll.

Bei den meisten ELISA-Verfahren und Immuno-Dotblots erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms durch Zerkleinern der Gewebeproben und Erhitzen auf 100°C (CIPRIANO et al. 1985; HSU et al. 1989; SAKAI et al. 1989). Dabei besteht jedoch die Gefahr einer sterischen Veränderung auch des Zielantigens durch die hohe Temperatur, so daß es vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Gleichzeitig können Epitope anderer Antigene nach entsprechender Konfigurationsänderung in verstärktem Maße mit dem spezifischen Antikörper reagieren (AMBROSIUS u. LUPPA 1987d) und so die Kreuzreaktivität erhöhen.

SONG et al. (1992) verwendeten SDS (Natrium-Dodecylsulfonat) zur Peroxidase-Blockierung, das gleichzeitig durch zelluläre Desintegration die Freisetzung von Antigen erhöhte.

Auch die Verwendung eines anderen Konjugatenzymes, der selten eingesetzten Phosphatase, löst das Problem nicht. Zwar benutzte DIXON (1987) in einem Phosphatase-konjugierten ELISA unbehandeltes Gewebe, ROSS et al. (1991) gelang es jedoch wegen der starken Hintergrundfärbung nicht, in einem Phosphatase-abhängigen Immuno-Dotblot Virusantigen direkt aus Nierengewebe oder Ovarialflüssigkeit von Fischen nachzuweisen. Endogene alkalische Phosphatase kommt in Knochen-, Nieren-, Leber- und Darmgewebe vor (NAISH et al. 1989).

In der Immunhistochemie werden Immunoperoxidase-Verfahren wegen einiger Nachteile der Immunfluoreszenz (rasches Ausbleichen der Fluoreszenz, fotografische Dokumentation notwendig, begrenzte Auflösung des Mikroskopes) häufig angewendet (LEWIS et al. 1983). Aus diesem Grund wurden chemische Möglichkeiten der Peroxidase-Inaktivierung in Gewebeschnitten beschrieben. Peroxidase kann in Abwesenheit eines Elektronendonors (Chromogen) durch einen Überschuß an Wasserstoffperoxid (reversibel) gehemmt werden (NAISH et al. 1989). Darauf beruht die Wirkung einer kurzzeitigen Inkubation von Gewebeschnitten in 3% Wasserstoffperoxid (ROMEIS 1989, S. 253; NAISH et al. 1989) oder Mischungen aus Methanol und Wasserstoffperoxid (STREEFKERK 1972). Auch Zyanide und Azide hemmen reversibel die Peroxidase-Aktivität (NAISH et al. 1989). Bei aggressiven Substanzen besteht jedoch auch hier die Gefahr von Antigenveränderungen und die Notwendigkeit geeigneter Kontrollen (AMBROSIUS u. LUPPA 1987b).

2.3.6.3 Gewebepigmente

Wegen des nichtselektiven Bindungscharakters binden sich bei Immuno-Dotblot-Verfahren auch Organpigmente an die NC-Membranen (HAWKES et al. 1982). Dies sind zum einen Blutfarbstoffe, den größeren Einfluß haben aber gewebeeigene Pigmente.

Fast alle der von AGIUS (1980) untersuchten Knochenfische wiesen pigmenthaltige Zellen (Melanomakrophagen) in den hämatopoetischen Geweben auf. Bei niederen Knochenfischen befinden sich diese Zellen bevorzugt im Lebergewebe, bei höheren sind

Milz und Niere in aller Regel stärker pigmentiert. Daneben finden sich Melanomakrophagen im Peritoneum und im Herzatrium. In allen höheren Fischen tritt eine Organisation dieser Zellen zu Aggregaten auf, lediglich bei Salmoniden erfolgt eine zufällige Verteilung im Gewebe.

Die Melanomakrophagen können drei verschiedene Pigmente enthalten: Lipofuszin, Melanin und Hämosiderin (AGIUS u. AGBEDE 1984). Eine zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse zu diesem Thema geben AGIUS (1985) und WOLKE (1992).

Danach stellt das gelbbraune Lipofuszin das häufigste Pigment dar. Es entsteht als Oxidationsprodukt mehrfach ungesättigter Lipide und reichert sich durch Alter, Nahrungsungleichgewichte (Vitamin-E-Mangel) und Impfungen an. Bei niedrigen Haltungstemperaturen steigt der Gehalt ungesättigter Fettsäuren in den Geweben und damit auch der Lipofuszingehalt (AGIUS 1985).

Das gelbbraune Hämosiderin wird im Rahmen des Erythrozytenabbaus als Eisenspeicherform gebildet (AGIUS 1979). Da es ausschließlich in Melanomakrophagen der Milz vorkommt, postulierte AGIUS (1979) funktionale Unterschiede zwischen diesen Zellen in Milz, Niere und Leber trotz gleicher Morphologie. Hämosiderin findet sich bei gesunden Regenbogenforellen auch in Milzgewebe nur in geringen Mengen, tritt aber mit zunehmendem Alter der Fische, bei Hungerzuständen sowie hämolytischen Erkrankungen verstärkt auf.

Melanin ist ein braunschwarzes Polymer aus dem Thyrosinabbau in Hautmelanozyten, Melanophoren und Melanomakrophagen. Seine Funktion in den hämatopoetischen Geweben bedarf noch der vollständigen Klärung. Melanin neutralisiert freie Radikale und Kationenaktivitäten, die mit oxidativen Bedingungen assoziiert sind, wodurch sich zum Teil die Akkumulation von melaninhaltigen Zellen bei Infektionen (chronische Entzündungen) und Verletzungen erklären lässt (BRUNO u. POPPE 1996, S.22).

Melanin spielt auch eine wichtige Rolle bei der nichtspezifischen Immunabwehr im Rahmen der Wasserstoffperoxid-Produktion (respiratory burst)(SECOMBES u. FLETCHER 1992). Fragmentation von Melanomakrophagen-Zellen im hämatopoetischen Gewebe gilt als eines der ersten Anzeichen einer endotoxischen Septikämie (FRERICHS

u. ROBERTS 1989). THORPE u. ROBERTS (1972) beobachteten bei Infektionen mit Aeromonaden eine weitgehende Zerstörung der interstitiellen Nieren-Melanomakrophagen.

Wie bei den anderen Pigmenten nimmt der Melaningehalt der Zellen mit dem Alter der Fische und insbesondere bei Hungerzuständen zu (AGIUS u. AGBEDE 1984).

Bei einigen Fischarten enthalten die Melanomakrophagen hauptsächlich Lipofuszin, bei anderen überwiegend Melanin; einige weisen Mischformen mit beiden Pigmenten auf. Bei den untersuchten Salmoniden (Bach- und Regenbogenforellen und atlantischer Lachs) wird für die Niere eine starke, die Milz eine mittlere und das Lebergewebe eine geringgradige Melaninpigmentierung beschrieben (AGIUS 1980). In der Untersuchung von AGIUS u. AGBEDE (1984) enthielt bei fünf untersuchten Fischarten lediglich das Nierengewebe von Regenbogenforellen mehr Melanin als Lipofuszin, gespeichert in hautzellähnlichen, ausschließlich melaninhaltigen Melanozyten.

Bei der Mehrzahl der Enzym-Immunoassays werden pigmenthaltige Gewebebestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (CIPRIANO et al. 1985; HSU et al. 1989; SAKAI et al. 1989). Der Zusatz eines Detergens kann dabei die Antigenmenge im Überstand erhöhen (GUDMUNDSDOTTIR et al. 1993).

In der Immunhistochemie finden Oxidationsmittel Verwendung, die Melanin und Lipofuszin zu bleichen vermögen; Hämosiderin ist nicht oxidierbar (ROMEIS 1989; S. 398). Wasserstoffperoxid wird in drei- bis fünfprozentiger Lösung als zuverlässig wirksames Bleichmittel beschrieben (ROMEIS 1989, S.398; NAISH et al. 1989). JANSSON et al. (1991) stellten jedoch fest, daß eine mindestens sechzehnstündige Inkubation notwendig war, um mikroskopisch Melanin und das ebenfalls braune Chromogen-Reaktionsprodukt unterscheiden zu können. Sie beobachteten dabei aber keine Hemmung der Immunreaktion.

BRUNO (1987) benutzte für die Darstellung eines Gram-positiven, intrazellulären Bakteriums Kaliumpermanganat und Oxalsäure zur Melaninbleichung. Durch Inkubation in 0.25- bzw. 1%igen Lösungen ließ sich der Schnitt innerhalb von sechs Minuten entfärben.

Das Redoxpotential von Kaliumpermanganat (KMnO_4) hängt stark vom pH-Wert ab. In

sauren Lösungen wird es zum farblosen Manganion reduziert, bei pH-Werten über 7 erfolgt eine Umsetzung nur bis zur Stufe des Mangandioxids, dem Braunstein.

Braunstein ist wasserunlöslich und die einzige stabile Verbindung des Mangans in den Oxidationsstufen +3 und +4 (JANDER u. SPANAU 1973). Es wirkt immer noch stark oxidativ (CHRISTEN 1976), so daß Oxalsäure $[(\text{COOH})_2]$ in einem autokatalytischen Prozess bei niedrigem pH umgesetzt wird und Manganionen entstehen (HENNING et al. 1976).

2.3.6.4 Filtrierbarkeit

Durch die Membranporen der NC kann Antigen mittels Filtration größerer Probenvolumina konzentriert werden (BERNOTH et al. 1993; NISHIKAWA et al. 1990; TAMPLIN et al. 1991). Um diesen Effekt auch bei Gewebeproben zu ermöglichen und einer frühzeitigen Membranblockierung durch Eiweiße (McALLISTER u. SCHILL 1986) entgegenzuwirken, untersuchte LEE (1989) die Wirkung von proteolytischen Enzymen auf Nierengewebe. Einprozentige Trypsinlösung, wie sie auch von ELLIOTT u. BARILA (1987) für Coelomflüssigkeit benutzt worden war, erwies sich dabei einer Protease-Anwendung als überlegen.

Eine weitere Möglichkeit stellt Zentrifugieren dar, das durch die Abtrennung von Gewebekomponenten außer einer Hintergrundreduzierung auch eine bessere Filtrierbarkeit von Organhomogenaten bewirken soll.

3. Material und Methoden

3.1 Liste der Chemikalien, Geräte und Lösungen

A. Anzucht der Bakterien

1. Schafblutagar

Pepton	10.0 g
Fleischextrakt	10.0 g
NaCl	5.0 g
A.dest.	ad 1000.0 ml
Agar	12.0 g
defibriertes Schafsblut	70.0 ml

2. Furunkulose-Bouillon nach FUHRMANN (1983)

Bacto-Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
L-Tyrosin	1.0 g
NaCl	2.5 g
dest. Wasser	ad 1000.0 ml

3. Furunkulose-Agar

Furunkulose-Bouillon	1000.0 ml
Agar	15.0 g

4. TSA-Coomassie-Agar

Trypton-Soya-Agar (Oxoid # CM 131),
angereichert mit 0.1 mg/ml Coomassie Brillant Blau (Merck # 12553)

B. Immuno-Dotblot

1. PBS (Phosphate buffered saline) pH 7.4

NaCl (Merck)	8.00 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Merck)	2.90 g
KCL (Merck)	0.20 g
A.dest.	ad 1000.0 ml

2. TBS (Tris buffered saline) pH 7.5

Tris (Merck)	4.84 g
NaCl	58.84 g
A. dest.	ad 1500.0 ml

ad us.: mit 1 N Salzsäure (HCl) den pH einstellen, mit A.dest auf 2000 ml auf füllen

3. Waschlösung

Tween 20 (Merck)	1.0 ml
TBS	ad 1000.0 ml

4. Blockierlösung

Tween 20	5.0 ml
Gelatine (Merck)	30.0 g
TBS	ad 1000.0 ml

5. Antikörperlösung

Tween 20	1.0 ml
Gelatine	10.0 g
TBS	ad 1000.0 ml

6. Goat-anti-rabbit-IgG (H+L)-Peroxidase (GARPO)

(Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande)

7. Chromogenlösung

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat 97%	75.0 mg
(BioRad Laboratories Richmond, USA #170-6535)	
CoCl ₂ -Lösung (1% w/v in A.dest.)	3.0 ml
PBS	ad 150.0 ml

ad us.: jeweils frisch ansetzen, 10 min bei 0°C in der Dunkelheit lösen lassen

H₂O₂ 30%ig (Merck) 45.0 µl

8. AEC-Chromogenlösung

AEC 20.0 mg

(3-Amino-9-Ethylcarbazol; Sigma Immuno Chemicals # A-6926)

Dimethylformamid (Sigma Immunochemicals #D-4254) 2.5 ml

50 mM Acetatpuffer, pH 5.0 unter Rühren 47.5 ml

H₂O₂ unmittelbar vor Gebrauch 25.0 µl

C. Gewebeaufbereitung

1. Trypsinlösung

Trypsin 100.0 mg

(1:250; Difco Laboratories, Detroit, USA #0152-13-1)

PBS ad 1.0 ml

2. Kaliumpermanganat-Lösung

KMnO₄ (Merck) 0.1 g

PBS ad 100.0 ml

3. Oxalsäure-Lösung

(COOH)₂(Merck) 1.0 g

PBS ad 100.0 ml

4. Wasserstoffperoxid-Lösung

H₂O₂ 30%ig 3.0 ml

Blockierlösung ad 100.0 ml

D. Immunfluoreszenz

1. PBS (Phosphate buffered saline)

s. u. Immuno-Dotblot

2. TBS (Tris buffered saline)

s. u. Immuno-Dotblot

3. TBS-X pH 7.6

Triton X-100 1.0 ml

(Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg; # 37240)

TBS ad 1000.0 ml

4. Holzleimlösung

Ponal (Henkel, Düsseldorf) 0.5 g

A.dest. ad 100.0 ml

auflösen bei 60°C

5. Ziege-Normalserum

Normal Goat Serum 15.0 µl

(ABC-Elite Testkitt Vectastain; Camon Labor Service, Wiesbaden, #S-1000)

TBS ad 1.0 ml

6. Aceton (Merck)

auf 4°C temperiert verwenden

7. Goat-Anti-Rabbit-Fluorescein-Isothiocyanat (GARFITC)

Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

8. Evans Blue

Evans Blue counterstain 0.1 ml

(Sigma Chemie, Deisenhofen; # E 0133)

A.dest. ad 100.0 ml

9. Eindecklösung

Glycerol (LKB, Bromma, Schweden) 90.0 ml

PBS 10.0 ml

DABCO 2.5 g

(1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-Octan -Triethylendiamin;

Sigma Chemie, Deisenhofen; # D 2522)

ad us.: bei 50°C unter Rühren lösen, pH einstellen auf 9.0 mit 1N NaOH

E. Ausrüstungen

Anzucht der Bakterien

1. Zentrifuge: Du Pont de Nemours (Deutschland) GmbH; Typ RC 5C
2. Photometer: Eppendorf 1101 M; Filter 578 nm

Immuno-Dotblot

1. Nitrozellulose-Membran (BioRad Laboratories # 170-6545)
2. Bio-Dot Microfiltration Apparatus (BioRad Laboratories; Richmond, USA)
3. Vakuumpumpe
4. Schüttelpult (Uni-Jogger, Fa. Guwina-Hoffmann GmbH, 221 Di)
5. Inkubator (37°C)

Gewebeaufbereitung

Ultraturrax (Fa. Jahnke u. Kunkel, IKA-Werke; Typ TP 18/10; Stäbe N10, N18)

Immunfluoreszenz

1. Diagnostica Objektträger mit hydrophober Teflonbeschichtung
(Fa. J. Schmid, Berlin; # 190000322; Mattrandobjektträger mit 10
Kammern à 6 mm Durchmesser)
2. Färbeküvetten und Färbeschlitten für Objektträger
3. Feuchte Kammer (Edelstahlwanne mit Deckel)
4. Inkubator (37°C)
5. ORTHOLUX-Mikroskop mit PLOEPAK 2.2 Fluoreszenz-Auflicht-Illuminator
(Leitz, Wetzlar)
6. Immersionsöl nach DIN (Merck; # 15577)

3.2 Vorversuche

3.2.1 Bakterien

Folgende Bakterien wurden verwendet:

Aeromonas salmonicida ssp. *salmonicida* (*A.salmonicida*)-Stämme

ATCC 14174 (Nr. 15): nicht autoagglutinierend, A-Protein-negativ; in den Vorversuchen verwendet, soweit nicht anders erwähnt, wegen der besseren Korrelation zwischen optischer Dichte und Keimgehalt in wäßrigen Lösungen

(Institut National de la Recherche Agronomique, Lab. d'Ichtyopathologie, France)

216/83: Isolat aus Bachforellen; autoagglutinierend, A-Protein-positiv

(Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BgVV; Abt. für Fischkrankheiten, Berlin)

449-T (Nr. 21): A-Protein-positiv

(Inst. f. Mikrobiologie und Tierseuchen der tierärztlichen Hochschule, Hannover)

MT 085 (NCMB 1102)(Nr.52): A-Protein-negativ

(DAFS Marine Laboratory, Aberdeen, UK)

MT 423 (Nr. 53): A-Protein-positiv (DAFS, UK)

Die Anzüchtung der Bakterien erfolgte auf Furunkulose-Agarplatten mittels Inkubation bei 15°C für 72h, die Aufbewahrung bei 4°C mit regelmäßiger Subkultivierung.

Zur Herstellung einer Gebrauchssuspension wurde Koloniematerial von Furunkulose-Platten mittels einer Öse abgenommen, in PBS suspendiert und im Photometer durch weitere PBS-Zugabe auf eine optische Dichte von 0.1 OD bei 578 nm gegen PBS eingestellt, entsprechend einer Keimdichte von etwa 1×10^8 kbE/ml. Der gewünschte Keimgehalt der aufzutragenden Suspensionen wurde durch weitere PBS-Verdünnung oder Zugabe einer entsprechenden Menge der Bakteriensuspension zu den Gewebemazeraten eingestellt. Die Gewinnung höherer Keimdichten für Infektionsversuche ist in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

Die Kreuzreaktivitätsprüfung des Anti-*A.salmonicida*-Serums erfolgte exemplarisch mit *Aeromonas hydrophila* (*A.hydrophila*):

44/88 (Isolat aus Bachforellen; BgVV)

30/91 (Isolat aus Regenbogenforellen; BgVV)

Pseudomonas fluoreszenz (*Ps.fluoreszenz*):

19/88 (Isolat aus Schleien; BgVV)

Cytophaga sp:

31/88 (Isolat aus Orfe; BgVV)

Yersinia ruckeri (*Y.ruckeri*):

65/87 (Landesfischereianstalt NRW, Kirchhundem)

Die Bakterien wurden nach 48 h Inkubation bei 25°C auf Schafblut- bzw. Cytophagen-Agar auf 0.1 OD in PBS eingestellt, anschließend wurde die exakte Zellzahl durch eine Keimzählung im Oberflächenverfahren bestimmt (Ausspateln einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf je zwei Platten pro Verdünnung; Inkubation für 48h bei 20°C; Auszählung von Platten mit 30 bis 300 Kolonien und Mittelwertbildung).

Acinetobacter sp., *Micrococcus* sp., Cytophagaceae, *Bacillus* sp. (Kiemenbakterien): Mischkultur nach Abstrich von gesundem Kiemengewebe der Kontrollfische (Spezieszuordnung nach Prüfung der biochemischen Eigenschaften); Anzucht auf Furunkulose-Agar 48 h bei 25°C, Abschwemmen mit PBS, Subkultur von 100 µl-Aliquoten durch Ausspateln; die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.2 Gewebe

Die Gewebe für die Vorversuche sowie Positiv- und Negativkontrollen in den Infektionsversuchen stammten von gesunden Bachforellen (*Salmo trutta* v. *fario*), aus instituts-eigener Haltung im Wasser-Durchflußsystem, mit einem Körpergewicht zwischen 180g und 450g. Die Tiere wurden nach Betäubung durch Genickschnitt getötet. Teile der

Rückenmuskulatur, Milz, Leber, Herz, Darm und Niere wurden steril entnommen, gewogen und einzeln bei -70°C in sterilen Plastikröhrchen eingefroren. Die Kiemenbögen einer Seite wurden vollständig herausgetrennt, die Lamellen vom Knorpelgewebe abgeschnitten und ebenfalls gewogen und eingefroren.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Proben mit Hilfe eines rotierenden Messers (Ultraturrax) zwei Minuten zerkleinert und gleichzeitig durch Zugabe von sterilem PBS 1:5 w/v verdünnt. Die Messerstäbe wurden nach jeder Probe gründlich mit sterilem PBS gespült und mit Ethanol abgeflammt. Kiemengewebe wurde anschließend bei Raumtemperatur 30 min stehengelassen, damit sich die unzerkleinerten Lamellenbestandteile absetzen. Vier Fünftel des Gesamtvolumens wurden dann von der Oberfläche abpipettiert und ebenso wie die anderen Mazerate portionsweise wieder eingefroren.

Die Gebrauchssuspensionen wurden nach dem Auftauen der Proben durch Zugabe von PBS (in jedem Versuch mitgeführte Negativkontrolle) oder einer PBS-Bakterienmischung (Positivkontrolle) auf die gewünschte Verdünnung eingestellt.

3.2.3 Immuno-Dotblot (ID)

Geräteaufbau, Membranbeschickung und die anschließende immunologische Färbung entsprechen dem von BERNOTH (1991) beschriebenen Protokoll:

1. Nitrozellulose (NC)-Membranen wurden in PBS 10 min eingeweicht und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Das Einlegen in die Mikrofiltrationseinheit und der Gerätezusammenbau erfolgten nach Maßgabe des Herstellers. Anschließend wurden 100 μl PBS in alle 96 Vertiefungen (wells) der Apparatur gefüllt und unter Vakuum filtriert.
2. Je nach Versuchsansatz wurden alle wells oder nur ein Teil mit Probenmaterial so befüllt, daß Membranspots einer Probe sowohl in Antiserum als auch in Normalserum inkubiert werden konnten (100 - 500 μl /well). Nicht benützte wells wurden mit PBS beschickt. Es wurde unter vollem Vakuum filtriert, bis keine Flüssigkeiten mehr auf der Membran erkennbar waren. Nicht filtrierbare Teilmengen wurden mittels einer Eppendorf-Pipette entfernt. Die Membran wurde dem Gerät entnommen und 30 min bei RT getrocknet.

Sollten mehrere Membranen benutzt werden, wurde das Gerät nach jeder Benutzung mit einem Oberflächen-Desinfektionsmittel eingesprüht (70% Ethanol)

und nach 15 min in destilliertem Wasser gespült.

3. Zur Blockierung noch freier Bindungsstellen wurden die Membranen über Nacht in einer Gelatine-Lösung mit Tween20 (Blockierlösung) bei RT aufbewahrt.
4. Die Membranen wurden dreimal in TTBS (je 100 ml pro Membran) auf einem Shaker gewaschen. Anschließend wurden sie beschriftet und dem Versuchsansatz entsprechend in Streifen geschnitten, um in den verschiedenen Seren inkubiert zu werden.
5. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in TTBS mit Gelatine (Antikörperlösung) für 60 min bei RT.

Verwendet wurden folgende Kaninchenserum:

- *A.salmonicida*-Antiserum (AS): Outer-membrane-Protein-AS gegen ein virulentes, A-Protein-positives *A.salmonicida*-Isolat (BERNOTH 1991)
- *Y.ruckeri*-AS: Ganzzell-Antiserum gegen *Yersinai ruckeri*-Isolat 65/87 (BERNOTH et al. 1993)
- Normalserum (NS) von nicht immunisierten Tieren

6. Die Membranen wurden erneut gewaschen (s. 4.)
7. Es schloß sich die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase; GARPO) für 60 min bei RT an.
8. Nochmaliges Waschen (s. 4.)
9. Die Membranen wurden in der Chromogenlösung für 5 min bei RT bewegt (positive Reaktion = Farbumschlag zu blau); die Reaktion wurde durch Waschen in PBS für 10 min gestoppt.
10. Die Membranen wurden vor und nach der Trocknung mit bloßem Auge ausgewertet. Verglichen wurde die Farbintensität der AS-Reaktion mit der im Normalserum. Die Reaktion wurde als negativ (--; gleiche Farbe und Intensität in AS und NS), schwach positiv ((+), zarte Blau- oder Dunklerfärbung im AS, nur bei feuchten Membranen oder im Durchlicht zu erkennen), positiv (+, stabile Blaufärbung, im AS intensiver als im NS), stark (++) oder sehr stark positiv (+++) beurteilt, wenn der Unterschied zwischen Antiserum und Normalserum größer war als der bei der Negativkontrolle.
11. Die Membranen wurden mit farblosen Klebestreifen auf weißem Papier befestigt und in Klarsichthüllen im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.4 Versuche zu allgemeinen Versuchsparametern

3.2.4.1 Filtrierbarkeit und Färbbarkeit von *A.salmonicida*

Feststellung der geeigneten Porengröße

Es wurden NC-Membranen mit 0.2 und 0.45 µm Porengröße verglichen hinsichtlich der Filtrierbarkeit von *A.salmonicida*-Suspensionen und Gewebehomogenaten.

Zerkleinerte Proben von Herz-, Leber-, Milz- und Muskelgewebe wurde mit *A.salmonicida* versetzt (Keimgehalt 10^7 kbE/ml), mit PBS weiterverdünnt (1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 w/v Gesamtverdünnung) und bei 500 x g 20 min zentrifugiert. Je 200 µl der Überstände wurden in mehrere wells gefüllt und das filtrierbare Volumen für die beiden Membrantypen verglichen.

Mehrfachauftragungen

In jeweils zwei Vertiefungen des Apparates wurden fünfmal nacheinander je 200 µl einer Bakteriensuspension mit einem Keimgehalt von 10^4 bis 10^7 kbE/ml gefüllt und filtriert. Verglichen wurden die Filtrierbarkeit sowie die Farbintensität dieser Spots mit denen von 200 µl Bakterien plus viermal 200 µl TBS.

Feststellung der Filtrationsgrenze

A.salmonicida-Suspensionen mit einem Keimgehalt von etwa 1×10^8 kbE/ml wurden in Schritten von 100 µl solange aufgetragen und filtriert, bis sich keine Flüssigkeit mehr absaugen ließ. Die überstehende Suspension wurde abpipettiert und das filtrierte Volumen berechnet.

Einfluß der Auftragsmenge im Verhältnis zur Verdünnungsstufe auf die Färbbarkeit

Verglichen wurden Filtrierbarkeit sowie Farbintensität und Randschärfe der Spots von 20 µl eines 1:20 und 200 µl eines 1:200 verdünnten Leber-*A.salmonicida*-Homogenates.

Einfluß der Probenposition auf die Filtrierbarkeit

Eine Muskulatur-Bakterien-Suspension wurde mehrfach in alle 96 wells des Filtrationsgerätes gefüllt und bis zum Erreichen der Filtrationsgrenze abgesaugt. Das maximal

erzielbare Volumen in den einzelnen wells und die Zeitdauer des Absaugens wurden bestimmt.

3.2.4.2 Vorläufige Bestimmung der geeigneten Serum- und Konjugat-Konzentrationen

Die Feststellung erfolgte durch dreimalige Schachbrett-Titration mit Antiserum-/Normalserum- und Konjugatkonzentrationen von 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000, 1:30000 und 1:40000. Die Membran war mit 1×10^6 kbE/well *A.salmonicida* beschickt.

Anschließend wurde die Nachweisgrenze bei Verdünnungen von 1:10000, 1:20000 und 1:40000 bestimmt durch Auftragung einer logarithmisch verdünnten *A.salmonicida*-Suspension (Keimgehalte 1×10^6 kbE/well bis 1×10^3 kbE/well).

3.2.4.3 Unspezifische Reaktionen; Hintergrundfärbung

Von Gewebemazeraten aller Organe, mit und ohne *A.salmonicida*-Zusatz (1×10^6 kbE/ml) wurden 100 μ l/well filtriert. Eine Membran wurde vollständig immunologisch gefärbt, die zweite mit TTBS anstelle des ersten Antikörpers, die dritte mit TTBS anstelle des Konjugates (Feststellung unspezifischer Antikörper-Adhäsion an Geweben) und die vierte nur mit der Chromogenlösung (Feststellung der endogenen Peroxidase-Aktivität) inkubiert. Ermittelt wurden Farbe und Intensität der Spots sowie Erkennbarkeit einer positiven Reaktion im Antiserum. Eine ungefärbte, nur in Blockierlösung eingelegte Membran gab Aufschluß über die pigmentbedingte Hintergrundfärbung der Spots.

3.2.5 Gewebeaufbereitungsverfahren zur Peroxidaseblockierung und Pigmentreduzierung

Der Vergleich der verschiedenen, für immunologische Nachweise beschriebenen Verfahren sollte nicht nur die Effektivität der jeweiligen Methode, sondern auch ihre Auswirkungen auf Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität des Testes erhellen.

3.2.5.1 Erhitzen

Ein Erhitzen der Proben soll durch eine Konformationsänderung aller peroxidatisch aktiven Gewebemoleküle zu einer irreversiblen Blockierung der unspezifischen Reaktion führen.

Einfluß auf die Färbbarkeit von *A.salmonicida*

Verglichen wurde die Färbbarkeit von reinen Bakteriensuspensionen sowie von mit *A.salmonicida* versetztem Muskelgewebe nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Keimsuspension von *A.salmonicida* und das *in-vitro* infizierte Gewebe wurde auf jeweils 10^7 kbE/ml eingestellt (s. 3.2.1).

Aliquote wurden bei 6°C, 22°C (Raumtemperatur, RT), 40°C, 50°C, 60°C, 80°C und 100°C je 20 min inkubiert. Alle Proben wurden 1:10 und 1:100 mit PBS weiterverdünnt und hiervon je 100 µl/well filtriert.

In weiteren Versuchen wurde die *A.salmonicida*-Ausgangssuspension in acht Stufen jeweils 1:2 verdünnt und Aliquote mit Muskulatur versetzt (Keimgehalt 1×10^7 - 1×10^5 kbE/ml). Als Kontrolle diente nicht infiziertes Gewebe. Alle Suspensionen wurden wie oben erhitzt, die Muskelproben anschließend bei 130 x g 20 min zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Sämtliche Suspensionen wurden 1:10 verdünnt, anschließend je 100 µl/well filtriert.

Einfluß auf die Kreuzreaktivität

Die unter 3.2.1 beschriebenen Bakterien, die in der Untersuchung von BERNOTH (1991) mit dem auch hier verwendeten *A.salmonicida*-Antiserum reagiert hatten, wurden in diesen Tests verwendet [*A.hydrophila* (2 Isolate), *Ps.fluoreszenz*, *Cytophagaceae*, *Y.ruckeri*, Kiemenbakterien]. Untersucht wurden reine Bakteriensuspensionen und Muskulatur-Bakterien-Mischungen. Der Keimgehalt verdoppelte sich jeweils in 8 Schritten.

Die Proben wurden entweder bei Raumtemperatur inkubiert oder 30 min auf 100°C erhitzt. Muskelgewebe wurde bei 130 x g zentrifugiert und 1:10 weiterverdünnt. Das Auftragungsvolumen betrug jeweils 100 µl/well.

Als Positivkontrolle wurde *A.salmonicida*, als Negativkontrolle reines Gewebe mitgeführt. Um mögliche Effekte durch das Zentrifugieren zu erkennen, wurde in einem Versuch Muskel- und Lebergewebe mit *A.salmonicida* oder *A.hydrophila* CH 143/91 versetzt. Nach

Zugabe von Trypsin (1% w/v, 30 min 35°C; s. 3.2.5.3) wurden die Proben anschließend bei RT oder 100°C inkubiert, wie oben beschrieben verdünnt und aufgetragen. Die Ergebnisse wurden mit denen der zentrifugierten Proben verglichen.

3.2.5.2 Zentrifugieren

Zentrifugieren der Proben soll eine möglichst große Fraktion störender Gewebestandteile abtrennen und so den Pigment- und Peroxidase-Gehalt der Membranspots reduzieren, dabei aber gleichzeitig eine hohe Antigenkonzentration im Überstand erzielen.

Antigengehalt des Überstandes, Hintergrundfärbung

Muskulatur, Leber- und Nierengewebe wurden auf einen definierten *A.salmonicida*-Keimgehalt mit dem autoagglutinierenden Isolat 216/83 eingestellt, um evt. vorhandene Anheftungsfaktoren der A-Protein-positiven Stämme zu berücksichtigen. Nach fünf- oder zwanzigminütiger Zentrifugation der Proben bei RT mit 25, 50, 130, 500, 1000, 1800, 2500 oder 3200 x g wurden die Überstände nach einer Keimzahlbestimmung weiterverdünnt auf 1:200 w/v und je 200 µl/well davon filtriert, soweit möglich. Die Hintergrundfärbung der resultierenden Membranspots wurde beurteilt.

In einem zweiten Versuch wurden die oben beschriebenen Gewebe zunächst bei 100 °C 30 min erhitzt, dann 1:20 mit kaltem PBS verdünnt und bei den oben genannten Drehzahlen zentrifugiert. Von den Überständen wurden wieder 200 µl/well filtriert.

Ein dritter Versuch wurde nur mit Nierengewebe (5×10^6 und 5×10^5 kbE/ml *A.salmonicida*) und zwanzigminütiger Zentrifugation bei 130 oder 500 x g durchgeführt. Die Überstände wurden abgenommen und verdünnt (1:200 w/v Gesamtverdünnung) und die Keimzahl aller vier Proben bestimmt. In Schritten von 100 µl/well wurden die Überstände bis zum Erreichen der Filtrationsgrenze aufgetragen.

Zusatz eines Detergens / Abhängigkeit der Keimzahl von der Drehzahl und dem Volumen des Überstandes

Den Angaben von GUDMUNSDOTTIR et al. (1993) entsprechend wurde HemoDe (Terpene und butyliertes Hydroxyanisol) eingesetzt, um zu prüfen, ob sich durch den Zusatz eines Detergens die Keimzahl im Überstand beim Zentrifugieren erhöhen ließ.

Im ersten Versuch wurde Lebergewebe (1:10 verdünnt) mit *A.salmonicida* versetzt und die Ausgangskeimzahl dieser Suspension bestimmt. Einer Hälfte wurde HemoDe zugesetzt (10 µl/ml Homogenat entsprechen 0.1% v/w Gewebe). Bei einem Drittel der Proben wurde das Gewebe durch Absetzenlassen für 20 min bei Raumtemperatur abgetrennt, die anderen bei 50 bzw. 130 x g 20 min zentrifugiert. Jeder Ansatz umfaßte drei Aliquote, von denen jeweils 1/4, 1/2 und 3/4 des Gesamtvolumens von der Oberfläche aus abgenommen wurden. Bei allen Überständen wurde die Keimzahl bestimmt und mit der Ausgangskeimzahl verglichen.

Anschließend wurden die Überstände mit 1% w/v Trypsinlösung versetzt, bei 37°C 30 min inkubiert und verdünnt (1:20, 1:50 und 1:100 w/v). Von diesen Lösungen wurden jeweils 100 µl/well aufgetragen. Zur Beurteilung der immunologisch fertig behandelten Membranen diente die Hintergrundfärbung der Spots sowie die Erkennbarkeit positiver Resultate bei Proben mit und ohne HemoDe.

Der Versuch wurde mit Muskulatur (50 und 130 x g) und Nierengewebe (500 und 1000 x g; 1/2 als Überstand entnommen) wiederholt.

Bei einem weiteren Versuch mit Nierengewebe wurde auf eine Zentrifugation und Keimzählung verzichtet. Nach Inkubation mit Trypsin erfolgte eine Verdünnung auf 1:50 oder 1:200 der zur Hälfte mit HemoDe versetzten Proben. Sie alle wurden mit 100 µl sowie dem maximal erreichbaren Volumen (in 100µl-Schritten) filtriert.

3.2.5.3 Trypsin-Zusatz zur Verbesserung der Filtrierbarkeit

Als Alternative zur Zentrifugation, die unbefriedigende Ergebnisse gezeitigt hatte, wurde auf Trypsin zurückgegriffen. Dieses Verfahren machte allerdings weitere Schritte zur

Hintergrundreduzierung der Membranen notwendig, die unter 3.2.5.4 und folgende beschrieben sind.

Geeignete Konzentration

Es wurden Filtrierbarkeit und Nachweisempfindlichkeit von Leber- und Bakterienproben untersucht, die zuvor bei 37 °C für 30 min mit Trypsin versetzt worden waren: 0.1%, 1% (durch Zugabe eines entsprechenden Volumens einer 10%igen Lösung in PBS), 5% und 10% w/v Organhomogenat (durch Einwiegen von Trypsin). Zum Vergleich dienten nicht behandelte Proben.

Optimale Gewebeerdünnungen

Anhand von Lebergewebe wurde der für die Filtration optimale Verdünnungsgrad der Organpräparate ermittelt. Verglichen wurde das maximale Filtrationsvolumen von 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 und 1:500 w Organ/ v PBS verdünnten Proben nach Trypsinanwendung (1% w/v, 30 min bei 37 °C) oder Zentrifugation bei 100 x g für 20 min.

Für alle anderen Gewebe wurden die Filtrationsraten von 1:100 und 1:200 w/v verdünnten und trypsinisierten Mazeraten verglichen.

Optimale Einwirkungsdauer

Untersucht wurden die Auswirkungen einer 1% w/v Trypsinlösung bei 37 °C auf die

- a) Filtrierbarkeit von Niere- und Leber-*A.salmonicida*-Proben nach 10, 20, 30, 45 und 60 min Inkubation durch Auftragung in 100 µl-Schritten bis zum Erreichen des Filtrationsmaximums
- b) Empfindlichkeit der Färbbarkeit von reinen Bakterienlösungen oder mit *A.salmonicida* versetztem Lebergewebe (1:2- Verdünnungsreihe der Bakterien; Auftragung 200 µl/well) nach 30 bzw. 60 min Inkubation.
- c) Veränderung der Kreuzreaktivität von *Yersinia ruckeri* (*Y.ruckeri*) und einer Mischung von Kiemenbakterien (s. 3.2.1) (1:10-Verdünnungsreihe) nach 30 und 60 min Inkubation bei einer reinen Bakterienlösung oder bei Gewebehomogenaten (nur *Y.ruckeri*; Niere, Leber).

3.2.5.4 Pigmentbleichung und Peroxidaseblockierung durch Kaliumpermanganat/Oxalsäure

Entsprechend den Empfehlungen von BRUNO (1987) wurde zunächst 0.25 % w/v KMnO_4 und 1 % w/v Oxalsäure in PBS verwendet. Alle Gewebemazerate waren, soweit nicht anders erwähnt, mit 1% w/v Trypsin versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert worden, bevor sie auf eine Gesamtverdünnung von 1:200 w/v mit PBS weiterverdünnt wurden.

Wirkung auf die NC-Membran

Eine nicht mit Antigen beladene Membran wurde in PBS gewässert, in KMnO_4 5 min inkubiert und dreimal in je 200 ml TBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Oxalsäure für 1 min und nochmaliges Spülen in TBS.

Wirkung auf Gewebe

Nierengewebe, das in PBS 1:10 verdünnt und mazeriert worden war, wurde auf eine NC-Membran aufgetropft (10 μl) und getrocknet. Die Membran wurde anschließend 5 min in KMnO_4 geschwenkt, dann dreimal in TBS gespült und 3 min in Oxalsäure inkubiert.

Später wurde Leber- und Milzgewebe mit und ohne *A. salmonicida* filtriert und anschließend für 60 min in KMnO_4 und nach Waschen 10 min in Oxalsäure inkubiert. Die Intensität der Hintergrundfärbung sowie die Erkennbarkeit positiver Proben wurden im Vergleich zu nicht gebleichten Membranen beurteilt.

Lösungsmittel für KMnO_4 und Oxalsäure

Untersucht wurden A. dest., TBS und PBS auf ihre Eignung als Lösungsmittel für KMnO_4 und Oxalsäure.

Anwendung der Entfärbung vor oder nach der Membranblockierung

Nierengewebe mit einem definierten Keimgehalt wurde mit je 100 μl /well filtriert. Nach Lufttrocknen wurde eine Hälfte der Membran in KMnO_4 /Oxalsäure gebleicht und anschließend in die Blockierlösung gegeben, die andere erst nach der Übernacht-Blockierung gebleicht. Beide Membranen wurden anschließend immunologisch weiterbehandelt und hinsichtlich der Erkennbarkeit positiver Reaktionen verglichen.

Einzelwirkungen von KMnO_4 und Oxalsäure, pH-Abhängigkeit

pH-Wert der KMnO_4 -Lösung

Von Leber- und Milzgewebe mit *A.salmonicida* wurden je 300 μl /well filtriert (1.1×10^4 kbE/well). Als Kontrollen dienten nicht infizierte Gewebe. Die Membranen wurden dann je 10 min (Leber) bzw. 15 min (Milz) geschwenkt in

- KMnO_4 in PBS pH 7.5
- KMnO_4 in A.dest. pH 6.6 (Zugabe von Salzsäure, HCl)
- KMnO_4 in A.dest. pH 2.5 (Zugabe von HCl)
- KMnO_4 in A.dest. pH 9.6 (Zugabe von Natronlauge, NaOH)

jeweils mit und ohne anschließende Oxalsäureeinwirkung.

Es wurden Pigmentierung, Peroxidase-Reaktion im Normalserum sowie die Feststellbarkeit einer positiven Antiserum-Reaktion verglichen.

In einem zweiten Versuch wurde Lebergewebe mit und ohne *A.salmonicida* wie oben beschrieben aufgetragen und in KMnO_4 -Lösungen mit einem pH von 7.5, 6.0, 5.0, 4.0 und 3.0 (Zugabe von HCl) 10 min entfärbt und anschließend in Oxalsäure weiterbehandelt. Eine Probe wurde nur in Oxalsäure für 10 min inkubiert. Farbveränderungen des Hintergrundes und die Empfindlichkeit des *A.salmonicida*-Nachweises wurden beurteilt.

pH-Wert der Oxalsäure-Lösung

Nierengewebe mit und ohne *A.salmonicida* wurde filtriert und in KMnO_4 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurden Oxalsäurelösungen mit pH 3.5, 6.0 und 7.5 (Zugabe von 1N NaOH) 10 min lang angewendet. Verglichen wurden Hintergrundfärbung und Erkennbarkeit der positiven Proben.

Konzentration, Einwirkungszeiten

Von *A.salmonicida*-haltigem Lebergewebe wurden jeweils 100 μl /well filtriert. Je eine Membran wurde in KMnO_4 10, 30 und 60 min entfärbt. Teile der jeweiligen Membran wurden anschließend in Oxalsäure für 2, 5 oder 10 min inkubiert. Farbintensität des Hintergrundes und der positiven Reaktionen wurden mit denen nicht entfärbter Membranteile verglichen.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde von Lebergewebe, mit einer 1:2-Verdünnungsreihe *A.salmonicida* versetzt, 100 µl/well filtriert. Je eine Membran wurde in KMnO_4 mit einer Konzentration von 0.05, 0.1 oder 0.25 % w/v inkubiert. Die Inkubationsdauer der einzelnen Membranteile betrug 2, 5 oder 10 min. Alle wurden dann für 10 min in Oxalsäure behandelt. Als Vergleich wurden nicht entfärbte Spots herangezogen.

Dieser Versuch wurde mit reinen *A.salmonicida*-Suspensionen und Nierengewebe wiederholt. Die Nierenspots wurden jedoch nur bei 0.1 und 0.25% für 30 min in KMnO_4 inkubiert, da sonst wegen der intensiven Hintergrundfärbung positive Proben in keinem Fall zu erkennen waren.

Wiederholte KMnO_4 / Oxalsäure-Anwendung

Verglichen wurden Hintergrundreduzierung und Nachweisempfindlichkeit von wiederholter KMnO_4 /Oxalsäure-Anwendung und insgesamt gleichlanger, nicht unterbrochener Inkubation. *A.salmonicida*-haltiges Lebergewebe wurde nach dem Blotten je 5 min in KMnO_4 und Oxalsäure entfärbt, Nierenproben für 15 min bzw. 10 min; nach einmaligem Waschen wurde der Vorgang wiederholt (2x5+2x5 min Leber, 2x15+2x10 min Niere). Verglichen wurden die Spots mit Membranen, die einmal je 10 min (Leber) oder 30 min in KMnO_4 / 20 min in Oxalsäure (Niere) gebleicht wurden.

Kreuzreaktivität

Die Versuche zur Konzentration und Einwirkungszeit und zur wiederholten KMnO_4 - Anwendung wurden mit *Y.ruckeri* anstelle von *A.salmonicida* wiederholt.

3.2.5.5 Blockierung der Peroxidase-Aktivität durch SDS

Den Angaben von SONG et al. (1992) folgend wurde zunächst homogenisiertes und 1:10 verdünntes Milzgewebe mit und ohne *A.salmonicida* mit SDS (Sodiumdodecylsulfat; Zugabe als 10%ige Lösung in PBS, entsprechend 5% w/w Organ) versetzt, 15 min bei RT inkubiert und filtriert. Ein zweiter Teil der Probe wurde zunächst mit Trypsin behandelt, abgekühlt und dann mit SDS versetzt. Zum Vergleich dienten Trypsin-behandelte und mit KMnO_4 / Oxalsäure entfärbte Membranspots. Der Versuch wurde mit Trypsin-behandel-

tem Lebergewebe wiederholt.

3.2.5.6 Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Wirkung auf Gewebe

Ein mit Lebergewebe geblottetes Membranteil wurde in Blockierlösung mit 1% H₂O₂ über Nacht aufbewahrt; ein identisches wurde erst 20 h in 1% H₂O₂ in PBS inkubiert, dann weitere 20 h blockiert. Die Auswertbarkeit der beiden Membranteile nach immunologischer Färbung sollte darüber Aufschluß geben, ob eine zeitsparende gleichzeitige Bleichung und Membranblockierung möglich war.

Dot blot-Membranen von Niere, Milz, Kiemen- und Herzgewebe, mit und ohne *A.salmonicida*, wurden über Nacht in Blockierlösung mit 1% H₂O₂ gelegt und anschließend immunologisch gefärbt. Beurteilt wurden Hintergrundfärbung und Peroxidase-Aktivität sowie die Unterscheidbarkeit positiver und negativer Proben.

Als Vergleich wurde eine höhere Konzentration (16.5% v/v PBS) bei kürzerer Einwirkungszeit in einer zweiten Versuchsreihe bei Leber-, Darm-, Kiemen- und Milzgewebe erprobt. In diesem Fall wurde auf den Peroxidase-markierten 2. Antikörper verzichtet, um eine eventuell noch vorhandene Restperoxidase der Gewebe beurteilen zu können.

Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität

Lebergewebe wurde mit einer Zweier-Verdünnungsreihe *A.salmonicida* oder einer logarithmisch verdünnten *Y.ruckeri*-Suspension versetzt. Ein Teil der Proben wurde mit Trypsin inkubiert, der andere ohne Trypsin gleich geblottet. Das Auftragungsvolumen betrug 100 µl/well. Der Blockierlösung wurden 1%, 5% oder 10% v/v H₂O₂ zugesetzt; ein Teil der Membranen wurde ohne H₂O₂ blockiert. Nach der immunologischen Färbung wurden die Nachweisgrenzen von *A.salmonicida* und *Y.ruckeri* in Anti-*A.salmonicida* - Serum bestimmt und mit nicht behandelten Proben verglichen.

3.2.5.7 Peroxidase-Blockierung / Pigmentbleichung mit einer Kombination von KMnO_4 / Oxalsäure und H_2O_2

Wirkung auf Gewebe

Nierengewebe mit und ohne *A.salmonicida* wurde mit Trypsin inkubiert und bis 500 μl /well filtriert. Die Behandlung der Membranen erfolgte mit KMnO_4 /Oxalsäure allein (2x15 + 2x10 min), H_2O_2 allein (5% v/v in Blockierlösung) oder verschiedenen Kombinationen hieraus (1x5+1x5min+1%; 2x5+2x5min+1%, 1x5+1x5min+5%, 2x5+2x5min+5%). Verglichen wurden Hintergrundfärbung, Peroxidase-Aktivität und Differenzierbarkeit positiver und negativer Proben.

Der Versuch wurde mit allen anderen Geweben wiederholt.

Nachweisgrenze und Kreuzreaktivität

Der Versuch wurde mit reinen Bakterien suspensionen (*A.salmonicida*, 1:2-Verdünnungsreihe; *Y.ruckeri*, 1:10-Verdünnungsreihe) sowie mit Leber-Bakterien-Mischungen durchgeführt. Festgestellt wurden die Nachweisgrenze von *A.salmonicida* sowie die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* in unbehandelten Proben und gebleichten Membranen (KMnO_4 /Oxalsäure 1x5+1x5 min +1% H_2O_2 oder 2x5+2x5min + 1% H_2O_2).

3.2.5.8 Zusammenwirken von Trypsin, KMnO_4 und H_2O_2

Lebergewebe wurde mit *A.salmonicida* oder *Y.ruckeri* versetzt. Ein Teil der Proben wurde mit Trypsin inkubiert. Das Auftragungsvolumen betrug 100 μl /well. Verschiedene Bleichungszeiten und Kombinationen (s. 4.1.2.8) wurden hinsichtlich der Nachweisgrenze beider Bakterien im Anti-*A.salmonicida*-Serum verglichen.

3.2.6 Infektionsversuch I: Unterschiede zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-infizierten Geweben; Prüfung der Aufbereitungsverfahren

Es sollte untersucht werden, ob und in welchen Organen experimentell infizierter Forellen *A.salmonicida* durch den Immuno-Dotblot mit den bisher beschriebenen Aufbereitungsverfahren nachzuweisen war. Ferner sollte geprüft werden, ob Organveränderungen

infolge der Infektion zu Veränderungen der Peroxidase-Aktivität und / oder der Hintergrundfärbung führten.

Anzucht der Bakterien

Das virulente, A-Protein-positive, pigmentbildende Isolat 216/83 wurde von Furunkulose-Platten in Furunkulose-Bouillon überimpft und 72 h bei 15 °C inkubiert. Eine Subkultur auf TSA-Coomassie-Agar bestätigte die Reinheit der Kultur. Die Bouillon wurde bei 3500 x g 30 min zentrifugiert, das Pellet je zweimal mit PBS resuspendiert und bei gleicher Drehzahl 15 min sedimentiert. Die Bakterien wurden in 1 ml PBS resuspendiert und bei -70 °C eingefroren; eine Keimzählung ergab eine Dichte von 1.1×10^{10} kbE/ml,

3.2.6.1 Infektionsverlauf, pathologisch-anatomische Befunde und bakteriologische Untersuchung

Es wurden Bachforellen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 97.6 g (51.5 - 192.4 g) verwendet, deren Haltung, im Gegensatz zu den Tieren der Vorversuche, in einer Kreislaufanlage erfolgt war.

Sieben der Fische wurden mit Benzocain (250 mg in 8 ml Aceton auf 8 l Wasser) betäubt und mit 0.1 ml der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension dorsolateral i.m. infiziert. Durch den Gewebedruck gingen dabei etwa 25% der verabreichten Menge verloren, so daß die durchschnittliche Infektionsdosis bei etwa 8.5×10^7 kbE/Fisch lag.

Die Tiere wurden auf drei frisch befüllte Aquarien mit je 100 l Inhalt (15 °C Wassertemperatur; geschlossener Wasserkreislauf mit Filteranlage und Luftsprudlern) verteilt. Fünf weitere, nicht infizierte Fische wurden dazu gesetzt, um eine möglichst natürliche Infektion durch Verteilung von *A.salmonicida* über das Wasser zu ermöglichen (Kohabitanten). Die Fische wurden während des Versuchszeitraumes nicht gefüttert, aber mehrmals täglich beobachtet. Beim Auftreten von Krankheitssymptomen wurden die Tiere mit Benzocain betäubt und getötet.

Alle Tiere wurden sofort nach ihrer Tötung obduziert und einer pathologisch-anatomischen Betrachtung unterzogen. Von allen Organen (Rückenmuskulatur an der Injektionsstelle, Kiemen, Darminnenwand, Milz, Leber, Niere) mit Ausnahme des Herzens wurden Gewebeabstriche mittels einer sterilen Öse auf Furunkulose- und TSA-Coomassie-

Platten angelegt, bevor sie entnommen und einzeln nach Bestimmung des Gewichtes bei -70°C eingefroren wurden. Die Platten wurden bei 25°C für 48 h inkubiert. Von Kolonien mit den charakteristischen Merkmalen (klein, glatt, glänzend, cremefarben bzw. dunkelblau, mit pigmentiertem Hof) wurden Grampräparate angelegt, ihre Katalase- und Oxidaseaktivität wurde geprüft. Die Bestimmung der Wachstumsdichte erfolgte anhand der ungefähren Koloniezahl (-: kein Wachstum spezifischer Kolonien; 1-10: Zahl spezifischer Kolonien je Platte; +: 1/3 des Impfstriches, ++: 2/3 des Impfstriches mit *A.salmonicida*-Kolonien bewachsen).

3.2.6.2 Immuno-Dotblot

Die bei Raumtemperatur aufgetauten Gewebe wurden wie in 3.2.2 beschrieben zerkleinert und dabei 1:5 w/v mit PBS verdünnt. Sie wurden portionsweise bei -70°C aufbewahrt.

Die Gewebeprobe wurde nach dem Auftauen 1:2 weiterverdünnt, soweit nicht anders beschrieben mit 1% w/v Trypsin versetzt und bei 37°C 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine Verdünnung von 1:200 bzw. 1:100 w/v (Muskulatur) eingestellt und filtriert. Das Filtrationsvolumen wurde von 100 μl bis zum Erreichen des Maximums in 100 μl -Schritten aufgetragen. Die weitere Behandlung der Membranen ist bei den einzelnen Versuchen beschrieben. Gewebeprobe gesunder Bachforellen (s. 3.2.2) dienten als Negativkontrollen, Positivkontrollen waren mit einer ausreichenden Anzahl von *A.salmonicida*-Zellen (Isolat 216-83) versetzt worden. Beide wurden in allen Versuchen mitgeführt und wie Proben der Versuchsfische behandelt.

Soweit nicht anders angegeben, betrug die Antiserum- und Normalserumverdünnung 1:10 000, GARPO wurde 1:15 000 verdünnt eingesetzt.

3.2.6.2.1 Muskulatur

Entfärben mit KMnO_4 /Oxalsäure

Muskelproben aller Fische und die Kontrollen wurden bis zum Maximum filtriert. Die geblotteten Membranen wurden in 0.1% KMnO_4 -Lösung 2x10 min und in 1% Oxalsäure-Lösung 2x5 min gebleicht und immunologisch gefärbt.

Entfärben mit H₂O₂

Bis zu 600 µl/well der Gewebeproben wurden geblottet. Die Membranen wurden dann über Nacht in einer Blockierlösung mit 1% v/v H₂O₂ inkubiert.

3.2.6.2.2 Kiemengewebe

Bleichen mit KMnO₄/Oxalsäure

Kiemengewebe aller Fische und der Kontrollen wurde filtriert, die Membranen dann in KMnO₄ 2x10 min und in Oxalsäure 2x5 min gebleicht.

3.2.6.2.2.1 Prüfung aller Inkubationsschritte auf Veränderung der Hintergrundfarbe

Um die Ursache für die in dem oben beschriebenen Versuch beobachtete grüne Verfärbung der Membranspots in der Chromogenlösung zu ermitteln, wurde alle in Frage kommenden Einzelschritte des Verfahrens kontrolliert.

Unspezifische Reaktionen der Chemikalien

Zu diesem Zweck wurde das Gewebe eines infizierten Fisches (F5) sowie eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet. Nach dem Blotten von 300 µl/well wurde die Hälfte der Spots mit KMnO₄ 2x10 min und Oxalsäure 2x5 min gebleicht, die anderen blieben unbehandelt. Membranteile wurden entweder direkt in einer der Chromogenlösung entsprechenden Konzentration von Kobaltchlorid oder DAB, in einer Kombination davon oder in vollständiger Chromogenlösung mit H₂O₂ inkubiert. Andere Teile wurden mit 1. und 2. Antikörper beschichtet, die Färbelösung war in diesem Fall entweder vollständig, oder es fehlten H₂O₂, DAB oder Kobaltchlorid.

Hintergrund nach Erhitzen und Zentrifugieren

Gewebe von fünf infizierten Fischen sowie von zwei Kohabitanten und die Kontrollen wurden 30 min auf 100°C erhitzt, mit kaltem PBS verdünnt und 20 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden geblottet, die Membranen in KMnO₄ 2x10 min und Oxalsäure 2x5 min gebleicht.

Prüfung der Betäubungsart

Die Fische des Infektionsversuches waren im Gegensatz zu den Kontrollfischen vor der Tötung mit Benzocain betäubt worden. Deshalb sollte geprüft werden, ob die Betäubung die Reaktionen in der Chromogenlösung verändert hatte.

Eine von drei Bachforellen (K22-24, Körpergewicht 196 bis 243 g) wurde durch Genickschlag betäubt und anschließend getötet, eine weitere 5 min in einem Wassereimer mit 8 ml Azeton gehalten und dann durch Genickschlag betäubt, und die dritte mit 250 mg Benzocain, gelöst in 8 ml Azeton, auf 8 l Wasser vor der Tötung betäubt.

Alle Organe wurden entnommen, zerkleinert, verdünnt, mit Trypsin versetzt und bis 500 µl/well filtriert. Leberspots wurden je 2x5 min, Kiemen und Darm 2x10 + 2x5 min, Herz, Niere und Milz 2x15 + 2x10 min in KMnO_4 /Oxalsäure gebleicht. Anschließend wurden alle Membranen sofort in Chromogenlösung verbracht.

In einem zweiten Versuch wurden die Bleichungszeiten aller Organe verlängert.

Einsatz eines anderen Chromogens (AEC)

Kiemengewebe von drei kulturell positiven Fischen, die mit DAB grüne Spots gezeigt hatten, sowie von den Kontrollen wurde geblottet, mit 2x10 + 2x5 min KMnO_4 /Oxalsäure gebleicht und mit AEC gefärbt.

Einsatz von EDTA und Hydrochinon

Es sollte geprüft werden, ob die abweichende Farbreaktion durch unvollständig entfernte Manganionen (Mn^{2+}) aus der KMnO_4 -Bleichung hervorgerufen worden war, die in einer Redoxreaktion mit Komponenten der Chromogenlösung zu einer grünen Substanz, wie z.B. einer Manganat(VI)-verbindung, oxidiert wurden.

Um diese überschüssigen Ionen von der Membran zu entfernen, wurden Komplexbildner zugesetzt: zum einen EDTA zur Chromogenlösung (nach ROSE et al. 1986), Waschlösung oder Blockierlösung (jeweils 0.01 M), zum anderen Hydrochinon der Waschlösung oder der Färbelösung (jeweils 0.01 M). Verwendet wurden Membranblots von zwei Kontrollfischen (K22 und K23, s.o.) mit und ohne *A.salmonicida*, die in anderen Versuchen eine intensive Grünfärbung aufgewiesen hatten. Die Membranen waren mit KMnO_4 /Oxalsäure 2x10 + 2x5 min gebleicht worden. Waren die Komplexbildner der Färbelösung zugesetzt, wurde auf CoCl_2 verzichtet, da die Kobaltionen mit ihnen reagiert hätten.

Bleichen mit H₂O₂

Gewebe von drei infizierten Fischen sowie K23, alle mit grüner Färbung der Spots in vorangegangenen Versuchen, wurde geblottet und in eine Blockierlösung mit 5% v/v H₂O₂ gelegt. In einem zweiten Versuch wurde die Membran 2 h in 16.5% H₂O₂ inkubiert. Zum Vergleich diente Gewebe, das mit KMnO₄/Oxalsäure je 5 min und 1% v/v H₂O₂ in der Blockierlösung gebleicht worden war.

3.2.6.2.3 Herzgewebe

Bleichung mit KMnO₄/Oxalsäure

Verwendet wurde Gewebe von Fischen des Infektionsversuches und von K22-24. Einwirkungszeiten von 2x15 + 2x10 min oder 3x10 min für KMnO₄ und 10+2x5 min für Oxalsäure wurden verglichen.

Kombination von KMnO₄/Oxalsäure mit H₂O₂

Gewebe aller Versuchsfische sowie der Kontrollen wurde bis zum jeweiligen Maximum geblottet. Die Membranen wurden anschließend je 2x5 min in KMnO₄ und Oxalsäure gebleicht und in Blockierlösung mit 1% H₂O₂ inkubiert.

3.2.6.2.4 Lebergewebe

Entfärben mit KMnO₄/Oxalsäure im Vergleich zu erhitzten, zentrifugierten Proben

Eine Hälfte der Proben aller infizierten Tiere wurde mit Trypsin versetzt, nach Verdünnung wurden 100 bis 500 µl/well und das Filtrationsmaximum aufgetragen. Die Membranen wurden dann in KMnO₄ und Oxalsäure gebleicht. Die andere Hälfte der Proben wurde 30 min auf 100°C erhitzt, dann verdünnt und anschließend bei 2500 x g 15 min zentrifugiert. Von den Überständen wurden ebenfalls 100 - 500 µl/well und das Filtrationsmaximum geblottet.

Der Versuch wurde insgesamt viermal mit unterschiedlichen Bleichungszeiten in KMnO₄ / Oxalsäure sowie zwei verschiedenen Antiserum- und Normalserum-Konzentrationen

durchgeführt. Die Filtrationsmaxima der erhitzten Proben waren dabei in der Regel größer als bei den trypsinisierten Homogenaten.

Verglichen wurden Hintergrundfärbung und Peroxidase-Aktivität in den einzelnen Versuchen sowie die Erkennbarkeit positiver Proben in Relation zu den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung.

Bleichen mit H₂O₂ im Vergleich zu einer Kombination von KMnO₄/Oxalsäure und H₂O₂

Gewebeproben von zwei i.m.-infizierten Fischen und einem Kohabitanten sowie die Kontrollen wurden bis 500 µl/well nach Trypsinbehandlung filtriert. Ein Teil der Membran wurde in KMnO₄ und Oxalsäure je 5 min gebleicht und anschließend in Blockierlösung mit 1% v/v H₂O₂ inkubiert. Damit verglichen wurden die gleichen Proben, nachdem sie nur mit H₂O₂ 1% oder 5% v/v in Blockierlösung gebleicht worden waren.

3.2.6.2.5 Nierengewebe

Vergleich zwischen Trypsin/Bleichen und Erhitzen/Zentrifugieren

Zwei der kleineren i.m.-infizierten Fische wurden nicht untersucht, da deren Probenmenge für den Doppelansatz nicht ausreichte.

Alle anderen einschließlich der Kontrollen wurden zur Hälfte mit Trypsin versetzt und inkubiert. Maximal filtrierbar waren zwischen 800 und 1600 µl/well. Die Membranen wurden anschließend gebleicht: KMnO₄ 2x15 min, Oxalsäure 2x10 min, bei mehr als 300 µl/well je 5 min länger. Die andere Hälfte der Proben wurde 30 min auf 100°C erhitzt, verdünnt, 15 min bei 2500 x g zentrifugiert und filtriert (maximal 3500 µl/well). Wegen der starken Braunfärbung der Spots wurden diese ebenfalls kurz in KMnO₄/Oxalsäure gebleicht (10+5 min + 2x5 min; >300 µl/well 15+10 + 10+5 min).

Die Ergebnisse wurden mit denen der bakteriologischen Untersuchung verglichen.

Bleichen mit KMnO₄ / Oxalsäure

Die Effektivität der Bleichung wurde noch zweimal mit je einem Teil der infizierten Gewebe überprüft. Dabei wurde zunächst ein ähnliches Filtrationsmaximum erreicht wie

oben, die Membranen wurden allerdings kürzer gebleicht (2x10 + 2x5 min, >500 µl/well je 5 min länger). Beim dritten Versuch wurden maximal 150 bis 600 µl/well filtriert, die Bleichungszeit betrug 2x10 + 2x10 min.

3.2.6.2.6 Milzgewebe

Bleichen mit KMnO₄/Oxalsäure

Milzgewebe aller Fische und der Kontrollen wurde aufgetaut, mit Trypsin inkubiert, verdünnt und filtriert. Das Filtrationsvolumen lag bei 100 bis maximal 600 µl/well. Gebleicht wurden die Membranen mit KMnO₄ 15+10 min und Oxalsäure 10+5 min.

Andere Methoden (KMnO₄, H₂O₂, AEC)

Diese Versuche wurden mit gepooltem Milzgewebe von drei neuen Kontrollfischen (K1-3), z.T. mit *A.salmonicida* versetzt, durchgeführt, da von den infizierten Fischen nur sehr wenig Probenmaterial vorhanden war.

Das Bleichen der Membranen erfolgte zunächst durch eine dreimalige KMnO₄/Oxalsäure-Einwirkung (2x10+5 min + 3x5 min) oder durch Zusatz von 1% H₂O₂ zur Blockierlösung. Eine Hälfte wurde nach Inkubation in den Seren mit DAB, die andere in AEC gefärbt.

Danach wurde die Wirkung von 1% und 5% H₂O₂ (v/v Blockierlösung über Nacht), 16.5% H₂O₂ (v/v PBS 2 h), sowie verschiedener Kombinationen von KMnO₄/Oxalsäure mit H₂O₂ (1x5+1x5 min + 1% H₂O₂, 2x5+2x5 min + 1% H₂O₂ und 2x5+2x5 min +5% H₂O₂) miteinander verglichen.

Gewebe von infizierten Fischen

Membranen mit Proben aller infizierten Fische wurden diesmal mit KMnO₄/ Oxalsäure 2x5+2x5 min, kombiniert mit 1% H₂O₂ über Nacht, gebleicht.

3.2.6.2.7 Darmgewebe

Die Versuche wurden zum Teil an den Fischen des Infektionsversuches, zum Teil an Kontrollfischen (K22-24) vorgenommen. Verglichen wurde die Wirkung verschiedener H₂O₂-Konzentrationen (1%, 5%, 16.5% v/v), unterschiedlich langer KMnO₄/Oxalsäure-Einwirkungen sowie Kombinationen von KMnO₄ und H₂O₂ (1x5+1x5 + 1% oder 2x5+2x5+1%).

3.2.7 Infektionsversuch II - Unterscheidbarkeit septikämischer Infektionen

Es sollte untersucht werden, ob allein die Tatsache einer septikämischen Infektion unabhängig vom auslösenden Agens zu Organveränderungen führt, die eine positive Reaktion im Immuno-Dotblot hervorrufen könnten. Als Vergleichsinfektion wurde *Yersinia ruckeri* (*Y.ruckeri*) ausgewählt, ein gramnegatives Bakterium, das bei Forellen die Rotmaulseuche (enteric redmouth disease; ERM) verursacht (AUSTIN u. AUSTIN 1993b). ERM verläuft ebenfalls septikämisch und ist bei akutem Krankheitsverlauf durch klinische und pathologische Befunde nicht von Furunkulose zu unterscheiden (RÜBSAMEN u. WEIS 1985).

Bakterien

Das *A.salmonicida*-Isolat 216/83 und das *Y.ruckeri*-Isolat 65/87 wurden in Furunkulose-Bouillon für 48 h bei 20°C angezüchtet. Die Reinheit der Kulturen wurde durch Subkultivierung auf TSA-Coomassie bzw. Yersinien-Selektivmedium (nach WALTMAN u. SCHOTTS 1984) bestätigt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen, in PBS mit 10% v/v Glycerol aufgenommen und nach einer Keimzahlbestimmung eingefroren.

3.2.7.1 Infektionsverlauf

Verwendet wurden gesunde Bachforellen aus der institutseigenen Kreislaufhaltung (82 - 150 g Körpergewicht, Durchschnitt 116 g). Die Fische wurden mit Benzocain betäubt. Zwei Tieren, die als Negativkontrollen dienen sollten, wurden 0.2 ml steriler PBS-

Glycerinlösung in die Rückenmuskulatur injiziert (F16, F17). Drei Fische (F18-20) erhielten *Y.ruckeri* (2.2×10^8 kbE/Fisch) intraabdominal injiziert, fünf Fische (F21-25) *A.salmonicida* in einer Keimdosis von 2×10^9 kbE intramuskulär.

Die drei Gruppen wurden getrennt in 100 l-Glasaquarien mit eigenem Wasserkreislauf bei 16°C gehalten. Die Tiere wurden einen Tag vor der Infektion und während des gesamten Versuchszeitraumes nicht gefüttert. Mehrmals täglich wurden die Gruppen auf Verhaltensänderungen und Krankheitssymptome hin beobachtet.

Nach drei Tagen wurden die Tiere nach Betäubung getötet. Das weitere Verfahren entspricht dem unter 3.2.6.1 beschriebenen.

3.2.7.2 Immuno-Dotblot

Die Organe wurden homogenisiert, dabei verdünnt, mit Trypsin inkubiert und auf die Endverdünnung eingestellt. Aufgetragen wurden jeweils 100 µl bis 900 µl oder das Filtrationsmaximum. Membranen mit Muskulatur, Kiemen-, Leber- und Darmgewebe wurden je 5 min, Milz-, Herz- und Nierengewebe je zweimal 5 min in KMnO_4 und Oxal-säure und anschließend über Nacht in H_2O_2 gebleicht. Alle Organproben wurden jeweils mit dem Antiserum gegen *A.salmonicida*, *Y.ruckeri* sowie Normalserum (1:10000) und GARPO (1:15000) inkubiert. Gewebe eines nicht infizierten Fisches wurde zusätzlich mit *A.salmonicida* oder *Y.ruckeri* versetzt und als Positivkontrollen mitgeführt.

3.2.8 Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität des Immuno-Dotblots

Festlegung der optimalen Serumverdünnungen, Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität

In mehreren Versuchen mit reinen Bakterienlösungen oder Gewebe-Bakterienmischungen (Muskulatur, Niere) wurde die Nachweisempfindlichkeit beider Antiseren für das jeweilige Zielantigen (1×10^5 kbE/well bis 1×10^3 kbE/well in 2er Verdünnungsschritten) und die Kreuzreaktivität mit dem anderen Keim (*A.salmonicida* ATCC 14174 und *Y.ruckeri* 65/87; bis 1×10^8 kbE/well) für Serum- und GARPO-Verdünnungen von 1:5000 bis 1:40 000 bestimmt.

Gewebe wie Bakteriensuspensionen wurden mit Trypsin inkubiert (1% w/v; 30 min bei 37°C) und nach dem Blotten gebleicht (max. 2x5+2x5 min + 1% H₂O₂).

Prüfung der Kreuzreaktivität auf Spezifität mit adsorbierten Seren

Das Anti-*A.salmonicida*-Serum wurde nach der Methode von CHALLACOMBE (1988) adsorbiert, um festzustellen, ob die aufgetretene Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* auf spezifische Antikörper gegen *A.salmonicida* oder auf den polyvalenten Charakter des Antiserums zurückzuführen war.

Das Antiserum wurde mit einem Achtel des Volumens dicht gepackter Zellen von *A.salmonicida* bzw. *Y.ruckeri* (Anzucht in Furunkulose-Bouillon, 48 h 25°C, zweimal gewaschen in PBS, zentrifugiert jeweils bei 4000 x g 30 min) für 1 h bei 37°C, dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach unzureichenden ersten Testergebnissen wurde der Vorgang wiederholt, das Antiserum jedoch vorher 1:10 verdünnt.

A.salmonicida wurde mit einer Keimdichte von 1.6×10^5 bis 5×10^3 kbE/well aufgetragen, *Y.ruckeri* von 1.1×10^8 bis 2.3×10^6 kbE/well, jeweils in Zwischenschritten verdünnt. Als Kontrolle diente nicht adsorbiertes Antiserum. Alle Seren wurden 1:10 000, GARPO 1:15 000 verdünnt angewendet.

3.2.9 Immunfluoreszenz

Der Immuno-Dotblot sollte mit einer zweiten serologischen Nachweismethode, die nicht den Einschränkungen durch Gewebe-Peroxidase und Hintergrundfärbung unterworfen ist, verglichen werden.

Ablauf

Die Versuche wurden nach dem von BURGER (1997) optimierten Protokoll durchgeführt.

- Aufbewahrung der Objektträger in Aceton für mehrere Tage (Entfettung): entnehmen, trockenwischen, Staub abflammen
- Beschichtung mit 0.5 % w/v Holzleim
20 µl / Feld, Trocknung bei 37°C über Nacht, staubfreie Aufbewahrung

1) Auftragung der Proben:

Bakterienlösungen oder Gewebe 1:20 in PBS mazeriert; 10 µl/Feld

2) Trocknung der Präparate:

60 min bei 37°C, anschließend kurze Hitzefixierung

3) Acetonfixierung:

10 min Fixierung in kaltem Aceton abs. bei 4°C, sofort spülen in A. bidest
ohne Lufttrocknung weiterverarbeiten

oder gründlich lufttrocknen (90 min) und anschließende Lagerung bei -20°C

Vor Aufbringung spezifischer Lösungen auf die einzelnen Felder wurden die teflonbeschichteten Ränder mit Zellstoff getrocknet

4) Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit Ziege-Normalserum:

20 µl pro Feld; 30 minütige Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C; Serum nur abgiessen, kein Spülen, keine Lufttrocknung

5) Auftragung des 1. Antikörpers:

20 µl der jeweiligen Gebrauchsverdünnung pro Feld; anschließend 30 min. bei 37°C in der feuchten Kammer inkubieren

6) Waschvorgang:

Objektträger möglichst zügig durch ein erstes Tauchbad mit TBS-X ziehen, dann in Färbeschlitten einsetzen und in Färbetrögen 2x5 min in TBS-X waschen, dann 3x kurz in zwei nachgeschaltete A.bidest-Bäder tauchen und sofort ohne Lufttrocknung weiterverarbeiten

7) Auftragen des 2. Antikörpers (GARFITC):

20µl der Gebrauchsverdünnung pro Feld; Inkubation bei 37°C für 30 min in der feuchten Kammer

8) Waschvorgang: s. 6)

9) Gegenfärben mit Evans Blue:

ein Tropfen pro Feld; 1-2 min bei RT inkubieren; Waschen mit TBS-X (3x kurz ein tauchen, dann 10 min) und Nachspülen mit A. bidest.; Trocknung 30 min bei RT

10) Eindecken mit Glycerin-DABCO:

je Feld ein Tropfen, Deckglas blasenfrei aufsetzen, mit Wasser reinigen

11) Auswertung von etwa 100 Feldern im Fluoreszenz-Mikroskop; die Bewertung erfolgte nach der Fluoreszenz-Intensität (FI)(0 bis 4+ in Schritten von 0.5) und der Uniformität (optimal; akzeptabel; nicht akzeptabel)(nach CVITANICH 1994).

3.2.9.1 Prüfung auf Eigenfluoreszenz und unspezifische Antikörper-Bindung

Je ein A-Protein-positives und -negatives *A.salmonicida*-Isolat sowie Nieren- und Lebergewebe gesunder Fische wurden aufgetragen und in Normalserum und GARFITC (jeweils 1:100), nur in GARFITC (1:50 bis 1:200) sowie nur in TBS-X inkubiert.

3.2.9.2 Ermittlung einer geeigneten Antiserum- und GARFITC - Konzentration

Testung mit Bakterien

Verwendet wurde der *A.salmonicida*-ATCC-Referenzstamm Nr. 15 (1×10^6 kbE/Feld). Antiserum und Normalserum wurden in Konzentrationen von 1:10 bis 1:10 240 (jeweils 1:2 fallend), GARFITC mit 1:100 angewendet.

In einem zweiten Versuch wurden die Seren 1:500 verdünnt, GARFITC 1:10 bis 1:10 240 (jeweils 1:2 fallend) und zusätzlich 1:500.

Prüfung bei Gewebe-Bakterien-Mischungen

Nierengewebe wurde mit Isolat 15 oder 53 versetzt und aufgetragen (je 2×10^5 kbE/Feld). Antiserum und Normalserum wurden in Verdünnungen von 1:80 bis 1:640, bei GARFITC von 1:80 bis 1:320 verdünnt angewendet.

Abhängigkeit von der Antigenkonzentration

Leber- und Nierengewebe wurde mit Isolat 53 in höherer Keimdichte als bisher (10^7) versetzt und aufgetragen. Serumverdünnungen sowie GARFITC-Konzentrationen von 1:40 bis 1:160 und 1:100 wurden getestet. Als Kontrolle wurde eine reine Bakteriensuspension mitgeführt (Seren 1:100, alle GARFITC-Konzentrationen).

Anschließend wurde Lebergewebe mit unterschiedlichen Konzentrationen des Isolates 53 versetzt (10^5 bis 10^7 kbE/Feld). Die Serumverdünnung betrug 1:100, für GARFITC 1:80.

3.2.9.3 Kreuzreaktivität

Um auszuschließen, daß *A.salmonicida*-Zellen trotz aller Vorsichtsmaßnahmen in Felder

mit *Y.ruckeri* abgeschwemmt wurden und dadurch zu falschen Ergebnissen führten, wurden bei den folgenden Versuchen für die beiden Bakterien getrennte Objektträger benutzt.

Leber- und Nierengewebe wurde mit *Y.ruckeri* 65/87 versetzt (10^6 kbE/Feld) und mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum oder Normalserum (1:80 bis 1:320) und GARFITC (1:80) inkubiert. Zum Vergleich diente eine in Anti-*Y.ruckeri*-Serum (1:160) inkubierte Probe.

Kreuzreaktivität mit adsorbierten Seren

Leber- und Nierengewebe wurde mit *A.salmonicida*-Isolat 53 oder mit *Y.ruckeri* versetzt (10^5 kbE/Feld). Außerdem wurde Nierengewebe eines mit *A.salmonicida* (52-3) und eines mit *Y.ruckeri* (Y8) infizierten Fisches (s. Hauptversuch) untersucht. Verglichen wurde die Fluoreszenz beider Bakterien in Antiseren gegen *A.salmonicida*, die entweder mit dem homologen Keim oder mit *Y.ruckeri* adsorbiert worden waren, mit der in den beiden nativen Antiseren und Normalserum (jeweils 1:320, GARFITC 1:80).

3.3 Hauptversuch

In diesem Versuch sollten die Sensibilität und Spezifität des Immuno-Dotblot-Verfahrens nach optimierter Gewebeaufbereitung sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Nachweishäufigkeit in den einzelnen Organen bei akut an Furunkulose erkrankten Fischen ermittelt werden.

3.3.1 Infektion mit *Aeromonas salmonicida*

Ausgewählt wurden zwei A-Protein-positive (Nr. 21, Nr. 53) und zwei A-Protein-negative Isolate (Nr. 15, Nr. 52; s. 3.2.1). Nach Anzucht in Furunkulose-Bouillon bei 20°C für 48 h wurden sie mit PBS auf 1×10^9 kbE/ml eingestellt.

Als Versuchstiere dienten fünf juvenile Bachforellen aus institutseigener Kreislaufhaltung (durchschnittlich 107 g) für jeden Stamm.

Je 1 ml der jeweiligen Zellsuspension wurde pro Fisch intramuskulär links laterocranial der Rückenflosse injiziert. Drei Kontrollfischen wurde je 1 ml steriler Furunkulose-

Bouillon i.m. injiziert. Die Fische wurden, nach Infektionsgruppen getrennt, in statische Systeme eingesetzt (5 Tiere je 100 l-Becken) mit etwa 90% Wasseraustausch pro Tag (Desinfektion des Wassers mit KMnO_4).

Zwei Tage vor Beginn und während der gesamten Versuchsdauer wurden die Fische nicht gefüttert.

Verhalten und Aussehen der Fische wurden mehrmals täglich protokolliert. Beim Auftreten schwerer Störungen des Allgemeinbefindens (Lethargie, Absonderung) oder erster Todesfälle wurden alle Fische einer Versuchsgruppe mit Benzocain (250 mg/10 l Wasser) betäubt und getötet. Die Bezeichnung der Tiere erfolgte entsprechend dem zur Infektion verwendeten Isolat (15-1 bis 15-5 usw.). Die Tiere wurden, soweit nicht anders möglich, bei -70°C eingefroren bis zur BU.

3.3.2 Infektion mit *Yersinia ruckeri*

Das *Y.ruckeri*-Isolat 65/87 wurde in Furunkulose-Bouillon angezüchtet (24 h bei 20°C), zentrifugiert und zweimal gewaschen. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen, die Keimzahl bestimmt und die Suspension auf 5×10^8 kbE/ml mit PBS eingestellt.

Zehn gesunde juvenile Bachforellen aus institutseigener Haltung (durchschnittlich 148 g) wurden nach Betäubung mit Benzocain intraabdominal mit 0.2 ml der Bakteriensuspension infiziert (1×10^8 kbE/Fisch). Zwei Kontrollfische erhielten steriles PBS anstelle der Bakterien.

Die Haltung der Fische und das weitere Vorgehen entsprachen dem unter 3.3.1 Beschriebenen.

3.3.3 Pathologisch-anatomische Untersuchung, BU

Alle Fische wurden einer pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen. Anschließend wurden von Milz, Leber, Darm, Niere und Muskulatur, hier an der Injektionsstelle, Abstriche auf Furunkulose-Agar, TSA-Coomassie-Agar und Yersinien-Selektivmedium (nach WALTMAN u. SCHOTTS 1984) angelegt, bevor die Organe steril entnommen und nach dem Wiegen einzeln eingefroren wurden. Auf eine BU des Herzgewebes wurde verzichtet, da diese eine sterile Entnahme des intakten Organes unmöglich gemacht hätte. Bei allen Fischen war die Gallenblase stark gefüllt und wurde bei der Exenterierung

entfernt.

Die Organabstriche wurden 4-5 Tage bei 15 °C inkubiert. *A.salmonicida* wurde nach dem Auftreten typischer mattweißer, runder Kolonien, Pigmentbildung auf Furunkulose-Agar und der Blaufärbung auf TSA-Coomassie identifiziert. Fragliche Kolonien wurden Gramgefärbt und auf ihre Oxidase-Aktivität geprüft. *Y.ruckeri* wurde durch das Wachstum typischer grüner Kolonien mit Hydrolyse-Zone auf dem Selektivmedium und eine Oxidase-negative Reaktion nachgewiesen.

Die Wachstumsdichte wurde als negativ (-) (keine als *A.salmonicida* oder *Y.ruckeri* identifizierbaren Kolonien), + (einzelne Kolonien), ++ (halber Impfstrich bewachsen) oder +++ (ganzer Impfstrich dicht bewachsen) beurteilt.

3.3.4 Immuno-Dotblot

Die Organe wurden bei RT aufgetaut, mit dem Ultraturrax mazeriert und dabei 1:5 (Leber, Muskulatur, Niere) oder 1:10 w/v in sterilem PBS verdünnt. Von den Nieren- und Leberpräparaten wurde eine Keimzählung angelegt (Furunkulose-Platten, 3 Tage bei 20 °C). Die Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C.

Die Proben wurden bei RT aufgetaut, soweit notwendig auf 1:10 w/v verdünnt und 30 min bei 37 °C mit 1% w/v Trypsin inkubiert. Anschließend wurden nach nochmaliger Verdünnung (Muskulatur 1:100, andere Organe 1:200 w/v Endverdünnung) 100 µl und 500 µl sowie das maximal filtrierbare Volumen aufgetragen. Als Positivkontrolle diente Gewebe je eines Kontrollfisches, das mit einer ausreichenden Zahl von *A.salmonicida* oder *Y.ruckeri* versetzt worden war. Die Verteilung der Proben auf der Membran erfolgte ohne festgelegtes Muster, um Voreingenommenheit des Auswerters zu vermeiden.

Die fertig geblotteten Membranen wurden wie folgt gebleicht:

Leber, Muskulatur, Darm 5 min in 0.1% w/v KMnO₄ und 5 min in 1% Oxalsäure;

Niere, Milz und Herz je zweimal 5 min abwechselnd in jeder Lösung.

Alle Membranen wurden über Nacht in Blockierlösung mit 1% v/v H₂O₂ aufbewahrt.

Membranspots aller Proben wurden in Antiserum gegen *A.salmonicida* und *Y.ruckeri* sowie Normalserum (1:20 000) und anschließend in GARPO (1:20 000) inkubiert. Die

Einwirkungszeit der Chromogenlösung betrug 5 min.

Die Membranen wurden sowohl feucht wie nach Trocknung ausgewertet.

Immuno-Dotblot-Versuche mit Leber- und Nierengeweben *A.salmonicida*-infizierter Fische wurden drei- bzw. viermal durchgeführt, um Abweichungen bei der Filtrationsrate und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu ermitteln.

3.3.5 Immunfluoreszenz

Serum- und Konjugatkonzentration: Prüfung an Geweben infizierter Fische

Nieren- und Lebergewebe von Fischen des Hauptversuches, die in der BU und im Immuno-Dotblot als sicher positiv beurteilt worden waren (53-3, 53-4, 53-5, 52-3, 21-5), wurden in Antiserum- und Normalserum-Konzentrationen von 1:40 bis 1:1280 und GARFITC von 1:80 untersucht.

Nierengewebe infizierter Fische

Gewebehomogenate aller Fische des Hauptversuches einschließlich der fünf Kontrollfische wurden mit den Antiseren gegen *A.salmonicida* und *Y.ruckeri* (jeweils 1:320 verdünnt) und GARFITC (1:80 verdünnt) inkubiert.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Allgemeine Versuchsparameter

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist auch unter 4.1.1.4 zu finden.

4.1.1.1 Filtrierbarkeit und Färbbarkeit von *A.salmonicida*

Feststellung der geeigneten Porengröße

Die Bakteriensuspension zeigte auf der Membran mit 0.2 µm Porengröße eine geringfügig intensivere Färbung als bei 0.45 µm, jedoch ließ sich keine der Gewebe-Bakterien-Mischungen vollständig filtrieren. Bei einer Porengröße von 0.45 µm waren die Muskelproben ab einer Verdünnung von mehr als 1:200, die der inneren Organe ab 1:500 vollständig filtrierbar.

Mehrfachauftragungen

Auch nach der fünften Auftragung erfolgte eine vollständige Filtration der Proben. Proportional zu der je well insgesamt filtrierten Keimzahl verstärkte sich das Farbsignal auf der fertigen Membran.

Feststellung der Filtrationsgrenze

Es ließen sich zwischen 850 und 1200 µl/well filtrieren. Der maximale Keimgehalt pro Membranspot bei reinen Bakteriensuspensionen betrug damit etwa 1×10^9 kBE.

Einfluß der Auftragungsmenge im Verhältnis zur Verdünnungsstufe auf die Färbbarkeit

Die zehnfach höhere Verdünnung (1:200, 200 µl/well) zeichnete sich durch bessere Filtrierbarkeit, eine geringere Hintergrundfärbung und eine intensivere und besser umgrenzte immunologische Reaktion der Spots aus im Vergleich zu den niedrig verdünnten Proben (1:20, 20 µl/well).

Einfluß der Probenposition auf die Filtrierbarkeit

Das maximale Filtrationsvolumen der Probe lag in der Mitte des Gerätes um 50 - 100 µl höher als in den beiden Randzeilen und in der ventilt nahen Spalte, die Filtrationsdauer bei vollem Vakuum erheblich niedriger.

Bei der Auftragung unterschiedlicher Volumina der gleichen Probe wurde deshalb die größte Menge nach Möglichkeit zentrumsnah filtriert, um eine größtmögliche Antigenmenge aufbringen zu können.

4.1.1.2 Vorläufige Bestimmung der geeigneten Serum- und Konjugat-Konzentrationen

Klar positive Ergebnisse konnten bis zur höchsten untersuchten Serum- und Konjugatverdünnung von 1:40 000 abgelesen werden. Im Normalserum trat bei keiner Konzentration eine sichtbare Färbung auf. Die Nachweisgrenze bis 1:30 000 lag bei etwa 1×10^3 kbE/well, bei 1:40 000 war sie um etwa eine Zehnerpotenz höher. Als vorläufige Arbeitsverdünnungen wurden 1:10 000 für die Seren und 1:15 000 für das Konjugat ausgewählt.

4.1.1.3 Spezifitätskontrollen; Hintergrundfärbung

Muskulatur wies auf der nicht immunologisch behandelten Membran als einziges Gewebe keine pigmentbedingte Hintergrundfärbung auf. Gewebespot, die ohne 1. oder 2. Antikörper inkubiert worden waren, zeigten eine gleichmäßige hellblaue Färbung, ebenso die der in Normalserum und Konjugat inkubierten Membranteile, Beweis einer peroxidatischen Aktivität des Muskelgewebes. *A.salmonicida*-haltige Proben färbten allerdings im Antiserum deutlich dunkler blau als im Normalserum, so daß eine positive Reaktion erkennbar blieb.

Kiemen, Leber- und Herzgewebe zeigten nach dem Blotten eine in dieser Reihenfolge zunehmende, intensive rötlich-braune Eigenfarbe (s. Abb. 1, S. 85). Darmgewebe war graugrün pigmentiert. Sowohl die Spots, die ohne Serum oder Konjugat inkubiert worden waren, als auch die mit Normalserum behandelten erschienen dunkler und bläulich gefärbt. Nur beim mit *A.salmonicida* versetzten Kiemengewebe ließ sich ein Unterschied in der Farbintensität zwischen Normal- und Antiserum und damit eine positive Reaktion erken-

nen. Ungefärbtes Milzgewebe erschien intensiv rotbraun, Nierenproben fast schwarz (s. Abb. 1, S. 85). Alle immunologisch behandelten Membranen wiesen einheitlich schwarze Spots auf, eine Differenzierung war nicht möglich.

4.1.1.4 Zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse zu allgemeinen Versuchsparametern

1. Geräteparameter

Die **Filtrierbarkeit** von Suspensionen war abhängig von

- der Porengröße der NC-Membran (0.45 µm ausgewählt)
- der Probenpositionierung im Gerät: das Filtrationsmaximum lag in der Mitte der Matrix 50 bis 100 µl höher als am Rand)
- der Gewebeerdünnung: höhere Verdünnungen ließen sich bei gleicher absoluter Substanzmenge besser filtrieren und zeigten bei größerer Randschärfe der Spots eine geringere Hintergrundfarbe.

Das **Filtrationsmaximum** betrug für reine Bakteriensuspensionen 1×10^9 kbE/well.

Mehrfachauftragungen und -filtrationen im gleichen well erzielten eine Antigenanreicherung auf der Membran mit entsprechender Signalverstärkung.

2. Serum- und Konjugatkonzentrationen bis 1:40 000 zeigten bei Antigenmengen von 10^6 kbE/well positive Reaktionen. Als Arbeitsverdünnungen bis zur Neubestimmung nach Festlegung der Gewebeaufbereitung wurden für die Seren 1:10 000 und für das Konjugat 1:15 000 ausgewählt.

3. Spezifitätskontrollen; Hintergrundfärbung

Eine unspezifische Anlagerungen des ersten oder zweiten Antikörpers an Gewebebestandteile konnte nicht festgestellt werden.

Alle Gewebe wiesen eine Peroxidase-Aktivität auf, die eine Umsetzung des Chromogens und eine Blaufärbung der Membranspots unabhängig vom Vorhandensein eines Immunkomplexes bewirkte.

Mit Ausnahme von Muskelproben zeigten die Gewebe rötlichbraune, Milz und Niere braunschwarz pigmentierte Spots. Zusammen mit der unspezifischen Peroxidase-Reaktion

entstand eine Hintergrundfärbung auf der Membran zwischen bläulichbraun und schwarz, die die Erkennbarkeit einer spezifischen positiven Reaktion stark einschränkte oder unmöglich machte (s.a. Abb. 1, S. 85).

4.1.2 Gewebeaufbereitungsverfahren zur Peroxidaseblockierung und Pigmentreduzierung

4.1.2.1 Erhitzen

Nachweisbarkeit von *A.salmonicida*

Bei den Bakteriensuspensionen zeigte sich mit steigender Temperatur eine zunehmende Färbbarkeit. Auf 100°C erhitze Proben waren zwei- bis zehnmal intensiver gefärbt, die Nachweisgrenze lag entsprechend niedriger.

Bei den mit *A.salmonicida* versetzten Muskelproben ergab sich ein uneinheitliches Bild. Bei 50 und 80°C meist, bei 60°C immer reduzierte sich die Reaktivität im Antiserum in allen Versuchen um maximal eine Zehnerpotenz verglichen mit nicht erhitzten Proben. Dagegen wies auf 100°C erhitztes Gewebe, wie die Bakteriensuspensionen, eine zwei- bis viermal, selten zehnmal bessere Färbbarkeit auf.

Im Normalserum waren Gewebeproben, die bis 60°C inkubiert worden waren, zartblau gefärbt, ab 80°C farblos, also frei von Peroxidase-Aktivität.

Die nicht mit Bakterien versetzten Gewebekontrollen hatten bei allen Temperaturen im Antiserum und Normalserum die gleiche hellblaue bzw. weiße Färbung und reagierten damit immer negativ.

Kreuzreaktivität

Das *Ps.fluoreszenz*-Isolat und die Kiemenbakterien wiesen nach dem Erhitzen keine verstärkten Reaktionen auf (Nachweisgrenze *Ps.fluoreszenz* >1 x 10⁸ kbE/well, Kiemenbakterien 2.4 x 10⁶ kbE/well). Bei allen anderen Keimen trat nach thermischer Behandlung eine Erhöhung der Reaktivität im Antiserum bis zum vier- bis sechzehnfachen, bei *Y.ruckeri* um fast zwei Zehnerpotenzen auf.

Mit den jeweiligen Bakterien versetzte Muskelgewebe reagierten mit einer noch stärkeren Zunahme der Kreuzreaktivität bei Erhitzen als die reinen Bakteriensuspensionen. Dieser Anstieg war in allen Fällen größer als die verstärkte Reaktion von hoch erhitzten *A.salmonicida*-Proben. Nicht zentrifugierte Proben erbrachten die gleichen Ergebnisse.

4.1.2.2 Einfluß des Zentrifugierens

Antigengehalt des Überstandes

Schon eine Zentrifugation von 25 bis 130 x g setzte die Keimzahl im Überstand auf 50% bis unter 10% gegenüber der Ausgangssuspension herab, unabhängig von der Dauer. Bei 2500 x g fanden sich im Überstand keine kulturell nachweisbaren Bakterien mehr.

Bis 100 x g sedimentierten die Gewebeteilchen unzureichend, bei einigen Proben war dadurch die saubere Abnahme des Überstandes mit einer Pipette nicht möglich. Höhere Drehzahlen erzielten mit zwanzigminütiger Zentrifugation eine bessere Sedimentierung als nach 5 min. Trotzdem ließen sich nicht alle Proben bei einer 1:200 w/v Gesamtverdünnung bis 200 µl/well filtrieren.

Bei Muskelgeweben trat im Normalserum eine mit zunehmender Drehzahl geringer werdende helle Blaufärbung auf. Schwach positive Proben konnten dadurch schlecht differenziert werden.

Lebergewebe wies bei der geblotteten, noch nicht mit Chromogenlösung inkubierten Membran eine bis 500 x g deutliche, dann abnehmende gelbbraune Farbe der Spots auf. Mit der Chromogenlösung vertiefte sich die Farbe zu braun, was die Erkennung von Intensitätsunterschieden zwischen Antiserum und Normalserum entsprechend erschwerte oder verhinderte.

Alle Proben von Nierengewebe waren bis 500 x g schwarz bis kräftig braun gefärbt und nicht als positiv zu erkennen. Auch bei höheren Drehzahlen verblieb eine gelbgraue Hintergrundfarbe, die positive Proben nur bei einem hohen Keimgehalt identifizierbar machte.

Eine Keimzahlbestimmung bei den hoch erhitzten Gewebeproben des zweiten Versuches

war natürlich nicht möglich. Eine feststellbare positive Reaktion setzte aber auch bei niedrigen Drehzahlen und selbst bei Muskelproben, die die geringste Eigenfarbe aufwiesen, zehn- bis hundertmal mehr Bakterien voraus als bei nicht zentrifugierten reinen Bakteriensuspensionen. Die Empfindlichkeit bezogen auf die Ausgangskeimzahl schwankte bei gleicher Drehzahl um eine bis zwei Zehnerpotenzen in den Wiederholungsversuchen. Eine unspezifische Chromogenumsetzung durch Gewebeperoxidasen trat nicht mehr auf.

Im dritten Versuch erreichten die beiden bei 130 x g zentrifugierten Nierenproben die errechnete Sollkeimzahl, bei 500 x g fehlten 80 bzw. mehr als 90 % der Bakterien im Überstand. Mit 130 x g zentrifugierte Proben ließen sich bis 900 µl/well, die höher zentrifugierten bis 1450 µl/well filtrieren.

Der Pigmentgehalt der Spots reduzierte sich bei Zentrifugation bei 500 x g besonders bei kleinen Auftragungsvolumina deutlicher als bei 130 x g, ab 700 µl/well bestand aber kein sichtbarer Unterschied mehr. Die hoch zentrifugierten Proben ließen sich wegen der geringeren Hintergrundfärbung besser als positiv erkennen, die Empfindlichkeit lag um etwa eine Zehnerpotenz höher als bei den bei 130 x g zentrifugierten. Dadurch wurde der beobachtete Keimzahlverlust des Überstandes von etwa 90 % ausgeglichen.

Abb. 3 (S. 86) verdeutlicht die verbliebene Hintergrundfärbung und die damit verbundene schlechte Ablesbarkeit der Ergebnisse.

Zusatz eines Detergens / Abhängigkeit der Keimzahl von Drehzahl und Volumen des Überstandes

Im ersten Versuch mit Lebergewebe zeigten die Keimzählungen der Überstände, daß der Einsatz des Detergens (HemoDe) keine Anreicherung erzielte, bei allen mit HemoDe versetzten Proben war die Bakterienmenge bis zu 50% niedriger als bei den Vergleichsproben.

Bei den nicht zentrifugierten Proben fanden sich in allen drei entnommenen Flüssigkeitsmengen (1/, 1/2, 3/4 des gesamten Überstandsvolumens) die gleiche Keimzahl wie bei der Ausgangssuspension. Nach Zentrifugation mit 50 x g stieg die Keimzahl mit zunehmendem Entnahmevermögen von 28 auf 66% der Ausgangssuspension, bei 130 x g lag sie unabhängig vom Volumen bei unter 10%.

Vollständig filtriert werden konnten die aufgetragenen 100 µl/well nur bei einer Verdünnung der Überstände auf 1:100 w/v und Zentrifugation bei 130 x g. Bei niedriger verdünnten Proben ließen sich die mit HemoDe versetzten geringfügig schlechter filtrieren. Nach den immunologischen Reaktionen blieb die Hintergrundfärbung insgesamt gering, positive Reaktionen waren ohne Probleme erkennbar. Unterschiede durch den Einsatz von HemoDe fanden sich hierbei nicht.

Die für Muskelgewebe ermittelten Keimzahlen wiederholten das Muster der Leberproben: die nicht zentrifugierten Proben enthielten die zugesetzten Bakterien in der gleichen Konzentration wie die Ausgangssuspension, bei 50 x g entsprechend dem Entnahmenvolumen zu 20 bis 50%, bei 130 x g lag die Keimzahl allerdings um zwei Zehnerpotenzen niedriger. HemoDe-Zusatz brachte diesmal keine Veränderungen. Als filtrierbar erwiesen sich 100 µl ab einer Verdünnung von 1:50 w/v bei den abgesetzten, ab 1:20 w/v bei den zentrifugierten Proben. Bei den zentrifugierten Geweben zeigte sich nach der immunologischen Färbung eine deutliche Verminderung der Hintergrundfarbe, positive Proben waren entsprechend ihrem Keimgehalt gut zu erkennen.

Beim Nierengewebe wiesen die Überstände entsprechend der höheren Drehzahlen um zwei bzw. drei Zehnerpotenzen kleinere Keimzahlen auf als die Ausgangssuspension, die mit HemoDe versetzten Proben noch geringfügig niedrigere. Eine ausreichende Filtrierbarkeit erreichte erst eine 1:50 w/v Verdünnung. Die tiefschwarzen Membranspots der nicht zentrifugierten Vergleichsprobe ließen sich nicht differenzieren. Mit zunehmender Drehzahl ging die Hintergrundfärbung deutlich zurück, positive Proben konnten je nach der Keimzahl mehr oder weniger gut erkannt werden.

Beim wiederholten Versuch mit Nierengewebe waren die mit HemoDe versetzten Proben deutlich schlechter, die mit Trypsin behandelten deutlich besser filterbar als die unbehandelten Vergleichsproben. Eine Beurteilung der 1:50 w/v verdünnten Proben erwies sich als unmöglich, da sich um die Spots große, ineinander laufende Höfe ausgebildet hatten bei dem Versuch, 300 µl/well zu filtrieren. Selbst bei größerer Auftragsmenge setzten sich 1:200 w/v verdünnte Proben hingegen klar voneinander ab. Die Hintergrundfarbe war

bei den hoch zentrifugierten Proben (1000 x g) etwas geringer, bei der Auftragung von 400 - 700 µl/well aber so stark, daß eine Beurteilung nicht möglich war. Eine positive Reaktion konnte allerdings auch bei nur 100µl/well nicht festgestellt werden, da möglicherweise die Keimzahlen nach dem Zentrifugieren zu niedrig lagen.

4.1.2.3 Trypsin-Zusatz zur Verbesserung der Filtrierbarkeit

Eine kurzgefaßte Darstellung der Trypsinwirkung auf Bakterien und Gewebe findet sich unter 4.1.2.8 und 4.1.2.9.

Geeignete Konzentration

Bakteriensuspensionen zeigten nach Inkubation mit 10% w/v Trypsin eine schlechtere Filtrierbarkeit sowie eine verstärkte Reaktion im Normalserum bei verringerter Nachweisbarkeit im Antiserum. Bei niedrigeren Trypsinkonzentrationen traten keine Veränderungen im Vergleich zu nicht behandelten Suspensionen auf.

Bei den Geweben verbesserte sich mit steigender Trypsinkonzentration die Filtrierbarkeit, lediglich Proben mit 0.1 % waren schlechter filtrierbar als unbehandelte.

Die festgestellte Erhöhung der Normalserum-Reaktion korrelierte mit dem höheren Filtrationsvolumen und der resultierenden größeren Gewebemenge auf den Spots.

Ein Trypsinzusatz von 1% w/v zu den 1:10 w/v verdünnten Geweben wurde danach als die Konzentration angesehen, die zu den geringsten potentiellen Veränderungen der Bakterien-Antigene bei ausreichender Erhöhung der Filtrierbarkeit führte, und entsprechend weiterbenutzt.

Optimale Gewebeverdünnung

Bei 1:20 und 1:50 w/v gesamtverdünnten Leberproben konnten weniger als 100 µl/well bei vollem Vakuum filtriert werden. Die Membranspots waren sehr unscharf begrenzt und zum Teil ineinander verlaufen.

Danach stieg die Filtrierbarkeit trypsinisierten Materials mit steigender Verdünnung überproportional an: von der 1:100 Verdünnung waren 350, von der zweihundertfachen 1000 µl/well filtrierbar. Das maximale Filtrationsvolumen der zentrifugierten Proben lag

hingegen bei 450 µl/well. Die Filtrationsgrenze der 1:500 verdünnten Trypsin-Probe wurde nicht erreicht, für zentrifugierte Proben betrug sie 900 µl/well.

Muskulatur ließ sich schon bei einer 1:100, die anderen Organe erst bei einer 1:200 w/v Gesamtverdünnung mit mehr als 500 µl/well filtrieren.

Entsprechende Endverdünnungen wurden für alle weiteren Versuche benutzt.

Optimale Einwirkungsdauer

Beim Vergleich unterschiedlicher Trypsin-Einwirkungszeiten ließen sich folgende Effekte feststellen:

a) die Filtrierbarkeit beider Gewebehomogenate nahm bis 30 bzw. 45 min Inkubationszeit leicht zu (Leber von 1200 auf 1400 µl/well, Niere von 800 auf 1000 µl/well) und blieb dann unverändert.

b) bei den *A.salmonicida*-Suspensionen erforderte eine Inkubationszeit sowohl von 30 wie 60 min. eine vierfach höhere Keimzahl (5.5×10^4 kbE/well) für eine positive Reaktion als in nicht behandelten Proben.

Für Lebergewebe stieg nach 30 min Inkubation die Nachweisgrenze auf den doppelten, nach 60 min auf den vierfachen Keimgehalt. Allerdings verminderte eine Trypsinbehandlung die Blaufärbung der Gewebesots im Normalserum.

c) Kiemenbakterien zeigten ebensowenig wie durch Erhitzen eine Veränderung der Reaktivität. Bei *Y.ruckeri* erhöhte sich die Kreuzreaktivität nach 60 min um eine Zehnerpotenz auf 1.2×10^7 kbE/well, nach 30 min war der Anstieg etwas geringer.

Wurde das Bakterium hingegen Gewebe zugesetzt, blieb die Kreuzreaktivität mit 30 min Trypsin unverändert, nach 60 min lag sie nur um etwa eine Zehnerpotenz höher.

Eine Inkubationszeit von 30 min wurde danach vorgezogen.

4.1.2.4 Pigmentbleichung und Peroxidaseblockierung durch Kaliumpermanganat/ Oxalsäure

Unter 4.1.2.8 und 4.1.2.9 findet sich eine Zusammenfassung der Wirkungen beider Substanzen auf Bakterien und Gewebe.

Wirkung von KMnO_4 / Oxalsäure auf die NC-Membran

KMnO_4 führte zu einer diffusen intensiven Rosafärbung der Membran, die jedoch vollständig durch zweimaliges kurzes Spülen in großen Mengen TBS herausgewaschen wurde. Oxalsäure bewirkte keine sichtbaren Membranveränderungen.

Danach wurde dreimaliges Spülen der Membran in je 200 bis 400 ml TBS nach KMnO_4 und einmaliges Waschen nach Oxalsäureanwendung beibehalten.

Wirkung auf Gewebe

Nach der Einwirkung von KMnO_4 verblaßten die vorher schwarzbraunen Nierenflecken zu rostrot, die anschließende Oxalsäureanwendung führte zu hellgelben Flecken. Es ließ sich mit dieser Kombination zumindest eine deutliche Aufhellung beim ansonsten nicht auswertbaren Nierengewebe erreichen.

Leberproben zeigten nach KMnO_4 zunächst dunklere Spots, die durch Oxalsäure farblos wurden (s. Abb. 1, S. 85). Die Nachweisgrenze lag bei einem etwa doppelt so hohen Keimgehalt wie bei nicht entfärbten Membranspots, die Entscheidungssicherheit verbesserte sich jedoch, da nicht unterschiedliche Brauntöne, sondern Blau gegen Weiß zu beurteilen war.

Milzgewebe wurde ebenfalls farblos im Neutralserum und damit positive Proben problemlos erkennbar.

Lösungsmittel für KMnO_4 und Oxalsäure

KMnO_4 färbte die TBS-Lösung sofort bräunlich, es bildete sich ein unlöslicher brauner Niederschlag, während Oxalsäure sich sehr schlecht in TBS löste.

Sowohl in A.dest. als auch PBS waren beide Substanzen schnell und vollständig löslich. Der pH-Wert von 1% w/v von Oxalsäure lag in A.dest. bei 2, in PBS bei 3.5.

Da die Wirkungen von KMnO_4 und Oxalsäure vom pH abhängen (s. u), wurde PBS als Lösungsmittel vorgezogen, um eine größere pH-Konstanz zu gewährleisten.

Anwendung der Enfärbung vor oder nach der Membranblockierung

Die vor dem Blockieren entfärbte Membran zeigte im Normalserum völlig farblose Spots, im Antiserum war eine deutliche positive Blaufärbung zu erkennen.

Bei der Anwendung von KMnO_4 /Oxalsäure nach dem Blockieren trat eine zartviolette

Restfärbung auf, die positive Antiserumreaktion war viel etwas schwächer aus als bei den sofort entfärbten Membranteilen.

Ein Entfärben vor dem Blockieren wurde danach vorgezogen.

Einzelwirkungen von KMnO_4 und Oxalsäure, pH-Abhängigkeit

pH-Wert der KMnO_4 -Lösung

Die Anwendung von KMnO_4 ohne Oxalsäure führte dazu, daß die Membranspots geringfügig (pH 9.6) bis deutlich (pH 2.5) brauner wurden als auf der unbehandelten Membran. Mit anschließender Oxalsäure-Einwirkung ließ sich bei $\text{pH} \leq 7.5$ Farblosigkeit (Leber) bzw. eine hellgelbe Färbung (Milz) erreichen. Bei pH 9.6 blieb eine gelbe bzw. hellbraune Hintergrundfarbe zurück.

Nach den immunologischen Reaktionen waren die ohne Oxalsäure behandelten, *A. salmonicida*-haltigen Proben ebenso wie die Negativkontrollen in Antiserum und Neutralserum gleichermaßen blau (Leber, pH 9.6) oder schwarz gefärbt. Alle mit KMnO_4 und Oxalsäure entfärbten Milzproben zeigten sich gleichmäßig beigefarben, bei pH 2.5 waren sie heller; eine positive Reaktion fehlte. Negative Leberkontrollspots waren hingegen in beiden Seren, positive Proben im Neutralserum farblos. Die Farbintensität der Antiserum-Reaktion nahm mit sinkendem pH ab, bei pH 2.5 ließ sich keine positive Blaufärbung mehr feststellen.

Im zweiten Versuch entfärbte KMnO_4 bei allen pH-Werten (7.5 bis 3.0) zusammen mit Oxalsäure die Leberproben vollständig, bakterienhaltige spots reagierten positiv im Antiserum. Die alleinige Anwendung von Oxalsäure beließ die Gewebefarbe unverändert. Nach der immunologischen Reaktion ließ sich die nur mit Oxalsäure behandelte Probe als positiv erkennen. Bei Anwendung von KMnO_4 und Oxalsäure traten positive Reaktionen nur bis pH 4 mit abnehmender Deutlichkeit auf, die bei pH 3 inkubierte Probe blieb negativ.

pH-Wert der Oxalsäure-Lösung

Oxalsäurelösungen mit einem pH von 3.5 entfärbten die Membran vollständig, positive

Proben traten eindeutig hervor. Bei pH 6 blieb eine deutliche Peroxidase-Aktivität bestehen, *A.salmonicida*-haltige Spots reagierten aber im Antiserum stärker und damit positiv. Eine Differenzierung positiver Reaktionen bei einem pH von 7.5 war hingegen nicht möglich, da alle Membranspots unverändert dunkel blieben.

Konzentrationen, Einwirkungszeiten

Alle gebleichten Membranen zeigten farblose Spots bei Leber-Negativkontrollen und im Neutralserum, das hingegen bei den nicht oxidierten Proben eine deutliche Blaufärbung aufwies. Die Nachweisempfindlichkeit war bei ungebleichten und den für 10 min in KMnO_4 behandelten Spots gleich, nach 30 min KMnO_4 eine und nach 60 min drei Verdünnungsstufen schlechter. Durch lange Einwirkungszeiten von KMnO_4 kam es demzufolge zu einer Heraufsetzung der Nachweisgrenze um maximal eine Zehnerpotenz, die Erkennung schwach positiver Proben gelang aber sehr viel leichter.

Durch unterschiedlich lange Oxalsäure-Einwirkungen ergaben sich keine Veränderungen der Hintergrundfarbe oder Empfindlichkeit.

Im zweiten Versuchsteil erschienen die für 10 min behandelten Spots zunächst dunkler, nach Oxalsäure deutlich heller als die für 2 min entfärbten Membranspots.

Die Nachweisempfindlichkeit positiver Proben im Antiserum ließ sowohl mit längerer Einwirkungszeit als auch mit steigender KMnO_4 -Konzentration um maximal eine Zehnerpotenz nach: 2 min in 0.05 % gebleichte Proben mit 5×10^3 kbE/well reagierten genau so intensiv wie Spots mit einem Antigenhalt von 4×10^4 kbE/well, die mit 0.25 % für 10 min inkubiert worden waren. Bei niedriger Konzentration und kurzer Einwirkungszeit (0.05 % 2 und 5 min, 0.1% 2 min) lag die Mindestkeimmenge pro well gleich hoch wie bei nicht entfärbten Proben, die Grenzziehung zwischen positiv und negativ wegen der fehlenden Hintergrundfarbe gelang aber besser.

Die nachlassende Färbbarkeit von *A.salmonicida* durch KMnO_4 trat bei reinen Bakterien-Suspensionen stärker, bei Nieren-Bakterien-Gemischen dagegen deutlich geringer in Erscheinung als bei den Leber-Bakterien-Mischungen.

Wiederholte KMnO_4 /Oxalsäure-Anwendung

Die wiederholte Anwendung von KMnO_4 /Oxalsäure bewirkte eine erheblich bessere Entfärbung und Peroxidaseblockierung (s. Abb. 1, S. 85). Die Empfindlichkeit lag doppelt so hoch wie bei nicht wiederholter, insgesamt aber gleichlanger Einwirkung.

Kreuzreaktivität

Mit längerer Einwirkungsdauer und steigender Konzentration von KMnO_4 stieg die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* am wenigsten in Nierengewebe an, bei keiner Probe aber um mehr als eine Zehnerpotenz. Durch eine zweimalige Anwendung von KMnO_4 und Oxalsäure erhöhte sich die Kreuzreaktivität weniger stark als bei gleichlanger, nicht wiederholter Inkubation.

4.1.2.5 Blockierung der Peroxidase-Aktivität durch SDS

Allein mit SDS inkubiertes Milzgewebe blieb auch bei einer sonst ausreichenden Gewebeverdünnung von 1:200 w/v nur mit 50 μl /well filtrierbar. Trypsin-vorbehandelte Gewebeproben filtrierten nach dem Zusatz von SDS geringfügig schlechter als ohne.

Nach der immunologischen Färbung trat bei den mit SDS inkubierten Proben neben der Gewebeeigenfarbe sowohl im Antiserum wie im Neutralserum eine intensive Blaufärbung infolge einer unspezifischen, peroxidatischen Chromogenumsetzung auf. Die mit *A.salmonicida* versetzten Proben konnten weder bei Leber- noch bei Milzgewebe als positiv erkannt werden, während bei den mit KMnO_4 / Oxalsäure gebleichten und weitgehend hintergrundfreien Proben keine Schwierigkeit bestanden.

4.1.2.6 Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Die durch H_2O_2 bei Bakterien und Geweben hervorgerufenen Effekte sind nochmals kurz unter 4.1.2.8 und 4.1.2.9 zusammengefaßt.

Wirkung auf Gewebe

Zwischen den in H_2O_2 -Blockierlösung- und den H_2O_2 -PBS-behandelten Membranen gab

es hinsichtlich der Hintergrundfärbung und Peroxidase-Aktivität keinen Unterschied. Die für zweimal 20 Stunden (H_2O_2 -PBS und anschließende Blockierung über Nacht) inkubierte Membran wies jedoch schwächer positive und insgesamt verwaschenere Spots auf. Demnach bot sich der Zusatz von H_2O_2 zur Blockierlösung als weiter anzuwendendes Verfahren an.

Mit steigender H_2O_2 -Konzentration reduzierte sich die Hintergrundfärbung aller Gewebe (s. Abb. 2, S. 85). Bei 1% und 5% v/v blieb jedoch eine braune bis graue Farbe der Spots bestehen. Positive Proben konnten ab 1% , bei Nierengewebe erst bei 5% erkannt werden; die Nachweisgrenze lag im Durchschnitt bei 1×10^4 kbE/well. Bei 16.5% erschienen Leber- und Milzspots farblos, mit zunehmender Auftragungsmenge (Leber 700, Milz 300 μl /well) trat aber eine sichtbare Reaktion mit der Chromogenlösung auf. Kiemen- und Darmgewebe wurde aufgehellt, zeigte aber schon ab 100 μl /well blaue Spots.

Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität

Bei den nur mit H_2O_2 behandelten Leberproben trat eine leichte Blaufärbung aller Spots im Antiserum und Normalserum auf, eine positive Reaktion ließ sich aber durch Vergleich der Farbintensitäten erkennen. Mit Trypsin und H_2O_2 inkubierte Proben blieben hingegen farblos im Neutralserum.

Die Nachweisempfindlichkeit von *A.salmonicida* veränderte sich bei keiner der H_2O_2 -Konzentration, die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* stieg nur bei der Kombination von Trypsin und 10% H_2O_2 v/v um eine Zehnerpotenz an.

4.1.2.7 Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung mit einer Kombination von KMnO_4 /Oxalsäure und H_2O_2

Unter 4.1.2.8 und 4.1.2.9 findet sich eine Zusammenfassung der Einzelwirkungen.

Wirkung auf Gewebe

H_2O_2 in einer Konzentration von 1% v/v bewirkte im Anschluß an eine einmalige, fünfminütige KMnO_4 /Oxalsäure-Einwirkung auf Nierengewebe keine zusätzliche Aufhellung der Membranspots, eine Erkennung positiver Proben war nicht möglich. 5% H_2O_2 allein und

seine Kombination mit einmaliger kurzer KMnO_4 -Einwirkung erzielten eine deutliche Aufhellung, eine Restperoxidase-Aktivität blieb aber bestehen. Kombinationen von wiederholter KMnO_4 -Einwirkung (2x5 min) mit H_2O_2 führten zu einer ebenso minimalen Hintergrundfarbe wie 2x15 min KMnO_4 ohne H_2O_2 , eine Blaufärbung im Normalserum trat nicht mehr auf (s. Abb. 2, S. 85). Die Farbintensität der positiven Reaktion war bei der Kombination mit 1% H_2O_2 am größten, bei 2x15 min KMnO_4 am geringsten.

Herz- und Milzgewebe ließen sich wie Nierengewebe optimal bleichen mit einer Kombination aus je 2x5 min KMnO_4 / Oxalsäure und 1% H_2O_2 bei hoher Farbintensität der positiven Proben im Antiserum. Muskulatur, Kiemen, Darm und Lebergewebe erwiesen sich schon nach 1x5+1x5min+1% H_2O_2 als ausreichend entfärbt und frei von Peroxidase-Aktivität. Bei längeren KMnO_4 -Einwirkungen kam es zu einer Beeinträchtigung der Farbreaktion positiver Proben, die H_2O_2 -Konzentration hatte keinen sichtbaren Effekt.

Nachweisgrenze und Kreuzreaktivität

Unbehandelte *A.salmonicida* reagierten bis zu einer Keimdichte von 1.2×10^4 kbE/well positiv, *Y.ruckeri* bis 1.1×10^7 kbE/well mit dem *A.salmonicida*-Antiserum.

Durch eine KMnO_4 -Einwirkung von 5 min verdoppelte sich der Mindestkeimgehalt von *A.salmonicida* für eine positive Reaktion, bei 2x5 min + H_2O_2 lag die Nachweisgrenze etwa fünfmal höher.

Die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* veränderte sich durch die kurze $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung nicht, bei 2x5 min + 1% H_2O_2 stieg sie um etwa eine Zehnerpotenz an.

Bei den bakterienhaltigen Leberproben waren die Abweichungen von unbehandelten Spots geringer. Die Nachweisgrenze von *A.salmonicida* verdoppelte sich nur durch die Anwendung der Kombination mit längerer KMnO_4 -Einwirkung, die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* blieb unverändert.

Nach diesen Ergebnissen wurde die Kombination von KMnO_4 /Oxalsäure und 1% H_2O_2 als Methode zur Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung in nachfolgenden Versuchen bevorzugt.

4.1.2.8 Tab.1: Auswirkungen von Trypsin, Wasserstoffperoxid und Kombinationen mit Kaliumpermanganat und Oxalsäure auf die Nachweisbarkeit von *A.salmonicida* (A.sal.) und die Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* (Y.r.) in Lebergewebe

Tr = Trypsin 1% w/v 30 min, % = v/v H₂O₂; 1x5=KMnO₄ 5 min + Oxalsäure 5 min; 2x5=KMnO₄/Oxalsäure wiederholt; P=Restperoxidase-Hintergrund; ↑=steigt; = = unverändert

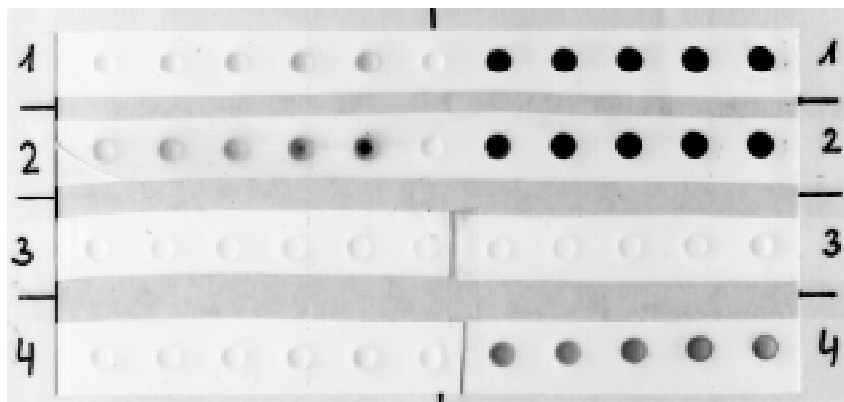
Behandlungsmethode	Peroxidase	Nachweisgrenze A.sal. kbE/well	Kreuzreaktivität Y.r. kbE/well
1. Unbehandelt	P; dunkelste Spots	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁸
2. Tr. 30 min	P	↑ 2x	=
3. Tr. 60 min	P	↑ 2x	↑ 10x
4.	1% P; weniger als 1.	=	=
5.	5% P; s.4.	=	=
6.	10% P; s.4.	↑ 2x	=
7. Tr. +	1% farblos	↑ 2x	=
8. Tr. +	5% farblos	↑ 2x	↑ 10x
9. Tr. +	10% farblos	↑ 2x	↑ 10x
10.	1x5 P	=	↑ 10x
11.	1x5 + 1% P; besser als 10	=	↑ 10x
12.	1x5 + 5% P; am besten	=	↑ 10x
13.	1x5 + 10% P	↑ 4x	↑ 100x
14. Tr. +	1x5 + 1% farblos	↑ 2x	↑ 10x
15. Tr. +	1x5 + 5% farblos	↑ 4x	↑ 10x
16. Tr. +	1x5 + 10% farblos	↑ 8x	↑ 100x
17.	2x5 farblos	↑ 2x	↑ 10x
18.	2x5 + 1% farblos	↑ 2x	↑ 10x
19.	2x5 + 5% farblos	↑ 4x	↑ 10x
20.	2x5 + 10% farblos	↑ 8x	↑ 100x
21. Tr. +	2x5 farblos	↑ 2x	↑ 10x
22. Tr. +	2x5 + 1% farblos	↑ 2x	↑ 10x
23. Tr. +	2x5 + 5% farblos	↑ 4x	↑ 10x
24. Tr. +	2x5 + 10% farblos	↑ 4x	↑ 100x

4.1.2.9 Zusammenfassung: Auswirkungen aller Gewebe-Aufbereitungsmethoden im Vergleich

Ass=*A.salmonicida*; Y.r.=*Y.ruckeri*

Substanz	Gewebewirkung	Nachweisgrenze Ass	Kreuzreaktivität Y.r.
Trypsin	Filtrierbarkeit steigt	steigt mit steigender Konzentration und Dauer max. 2x	steigt mit steigender Konzentration und Dauer max. 10x
Erhitzen auf 100°C	unvollständige Peroxidase-Blockierung	sinkt bei reinen Ass stärker als bei Gewebe-Ass max. 10x	steigt bei Gewebe-Y.r.-Mischungen stärker als bei reinen Y.r.; max 100x
Zentrifugieren	Abtrennung von Gewebeteilen	steigt mit steigender Drehzahl; hohe Antigenverluste	
Kaliumpermananganat und Oxalsäure (K/O)	Pigmentbleichung u. Peroxidase-blockierung vollständig	steigt mit steigender Konzentration und Dauer und sinkendem pH; max. 10x, Effekt kleiner in Geweben mit Pigment	steigt mit steigender Konzentration und Dauer; max 10x; Effekt kleiner in Geweben mit Pigment
Wasserstoffperoxid (WP)	Pigmentbleichung u. Peroxidase-Blockierung unvollständig	unverändert bis 10% v/v, max 2x	unverändert
K/O + WP	synergistischer Effekt bei Bleichung u. Blockierung	negativer additiver Effekt bei steigender Konz. und Dauer max. 8x	negativer additiver Effekt; max. 100x bei 10 % WP
Trypsin + K/O	Einzeleffekte unverändert	wie K/O allein	wie K/O allein
Trypsin + WP	bessere Peroxidase-blockierung	wie Trypsin allein	negativer additiver Effekt ab 5%, max 10x
Trypsin + K/O + WP	wie K/O + WP allein	wie K/O + WP allein	wie K/O + WP allein

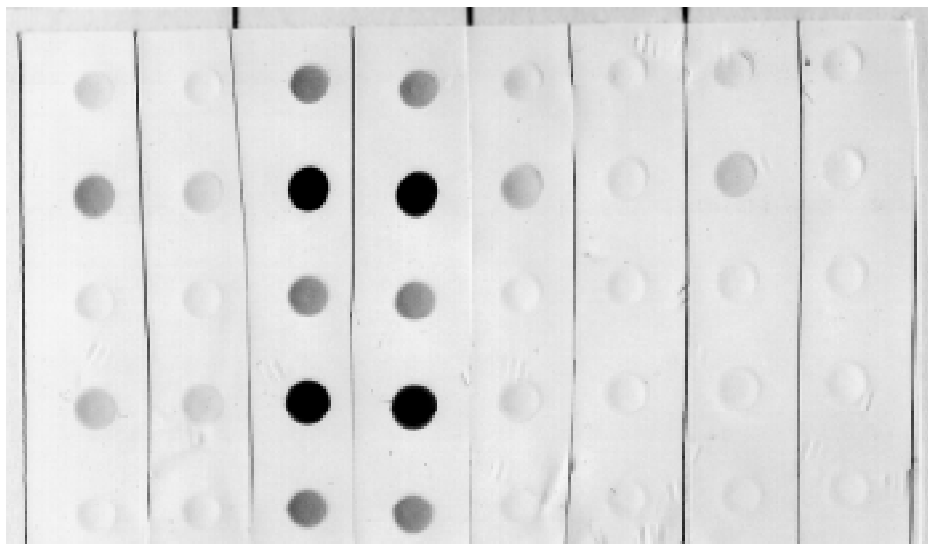
Abbildung 1. Pigmentbleichende Wirkung von Permanganat / Oxalsäure



Lebergewebe (links) und Nierengewebe (rechts), 1:200 w/v; keine immunologische Färbung; Auftragung 100 - 500 µl/well

- 1: geblottetes Gewebe, Hintergrundfarbe durch Pigment
- 2: nach Einwirkung von KMnO_4 : Bildung von Braunstein, Leber erkennbar dunkler
- 3: zweimalige Anwendung von KMnO_4 und Oxalsäure: Leber je 2x5 min, Niere je 2x15 min
- 4: einmalige Anwendung: Leber je 1x10 min, Niere je 1x30 min; Nierengewebe unzureichend entfärbt

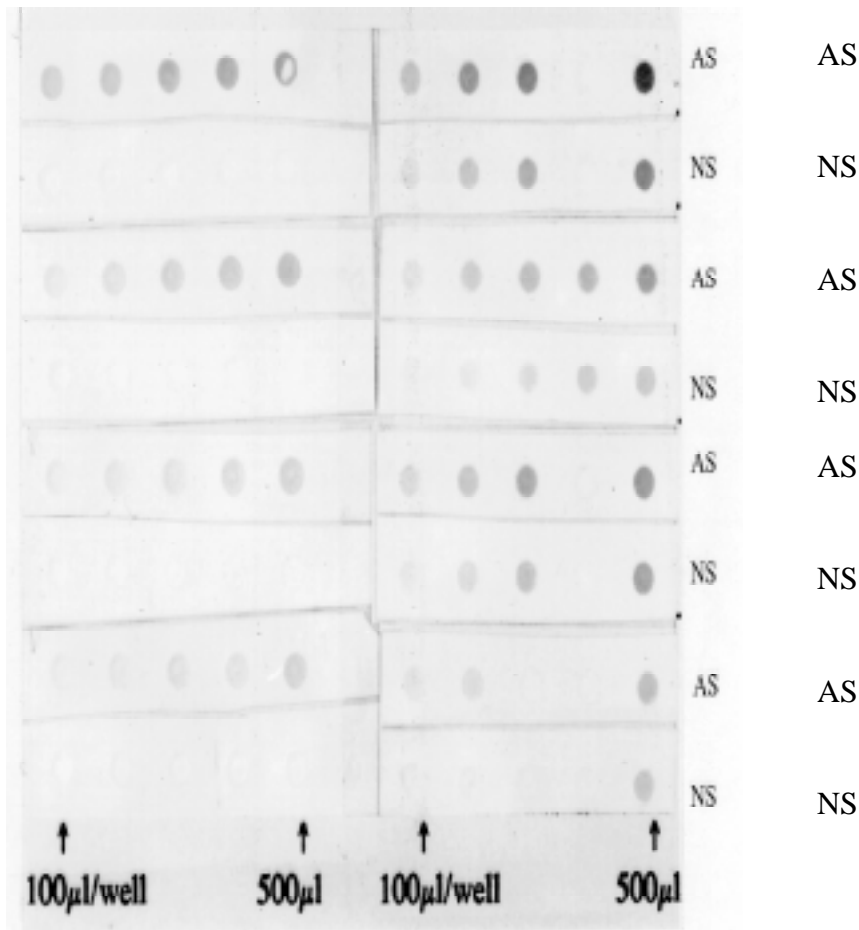
Abbildung 2. Vergleich der Pigmentbleichung und Peroxidase-Blockierung von Permanganat / Oxalsäure und Wasserstoffperoxid



in-vitro-infiziertes Nierengewebe; Keimzahl von *A.salmonicida* in vier logarithmischen Stufen von oben nach unten abnehmend; linke Membranstreifen jeweils in Antiserum gegen *A.salmonicida*, rechte in Normalserum inkubiert.

- 1: Wasserstoffperoxid 5% v/v für 20 h;
 - 2: Wasserstoffperoxid 1% v/v für 20 h
 - 3: Kombination aus je 2x5 min Permanganat / Oxalsäure und 1% v/v Wasserstoffperoxid 20 h
 - 4: je 2x15 min Permanganat /Oxalsäure
- Bei 1. und 2. bleibt eine Hintergrundfärbung im Normalserum zurück, 3. und 4. werden farblos.

Abbildung 3. Vergleich der Gewebeaufbereitung mit Trypsin / Oxidationsmitteln und Erhitzen / Zentrifugieren



in-vitro-infiziertes Nierengewebe, 1:200 w/v; Keimzahl von *A.salmonicida* von oben nach unten in einer Zweiverdünnungsreihe abnehmend; linke Seite Kombination von Trypsin, Permanganat / Oxalsäure und Wasserstoffperoxid; auf der rechten Seite wurden alle Proben 30 min auf 100°C erhitzt und nach Verdünnung mit 150 x g zentrifugiert.

Die Erkennbarkeit einer positiven Reaktion im Antiserum (AS) ist auf der linken Seite durch den weißen Hintergrund im Normalserum (NS) deutlich besser.

4.1.3 Infektionsversuch I: Unterschiede zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-infizierten Geweben, Prüfung der Aufbereitungsverfahren

4.1.3.1 Infektionsverlauf, pathologisch-anatomische Befunde und bakteriologische Untersuchung

Alle Fische zeigten 24 h post infectionem Dunkelfärbung der Haut und verhielten sich sehr ruhig am Beckenboden. Nach 2 Tagen mußte ein Fisch wegen eines Geschwürs an der Injektionsstelle getötet werden. Drei weitere hatten eine geringfügige Schwellung in der Rückenmuskulatur; andere, spezifische Symptome ließen sich nicht feststellen. Sechs Fische wurden 3 Tage, die restlichen fünf 4 Tage nach der Infektion getötet.

Der wegen Geschwürbildung getötete Fisch wies eine ausgedehnte Kolliquationsnekrose in der Muskulatur mit blutiger Durchtränkung des umgebenden Gewebes auf. Die Haut war von diesem Bereich weitgehend abgelöst und fehlte an der Injektionsstelle. Die anderen sechs i.m.-infizierten Fische zeigten eine nachgiebige Erweichung der Rückenmuskulatur entlang des Stichkanales, die Haut war geschlossen, aber dunkel verfärbt.

Bei der Obduktion wurden bei allen i.m.-infizierten Tieren unterschiedlich ausgedehnte Muskelnekrosen und Blutungen im Bereich der Injektionsstelle festgestellt. Die restliche Muskulatur erschien unauffällig. Bei einigen dieser Fische fanden sich mehrere kleine petechiale Blutungsbereiche im Peritoneum. Darm und Herz zeigten sich ohne Befund, die Leber und die Milz waren bei einigen Fischen vergrößert, feucht und abgerundet. Nierengewebe ließ sich bei drei Tieren wegen seiner Weichheit schlecht entnehmen. Das Kiebgewebe war dunkelrotbraun und häufig sehr schleimig.

Von den Kohabitationsfischen wiesen drei Tiere eine Schwellung und Abrundung der Milz auf, sonst blieben alle Befunde unauffällig.

In der bakteriologischen Untersuchung (BU) fanden sich in allen inneren Organen ausschließlich *A.salmonicida* -Kolonien, bei Kiemen und z.T. beim Darm traten Mischkulturen auf.

Die i.m.-infizierten Fische zeigten alle in der Muskulatur ein dichtes Wachstum von *A.salmonicida* (++) , ebenso die Nierenproben (1 Fisch mit nur 1 Kolonie). Die Leberproben waren bei zwei Fischen negativ, die anderen wiesen bis zu 10 Kolonien auf. Milzausstriche blieben bei allen Fischen negativ, möglicherweise war der entnommene

Gewebeteil zu klein. Beim Kiemengewebe ließen sich bei allen Tieren trotz der Mischkultur spezifische Kolonien erkennen (3 Kolonien bis ++), bei den Darmausstrichen wuchs nur bei 3 Tieren *A.salmonicida* (3 Kolonien bis +).

Von den Kohabitanten war nur ein Nierenausstrich mit 2 Kolonien positiv, auf allen anderen Platten konnte *A.salmonicida* nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der BU sind auch in 4.1.4.3 wiedergegeben.

4.1.3.2 Immuno-Dotblot

Eine Zusammenfassung der Unterschiede zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-infizierten Organen und der Wirksamkeit der Aufbereitungsmethoden findet sich unter 4.1.4.3.

4.1.3.2.1 Muskulatur

Entfärben mit KMnO_4 /Oxalsäure

Das Filtrationsvolumen betrug zwischen 600 und 1000 μl /well und lag bei allen Proben infizierter Fische höher als bei den Kontrollen.

Nach der immunologischen Reaktion waren drei der Proben im Antiserum nicht blau, sondern rotbraun bis bläulich braun gefärbt, einer dieser Fische zeigte auch im Normalserum eine hellbraune Farbe. Alle i.m.-infizierten Fische und die Positivkontrolle reagierten im Antiserum deutlicher blau oder zumindest dunkler als im Normalserum und waren damit als positiv zu beurteilen, die Kohabitanten und die Negativkontrolle blieben in Antiserum wie Normalserum gleichermaßen farblos und negativ.

Entfärben mit H_2O_2

Bei größerer Auftragungsmenge zeigte sich bei allen Proben eine z.T. kräftige graublaue Hintergrundfärbung. Positive Proben ließen sich aber durch eine deutlich intensivere Farbe im Antiserum identifizieren.

4.1.3.2.2 Kiemengewebe

Bleichen mit KMnO_4 /Oxalsäure

Während die Kontrollen keine Hintergrundfärbung aufwiesen und die Positivkontrolle erkennbar reagierte, erschienen die Spots der Versuchsfische im Antiserum wie Normalse- rum gleichermaßen dunkel. Dabei trat eine Grünfärbung auf, die bei keiner der bis dahin untersuchten Gewebeproben beobachtet worden war. Nach etwa 24 h verfärbten sich die vollständig getrockneten Membranspots braun.

4.1.3.2.2.1 Prüfung aller Inkubationsschritte auf Veränderung der Hintergrundfarbe

unspezifische Reaktionen der Chemikalien

Die Spots von Kontrollgewebe zeigten sich vor jeder weiteren Behandlung hell graugelb. Nicht gebleichte Membranteile waren nach allen Inkubationen grau und positive Re- aktionen nicht erkennbar. Die mit KMnO_4 /Oxalsäure gebleichten Spots wurden farblos, die *A.salmonicida*-haltige Probe reagierte bei Inkubation mit beiden Antikörpern in allen Fällen positiv. Dabei war die Intensität der Reaktion in der Chromogenlösung ohne CoCl_2 oder DAB am geringsten, bei Anwesenheit aller drei Komponenten am stärksten.

Nicht gebleichtes Gewebe des infizierten Fisches F5 wies schon zu Anfang eine dunkler graugelbe Farbe auf als die Kontrollen. Schon beim Zusatz von CoCl_2 oder DAB vertiefte sie sich zu Braun, ebenso wie bei Spots, die mit Antikörpern, aber in unvollständiger Chromogenlösung inkubiert worden waren. Eine grünbraune Färbung trat bei den Proben auf, die mit $\text{CoCl}_2 + \text{DAB}$, $\text{CoCl}_2 + \text{DAB} + \text{H}_2\text{O}_2$ oder mit Antikörpern und vollständiger Chromogenlösung inkubiert wurden. Intensitätsunterschiede konnten dabei nicht fest- gestellt werden.

Dagegen wurde gebleichtes Kiemengewebe von F5 zunächst farblos. Die Spots nahmen jedoch bei Zusatz von Teilen der Chromogenlösung eine zunehmend intensiv gelbe Farbe an. Die Abstufung entsprach der oben beschriebenen, insgesamt blieben die Spots aber heller. Bei Verwendung der vollständigen Färbelösung mit und ohne Antikörper ergab sich auch hier eine grünliche Farbe. Positive Reaktionen im Antiserum traten nicht auf.

Hintergrund nach Erhitzen und Zentrifugieren

Alle Proben der infizierten Fische färbten sich ab 500 µl/well, ein Teil schon bei 100 µl/well grün. Drei Proben konnten richtig als positiv erkannt werden.

Prüfung der Betäubungsart

Nach der Inkubation in der Chromogenlösung wiesen die Gewebesots aller Organe der neuen Kontrollfische eine gelbe bis dunkelgrüne Farbe auf, ein mit der Art der Betäubung zusammenhängendes Muster konnte nicht gefunden werden. Nur Lebergewebe nahm bei allen drei Fischen einen Gelbton an. Längere KMnO_4 /Oxalsäure-Bleichung hellte die Spots auf, Grünfärbung trat aber bei den gleichen Proben wieder in Erscheinung.

Einsatz eines anderen Chromogens (AEC)

Die Kontrollen besaßen keine Hintergrundfärbung, Gewebe mit *A.salmonicida* regierte im Antiserum rötlich gefärbt und damit positiv. Allerdings verblaßte die Reaktion nach einigen Tagen vollständig. Die Proben der Versuchsfische hingegen färbten gleichmäßig hell- bis kräftig braun.

Einsatz von EDTA und Hydrochinon

Alle Spots wiesen nach dem Färben mit DAB die gleiche leuchtend gelbe bis grüngraue Farbe auf, die beim Trocknen zu beige verblaßte. Außer bei Zusatz von Hydrochinon zur Färbelösung konnte eine positive Reaktion jedoch immer erkannt werden.

Bleichen mit H_2O_2

Ein Unterschied zwischen den drei H_2O_2 -Konzentrationen (1%, 5%, 16.5% v/v) wurde nicht festgestellt, alle Membranspots waren graugrün gefärbt.

4.1.3.2.3 Herzgewebe

Bleichung mit KMnO_4 /Oxalsäure

Die Proben hatten alle, je nach Einwirkungszeit der Bleichung, eine gelbe oder dunkelgrün bis hellgraugrüne Farbe. Von den Versuchsfischen konnte keiner als positiv identifiziert werden, die Nachweisgrenze bei der Positivkontrolle lag doppelt so hoch wie bei den kürzer gebleichten anderen Geweben.

Kombination von KMnO_4 /Oxalsäure mit H_2O_2

Das maximale Filtrationsvolumen betrug zwischen 270 und 480 μl /well (vorherige Versuche 370-600), eine Hintergrundfärbung trat diesmal nicht auf. Die Nachweisgrenze für die Positivkontrolle lag 7.5×10^3 kbE/well. Von den sieben i.m.-infizierten Fischen reagierten vier positiv, alle anderen negativ (eine BU war nicht durchgeführt worden).

4.1.3.2.4 Lebergewebe

Entfärben mit KMnO_4 /Oxalsäure im Vergleich zu erhitzten, zentrifugierten Proben

Das maximale Filtrationsvolumen fiel bei allen Proben ungewöhnlich groß aus unabhängig vom Gewicht der Fische und Organe.

Besonders bei den Versuchen mit höheren Serumkonzentrationen trat bei einigen der Fische eine störende blaubräunliche Hintergrundfarbe zu Tage, die bei den auf 100°C erhitzten Proben etwas geringer ausfiel. Der zweite und dritte Versuch konnten aus diesem Grund nicht ausgewertet werden. Bei den beiden anderen Versuchen ließen sich positive Proben nur schwer differenzieren, sie zeigten im Antiserum nur eine sehr zarte Blaufärbung und damit eine nur zweifelhaft positive Reaktion. Zwei der erhitzten Proben wiesen im letzten Versuch noch Peroxidase-Aktivität auf. Die Positivkontrolle reagierte ab 4×10^3 kbE/well positiv, allerdings auch die erhitzte Negativkontrolle.

Die Ergebnisse des letzten Versuches sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Bleichen mit H_2O_2 im Vergleich zu einer Kombination aus KMnO_4 /Oxalsäure und H_2O_2

Nur mit H_2O_2 gebleichtes Lebergewebe der Versuchsfische wies eine Blaugraufärbung infolge einer Restperoxidase-Aktivität auf, die beiden infizierten Proben reagierten aber erkennbar positiv. Kohabitant und Kontrollen zeigten eine insgesamt geringere Hintergrundfärbung.

Bei der Kombination von kurzer KMnO_4 /Oxalsäure-Bleichung mit anschließender H_2O_2 -Einwirkung verminderte sich die Hintergrundfärbung deutlich, und die positiven Proben hoben sich stärker ab, die Positivkontrolle war allerdings geringfügig weniger intensiv gefärbt.

4.1.3.2.5 Nierengewebe

Eine Auswertung der Versuche ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Vergleich zwischen Trypsin / Bleichen und Erhitzen / Zentrifugieren

Nach der immunologischen Färbung trat bei einer Probe eine leicht grünliche, später hellgraue Hintergrundfarbe auf, alle anderen blieben farblos. Die auf 100°C erhitzte Positivkontrolle reagierte auch bei 3500 µl/well nur sehr schwach, die mit Trypsin behandelte schon ab 100 µl/well eindeutig positiv. Gemessen an den Ergebnissen der BU wurden von den Trypsin-behandelten Fischen vier als richtig positiv, einer als falsch positiv und zwei als falsch negativ beurteilt, hiervon einer mit nur einer Kolonie in der BU (7/10 Proben richtig).

Bei den erhitzten Proben ergab ein Vergleich mit der BU 4/10 richtige, zwei falsch negative (beide mit ++ Wachstumsdichte in der BU) und fünf falsch positive Resultate bei 3500 µl/well. Wurden hier nur die Spots bis 500 µl/well berücksichtigt, verbesserte sich das Ergebnis auf 5/10 richtig beurteilte Proben, alle anderen waren falsch negativ.

Bleichen mit KMnO₄ /Oxalsäure

Es konnte nicht ermittelt werden, ob das so viel kleinere Filtrationsvolumen im dritten Versuch durch eine fehlerhafte Verdünnung, unzureichenden Trypsinzusatz oder zu häufiges / zu langes Einfrieren verursacht wurde, da nicht mehr genug Material für einen Wiederholungsversuch vorlag.

Im zweiten Versuch wurden im Vergleich zur BU fünf Proben als richtig positiv bewertet, eine als richtig negativ und eine als falsch positiv, die gleiche wie beim ersten Blot. Zusammen mit dem ersten Versuch ergaben sich 11/12 richtig beurteilte und eine falsch positive Probe.

Im dritten Versuch stimmten die Ergebnisse der neun untersuchten Proben mit denen der BU überein. Die Positivkontrolle zeigte eine Reaktion ab 7.5×10^3 kbE/well.

Tabelle I: Infektionsversuch I:**Vergleich der Nachweisbarkeit von *Aeromonas salmonicida***

Fisch	Status	Lebergewebe			Nierengewebe			
		BU	Immuno-Dotblot		BU	Immuno-Dotblot		
			K+Z	T+E		K+Z	T+E	T+E
F3	i.m.	2	--	--	++	--	+	+
F4	i.m.	10	--	(+)	++	--	nd	+
F5	i.m.	10	--	(+)	++	(+)	nd	+
F6	i.m.	2	--	--	+	nd	+	+
F7	Khb	1	(+)	--	2	nd	(+)	nd
F8	i.m.	--	--	--	++	(+)	(+)	+
F10	Khb	--	+	--	--	+	(+)	--
F11	i.m.	--	(+)	(+)	1	+	+	+
F12	Khb	--	--	--	--	+	--	nd
F13	i.m.	1	(+)	--	+	+	nd	+
F14	Khb	--	(+)	--	--	+	nd	--
F15	Khb	--	--	--	--	+	nd	-

Legende:

Status: Fisch i.m.-infiziert (i.m.) oder Kohabitant (Khb);

BU: bakteriologische Untersuchung auf Agarplatten;

Immuno-Dotblot: vgl. 4.1.3.1.3 und 4.1.3.1.4;

K+Z: Aufbereitung der Gewebe durch Erhitzen auf 100° C und Zentrifugieren;

T+E: Aufbereitung durch Trypsin und Bleichen mit Kaliumpermanganat und Oxalsäure;

BU-Ergebnisse: -- = negatives Ergebnis; 1-10 = Zahl der *Aeromonas salmonicida*-Kolonien pro Platte; + - ++ = mittleres bis dichtes Wachstum;

Immuno-Dotblot-Ergebnisse: -- = negativ, (+) = schwach positiv; + = positives Ergebnis;

nd = nicht untersucht

4.1.3.2.6 Milzgewebe

Bleichen mit KMnO_4 /Oxalsäure

Der Versuch war nicht auswertbar, alle Spots der Versuchsfische zeigten in Antiserum und Normalserum eine gleichermaßen blaue oder grüne Farbe, während die Kontrollen eine nur geringe Hintergrundfärbung aufwiesen.

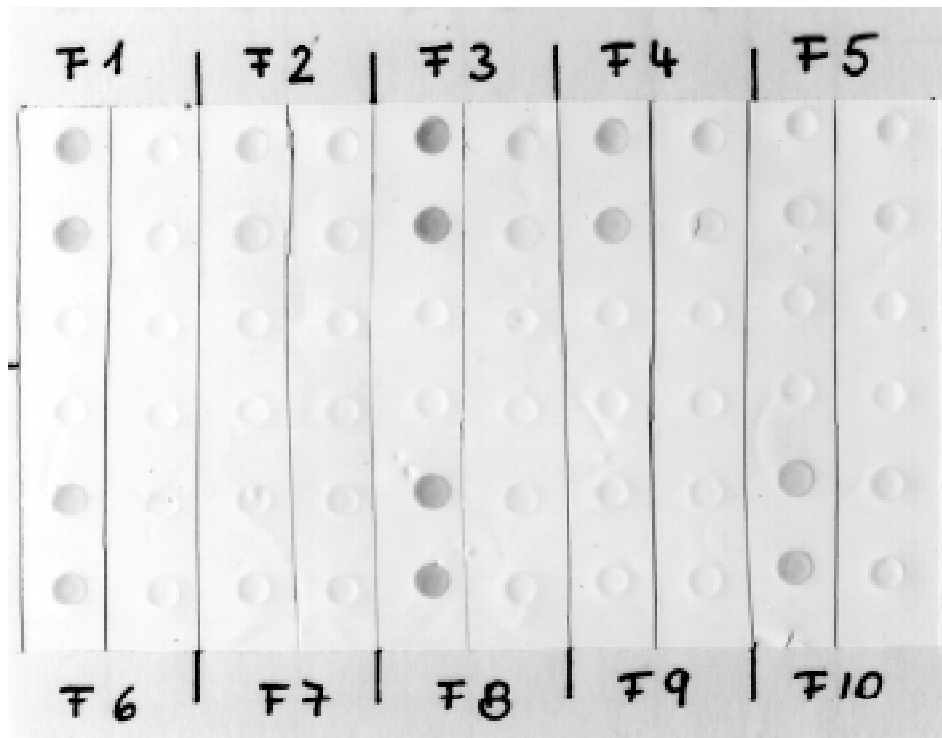
Andere Methoden (KMnO_4 , H_2O_2 , AEC)

Die zunächst dunkelbraunen Membranspots wurden nach einer verlängerten Bleichung mit KMnO_4 / Oxalsäure farblos, mit H_2O_2 je nach Auftragsmenge farblos bis hellgrau. Bei Anwendung der Chromogenlösung mit DAB erschienen sie grau bis graubraun, mit einer AEC-Färbelösung orangefarben. Positive Reaktionen der mit *A.salmonicida* versetzten Proben traten nach Bleichen mit H_2O_2 schon bei einer wesentlich niedrigeren Keimzahl auf als bei KMnO_4 / Oxalsäure, und waren mit einer DAB-Färbung besser erkennbar als mit AEC.

In den weiteren Versuchen nahm die Gewebebleichung mit steigender H_2O_2 -Konzentration zu, eine vollständige Blockierung der endogenen Peroxidasen hingegen wurde auch mit 16.5% nicht erreicht. Die mit Kombinationen aus KMnO_4 und H_2O_2 gebleichten Membranspots zeigten sich deutlich aufgehellt, dabei wirkte eine längere KMnO_4 -Einwirkung effektiver als eine höhere H_2O_2 -Konzentration. Die Kombination mit 5% H_2O_2 bewirkte dabei eine schlechtere Differenzierbarkeit und eine niedrigere Empfindlichkeit als die mit 1%.

Gewebe von infizierten Fischen

Die mit einer Kombination von KMnO_4 und H_2O_2 entfärbten Spots zeigten diesmal nach Inkubation in Chromogenlösung eine vom Infektionsstatus des jeweiligen Fisches unabhängige sehr helle oder deutlich graue Hintergrundfarbe, die jedoch positive Reaktionen klar zu erkennen gab. Alle sieben i.m.-infizierten Fische reagierten positiv, die fünf Kohabitanten negativ (S. Abb. 4, S. 95). Die BU hatte in keiner Milzprobe *A.salmonicida* nachweisen können.

Abbildung 4. Immuno-Dotblot von *in-vivo* infizierten Milzgeweben

F1-4, 6, 8, 10: Gewebe von intramuskulär mit *A. salmonicida* infizierten Fischen

F5, 7, 9: Kohabitationsfische

jeweils links Antiserum gegen *A. salmonicida*, rechts Normalserum

Auftragung 300 und 600 µl/well

Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung mit je 2x5 min Permanganat / Oxalsäure und 1% v/v Wasserstoffperoxid über Nacht

4.1.3.2.7 Darmgewebe

Keine der untersuchten Bleichungsmethoden erzielte ein befriedigendes Resultat. Die Membranspots zeigten zunächst eine graugrüne, in späteren Versuchen eine dunkelgraue Hintergrundfarbe. Eine sichere Beurteilung positiver Proben war so in keinem Fall möglich.

4.1.4 Infektionsversuch II - Unterscheidbarkeit septikämischer Infektionen

4.1.4.1 Infektionsverlauf

Nach 24 h entwickelten zwei, nach 48 h vier der mit *A.salmonicida* infizierten Fische eine Hyperpigmentierung und sonderten sich ab. Eines der *Y.ruckeri*-infizierten Tiere zog sich ebenfalls zurück. Nach 72 h wurde einer der *Y.ruckeri*-Fische (F18) tot aufgefunden, das Verhalten der anderen hatte sich nicht weiter verändert.

Die beiden Kontrollfische waren bei der adspektorischen Untersuchung unauffällig und in der BU negativ.

F18 zeigte Anzeichen einer schweren Septikämie (Rötungen und Gefäßinjektionen der Seitenlinie und aller Flossenansätze, punktförmige Blutungen am Anus sowie der Maulhöhle und den Kiemen; blutige Flüssigkeit in der Bauchhöhle, petechiale Blutungen im Peritoneum, Splenomegalie, blutige Imbibition der Darmwand). Die BU ergab in Muskulatur, Niere, Milz und Herz dichtes Wachstum von *Y.ruckeri*. Bei einem weiteren mit *Y.ruckeri* infizierten Fisch fielen keinerlei makroskopisch sichtbaren Veränderungen auf, er war aber in der BU der Niere hochgradig, im Herzgewebe gering *Y.ruckeri*-positiv. Der dritte wies eine leichte Rötung von Flossenansätzen, Maulinnenseite und Anus sowie Splenomegalie und starke Rötung des Enddarmes auf. Kulturell ließen sich *Y.ruckeri* in geringer Dichte in Herz- und Milzgewebe nachweisen.

Bei der Untersuchung der *A.salmonicida*-infizierten Tiere wurden nur geringfügige pathologische Veränderungen festgestellt. In der Muskulatur an der Injektionsstelle wiesen alle Fische eine engbegrenzte Blutung entlang des Stichkanales auf, die BU ergab hier immer positive Ergebnisse (Wachstumsdichte von 1 Kolonie bis sehr hoch). Zwei Fische zeigten eine Milzvergrößerung. Positive BU-Ergebnisse traten nur in zwei Organen auf (Herz F22, Milz F23).

4.1.4.2 Immuno-Dotblot

Bei Nieren-, Milz- und Darmgewebe blieb bei einigen Fischen eine gelbe Restfärbung auf der Membran zurück, die aber die Erkennbarkeit einer positiven Blaufärbung im Antise-

rum nicht behinderte.

Die Proben nicht infizierter Fische erwiesen sich in allen Versuchen als negativ.

Muskelgewebe sämtlicher *A.salmonicida*-Fische reagierte im Immuno-Dotblot unabhängig von der Koloniedichte in der BU stark positiv, ebenso wie die beiden BU-positiven inneren Organe. Alle anderen Proben blieben negativ im *A.salmonicida*-Antiserum. Reaktionen mit dem Anti-*Y.ruckeri*-Serum traten nicht auf.

Bei den beiden getöteten *Y.ruckeri*-Fischen bestätigten sich die positiven BU-Ergebnisse von Niere und Milz mit dem Antiserum gegen *Y.ruckeri*, die beiden Herzproben blieben negativ. Die BU-positiven Organe des gestorbenen Fisches reagierten im Immuno-Dotblot alle stark im *Y.ruckeri*-Antiserum. Bei ihnen traten allerdings auch schwache, aber eindeutig positive Reaktionen mit dem *A.salmonicida*-Antiserum auf, die zu einem falsch positiven Ergebnis bei einer Untersuchung auf Furunkulose geführt hätten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten und zweiten Infektionsversuches findet sich unter 4.1.4.3.

4.1.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von Infektionsversuch I und II

1. Der Peroxidase- und Pigmentgehalt war abhängig von der Art der Gewebe, individuell verschieden und bei einer septikämischen Erkrankung erhöht unabhängig vom verursachenden Bakterium.

2. Endogene Peroxidase-Aktivität war zu blockieren / Pigment war zu bleichen

durch	gesunde Gewebe	Organe bei Septikämie
Erhitzen und Zentrifugieren	ja / teilweise	teilweise / teilweise
Wasserstoffperoxid	teilweise/ nein	nein / nein
Kaliumpermanganat/Oxalsäure	ja / teilweise	teilweise / teilweise
Kaliumpermanganat/Oxalsäure kombiniert mit Wasserstoffperoxid	ja / ja	ja / weitgehend

Die Oxidationsmittel zeigten sich am wirkungsvollsten bei Nieren- und Lebergewebe; Milz-, Herz- und Darmgewebe wiesen zum Teil eine nicht zu beseitigende Restfärbung auf; Kiemengewebe eignete sich nicht zum Nachweis von Bakterien mit dem Immuno-Dotblot wegen des intensiven Hintergrundes.

3. Nachweishäufigkeit von *A.salmonicida* in den einzelnen Organen durch Immuno-Dotblot

Peroxidase-Blockierung und Pigmentbleichung mit einer Kombination von Kaliumpermanganat / Oxalsäure und Wasserstoffperoxid

	Infektionsversuch I (12 Fische)		Infektionsversuch II (5 Fische)	
	Immuno-Dotblot	kulturell	Immuno-Dotblot	kulturell
Muskulatur	7	7	5	5
Niere	9	8	0	0
Leber	3	6	0	0
Milz	5	0	1	1
Herz	4	nicht untersucht	1	1
Kiemen	0	12	nicht untersucht	
Darm	0	3	0	0

4.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität

Festlegung der optimalen Serumverdünnungen, Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität

A.salmonicida reagierte in allen Serumverdünnungen und GARPO-Konzentrationen positiv bis 1×10^4 kbE/well. Bis 1:20 000 lag die Nachweisgrenze bei 5×10^3 kbE/well, mit sinkender Serumkonzentration schwächte sich die Farbintensität allerdings ab.

Y.ruckeri zeigte mit seinem homologen Antiserum deutlich positive Reaktionen bei Serumverdünnungen bis 1:20 000 und allen GARPO-Konzentrationen bis 2.5×10^4 kbE/well. Bei höheren Verdünnungen ließ die Signalstärke bei reinen Bakteriensuspensio-

nen stärker nach als bei Gewebe-*Y.ruckeri*-Mischungen.

Eine Kreuzreaktivität von *A.salmonicida* mit Antiserum gegen *Y.ruckeri* trat bis zu einer Keimdichte von 1×10^6 kbE/well bei der niedrigsten Verdünnung auf, bei 1:20 000 bis 1×10^7 kbE/well. Unterhalb dieser Serumkonzentration kam es auch im Normalserum zu einer schwachen Reaktion.

Das *A.salmonicida*-Antiserum reagierte positiv mit *Y.ruckeri* bis 5×10^6 kbE/well oder 5×10^7 kbE/well, je nach Verdünnung. Auch hier trat unter 1:20 000 eine deutliche Normalserumreaktion auf. Der Unterschied in der Farbintensität zwischen Antiserum und Normalserum, auf dem eine positive Diagnose beruhte, blieb jedoch stets gleich.

In den nachfolgenden Versuchen wurden alle Seren und GARPO auf 1:20 000 verdünnt verwendet.

Prüfung der Kreuzreaktivität auf Spezifität mit adsorbierten Seren

Das mit *Y.ruckeri* adsorbierte Anti-*A.salmonicida*-Serum zeigte im Vergleich zum nicht adsorbierten Serum keine feststellbare Veränderung der Nachweisempfindlichkeit von *A.salmonicida*, die Farbintensität von *Y.ruckeri* verringerte sich minimal. Mit *A.salmonicida* adsorbiertes Antiserum reagierte hingegen bei keiner Keimdichte mit *A.salmonicida* oder *Y.ruckeri*. Die beobachtete Kreuzreaktivität von *Y.ruckeri* beruhte demzufolge auf spezifischen Antikörpern gegen *A.salmonicida*.

4.1.6 Immunfluoreszenz

4.1.6.1 Prüfung auf Eigenfluoreszenz / unspezifische Antikörper-Bindung

Weder bei Bakterien noch bei Geweben bildete sich nach Gegenfärbung mit Evans Blue eine Autofluoreszenz aus. Wurde GARFITC ohne spezifischen Antikörper angewendet, ließen sich bei Verdünnungen bis 1:100 schwache Bakterienkonturen erkennen, Lebergewebe zeigte mehr als Nierengewebe eine leichte, diffuse Hintergrundfluoreszenz.

4.1.6.2 Ermittlung einer geeigneten Antiserum- und GARFITC - Konzentration

Prüfung mit Bakteriensuspensionen

Bis zu einer Antiserum-Verdünnung von 1:160 wurde die Fluoreszenz-Intensität (FI) mit 4+ bei optimaler Uniformität bewertet. Danach sank die FI kontinuierlich bis 1.5+ bei akzeptabler Uniformität, erst bei einer Antiserum-Verdünnung von 1:10240 lag die FI bei 1.0+. Die Reaktion im Normalserum verminderte sich bis 1:320 kontinuierlich von 4+ bis 1.0+, hier war die Uniformität erstmals nicht mehr akzeptabel. Bei höheren Verdünnungen trat im Normalserum keine Fluoreszenz mehr auf.

Mit GARFITC-Konzentrationen zwischen 1:10 und 1:80 betrug im Antiserum die FI 4+, bis 1:500 erreichte sie 3.0+ und lag erst ab 1:5120 unter 1.0+. Die Uniformität konnte bis 1:500 als optimal gelten. Mit Normalserum wurde nur bis zu einer GARFITC-Verdünnung von 1:80 eine FI von 1.0+ mit akzeptabler Uniformität beobachtet.

Prüfung bei Gewebe-Bakterien-Mischungen

Die FI war hier insgesamt niedriger als bei reinen Bakteriensuspensionen. Bei maximaler Antiserum- und GARFITC-Konzentration betrug sie nur 3.0+ bei akzeptabler Uniformität. Sie verringerte sich mit sinkender GARFITC-Konzentration stärker als mit sinkender Antiserum-Konzentration, bei einer 1:320 Verdünnung lag sie maximal bei 1.5+. GARFITC-Verdünnungen von 1:80 führten zusammen mit Normalserum zu einer FI von 1.0+ mit z.T. akzeptabler Uniformität, bei 1:160 betrug die FI bei allen Neutralserum-Konzentrationen weniger als 1.0+.

Es fiel auf, daß nur bei dem A-Protein-negativen Isolat eine klare Konturierung der Bakterienzellen auftrat. Gewebe-*A.salmonicida*-Mischungen mit dem A-Protein-positiven Stamm führten zu einer stark granulierten Fluoreszenz mit diffusen Wolken, ohne daß die Bakterien klar erkennbar gewesen wären.

Abhängigkeit von der Antigenkonzentration

Höhere Keimzahlen pro Feld reduzierten die FI deutlich, auch bei den reinen Bakteriensuspensionen wurde nicht mehr als eine 2.5+-Intensität erreicht. Die besten Ergebnisse erzielten Antiserum-Verdünnungen von 1:100 und GARFITC von 1:80. Auch in diesem Versuch traten in beiden Geweben, besonders bei hohen GARFITC-Konzentrationen, nur

selten klar konturierte Bakterien auf.

Bei sinkender Keimzahl stieg die FI an (von 1.5+ auf 3.0+), gleichzeitig verbesserte sich die Erkennbarkeit einzelner Bakterien.

4.1.6.4 Kreuzreaktivität

Y.ruckeri zeigte in allen untersuchten Verdünnungsstufen eine klare Reaktivität bis 2.5+ mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum. Die Normalserum-Reaktionen lagen nicht höher als 0.5+. Mit seinem eigenen Antiserum reagierte es positiv bei einer FI von maximal 2.5+. Form und Größe der Zellen unterschieden sich geringfügig von *A.salmonicida*, eine sichere Differenzierung war aber nicht möglich.

Kreuzreaktivität mit adsorbierten Seren

A.salmonicida in allen Proben reagierte erwartungsgemäß eindeutig positiv mit seinem Antiserum und dem mit *Y.ruckeri* adsorbierten Serum. In Normalserum und Antiserum, das mit *A.salmonicida* adsorbiert worden war, trat keine Fluoreszenz auf. Alle *A.salmonicida*-haltigen Proben zeigten auch mit dem Anti-*Y.ruckeri*-Serum Fluoreszenz, die um etwa eine Stufe unter der mit dem homologen Serum lag, Zellaggregate aber deutlich erkennbar machte.

Y.ruckeri besaß mit seinem homologen Antiserum eine FI von 2.0+, im Antiserum gegen *A.salmonicida* und dem mit *Y.ruckeri* adsorbieren Serum lag sie um mindestens einen halben Punkt höher. Normalserum und *A.salmonicida*-adsorbiertes Antiserum wiesen hingegen mit *Y.ruckeri* keine Fluoreszenz auf.

4.2 Hauptversuch

4.2.1 Infektion mit *A.salmonicida*

Die Kontrolltiere wurden nach drei Tagen getötet, ohne daß Krankheitserscheinungen aufgetreten waren. Die Symptome der infizierten Fische sind in Tabelle 3 (S. 106 ff) wiedergegeben.

4.2.2 Infektion mit *Y.ruckeri*

Alle infizierten Fische zeigten nach 24 h eine leichte, nach 48h eine deutliche Rötung der Maulschleimhaut, Dunkelfärbung und Lethargie. Ein Fisch wurde nach 72 h tot aufgefunden, die anderen am gleichen Tag getötet. Die Kontrollfische waren symptomlos geblieben.

4.2.3 Pathologisch-anatomische Untersuchung, BU

Wegen einer weit fortgeschrittenen Autolyse der inneren Organe erfolgte keine Untersuchung des *Y.ruckeri*-infizierten, gestorbenen Fisches. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der einzelnen Tiere sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Innerhalb der *A.salmonicida*-Infektionsgruppe wiesen die zwei tot aufgefundenen Fische, die mit dem als A-Protein-negativ eingestuften Isolat 52 infiziert worden waren, besonders ausgedehnte und massive Veränderungen der Muskulatur an der Injektionsstelle auf.

Alle Kontrollfische zeigten ausschließlich normale Befunde, auch die BU verlief hier in allen Fällen negativ.

Für alle anderen Fische wies die BU Reinkulturen von *A.salmonicida* bzw. *Y.ruckeri* entsprechend ihrem Infektionsstatus nach. Die Einzelergebnisse der BU und der Keimzählungen von Niere und Leber sind ebenfalls in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

4.2.4 Immuno-Dotblot

4.2.4.1 Infektion mit *A.salmonicida*

Die Filtrationsrate bei Nierengewebe schwankte bei drei Versuchen zwischen 300 und 1000 µl/well; der Durchschnitt aller Nierenproben lag im ersten Versuch bei 547µl, im zweiten bei 545 µl und im dritten bei 605 µl / well. Für die einzelnen Nierenproben betrug die maximale Abweichung vom Mittelwert 270 µl, der Variationskoeffizient V% reichte von 3 bis 31%, mit einem Durchschnitt von 18%. Bei Lebergewebe streuten die Resultate weniger, die maximale Mittelwertabweichung betrug nicht mehr als 175 µl. Der Filtrationsdurchschnitt der drei Versuche lag bei 455, 475 bzw. 457 µl/well.

Milzgewebe war zwischen 300 und 1000 $\mu\text{l/well}$, im Durchschnitt mit 730 $\mu\text{l/well}$ filterbar, Herzgewebe durchschnittlich mit 590 $\mu\text{l/well}$ (100 - 1000 $\mu\text{l/well}$), Darmgewebe nur mit 458 $\mu\text{l/well}$ (300 - 500 $\mu\text{l/well}$). Muskulatur zeigte die beste Filtrierbarkeit mit durchschnittlich 727 $\mu\text{l/well}$ (200 - 1000 $\mu\text{l/well}$). Bei keinem Organ ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Filtrationsrate und dem Gewicht des Fisches/Organes, makroskopischen Veränderungen oder der Keimzahl herstellen.

Die Reproduzierbarkeit eines positiven oder negativen Ergebnisses betrug bei Nierenproben 95%, lediglich ein Fisch reagierte trotz einer sehr hohen Keimzahl nur in einem der drei Versuche positiv. Bei Lebergewebe lag die Zahl der in allen Versuchen gleich reagierenden Proben bei 75%. Die in der BU festgestellten Keimzahlen pro Gramm Organengewicht war bei den Fischen mit variablem Immuno-Dotblot-Ergebnis allerdings sehr niedrig (1×10^2 bis 1×10^4 kbE/g).

Die mitgeführten Positivkontrollen, die mit *A.salmonicida* versetzt worden waren, zeigten Reaktionen mit dem homologen Antiserum bei einer Antigenmenge zwischen 3.75×10^3 und 5×10^4 kbE/well und befanden sich damit in guter Übereinstimmung mit den durchschnittlichen Nachweisgrenzen der Vorversuche.

Positive Reaktionen mit dem *Y.ruckeri*-Antiserum traten trotz der zum Teil sehr hohen Keimzahlen (1.5×10^7 kbE/well; Niere 53-5) bei keiner Probe auf.

Die Einzelergebnisse der Immuno-Dotblotversuche, für Leber- und Nierengewebe aller drei bzw. vier Versuche, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Eine Gegenüberstellung der Nachweisraten in den einzelnen Organen durch Immuno-Dotblot und BU enthält Abbildung 6 (S. 111) wiedergegeben, Abbildung 5 (S. 105) zeigt eine exemplarische Immuno-Dotblot-Membran mit Nierengewebsproben infizierter Fische.

Bei allen Fischen wurde *A.salmonicida* auch aus den inneren Organen isoliert und/oder im Immuno-Dotblot nachgewiesen, nicht nur an der Injektionsstelle. Auch Nieren- und Milzproben von Fischen, die mit den als avirulent eingestuften Isolaten Nr. 15 (BER-NOTH 1990a) und 52 infiziert worden waren, zeigen trotz niedriger Keimzahlen und z.T. negativer BU-Ergebnisse stark positive Reaktionen im Immuno-Dotblot.

Wie aus dem Vergleich der Nachweisraten (Abb. 6) hervorgeht, ließen sich die meisten Fische (19 von 20) bei einer Untersuchung des Nierengewebes als positiv diagnostizieren (Muskulatur wurde wegen des artifiziellen Infektionsmodus hier nicht berücksichtigt). Bei zwei Fischen allerdings (21-2 und 53-2) reagierten Nierengewebe im Immuno-Dotblot trotz hoher Keimzahlen (4.5×10^5 bzw. 1.6×10^6 kbE/g Organ) nur in einem bzw. keinem Versuch positiv. Die Leberproben dieser Tiere waren ebenfalls kaum als positiv zu erkennen, während Milz und insbesondere Herzgewebe eine starke Reaktion zeigten. Der Grund hierfür konnte nicht ermittelt werden.

Die Ergebnisse des Immuno-Dotblots von Herzgewebe, für das keine BU angelegt worden war, stimmten in 16 von 20 Fällen mit denen des Milzgewebe überein, in vier Fällen fielen sie bei positivem Milzergebnis negativ aus.

Darmgewebe wies bei allen untersuchten Proben eine so starke graue Hintergrundfarbe nach Abschluß der immunologischen Färbung auf, daß positive Reaktionen, auch bei der Positivkontrolle, nicht festgestellt werden konnten.

Andere Gewebesparts zeigten zum Teil eine individuell unterschiedliche, in keinem Zusammenhang mit dem Ergebnis von BU oder Immuno-Dotblot stehende, zartgelbe Hintergrundfarbe, die die Differenzierung positiver Proben nicht behinderte. Lediglich bei Muskelproben ließ sich ein Zusammenhang zwischen Hintergrundfärbung und der Schwere der Gewebsveränderungen an der Injektionsstelle feststellen.

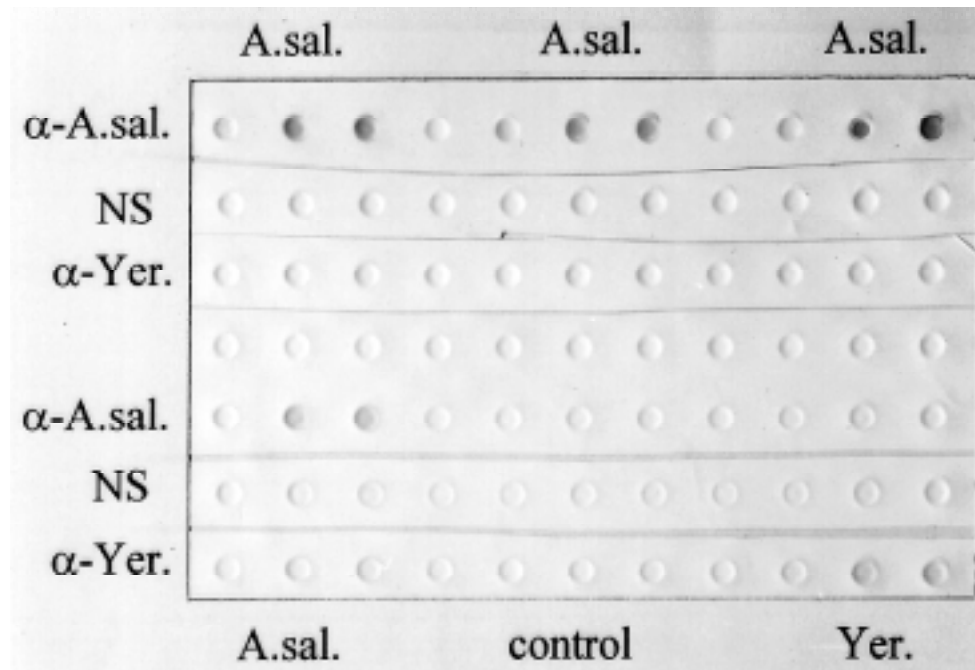
4.2.4.2 *Y.ruckeri*-infizierte Fische

Für alle infizierten Tiere ließen sich mittels der BU in der Niere und mit einer Ausnahme auch in der Milz *Y.ruckeri* nachweisen, der Immuno-Dotblot ergab allerdings nur für vier Fische positive Resultate (zweimal nur Milz, einmal Milz und Leber, einmal Milz, Leber und Niere). Die für eine positive Reaktion benötigten Keimzahlen lagen um zwei bis drei Zehnerpotenzen über denen für *A.salmonicida*. Falsch positive Reaktionen mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum traten in diesem Versuch nicht auf.

Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Abbildung 5

Hauptversuch: Immuno-Dotblot von Nierengeweben, *in-vivo* infiziert mit *Aeromonas salmonicida* (A.sal.) oder *Yersinia ruckeri* (Yer.)



α -A.sal: Antiserum gegen *Aeromonas salmonicida*

NS: Normalserum

α -Yer: Antiserum gegen *Yersinia ruckeri*

control: Negativkontrolle, nicht infiziertes Gewebe

Auftragungsvolumen jeweils 100, 300 μ l/well und Filtrationsmaximum

**Tabelle 3: Hauptversuch: Infektion mit *Aeromonas salmonicida*
Befunde der einzelnen Fische und Organe**

Legende: path.-anat.= pathologisch-anatomische Untersuchung; Abweichungen vom Normalbefund: B=Blutung, V=Verflüssigung; S=Schwellung; H=Veränderungen der Haut; F=Feuchtigkeitsgehalt erhöht; G=Gefäße injiziert; -- = keine sichtbaren Abweichungen; BU= bakteriologische Untersuchung; ID = Ergebnisse der Immuno-Dotblot-Versuche; -- bis +++: Grad der Abweichungen/negatives bis stark positives Ergebnis; †=gestorben; n.d.: nicht durchgeführt
Infektionsgruppe 15: alle Fische zeigten ein stark beeinträchtigtes Allgemeinbefinden mit Lethargie und Absonderung und wurden nach 2 Tagen getötet.

	path.-anat.	BU	ID	kbE/g Organ
Fisch 15-1; 120 g				
Muskulatur	B++, V+	+++	+++	
Leber	--	--	--/++/+	2.7×10^2
Milz	--	--	--	
Darm	--	--	--	
Niere	--	5 Kol	+++ / +++ / +++ / ++	1.4×10^4
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 15-2; 113 g				
Muskulatur	B++; V++	+++	+++	
Leber	G+	++	++ / +++ / +++	1.2×10^5
Milz	S++	++	+++	
Darm	--	++	--	
Niere	--	++	+ / +++ / +++ / +	1.8×10^6
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 15-3; 125 g KG				
Muskulatur	B++	++	+++	
Leber	--	--	-- / + / (+)	$<4.1 \times 10^1$
Milz	--	--	++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	--	++ / ++ / +++ / +	$<2.5 \times 10^2$
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 15-4; 120 g				
Muskulatur	B+	+++	+++	
Leber	S+, F+	4 Kol	+ / +++ / +++	4.3×10^3
Milz	S++	4 Kol	+++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	3 Kol	+++ / ++ / +++ / ++	1.8×10^5
Herz	n.d.	n.d.	+	
Fisch 15-5; 100 g				
Muskulatur	B+	+++	+++	
Leber	--	2 Kol	+ / +++ / ++	2.5×10^2
Milz	S+	--	+++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	+	++ / +++ / +++ / +	2.2×10^6
Herz	n.d.	n.d.	+	

Tabelle 3 : Fortsetzung der Ergebnisse des Hauptversuches

Legende: path.-anat.= pathologisch-anatomische Untersuchung; Abweichungen vom Normalbefund: B=Blutung, V=Verflüssigung; S=Schwellung; H=Veränderungen der Haut; F=Feuchtigkeitsgehalt erhöht; G=Gefäße injiziert; -- = keine sichtbaren Abweichungen; BU= bakteriologische Untersuchung; ID = Ergebnisse der Immuno-Dotblot-Versuche; -- bis +++: Grad der Abweichungen/negatives bis stark positives Ergebnis; †=gestorben; n.d.: nicht durchgeführt
Infektionsgruppe 21: alle Fische zeigten starke Symptome (Lethargie, Muskelnekrosen, Absonderung) und wurden nach 24 h (21-1, 21-2) bzw 48 h getötet.

	path.-anat.	BU	ID	kbE/g Organ
Fisch 21-1; 100 g				
Muskulatur	H+++; V+++;B+++;	+++	+++	
Leber	S+, F++	+	+/(+)/+	4.6 x 10 ³
Milz	S++	--	+	
Darm	--	--	--	
Niere	--	+	+ /+++ /+++ /+	6.5 x 10 ⁵
Herz	n.d.	n.d.	++	
Fisch 21-2; 92 g				
Muskulatur	H+; V+++; B++	+++	+++	
Leber	S+; F+	+	--/--/--	2.7 x 10 ³
Milz	--	+	+	
Darm	--	--	--	
Niere	S+	++	--/+/--/--	1.6 x 10 ⁶
Herz	n.d.	n.d.	++	
Fisch 21-3; 80 g				
Muskulatur	H+; B+++; V+	+++	+++	
Leber	S+	++	+ /+++ /+++	6.7 x 10 ⁵
Milz	S++	+	++	
Darm	--	+	--	
Niere	S++	+++	+++ /+++ /+++ /+++	8.4 x 10 ⁶
Herz	n.d.	n.d.	+++	
Fisch 21-4; 100 g				
Muskulatur	H+; B+++; V++	+++	+++	
Leber	B+; S+; F+	+	+ /+++ /+++	9.3 x 10 ⁵
Milz	S+	+++	+++	
Darm	--	++	--	
Niere	--	+++	+++ /+++ /+++ /+++	1.5 x 10 ⁸
Herz	n.d.	n.d.	+++	
Fisch 21-5; 120 g				
Muskulatur	H+; B+++; V++	+++	+++	
Leber	S+	+	++ /+++ /+++	3.6 x 10 ⁶
Milz	S++	+++	+++	
Darm	--	++	--	
Niere	--	+++	++ /+++ /+++ /+++	1.2 x 10 ⁷
Herz	n.d.	n.d.	+++	

Tabelle 3: Fortsetzung der Ergebnisse des Hauptversuches

Legende: path.-anat.= pathologisch-anatomische Untersuchung; Abweichungen vom Normalbefund: B=Blutung, V=Verflüssigung; S=Schwellung; H=Veränderungen der Haut; F=Feuchtigkeitsgehalt erhöht; G=Gefäße injiziert; -- = keine sichtbaren Abweichungen; BU= bakteriologische Untersuchung; ID = Ergebnisse der Immuno-Dotblot-Versuche; -- bis +++: Grad der Abweichungen/negatives bis stark positives Ergebnis; †=gestorben; n.d.: nicht durchgeführt
Infektionsgruppe 52: keiner der Fische zeigte Symptome. Nachdem zwei Tiere (52-4, 52-5) nach 48 h tot aufgefunden worden waren, wurden die verbleibenden drei getötet.

	pathol.-anatom.	BU	ID	kbE/g Organ
Fisch 52-1; 111 g				
Muskulatur	H+; B+++; V++	+++	+++	
Leber	G+; F+	+	+ / + / +	5.8×10^4
Milz	S++;	++	+++	
Darm	--	--	--	
Niere	S+	++	+++ / +++ / +++ / +++	1.8×10^6
Herz	n.d.	n.d.	+	
Fisch 52-2; 116 g				
Muskulatur	H+++; B+++; V+++	+++	+++	
Leber	--	--	-- / (+) / (+)	4.6×10^2
Milz	--	--	+++	
Darm	--	1 Kol	--	
Niere	--	3 Kol	+ / + / + / +	n.d.
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 52-3; 149 g				
Muskulatur	H+++; B++; V++	+++	+++	
Leber	G+; S+	--	-- / -- / --	1.3×10^2
Milz	S+	3 Kol	++	
Darm	G+; S+	--	--	
Niere	S+	1 Kol	+ / + / + / + / +	1.3×10^3
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 52-4; 83 g †				
Muskulatur	H+++; B+++; V+++	+++	++	
Leber	G+; S+	+++	+++ / +++ / +++	3.8×10^6
Milz	--	++	+++	
Darm	--	+	--	
Niere	--	+++	+++ / +++ / nd / nd	n.d.
Herz	n.d.	n.d.	+++	
Fisch 52-5; 103 g †				
Muskular	H+++; B+++; V+++	+++	+++	
Leber	G+; F+	++	++ / +++ / +++	1.1×10^6
Milz	S++	++	+++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	+++	+++ / +++ / +++ / +++	3.5×10^7
Herz	n.d.	n.d.	++	

Tabelle 3: Fortsetzung der Ergebnisse des Hauptversuches

Legende: path.-anat.= pathologisch-anatomische Untersuchung; Abweichungen vom Normalbefund: B=Blutung, V=Verflüssigung; S=Schwellung; H=Veränderungen der Haut; F=Feuchtigkeitsgehalt erhöht; G=Gefäße injiziert; -- = keine sichtbaren Abweichungen; BU= bakteriologische Untersuchung; ID = Ergebnisse der Immuno-Dotblot-Versuche; -- bis +++: Grad der Abweichungen/negatives bis stark positives Ergebnis; †=gestorben; n.d.: nicht durchgeführt
Gruppe 53: alle Fische zeigten Symptome von Lethargie, Absonderung und Muskelnekrosen. Zwei Tiere wurden nach 48 Std tot aufgefunden (53-4, 53-5), die restlichen am gleichen Tag getötet.

	pathol.-anatom.	BU	ID	kbE/g Organ
Fisch 53-1; 84 g				
Muskulatur	V+++; B+++; V++	+++	+++	
Leber	S+; F+	++	(+)/+/+	1.9 x 10 ⁵
Milz	--	++	++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	++	++/++/++/+	1.8 x 10 ⁶
Herz	n.d.	n.d.	+	
Fisch 53-2; 152 g				
Muskulatur	V+; B++	+++	+++	
Leber	--	+	(+)/(+)/--	1.3 x 10 ⁴
Milz	--	--	+	
Darm	--	--	--	
Niere	--	+	--/--/--/--	4.5 x 10 ⁵
Herz	n.d.	n.d.	+++	
Fisch 53-3; 109 g				
Muskulatur	H+; B++; V++	+++	+++	
Leber	G+;S+	5 Kol	--/+/--	1.1 x 10 ²
Milz	S+	10 Kol	+	
Darm	--	--	--	
Niere	S+	+	+/+/++/+	5.1 x 10 ⁴
Herz	n.d.	n.d.	--	
Fisch 53-4; 91 g †				
Muskulatur	H+++; B+++; V+++	+++	+++	
Leber	S+	++	++/+/+++	7.4 x 10 ⁴
Milz	S++	+++	+++	
Darm	--	--	--	
Niere	--	+++	+++//+++//+++//+++	1.2 x 10 ⁶
Herz	n.d.	n.d.	+++	
Fisch 53-5; 100 g †				
Muskulatur	H+; B+++; V+	+++	+++	
Leber	--	++	+++//+++//+++	1.7 x 10 ⁶
Milz	S++	++	+++	
Darm	--	+	--	
Niere	--	+++	+++//+++//+++//+++	1.3 x 10 ⁶
Herz	n.d.	n.d.	+++	

Tabelle 4: Hauptversuch: Infektion mit *Yersinia ruckeri*

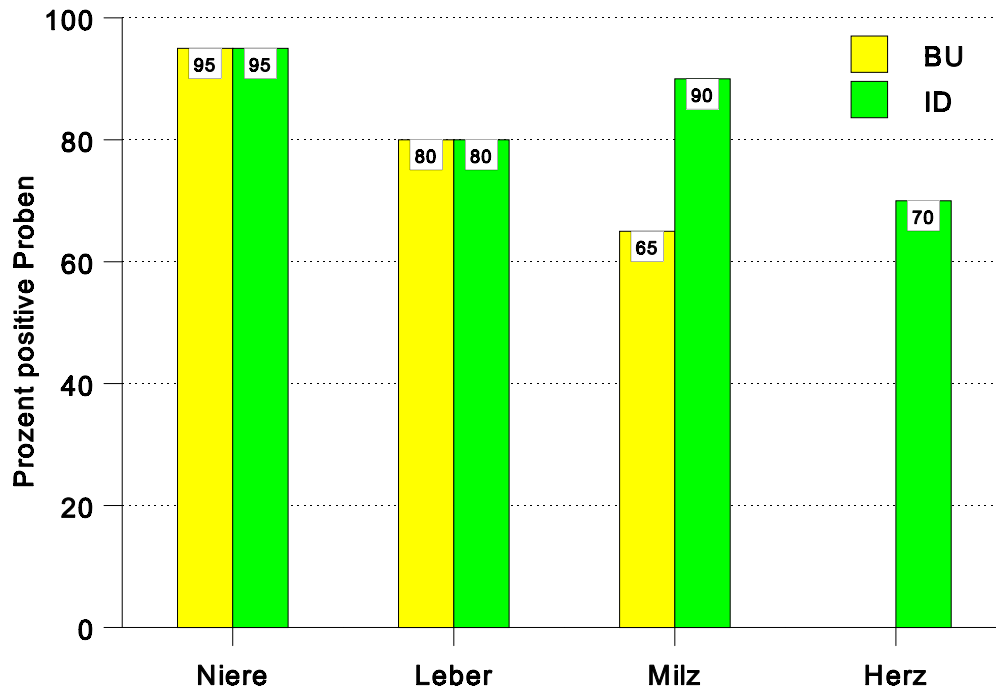
Legende: s. Tabelle 3

Alle Fische wurden nach 72h und einem ersten Todesfall (nicht untersucht) getötet
Herz- und Darmgewebe war bei allen Fischen in der adspektorischen Untersuchung, der
BU und dem Immuno-Dotblot negativ.

	pathol.-anatom.	BU	ID	kbE/gr Organ
Fisch Y1 179 g				
Leber	F+	1 Kol	--	8×10^1
Milz	F+; S+	--	--	
Niere	B+	2 Kol	--	1×10^4
Fisch Y2 83 g				
Leber	--	--	--	3×10^2
Milz	S+++; F+	4 Kol	--	
Niere	B++	+	--	5×10^5
Fisch Y3 160 g				
Leber	S+	++	--	1.4×10^4
Milz	S+	+	+	
Niere	B+	++	--	1.4×10^6
Fisch Y4 181 g				
Leber	S+; F+	--	--	<10
Milz	S++	1 Kol	--	
Niere	B+	1 Kol	--	8×10^3
Fisch Y5 182 g				
Leber	--	1 Kol	--	2.4×10^1
Milz	--	--	--	
Niere	--	3 Kol	--	5.2×10^4
Fisch Y6 151 g				
Leber	S+	+	+	5.6×10^5
Milz	S+	+	+	
Niere	--	+	--	3.2×10^5
Fisch Y7 181 g				
Leber	F+	1 Kol	--	2×10^5
Milz	S+	++	--	
Niere	S+	+	--	3×10^4
Fisch Y8 122 g				
Leber	F+	+	++	3.5×10^6
Milz	S++	+++	++	
Niere	S+	++	+	6.7×10^6
Fisch Y9 157 g				
Leber	S+	+	--	5.6×10^5
Milz	S++	+	+	
Niere	S+	++	--	2.3×10^6

Abbildung 6.**Hauptversuch: Vergleich der Nachweisraten von *Aeromonas salmonicida* durch bakteriologische Untersuchung (BU) und Immuno-Dotblot (ID)**

Eine BU des Herzgewebes wurde nicht durchgeführt.

**4.2.5 Immunfluoreszenz****4.2.5.1 Serum- und Konjugatkonzentration: Prüfung an Geweben infizierter Fische**

Bei allen Proben ließen sich nur vereinzelt Bakterien erkennen, die Fluoreszenz verteilte sich meist in hellen Punkten und diffusen Wolken über das Feld.

Bei Neutralserum-Konzentrationen bis 1:160 war die Fluoreszenzintensität zwar geringer als im Antiserum, aber auch hier traten Fluoreszenzwolken und nur einzelne, klar umrissene Bakterien auf. Erst bei einer Verdünnung von 1:320 unterschied sich die Neutralserum-Reaktion erkennbar von der im Antiserum. Höhere Verdünnungen erzielten nur eine unzureichende Fluoreszenzintensität im Antiserum.

Nierengewebe infizierter Fische

Alle Kontrollfische reagierten in beiden Antiseren negativ.

Das Ergebnis der infizierten Fische ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5. Hauptversuch : Ergebnisse der Immunfluoreszenz (IF) im Vergleich zum kulturellen Nachweis (BU) und zum Immuno-Dotblot (ID) von Nierengeweben

<i>A.salmonicida</i> -infizierter Fisch Nr....										
	15-1	15-2	15-3	15-4	15-5	21-1	21-2	21-3	21-4	21-5
IF A.sal.-AS	+	--	+	--	+	+	+	+	--	--
IF Y.r.-AS	--	--	--	--	--	+	+	+	--	--
BU	+	++	--	+	+	+	++	+++	+++	+++
ID A.sal.-AS	+++	+++	++	+++	+++	++	(+)	+++	+++	++
	52-1	52-2	52-3	52-4	52-5	53-1	53-2	53-3	53-4	53-5
IF A.sal.-AS	+	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+
IF Y.r.-AS	--	--	--	(+)	--	+	(+)	--	--	(+)
BU	++	+	+	+++	+++	++	+	+	+++	+++
ID A.sal.-AS	+++	++	++	+++	+++	++	--	+	+++	+++
<i>Y.ruckeri</i> -infizierter Fisch Nr....										
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	
IF A.sal.-AS	--	n.a.	+	--	--	+	--	+	+	
IF Y.r.-AS	(+)	n.a.	+	--	--	+	--	+	+	
BU	+	+	++	+	+	+	+	++	++	
ID Y.ru-AS	--	--	--	--	--	--	--	+	--	

Legende: A.sal.-AS: Antiserum gegen *A.salmonicida*; Y.r.-AS: Antiserum gegen *Yersinia ruckeri*; Reaktionsstärke: -- negativ, (+) schwach positiv, + - +++ positiv bis stark positiv; n.a. nicht auswertbar

5. Diskussion

Bakteriologische Untersuchung und Immunfluoreszenz

Von den zahlreichen zur Verfügung stehenden Diagnose-Verfahren für *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*) werden für die Praxis nur der kulturell-biochemische Erregernachweis und die Immunfluoreszenz empfohlen. Allerdings besteht hier die Möglichkeit einer Fehldiagnose bei Material, das nicht in optimaler Form zur Untersuchung gelangt (tiefgefroren, autolytisch, durch Kontaminanten belastet; SCHLOTFELDT u. ALDERMAN 1995).

Die bakteriologische Untersuchung (BU) von Organen infizierter Fische, die im Hauptversuch mit hoher Inzidenz positive Resultate erbrachte, erlaubte mit anschließender biochemischer Differenzierung eine sichere Identifizierung des ätiologischen Agens. Daneben stellt die Möglichkeit, durch ein Antibiotogramm der Kulturen ein geeignetes Behandlungsmittel auszuwählen, einen Vorteil dieser Methode dar, den keines der serologischen Verfahren besitzt. Andererseits erfolgt die Diagnose durch eine BU erst nach sechs Tagen, dieser Zeitraum ist zur Isolierung von Reinkulturen und für die biochemischen Prüfungen notwendig (s. auch BÖHM et al. 1986).

Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz (IFAT) lagen dagegen, wie bei allen serologischen Nachweisen, innerhalb kürzerer Zeit (1-2 Tage) vor. Das Verfahren erfordert aber eine spezielle technische Ausstattung (Fluoreszenzmikroskop) und hängt hinsichtlich seiner Sensitivität und Reproduzierbarkeit von der Erfahrung und Geduld der durchführenden Person ab. Auch EVELYN et al. (1981) berichteten von divergierenden Aussagen über den Infektionsstatus von Fischgeweben, wenn der Auswerter wechselte.

Zudem gestaltet sich die Auswertung zeitaufwendig und anstrengend. Die vollständige Durchmusterung der Präparate mit dem Mikroskop nahm Stunden in Anspruch, obwohl die verwendeten Objektträger mit mehreren Feldern eine rationellere Handhabung größerer Probenzahlen ermöglichen. GRIFFITHS et al. (1991) bemängelten ebenfalls die hohe Stressbelastung der Untersucher bei Fluoreszenzverfahren.

Die Versuche mit *in-vivo* und *in-vitro* infizierten Geweben zeigten darüber hinaus, daß Antiseren, die sich für den Immuno-Dotblot eignen, für den Fluoreszenz-Nachweis direkt aus Gewebe untauglich sein können. Es ließ sich keine Antiserum-Verdünnung finden, die

zwischen *A.salmonicida* und *Yersinia ruckeri* (*Y.ruckeri*) unterschied. Möglicherweise spiegelt diese Kreuzreaktivität einen direkten Einfluß der Gewebe wider, die durch enzymatische Veränderungen der Bakterienepitope Einfluß auf die Antiserum-Spezifität nehmen, denn DENZIN (1995) stellte bei Verwendung von *Y.ruckeri* aus Plattenkulturen in der IFAT mit den gleichen Antiseren keine Kreuzreaktivität mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum fest. Die Beobachtung, daß in Anwesenheit von Leber- oder Nierengewebe zumindest bei A-Protein-positiven Isolaten keine klare Umrißmarkierung erfolgte, stützt die Annahme eines Gewebeeinflusses. Die Fluoreszenz verteilte sich in diesen Fällen diffus in Form von Wolken und Punkten, möglicherweise durch eine Abspaltung von Oberflächen-Antigenen. Zudem trat bei den im Hauptversuch untersuchten Proben, die A-Protein-positiv *A.salmonicida*-Isolate enthielten, in sechs von 10 Fällen eine Kreuzreaktivität mit dem Anti-*Y.ruckeri*-Serum auf, während die mit einem A-Protein-negativen Isolat infizierten Proben nur mit dem homologen Serum reagierten.

Immuno-Dotblot

Der Immuno-Dotblot erwies sich als einfach und mit geringem technischen Aufwand durchführbar. Durch die subjektive Bewertung hängen die Ergebnisse von der Person des Auswerters ab, nach den Erfahrungen mit dieser Methode variierten die Resultate nach kurzer Einarbeitung und Übung aber nur wenig. Bei einem weitgehend farblosen Hintergrund lassen sich, wie von HAWKES et al. (1982) beschrieben, Farbunterschiede im direkten Vergleich von Antiserum- und Normalserum-Reaktionen leicht erkennen und durch geeignete Positiv- und Negativkontrollen auch einschätzen. Eine Beurteilung der Membran im Durchlicht kann die Nachweisempfindlichkeit um etwa eine Zehnerpotenz erhöhen, da offenbar ein beträchtlicher Teil der Immunkomplexe in der Membran lokalisiert ist (BLOCK 1988). Die Verwendung eines Mikrofiltrationengerätes erlaubt nicht nur eine präzisere Auftragung von Proben und damit einen rationelleren Materialeinsatz, sondern führt, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BERNOTH et al. (1993), auch zu einer Antigenkonzentration auf der Membran mit entsprechender Signalverstärkung. Die Filtrationsgrenze reiner Bakteriensuspensionen beträgt 1×10^9 kbE/well bei Verwendung der Nitrozellulose-Membran mit $0.45 \mu\text{m}$ -Porengröße. NISHIKAWA et al. (1990) erreichten mit einer Polyvinyl-Membran dagegen nur eine Filtrationsrate von 1×10^8 kbE/well.

Filtrierbarkeit

Die gewünschte Akkumulation von Antigen auf der Membran setzt eine möglichst hohe Filtrierbarkeit der Proben voraus.

Eine Zerkleinerung und Homogenisierung der Gewebe mit einem rotierenden Messer wie dem Ultraturrax wirft einige Probleme auf. Zum einen droht bei kleinen Probenvolumina eine Überhitzungsgefahr, der mit einem Eisbad um den Probenbehälter begegnet werden kann, zum anderen lassen sich die verwendeten Edelstahlstäbe nur schlecht reinigen und desinfizieren, so daß eine Keimverschleppung von Probe zu Probe nicht völlig auszuschliessen ist. Durch Rupturen der Gewebezellen kommt es darüberhinaus zur Freisetzung von Pigmenten, die durch Zentrifugation nicht vollständig sedimentieren und zu einer je nach Organ unterschiedlich intensiven Hintergrundfärbung der Membran führen. Andere Arten der Gewebekomogenisierung, z.B. mittels Stomacher oder Ultraschall, die allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, könnten möglicherweise bei hoher erzielbarer Filtrierbarkeit eine geringere Hintergrundfärbung bewirken.

Die Anwendung von Trypsin bei den Homogenaten, in einer Konzentration von 0.1% w/w Gewebe (1% w/v bei 1:10 verdünnten Homogenaten), die auch von LEE (1989) sowie ELLIOTT u. BARILA (1987) empfohlen wurde, erwies sich als optimal und führte bei allen Organen zu einer deutlich höheren Filtration. Allerdings variierte das maximale Filtrationsvolumen stark. Während in den Vorversuchen Probenmengen von 1000 µl/well und mehr häufig vorkamen, wiesen die Gewebe im Hauptversuch nur eine durchschnittliche maximale Filtrationsleistung von etwa 500 µl/well auf, einzelne Proben filtrierten jedoch auch hier mit 1000 µl/well gut. Ein Zusammenhang zwischen Organgewicht, Keimzahl oder vermutlich erhöhter Zellzahl bei makroskopisch sichtbaren Veränderungen war dabei nicht ersichtlich, auf eine statistische Prüfung wurde allerdings verzichtet.

Trypsin ermöglicht darüber hinaus eine verbesserte Peroxidase-Blockierung durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Immunhistochemie verwendet Vorbehandlungen von Gewebeschnitten mit Trypsin zur besseren Penetration von Immunglobulinen (HEYDERMAN 1979). Möglicherweise beruht die im Immuno-Dotblot beobachtete höhere Wirksamkeit von H_2O_2 in Kombination mit Trypsin auf einem ähnlichen Mechanismus.

Peroxidatische Aktivität der Gewebe

Durch den nichtselektiven Bindungscharakter der Nitrozellulose werden aus dem zerkleinerten Gewebe auch Moleküle mit peroxidatischer Aktivität gebunden. Dadurch erfolgt eine Umsetzung des Chromogens auch in Abwesenheit des Peroxidase-markierten zweiten Antikörpers. Diese in allen untersuchten Geweben beobachtete Aktivität tritt bei septikämisch erkrankten Fischen verstärkt auf. MOYNER et al. (1993) beschrieben Veränderungen von nichtspezifischen Immunparametern, wie eine erhöhte Lysozym- und Protease-Aktivität, bei akuten *A.salmonicida*-Infektionen, allerdings untersuchten sie nicht die Peroxidase-Aktivität der Gewebe.

Aus diesem Grund erfolgte ein Vergleich verschiedener Methoden zur Blockierung der endogenen Peroxidasen.

Das einfachste und meistverwendete Verfahren, das Erhitzen der Proben, führt nicht in allen Fällen zum Erfolg. Ein Teil der Gewebe infizierter Fische weist auch noch nach dreißigminütigem Erhitzen auf 100°C und anschließendem Zentrifugieren eine Restaktivität auf, die eine Beurteilung schwach positiver Proben stark behindert.

Die von vielen Autoren in der Immunhistochemie beschriebene Verwendung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hat noch weniger Erfolg. Trotz einer Anwendung über Nacht, die übereinstimmend mit den Ergebnissen von JANSSON et al. (1991) notwendig ist, erreicht H_2O_2 bis 10 % v/v keine vollständige Peroxidase-Blockierung.

Eine Inkubation der Membranspots in einer 0.1%igen Lösung von Kaliumpermanganat ($KMnO_4$) und anschließend in einer 1% w/v Oxalsäure-Lösung mit einem deutlich sauren pH blockiert dagegen vollständig die endogene Peroxidase aller Gewebe. Die dafür festgestellte notwendige Einwirkungszeit von nur 30 min widerspricht den Angaben von ROMEIS (1989; S.399). Eine wiederholte Anwendung ermöglicht die weitere Verkürzung der Einwirkungszeit auf etwa die Hälfte. Wegen der pH-abhängigen Wirkung beider Substanzen ist Phosphat-Puffer als Lösungsmittel der Vorzug vor destilliertem Wasser zu geben, um konstantere Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Eine Peroxidase-Blockierung durch SDS, wie sie SONG et al. (1992) beschrieben, trat nicht auf. Weder bei den untersuchten Milzgeweben noch bei Lebergeweben, die bei

Forellen im Vergleich zu anderen Organen einen geringeren Peroxidase-Gehalt haben, verringerte sich bei den empfohlenen Konzentrationen und Einwirkungszeiten die Gewebeperoxidase-Aktivität. Allerdings benutzten die Autoren einen gewebefreien, sterilfiltrierten Überstand des Hepatopankreas von Shrimps, dessen Peroxidase-Aktivität im Vergleich zum zellreichen, nicht sedimentierten Fischgewebe dieses Versuches sehr viel geringer gewesen sein dürfte.

Das Problem endogener Peroxidasen ließe sich möglicherweise durch die Verwendung von alkalischer Phosphatase als Konjugatenzym umgehen. Alkalische Phosphatase bildet nach NAISH et al. (1989) mit Fast Red oder New Fuchsin ebenfalls unlösliche Chromogenverbindungen und wird in allen Geweben außer Darm durch einen Zusatz von Levamisol zuverlässig gehemmt, seine Anwendung in serologischen Nachweisen ist allerdings selten. Eine Reduzierung der pigmentbedingten Hintergrundfärbung durch Oxidationsmittel (s.u.) bliebe in jedem Falle notwendig.

Pigmentierung

Einen größeren Einfluß auf die Hintergrundfärbung als die Peroxidase-Aktivität nehmen die in allen Organen außer gesunder Muskulatur vorhandenen gewebeeigenen Pigmente. Die Färbung der gewebehaltigen Membranspots entspricht der von AGIUS (1985) beschriebenen Pigmentverteilung der inneren Organe, aber auch geblottetes Kiemen-, Darm- und nekrotisches Muskelgewebe weisen eine gelbbraune Farbe auf.

Die Farbintensität der Homogenate auf der Membran ist individuell verschieden, bei Proben infizierter Tiere aber in der Regel höher.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Pigmente entweder vom Zielantigen abzutrennen oder chemisch zu bleichen, um eine größere Entscheidungssicherheit und eventuell eine höhere Nachweisgenauigkeit zu erreichen.

Zentrifugation erreicht keine vollständige Abtrennung der Pigmente aus den Gewebemogenaten unabhängig von der Drehzahl. Je nach Organ und Auftragungsvolumen bleibt eine gelbe bis schwarze Hintergrundfärbung der Membranspots bestehen.

Auch H_2O_2 kann in den untersuchten Konzentrationen keine vollständige Pigmentbleichung herbeiführen. In diesem Punkt weichen die Untersuchungsergebnisse von den

Angaben aus der Immunhistochemie ab (ROMEIS 1989, S. 398; NAISH et al. 1989; JANSSON 1991).

KMnO₄ und Oxalsäure benötigen eine deutlich längere Einwirkungszeit zur Pigmentbleichung als zur Peroxidase-Blockierung, hinterlassen jedoch die weitaus geringste Hintergrundfarbe. Die festgestellte Abhängigkeit der Wirksamkeit beider Substanzen vom pH-Wert stimmt mit den Angaben von HENNING et al. (1976) überein. Auch hier reduziert eine wiederholte Anwendung die erforderliche Einwirkungszeit.

Eine Kombination von Kaliumpermanganat und Oxalsäure mit einer Inkubation in wasserstoffperoxidhaltiger Blockierlösung (1% v/v) über Nacht erlaubt die weitere Verkürzung der Anwendung von Kaliumpermanganat besonders beim Nieren- und Milzgewebe. Die pigmentbleichende und Peroxidase-blockierende Gesamtwirkung der Kombination entspricht einer mehr als dreimal so langen Permanganat-Inkubation, eine vollständige Bleichung ist hierdurch auch in Geweben infizierter Fische weitestgehend möglich.

Ein erfolgreiches Entfärben von Probenspots, die möglicherweise noch stärker als die untersuchten Gewebe pigmentiert sind, könnte durch die Verwendung einer höheren H₂O₂-Konzentration möglich sein.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich ab dem ersten Infektionsversuch eine weitere Form der Hintergrundfarbe. Die zunächst oxidativ vollständig gebleichten Membranspots aller Organe färbten sich nach Zugabe des Chromogens mit und ohne H₂O₂ gelb bis braun. Zusammen mit einer unspezifischen Chromogenumsetzung und dem resultierenden Endprodukt führte dies zu einer leuchtend grünen, später grauen (DAB plus Kobaltchlorid als Chromogen) oder orange-braunen (AEC-Chromogen) Färbung der Spots, die eine Auswertung der Membran meist unmöglich machte.

In den beiden anderen Infektionsversuchen trat dieser Farbumschlag bei den inneren Organen weniger stark auf, eine Auswertung der Membranen gelang, trotz einer eventuellen leichten Gelbfärbung, ohne Schwierigkeiten in allen Fällen bei Muskulatur, Herz, Leber, Niere und Milz. Eine Beurteilung von Darm- und Kiemengewebe war hingegen nicht mehr möglich. Die durch das kulturelle Ergebnis der in Infektionsversuch I untersuchten Kohabitanten gestützte Hypothese, daß latent infizierte Fische *A.salmonicida* hauptsächlich auf den Kiemen beherbergen (BRUNO 1986; BENEDIKTSDOTTIR u.

HELGASON 1990), konnte deshalb leider nicht mit dem Immuno-Dotblot verifiziert werden.

Eine schlüssige Erklärung für das beobachtete Phänomen fand sich letztendlich nicht angesichts der Vielzahl der beteiligten Substanzen, die farbige Verbindungen eingehen können (Organpigmente, Hämoglobin, Kobalt, Permanganat, DAB, AEC).

Nach den Versuchsergebnissen läßt sich jedoch ausschließen, daß eine der untersuchten Chemikalien oder eine der Methoden zur Gewebebleichung und immunologischen Färbung allein verantwortlich ist. Auch ein Zusammenhang mit dem Infektionsstatus der Fische kann ausgeschlossen werden, da die gleichen Veränderung an gesunden Kontrollfischen aus der selben Haltungsgruppe auftraten.

Festzuhalten bleibt, daß die Fische der Infektionsversuche unter gänzlich anderen Bedingungen gehalten wurden als die ersten, in den Vorversuchen verwendeten Tiere. Schon die unterschiedlichen Wasserqualitäten, die in einem Durchflußsystem (Haltung der Vorversuchsfische) und in einer Kreislaufanlage (alle Fische ab Infektionsversuch I) auftreten, führen zu Veränderungen im Blutbild der Fische (PUND et al. 1994). Zudem wurden die Fische der ersten Infektionsgruppe, bei denen die massivsten Farbveränderungen bei allen untersuchten Methoden auftraten, aus dem Kreislauf in kleine Becken ohne vorherige Einstellung auf nicht-toxische Wasserparameter (Nitrit-/Nitratgehalt, Gesamtkeimzahl) eingesetzt. Dies bedingt einen massiven Streß für die Fische und ebenfalls spezifische Blutbildveränderungen (PUND u. BERNOTH 1993). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Bedingungen Veränderungen in den Geweben (z.B. Erhöhung der peroxidatischen und anderer Enzym-Aktivitäten, vermehrter und/oder veränderter Erythrozytenabbau mit verstärkter Hämosiderinbildung) induzieren, die in einer Reaktion mit Komponenten der Färbelösung zu einer gelben Verbindung führen.

Bei den nachfolgenden Infektionsversuchen erfolgte die Einstellung der Versuchsbecken auf stabile und nichttoxische Wasserbedingungen vor dem Fischbesatz nach der Methode von PUND u. BERNOTH (1993). Wie beschrieben trat in diesen Fällen eine sehr viel geringere Hintergrundfärbung bei den inneren Organen auf.

Die Tatsache, daß die Hintergrundfärbung der Membranspots von einer Vielzahl von Faktoren abhängt (Rasse, Alter, Ernährungs- und Gesundheitszustand der Fische, Haltungsform) und nur in begrenztem Umfang zu beiseitigen ist, schränkt möglicherweise die Verwendbarkeit des Immuno-Dotblots in der Praxis ein.

Sensitivität und Spezifität

Die Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität des Immuno-Dotblots hängen in erstaunlichem Ausmaß von der Aufbereitung des Probenmaterials ab.

Selbst das Zentrifugieren bei niedrigen g-Zahlen entfernt, unabhängig von einem eventuellem Erhitzen der Proben, eine nicht vorhersehbar große Antigenmenge aus dem Überstand (10 - 99% der Ausgangskeimzahl). Bis 130 x g läßt sich die Keimzahl erhöhen, wenn ein größeres Überstandsvolumen abpipettiert wird. Dadurch kann die Nachweisempfindlichkeit nicht verlässlich festgelegt werden, und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bleibt gering. Für eine erfolgreiche Diagnose infizierter Fische sind daher bei dieser Methode der Gewebeaufbereitung sehr hohe Keimzahlen pro Gramm Gewebe notwendig.

Durch den Einsatz eines Detergens (HemoDe) erhöht sich die Keimzahl im Überstand bei keiner Drehzahl, die Filtrierbarkeit der Proben wird jedoch erheblich beeinträchtigt. GUDMUNSDOTTIR et al. (1993) setzten dieses Detergens allerdings bei gekochten Proben zum ELISA-Nachweis von *Renibacterium salmoninarum*, einem intrazellulären Bakterium, ein, bei dem die Filtrierbarkeit keine Rolle spielte.

Eine Verstärkung der Nachweisempfindlichkeit von *A. salmonicida* erzielt das Erhitzen der Proben auf 100°C. Allerdings fällt die Wirkung in Anwesenheit von Geweben geringer aus als bei reinen Bakteriensuspensionen. Daneben tritt in Gewebe-Bakterien-Mischungen aber auch eine verminderte Reaktivität von *A. salmonicida* mit seinem Antiserum bei Inkubationstemperaturen um 60°C auf.

Trypsin und KMnO_4 vermindern die Nachweisempfindlichkeit des Testes je nach Konzentration und Einwirkungszeit zum Teil erheblich, während H_2O_2 allein kaum zu einer Beeinträchtigung der Immunreaktion führt.

Mögliche Ursache hierfür könnte das verwendete polyklonale Outer-membrane-Protein-Antiserum gegen einen A-Protein-positiven *A. salmonicida*-Stamm sein. Nach einer Untersuchung von McCARTHY et al. (1983) zerstört hohes Erhitzen das A-Protein von *A. salmonicida*, das dann immunologisch (in einer Counter Immunoelectrophorese) nicht mehr reaktiv ist. Eine Verminderung der Immunreaktion wäre deshalb auch im Immuno-Dotblot zu erwarten gewesen. Die hingegen beobachtete erhöhte Reaktivität hoch erhitzter

Proben könnte auf der Freisetzung weniger speziesspezifischer Antigene aus dem Zellinneren (SCHILL et al. 1989) und ihrer Reaktion mit anderen Antikörpern des polyklonalen Serums beruhen.

Trypsin spaltet das A-Protein in zwei Peptide (BEVERIDGE 1994) und verminderte in einer Untersuchung von McCARTHY et al. (1983) die Fähigkeit vorbehandelter Zellen, alle Antikörper aus einem Anti-*A.salmonicida*-Serum zu adsorbieren. Die immunologische Nachweisbarkeit von *A.salmonicida*-Extrakten hingegen wurde durch Trypsin, im Gegensatz zu den hier ermittelten Ergebnissen, nicht beeinträchtigt.

Kaliumpermanganat als aggressives Oxidationsmittel kann zu starken Konformationsänderungen der Epitope und damit zu einer verminderten Reaktivität führen (AMBROSIUS u. LUPPA 1987b). Die Anwesenheit anderer oxidierbarer Substanzen wie Gewebepigmenten verringert seinen negativer Einfluß auf die antigenen Strukturen und damit auf die Nachweisbarkeit von *A.salmonicida* jedoch erheblich, so daß er bei Nierengewebe mit seinem hohen Melaningehalt nicht mehr festzustellen ist.

Weitaus dramatischer als die Nachweisempfindlichkeit von *A.salmonicida* verändert sich die Kreuzreaktivität einiger Bakterien durch die verschiedenen, hier untersuchten Aufbereitungsverfahren.

Erhitzen auf 100°C beeinflußt *Pseudomonas* ssp. und eine gemischte Kultur von Kiemenbakterien nicht, dagegen steigt die Reaktivität verschiedener *A. hydrophila*-Isolate und von *Y.ruckeri* mit dem Anti-Serum um bis zu zwei Zehnerpotenzen an. Die Reaktivitätszunahme tritt hier in Mischungen mit Geweben stärker auf als bei Bakteriensuspensionen und ist immer größer als die von erhitzten *A.salmonicida*-Zellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von BERNOTH et al. (1993), die bei einer breit angelegten Untersuchung mit dem gleichen Serum bei erhitzten Kultur-Bakterien eine Erhöhung oder ein erstmaliges Auftreten der immunologischen Kreuzreaktion beobachteten. Im Falle eines gegen *Y.ruckeri* erzeugten Antiserums hingegen ging die Kreuzreaktivität mit Wasserkeimen nach Erhitzen der Proben zurück.

Auch KMnO_4 und, in geringerem Maße, Trypsin führt zu einer Erhöhung der Reaktivität anderer Bakterien mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum, allerdings nur bis zu maximal einer

Zehnerpotenz. Der Effekt bleibt um so geringer, je mehr andere oxidierbare Substanzen verfügbar sind, so daß auch hier die negative Wirkung in Nierengewebe am geringsten ausfällt.

Bei den für den Immuno-Dotblot festgelegten Antiseren-Konzentrationen reagiert *Y.ruckeri* allerdings erst ab Keimzahlen, die mehr als drei Zehnerpotenzen über der Nachweisgrenze von *A.salmonicida* liegen.

Wie die Versuche mit adsorbierten Seren zeigen, beruht der größte Teil der Reaktionen von *Y.ruckeri* auf einer Bindung spezifischer Antikörper gegen *A.salmonicida* und kann durch eine Adsorption des Antiserums mit *Y.ruckeri* nicht beseitigt werden. Eine Aufreinigung des polyklonalen Serums zur Abtrennung möglicherweise störender anderer Antikörper wurde deshalb nicht in Betracht gezogen.

Die Ursache der Kreuzreaktivität bleibt spekulativ, aus den Versuchen können aber einige Schlußfolgerungen gezogen werden. Die Immunfluoreszenz weist nach, daß Antikörper gegen *A.salmonicida* auch an Oberflächenstrukturen von *Y.ruckeri* binden.

Antikörper gegen das speziesspezifische A-Protein von *A.salmonicida* können keinen großen Anteil an der Immunreaktion haben, da das verwendete Antiserum mit A-Protein-positiven wie negativen Isolaten gleichstark (ebenso bei BERNOTH et al. 1993) und nach Adsorption mit einem A-Protein-negativen Isolat zumindest erheblich vermindert reagiert. Möglicherweise beruht die Kreuzreaktivität im wesentlichen auf Antikörpern gegen Lipopolysaccharide (LPS), die nach den Angaben von PHIPPS et al. (1983) und WAGNER (1996, pers. Mitteilung) kaum vollständig aus Outer-membrane-Protein-Fractionen abzutrennen sind. Eine Überprüfung dieser Hypothese mit monoklonalen Antikörpern gegen A-Protein und LPS steht noch aus.

Organveränderungen durch eine septikämische Erkrankung an sich führen nicht zu einem positiven Immuno-Dotblotergebnis.

Zwar besitzt der zweite Infektionsversuch nur begrenzte Aussagekraft, da alle mit *A.salmonicida* infizierten Fische nur sehr geringe Keimgehalte aufwiesen, wahrscheinlich infolge eines Virulenzverlust des verwendeten Isolates, aber hier wie im Hauptversuch unterschied der Immuno-Dotblot bei BU-positiven Organen Infektionen mit *A.salmonicida* und *Y.ruckeri* zuverlässig.

Lediglich Proben eines tot aufgefundenen, *Y.ruckeri*-infizierten Fisches mit sehr großer Keimdichte in den Organen reagierten mit dem Anti-*A.salmonicida*-Serum positiv, allerdings deutlich schwächer als mit dem homologen Antiserum. Wie nach den Ergebnissen der Kreuzreaktivitätsprüfung zu erwarten, besteht demnach nur bei sehr hohen Keimzahlen (mehr als 10^7 kbE/well) die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse. Konsequenterweise sollten deshalb tot aufgefundene oder vor längerer Zeit getötete Fische, bei denen eine starke Keimvermehrung einsetzt, von einer Untersuchung ausgeschlossen werden.

Die Feststellung der Empfindlichkeit und Spezifität für einen Erreger-Nachweises aus Organgewebe lediglich anhand von Tests mit unbehandelten Bakteriensuspensionen kann nach den vorliegenden Ergebnissen zu übertrieben optimistischen Einschätzungen führen, da das Aufbereitungsverfahren der Gewebeproben je nach Bakterium und Antiserum diese Parameter in unterschiedlichem Ausmaß, im Einzelfall aber gravierend negativ beeinflusst.

Die Empfindlichkeit des hier vorgestellten Immuno-Dotblot-Verfahrens mit der ermittelten optimierten Aufbereitung der Gewebe (Trypsin, KMnO_4 und H_2O_2) für *A.salmonicida* liegt bei durchschnittlich 1×10^4 kbE/well, entsprechend 2×10^6 kbE/g Organ (500 μl /well Filtration, 1:200 w/v Verdünnung der Gewebe). Sie wurde als Mittelwert aus allen Versuchen mit *in-vitro* *A.salmonicida*-infizierten Kontrollen errechnet. Die Ergebnisse der Keimzählung in Nieren- und Lebergewebe im Hauptversuch, die zum Teil eine sehr viel höhere Empfindlichkeit nahelegen, blieben wegen der Möglichkeit von nicht kultivierbaren Antigenen im Gewebe unberücksichtigt.

Das Limit von 1×10^4 kbE/well unterschreitet die von BERNOTH (1991) und BERNOTH et al. (1993) für Kultur-*A.salmonicida* ermittelte Nachweisgrenze ($4-9.6 \times 10^4$ kbE/well). Allerdings wurden Membranen von ihnen nur nach vollständiger Trocknung ausgewertet, wenn die verstärkende Kobaltfärbung bereits verblaßt ist.

NISHIKAWA et al. (1990) erreichten mit ihrem Immuno-Dotblot für *Vibrio cholerae* eine Nachweisgrenze von 2×10^5 kbE/well, TAMPLIN et al. (1991) mit monoklonalen Antikörpern gegen *Vibrio vulnificus* 2×10^3 kbE/well.

Die Angaben über eine Nachweisempfindlichkeit von 10^2 kbE/g Nierengewebe oder ml

Überstand für verschiedene Immuno-Dotbotverfahren (Nachweis von *A.salmonicida* und *Renibacterium salmoninarum*) in mehreren Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe um M. Sakai lassen sich nur schwer vergleichen (SAKAI et al. 1986; SAKAI et al. 1987; SAKAI et al. 1989). Zum einen fehlen Angaben über Spezifität und Herkunft der Seren, zum anderen legen die spärlichen Angaben zur Methodik den Schluß nahe, daß die Autoren Antigene von nur vier Bakterienzellen erfassen konnten, eine Nachweisgrenze, die selbst in molekularbiologischen Verfahren kaum erreicht wird (GUSTAFSON et al. 1992; HINEY et al. 1992).

ADAMS u. THOMPSON (1990) entwickelten zwei ELISA-Verfahren für den Nachweis von *A.salmonicida* direkt aus Nieren infizierter Fische. Die Empfindlichkeit ihrer Methoden geben sie mit 10^6 bzw. 10^3 kbE/g Organ an, die allerdings auf Keimzahlbestimmungen der *in-vivo* infizierten Gewebe ohne Berücksichtigung eventuell gespeicherten, nicht kultivierbaren Antigens beruht.

Die von SMITH (1981) publizierte Nachweisgrenze von 10^2 kbE/ml im ELISA ist um eine Zehnerpotenz niedriger als bei allen anderen vergleichbaren serologischen Tests.

Kommerzielle ELISA-Kits für den Nachweis von *Renibacterium salmoninarum* erfordern eine Keimzahl von mehr als 10^6 Zellen/g Gewebe (BANDIN et al. 1996).

Der Immuno-Dotblot ist mit dieser Nachweisgrenze empfindlich genug, akut an Furunkulose erkrankte Fische zu diagnostizieren; die Keimgehalte der Organe im Hauptversuch lagen meist zwischen 10^6 und 10^8 kbE/g Niere. ADAMS u. THOMPSON (1990) und CIPRIANO u. BERTOLINI (1988) ermittelten Keimzahlen zwischen 10^7 und 10^9 kbE/g.

NOMURA et al. (1992) fanden bei symptomlos infizierten Lachsen Keimgehalte von 5×10^1 bis 1×10^8 kbE/g, ADAMS u. THOMPSON (1990) bei Überlebenden eines Infektionsversuches zwischen 10^2 und 10^5 Zellen/g Nierengewebe. Eine erfolgreiche Diagnose latent infizierter Carrierfische durch den Immuno-Dotblot mit der für das verwendete *A.salmonicida*-Antiserum festgestellten Empfindlichkeit erscheint daher fraglich.

Hauptversuch: Immuno-Dotblot im Vergleich zur bakteriologischen Untersuchung

Im Hauptversuch wiesen alle infizierten Fische die typischen Symptome und pathologischen Veränderungen einer akuten Furunkulose (AUSTIN u. AUSTIN 1993a) bzw. Yersiniose auf (AUSTIN u. AUSTIN 1993b).

Mit Hilfe des Immuno-Dotblot konnten alle zwanzig mit *A.salmonicida* infizierten Fische identifiziert werden. Neunzehn Tiere zeigten einen positiven Nachweis im Nierengewebe, was die Bedeutung dieses Organes für die *A.salmonicida*-Diagnose unterstreicht (McCARTHY u. ROBERTS 1980; BÖHM et al. 1986; FRERICHS u. ROBERTS 1989). Allerdings reagierte Nierengewebe eines Fisches in keinem, das eines weiteren nur in einem von drei Versuchen positiv trotz einer hohen Keimzahl. Der Grund hierfür konnte nicht ermittelt werden. Dieses abweichende Verhalten unterstreicht aber die Forderung von DALY u. STEVENSON (1985), weitere Organe in die Untersuchung einzubeziehen, da die gleichen Fische stark positive Reaktionen bei der Untersuchung von Herz- und Milzgewebe aufwiesen.

In der bakteriologischen Untersuchung (BU) zeigten ebenfalls neunzehn Nieren-Proben Wachstum von *A.salmonicida*. Die von BÖHM et al. (1986) festgestellte überlegene Nachweisrate serologischer Tests gegenüber der BU ließ sich aufgrund der meist sehr hohen Keimzahlen infolge des artifiziellen Infektionsmodus nicht überprüfen.

Im Milzgewebe erzielte der Immuno-Dotblot die zweithöchste Nachweisrate (90%), die BU blieb mit 65% deutlich dahinter zurück. Eine Ursache hierfür mag der zu kleine Gewebeanteil gewesen sein, der für die BU aus dem im Durchschnitt nur 0.15 g schweren Organ in situ entnommen werden konnte, ohne es vollständig zu zerstören. Zum anderen stellt die Milz beim Fisch durch das Fehlen von Lymphknoten den wichtigsten Antigenfilter im Gefäßsystem dar (FERGUSON 1989; ELLIS 1980), in dem auch nicht mehr kulturell nachweisbares Antigen von Bakterien eine positive Immuno-Dotblot-Reaktion auslösen kann. So wiesen diejenigen Tiere, die mit den weniger virulenten, A-Protein-negativen Isolaten infiziert worden waren, sehr niedrige Keimzahlen in Leber und Niere auf. In der BU aller inneren Organe zeigten sich negative Befunde oder ein nur geringes Koloniewachstum, im Immuno-Dotblot dagegen reagierten sie in der Mehrzahl eindeutig positiv.

Diese Möglichkeit von Totantigenen in den Geweben beschränkt die Aussagekraft der in

Leber und Niere gefundenen Lebendkeimzahlen für die Abschätzung der Verfahrensempfindlichkeit.

Bei Lebergewebe erwiesen sich BU und Immuno-Dotblot als gleich empfindlich, auch hier traten allerdings falsch negative Ergebnisse bei den beiden gleichen Tieren wie bei der Nierenuntersuchung auf.

In Herzgewebe ließ sich *A.salmonicida* ebenfalls mit hohem Prozentsatz durch den Immuno-Dotblot identifizieren.

Membranen mit Darmgewebe konnten wegen der intensiven Hintergrundfarbe in keinem Fall ausgewertet werden, während die BU bei sieben Fischen *A.salmonicida* nachwies.

Bei den mit *Y.ruckeri* infizierten Fischen lagen die festgestellten Keimzahlen der Organe insgesamt niedriger. Auch bei mehr als 10^6 kbE/g Organ traten z.T. keine positiven Immuno-Dotblot-Ergebnisse auf. Die in den Vorversuchen ermittelte und auch von BERNOTH et al. (1993) beschriebene niedrigere Empfindlichkeit des *Y.ruckeri*-Antiserums stimmt mit diesem Befund überein. Hauptnachweisorgan war in diesem Fall das Milzgewebe.

Falsch positive Reaktionen von *A.salmonicida* mit dem Anti-*Y.ruckeri*-Serum oder umgekehrt ließen sich im Hauptversuch nicht feststellen. Sie können aber nach den Ergebnissen der Vorversuche und der Reaktivität der Proben des stark mit *Y.ruckeri* belasteten Fisches aus dem zweiten Infektionsversuch zumindest nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden bei sehr hohen Keimzahlen.

Der Immuno-Dotblot ermöglicht es daher nach den vorliegenden Ergebnissen, nach einer optimierten Gewebeaufbereitung Proben rationell und mit geringem technischen und Arbeitsaufwand auf verschiedene bakterielle Krankheitserreger gleichzeitig zu untersuchen, wenn geeignete Antiseren zur Verfügung stehen.

6. Zusammenfassung

Die indirekte Immuno-Dotblot-Technik erlaubte den Nachweis von *Aeromonas salmonicida* in Muskel-, Nieren-, Leber-, Milz- und Herzgewebe von experimentell infizierten Forellen mit akuter Furunkulose. Kiemen- und Darmgewebe eigneten sich wegen ihrer nicht zu beseitigenden starken Hintergrundfärbung nicht für das Verfahren. Die durchschnittliche Sensitivität des Testes betrug 2×10^6 Bakterien pro Gramm Gewebe.

Im Vergleich zu einer bakteriologischen Untersuchung erbrachte der Immuno-Dotblot bei Milzgewebe deutlich häufiger positive Ergebnisse, für Leber- und Nierengewebe glichen sich die Nachweisraten.

Die Methode konnte zwischen Infektionen mit *Aeromonas salmonicida* und *Yersinia ruckeri* unterscheiden. Sie war preiswert, einfach durchzuführen und auszuwerten und erlaubte die gleichzeitige Untersuchung großer Probenzahlen auf verschiedene bakterielle Antigene. Die Untersuchung ließ sich in anderthalb Tagen abschließen.

Bei einer indirekten Immunfluoreszenz-Untersuchung hingegen trat bei allen Antiserumverdünnungen eine so starke spezifische Kreuzreaktivität von *Yersinia ruckeri* und *Aeromonas salmonicida*, insbesondere bei A-Protein-positiven Isolaten, mit dem jeweils anderen Antiserum auf, daß eine Unterscheidung der Bakterien in Gewebeproben nicht möglich war.

Im Immuno-Dotblot zeigten alle untersuchten Gewebemogenate auf der Membran eine durch Gewebepigmente bedingte, vom Organ und dem Gesundheitszustand des Tieres abhängige Hintergrundfarbe und endogene Peroxidase-Aktivität, die zusammen die Auswertbarkeit des Testes und damit die Nachweisbarkeit von Antigen stark behinderten.

Beim Vergleich verschiedener Methoden zur Blockierung dieser Peroxidase-Aktivität und der Reduzierung des Pigmentes erzielten das Erhitzen und Zentrifugieren der Proben nur unzureichende Ergebnisse. Sie hinterließen eine Restaktivität bei Proben infizierter Fische und trennten das Pigment nur unvollständig ab. Im Gegensatz zur Immunhistochemie konnte Wasserstoffperoxid trotz einer Einwirkung über Nacht keine vollständige Bleichung der Pigmente bewirken. Farblose Hintergründe auch beim intensiv gefärbten Milz- und Nierengewebe sowie eine vollständige Aufhebung der unspezifischen Peroxidase-

Reaktionen erreichte hingegen eine Oxidation mit Kaliumpermanganat und Oxalsäure. Die Wirkung hing von dem pH-Wert der Lösungen und von der Einwirkungszeit, die sich durch eine wiederholte Anwendung beider Substanzen verkürzen ließ, ab. Die besten Ergebnisse erzielte eine Kombination von Kaliumpermanganat/Oxalsäure mit Wasserstoffperoxid-Einwirkung über Nacht, die eine weitere Reduzierung der Permanganat-Inkubation erlaubte.

Sensitivität und Spezifität des Immuno-Dotblots hingen in hohem Maße von der jeweiligen Methode zur Gewebeaufbereitung ab. Beim Zentrifugieren der Homogenate fehlten, unabhängig von der Drehgeschwindigkeit und Zeitdauer, bis zu 99% des Antigens im Überstand. Das Erhitzen der Proben auf 100°C führte zwar zu einer geringfügig besseren Nachweisbarkeit von *A.salmonicida*, erhöhte aber auch die Kreuzreaktivität verschiedener Gram-negativer Bakterien bis zum hundertfachen Wert. Einen feststellbaren, aber deutlich geringeren Anstieg der Reaktivität von Fremdkeimen bewirkten auch Trypsin und Kaliumpermanganat. Der negative Effekt blieb allerdings in Gewebe-Bakterienmischungen mit ihrem höheren Anteil anderer oxidierbarer Substanzen kleiner als bei reinen Bakterien-suspensionen, ganz im Gegensatz zu den Resultaten bei erhitzten Proben. Durch Wasserstoffperoxid ergab sich bei keiner der untersuchten Konzentrationen eine Veränderung der Reaktivität. Die Kombination von Kaliumpermanganat und Wasserstoffperoxid führte nur zu geringen negativen Effekten auf die Bakterien-Epitope, besonders in Geweben mit einem hohen Pigmentgehalt.

Damit erscheint der indirekte Immuno-Dotplot mit der beschriebenen optimierten Gewebeaufbereitung zur Diagnose von Krankheitserregern direkt aus Forellenorganen geeignet, wenn spezifische und sensitive Antiseren zur Verfügung stehen.

7. Summary

Applicability of an indirect immuno-dotblot technique for the detection of *Aeromonas salmonicida* in trout tissues

Using an indirect immuno-dotblot technique it was possible to detect *Aeromonas salmonicida* in kidney, liver, spleen, and heart tissues of experimentally infected trout with acute furunculosis. Tissues of gills and gut could not be assessed because of their intense background staining.

The average sensitivity of the test was 2×10^6 cfu per gramme tissue. The frequency of positive results in spleen samples was higher with the immuno-dotblot than with a bacteriological examination, and identical in kidney and liver tissues.

The method distinguished between infections with *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri*. It was cheap, easy to perform and read, and allowed simultaneous testing of large numbers of samples for different bacterial antigens. Results could be obtained after one and a half day.

In contrast, an indirect fluorescence assay revealed such an amount of specific cross-reactivity between both *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida*, especially A-protein-positive isolates, and the respective opposite antiserum that it was impossible to distinguish the bacteria in tissue samples.

On nitrocellulose membranes, all tissues exhibited a strong peroxidase activity and pigmentation according to the organ examined and the fish' health status. The resulting background staining made it difficult to decide whether or not a sample showed a positive reaction.

Comparing several methods to block endogenous peroxidase activity and minimize pigmentation, heated and centrifugated samples of infected fish showed residual peroxidase activity and pigments on the membrane spots.

Peroxidate was even more unable to completely bleach pigments and inhibit the tissue peroxidase activity although it took effect in an overnight incubation.

An oxidization of membrane spots with potassium permanganate and oxalic acid resulted in colourless backgrounds, even with the intensely pigmented and peroxidase rich samples of spleen and kidney. Their effect depended on the pH value of their solutions and the incubation time, which could be shortened by repeating the procedure.

The best results were obtained with a combination of permanganate and peroxide permitting a further reduction of permanganate incubation time.

Sensitivity and specificity of the test depended to a high degree on the sample processing technique. In centrifugated homogenates, up to 99% of antigen were missing in the supernatant, independent of time and speed. Boiling of samples enhanced the reactivity of *A.salmonicida* only slightly, but the cross reactivity of different gram-negative bacteria up to a hundred times. A measurable but much lesser effect on cross reactivity inflicted trypine and permanganate. In contrast to heating, their negative influence was stronger on pure bacteria suspensions than on bacteria mixed with tissues, presumably because of the higher tissue content of other oxidizable substances like pigment. Peroxidase alone did not visibly change cross reactivity at any concentrations examined. The combination of permanganate and peroxide effected only negligible alterations of bacterial epitopes, especially in richly pigmented tissue samples.

Therefore, the indirect immuno-dotblot with the described procedure of tissue processing seems to be efficient to identify bacteria in trout tissues as long as specific and sensitive antisera are available.

8. Literaturverzeichnis

ADAMS, A., u. K. THOMPSON (1990):

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue.

J. Aquat. Anim. Health. 2, 281 - 288

AGIUS, C. (1985):

The melano-macrophage centres of fish: a review.

in: M. J. MANNING u. M. F. TATNER (Hrsg.): Fish Immunology. Academic Press, London, Orlando; S. 85 - 105

AGIUS, C. (1979):

The role of melanomacrophage centres in iron storage in normal and diseased fish.

J. Fish Dis. 2, 337 - 343

AGIUS, C. (1980):

Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish.

J. Zool., Lond. 191, 11 - 31

AGIUS, C., u. S. A. AGBEDE (1984):

An electron microscobial study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish.

J. Fish Biol. 24, 471 - 488

AINSWORTH, A.J., G. CAPLEY, P. WATERSTREET u. D. MUNSON (1986):

Use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*.

J. Fish Dis. 9, 439-444.

AMBROSIUS, H., u. H. LUPPA (1987a):

Immunhistochemie - Grundlagen und Techniken

12. Methoden der Immunhistochemie (Grundlagen)

Akademie-Verlag Berlin, S. 134 - 140

AMBROSIUS, H., u. H. LUPPA (1987b):

Immunhistochemie - Grundlagen und Techniken

13.2. Immunezymtechniken

Akademie-Verlag Berlin, S. 153 - 159

AMBROSIUS, H., u. H. LUPPA (1987d):

Immunhistochemie - Grundlagen und Techniken

4. Die Spezifität der Antigen - Antikörper - Reaktion

Akademie-Verlag Berlin, S. 48 - 66

ANDERSON, D.P., (1990):

Fluorescent antibody test.

in: J.S. STOLEN, T.C. FLETCHER, D.P. ANDERSON, B.S. ROBERTSON u. W.B van MUISWINKEL (Hrsg.): Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, Fair Haven, USA. S. 1-8.

AUSTIN, B. (1993):

Recovery of 'atypical' isolates of *Aeromonas salmonicida*, which grow at 37°C, from ulcerated non-salmonids in England.

J. Fish Dis. 16, 165 - 168

AUSTIN, B., u. D. ALLEN-AUSTIN (1985):

Microbial quality of water in intensive fish rearing.

J. Appl. Bacteriol. Symp. Supplement, 207 - 226

AUSTIN, B., u. D.A. AUSTIN (1993a):

Aeromonadaceae representatives (*Aeromonas salmonicida*).

in: Bacterial fish pathogens - disease in farmed and wild fish.

Verlag Ellis Horwood, New York, London; S. 86-170.

AUSTIN, B., u. D.A. AUSTIN (1993b):

Yersinia ruckeri.

in: Bacterial fish pathogens - disease in farmed and wild fish.

Verlag Ellis Horwood, New York, London; S. 208-216.

AUSTIN, B., T. BISHOP, C. GRAY, B. WATT u. J. DAWES (1986):

Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms.

J. Fish Dis. 9, 469 - 474

AUSTIN, D.A., D. McINTOSH u. B. AUSTIN (1989):

Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nova.

System. Appl. Microbiol. 11, 277-290.

BANDIN, I., P. HEINEN, L.L. BROWN u. A.E. TORANZO (1996):

Comparison of different ELISA kits for detecting *Renibacterium salmoninarum*.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 16(1), 19-22.

BATTEIGER, B., W.J. NEWHALL u. R.B. JONES (1982):

The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes.

J. Immunol. Meth. 55, 297-307.

BELLAND, R.J., u. T.J. TRUST (1987):

Cloning of the gene for the surface array protein of *Aeromonas salmonicida* and evidence linking loss of expression with genetic deletion.

J. Bacteriol. 169(9), 4086-4091.

BELLAND, R.J., u. T.J. TRUST (1988):

DNA:DNA reassociation analysis of *Aeromonas salmonicida*.

J. Gen. Microbiol. 134, 307-315.

BENEDIKTSDOTTIR, E., u. S. HELGASON (1990):

The isolation of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* from the gills of salmonid fish.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10 (4), 104 - 105

BERNOTH, E.-M. (1990a):

Autoagglutination, growth on tryptone-soy-Coomassie-agar, outer membrane protein patterns and virulence of *Aeromonas salmonicida* strains.

J. Fish Dis. 13, 145 - 155

BERNOTH, E.-M. (1990b):

Screening for the fish disease agent *Aeromonas salmonicida* with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

J. Aquat. Anim. Health. 2, 99 - 103

BERNOTH, E.-M. (1991):

Identification of cultured *Aeromonas salmonicida* by an indirect dot blot immunoassay.

J. Fish Dis. 14, 419 - 422

BERNOTH, E.-M., u. G. ARTZ (1989):

Presence of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue may be overlooked by sole reliance on furunculosis-agar.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 9(1), 5-6

BERNOTH, E.-M., S. BANNEKE u. A. SCHULTZE (1993):

Indirekter Immunoblot zum Nachweis von *Aeromonas salmonicida* und *Yersinia ruckeri* in aus Fischen und Wasser stammenden bakteriellen Mischkulturen.

Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie" der DVG, 03.06.-05.06.1992, Rauschholzhausen.

Proceedings ISBN 3-924851-76-X, S. 123-133.

BERNETH, E.-M., u. K.H. BÖHM (1988):

Serological comparison between isolated strains of *Aeromonas salmonicida* by agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

J. Vet. Med. B 35, 637-647.

BERNETH, E.-M., u. W. KÖRTING (1992):

Identification of a cyprinid fish, the tench *Tinca tinca* L., as a carrier of the bacterium *Aeromonas salmonicida*, causative agent of furunculosis in salmonids.

J. Vet. Med. 39, 585-594.

BEVERIDGE, T.J. (1994):

Bacterial S-layers.

Current Opinion in Structural Biology 4, 204-212

BLOCK, J. (1988):

Entwicklung und Optimierung eines ELISA mit Nitrozellulose als fester Phase zum Nachweis von antiviralen Antikörpern in Hühnerseren.

Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation; S. 10

BÖHM, K. H., H. FUHRMANN, H.- J. SCHLOTFELDT u. W. KÖRTING (1986):

Aeromonas salmonicida from salmonids and cyprinids - serological and cultural identification

J. Vet. Med. B, 33, 777 - 783

BOOTSMA, R., N. FIJAN u. R. BLOMMAERT (1977):

Isolation and preliminary identification of the causative agent of Carp Erythrodermatitis.

Vet. Arch. 47 (6), 291 - 302

BOURNE, J.A. (1983):

Handbook of immunoperoxidase staining methods.

DAKO Corporation, Carpintera, Kalifornien, USA.

BRUNO, D. W. (1986):

Furunculosis in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Colonization of the gill epithelium.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 6 (3), 76 - 78

BRUNO, D. W. (1987):

Serum agglutinating titres against *Renibacterium salmoninarum* the causative agent of bacterial kidney disease, in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L.

J. Fish Biol. 30, 327 - 334

BRUNO, D. W., A. L. S. MUNRO u. E. A. NEEDHAM (1986):

Gill lesions caused by *Aeromonas salmonicida* in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L.

Intern.Council for the Exploration of the Sea, Maricultural Committee, CM 1986, F:6

BRUNO, D.W., u. T.T. POPPE (1996):

Bacterial diseases.

in: A colour atlas of Salmonid diseases. Verlag Academic Press, London; S. 36-67

BULLOCK, G.L., u. H.M. STUCKEY (1975):

Aeromonas salmonicida: detection of asymptotically infected trout.

Progr. Fish Cult. 37, 237-239.

BULLOCK, G.L., u. H.M. STUCKEY (1987):

Studies on vertical transmission of *Aeromonas salmonicida*.

Progress. Fish Cult. 49, 302-303.

BURGER, B. (1997):

Eignung der indirekten Fluoreszenztechnik und des Dot Immunobinding Assays zum Nachweis ausgewählter Streptokokken und Enterokokken in Fischgeweben.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Fachbereich Fischkrankheiten

CHALLACOMBE, S.J. (1988):

Application of ELISA to Microbiology.

in: D.M. KEMENY u. S.J. CHALLACOMBE (Hrsg.): ELISA and other solid phase immunoassays. Verlag John Wiley & Sons, London, UK, S. 319-355.

CHART, H., D.H. SHAW, E.E. ISHIGURO u. T.J. TRUST (1984):

Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide.

J. Bacteriol. 158, 16-22.

CHRISTEN, H.-R. (1976):

Chemie.

Verlag Diesterweg, Frankfurt a.M., 10. Auflage S. 343

CHU, S., C.E. GUSTAFSON, J. FEUTRIER, S. CAVAIGNAC u. T.J. TRUST (1993):

Transcriptional analysis of the *Aeromonas salmonicida* S-layer protein gene *vapA*.

J. Bacteriol. 175 (24), 7968-7975

CIPRIANO, R.C. (1982a):

Furunculosis in brook trout: infection by contact exposure.

Prog. Fish-Cult. 44(1), 12-14

CIPRIANO, R.C. (1982b):

Immunization of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) against *Aeromonas salmonicida*: immunogenicity of virulent and avirulent isolates and protective ability of different antigens.

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39(1), 218-221.

CIPRIANO, R.C. (1986):

Immunodetection of antibodies in the mucus of rainbow trout infected with or immunized against the furunculosis agent *Aeromonas salmonicida*.

Microbios Letters 32, 105-112.

CIPRIANO, R.C., u. J. BERTOLINI (1988)

Selection for virulence in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, using Coomassie brilliant blue agar.

J. Wildlife Dis. 24(4), 672 - 678

CIPRIANO, R.C., G.L. BULLOCK u. A. NOBLE (1996):

Nature of *Aeromonas salmonicida* carriage on asymptomatic rainbow trout maintained in a culture system with recirculating water and fluidized sand biofilters.

J. Aquat. Anim. Health 8, 47-51.

CIPRIANO, R.C., L.A. FORD, J.D. TESKA u. L.E. HALE (1992):

Detection of *Aeromonas salmonicida* in the mucus of salmonid fishes.

J. Aquat. Anim. Health. 4, 114 - 118

CIPRIANO, R.C., u. C.M. HEARTWELL (1986):

Susceptibility of salmonids to furunculosis: differences between serum and mucus responses against *Aeromonas salmonicida*.

Transactions of the American Fisheries Society. 115, 83 - 86

CIPRIANO, R. C., J. B. PYLE, C. E. STARLIPER u. S. W. PYLE (1985):

Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay.

J. Wildlife Dis. 21 (3), 211 - 218

CVITANICH, J.D. (1994):

Improvements in the direct fluorescent antibody technique for the detection, identification, and quantification of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney smears.

J. Aquat. Anim. Health 6(1), 1-12.

DALY, J. G., u. R. M. W. STEVENSON (1985):

Importance of culturing several organs to detect *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish.

Transactions of the American Fisheries Society 114, 909 - 910

DENZIN, N. (1995):

Untersuchung der Eignung von Eigelbimmunglobulinen (IgY) für die Diagnostik des Fischpathogens *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin.

DIXON, P. F. (1987):

Detection of *Renibacterium salmoninarum* by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

J. Appl. Ichthyol. 3, 77 - 82

DUFF, D.C.B. (1942):

The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*.

J. Immunol. 44, 87-94.

EFFENDI, I., u. B. AUSTIN (1995):

Uptake of *Aeromonas salmonicida* by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15 (4), 115-118

ELLIOTT, D.G., u. T.Y. BARILA (1987):

Membrane filtration-fluorescent antibody staining procedure for detecting and quantifying *Renibacterium salmoninarum* in coelomic fluid of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 206-210.

ELLIS, A.E. (1980):

Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L.

J. Fish Dis. 3, 413 - 426

ELLIS, A.E. (1991):

An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*.

J. Fish Dis. 14, 265-277

ELLIS, A.E., I.R. BRICKNELL u. A.L.S. MUNRO (1992):

Current status of a Scottish furunculosis vaccine.

Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 11 - 15

ELLIS, A.E., A.S. BURROWS u. K.J. STAPLETON (1988):

Lack of relationship between virulence of *Aeromonas salmonicida* and the putative virulence factors: A-layer, extracellular proteases and extracellular haemolysins.

J. Fish Diseases 11, 309-323.

EMMERICH, R., u. E. WEIBEL (1894):

Über eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen.

Arch. Hyg. Bakteriolog. 21, 1-21.

ENGER, Ø., B. GUNNLAUGSDOTTIR, B.K. THORSEN u. B. HJELTNES (1992):

Infectious load of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* during the initial phase of a cohabitant infection experiment with Atlantic salmon, *Salmo salar* L.

J. Fish Dis. 15, 425-430

EVELYN, T.P.T. (1971):

An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and from two species of cultured Pacific salmon.

J. Fish. Res. Board Canada 28, 1629-1634.

EVELYN, T.P.T., J.E. KETCHESON u. L. PROSPERI-PORTA (1981):

The clinical significance of immunofluorescence-based diagnoses of the bacterial kidney disease carrier.

Fish Pathol. 15, 293-300.

EVENBERG, D., R. VERSLUIS u. B. LUGTENBERG (1985):

Biochemical and immunological characterization of the cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*.

Biochem. Biophys. Acta 815, 233-244.

FAO (1994):

FAO Fisheries Circular No. 815 Rev. 6

zitiert nach: Aquaculture Europe 20(1) 1995, S. 26

FERGUSON, H. W. (1989):

Systemic pathology of fish.

Iowa State University Press, Ames, USA

FERGUSON, H.W., u. D.H. McCARTHY (1978):

Histopathology of furunculosis in brown trout *Salmo trutta* L.

J. Fish Dis. 1, 165 - 174

FREEDMAN, S.J. (1991):

The role of alpha 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout.

Comp. Biochem. Physiol. 98B (4), 549-553.

FRERICHS, G.N., u. R.J. ROBERTS (1989):

The bacteriology of teleosts.

in: R.J. ROBERTS (Hrsg.): Fish Pathology. Verlag Baillière Tindall, London, Philadelphia; S. 307-312.

FUHRMANN, H. (1983):

Vorkommen und Bedeutung fischpathogener Erreger in Fischhaltungen Nordwestdeutschlands.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Fachbereich Fischkrankheiten

GRAHAM, R.C., u. M.J. KARNOVSKY (1966):

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique.

J. Histochem. Cytochem. 14, (4), 291-302

GRAHAM, R.C., U. LUNDHOLM u. M. J. KARNOVSKY (1965):

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-Amino-9-Ethylcabazole
J. Histochem. Cytochem., 13, 150-152

GRIFFIN, P.J., S.F. SNIETZKO u. S.B. FRIDDLE (1953):

Pigment formation by *Bacterium salmonicida*.
J. Bacteriol. 65, 652-659.

GRIFFITHS, S.G., G. OLIVIER, J. FILDES u. W.H. LYNCH (1991):

Comparison of western blot, direct fluorescent antibody and drop-plate culture methods for the detection of *Renibacterium salmoninarum* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).
Aquaculture 97, 117-129.

GROMAN, D., D. TWEEDIE u. D. SHAW (1992):

Experiences with atypical furunculosis in Newfoundland: an overview.
Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 36 - 39

GUDMUNDSDOTTIR, S., E. BENEDIKTSDOTTIR u. S. HELGASON (1993):

Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples: a comparison of results using double-sandwich ELISA and isolation on selective medium.
J. Fish Dis. 16, 185-195

GUPTA, Y., P. CHAND, A. SINGH u. N.C. JAIN (1990):

Dot immunobinding assay in comparison with enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bluetongue virus antibodies in sheep.
Vet. Microbiol. 22, 365-371.

GUSTAFSON, C.E., C.J. THOMAS u. T.T. TRUST (1992):

Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene.
App. Environ. Microbiol. 58 (12), 3816 - 3825

HASTINGS, T.S. (1988):

Furunculosis Vaccines.

in: ELLIS, A.E. (Hrsg.): Fish Vaccination. Academic Press, London; S. 93-111

HAWKES, R., E. NIDAY u. J. GORDON (1982):

A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies.

Anal. Biochem. 119, 142 - 147

HENNING, H.-G., W. JUGELT u. G. SAUER (1976):

Praktische Chemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 3. Aufl.

Verlag Harri Deutsch, Thun, Frankfurt a. Main, S. 120-121; S. 162-163; S. 266; S. 268-273

HEYDERMAN, E. (1979):

Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls.

J. Clinic. Pathol. 32, 971 - 978

HINEY, M., M.T. DAWSON, D.M. HEERY, P.R. SMITH, F. GANNON u. R. POWELL (1992):

DNA probe for *Aeromonas salmonicida*.

Appl. Environ. Microbiol. 58, 1039-1042

HINEY, M.P., J.J. KILMARTIN u. P.R. SMITH (1994):

Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections.

Dis. Aquat. Org. 19, 161-167.

HIRST, I.D., u. A.E. ELLIS (1994):

Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis.

Fish & Shellfish Immunology, 4 (1), 29-45

HIRVELÄ-KOSKI, V., P. KOSKI u. T. KUOPPAMÄKI (1988):

Enrichment in tryptic soy broth for the detection of *Aeromonas salmonicida* from the kidney of carrier fish.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8(4), 85-86.

HJELTNES, B., O. BERGH, H. WERGELAND u. J.C. HOLM (1995):

Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua*, halibut *Hippoglossus hippoglossus* and wrasse (*Labridae*) to *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and the possibility of transmission of furunculosis from farmed salmon *Salmo salar* to marine fish.

Dis. aquat. Org. 23, 25-31

HØIE, S., M. HEUM u. O.F. THORESEN (1996):

Detection of *Aeromonas salmonicida* by polymerase chain reaction in Atlantic salmon vaccinated against furunculosis.

Fish & Shellfish Immun. 6, 199-206.

HOLT, J.G., N.R. KRIEG, P.H.A. SNEATH, J.T. STALEY u. S.T. WILLIAMS (Hrsg.)(1994):

Group 5 facultative anaerobic Gram-negative rods, subgroup 2: Family Vibionaceae.

in: Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 9. Aufl., Verlag Williams u. Wilkins, Baltimore, USA. S. 175-290.

HODGKINSON, J.L., D. BUCKE u. B. AUSTIN (1987):

Uptake of the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*, by rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.).

FEMS Microbiology Letters 40, 207-210.

HSU, Y.-L., S.-Y. CHIANG, S.-T. LIN u. J.-L. WU (1989):

The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by the immuno dot blot method.

J. Fish Dis. 12, 569 - 571

IIDA, T., K. NAKAKOSHI u. H. WAKABAYASHI (1984):

Isolation of atypical *Aeromonas salmonicida* from diseased eel, *Anguilla japonica*.
Fish Pathol. 19, 109-112.

ISHIGURO, E.E., T. AINSWORTH, W.W. KAY u. T.J. TRUST (1986):

Heme requirement for growth of fastidious atypical strains of *Aeromonas salmonicida*.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (3), 668-670.

ISHIGURO, E.E., W.W. KAY, T. AINSWORTH, J.B. CHAMBERLAIN, R.A. AUSTEN,
J.T. BUCKLEY u. T.J. TRUST (1981):

Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature.
J. Bacteriol. 148, 333-340.

JANDER, G. u. H. SPANDAU (1973):

Kurzes Lehrbuch der anorganischen und allgemeinen Chemie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; 7. Aufl., S. 278

JANSSON, E., T. HONGSLO, R. LINDBERG, O. LJUNGBERG u.

B.-M. SVENSSON (1991):

Detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Yersinia ruckeri* by the peroxidase -
antiperoxidase immunohistochemical technique in melanin-containing cells of fish tissues.
J. Fish Dis. 14, 689 - 692

KAY, W.W., B.M. PHIPPS, E.E. ISHIGURO u. T.J. TRUST (1985):

Porphyrin binding by the surface protein array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*.
J. Bacteriol. 164, 1332-1336.

KLONTZ, G.W., u. D.P. ANDERSON (1968):

Fluorescent antibody studies of isolates of *Aeromonas salmonicida*.
Bull. Off. int. Epiz. 69 (7-8), 1149-1157

LEE, E.G.-H. (1989):

Technique for the enumeration of *Renibacterium salmoninarum* in fish kidney tissues.
J. Aquat. Anim. Health 1, 25-28.

LEWIS, R.E., W.W. JOHNSON u. J.M. CRUSE (1983):

Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical
pathologic diagnosis.
Surv. Synth. Path. Res. 1, 134 - 152

LUKOWICZ, M.v. (1995):

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten: Jahresbericht über die
deutsche Fischwirtschaft 1994/95.
Köllen Druck + Verlag GmbH, Bonn

MARKWARDT, N., Y.M. GOCHA u. G.W. KLONTZ (1989):

A new application for Coomassie Brilliant Blue agar: detection of *Aeromonas salmonicida*
in clinical samples
Dis. aquat. Org. 6, 231 - 233

MAWDESLEY-THOMAS, L.E. (1969):

Furunculosis in the goldfish *Carassius auratus* (L.).
J. Fish Biol. 1, 19-23.

McALLISTER, P.E., u. W.B. SCHILL (1986):

Immunoblot assay: a rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses.
J. Wildlife Dis. 22(4), 468-474.

McCARTHY, D. H. (1975):

Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue.
J. Gen. Microbiol. 88, 384 - 386

McCARTHY, D. H. (1977a):

Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen - *Aeromonas salmonicida*.

in: F. A. SKINNER u. J. M. SHEWAN (Hrsg.): Aquatic Microbiology. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series no. 6, Academic Press, London, S. 299 - 324

McCARTHY, D. H. (1977b):

A latex test for rapid identification of both pure and mixed agar culture of *Aeromonas salmonicida*.

Fish Health News 6, 146 - 147

McCARTHY, D.H., D.F. AMEND, K.A. JOHNSON u. J.V. BLOOM (1983):

Aeromonas salmonicida: determination of an antigen associated with protective immunity and evaluation of an experimental bacterin.

J. Fish Dis. 6, 155-174

McCARTHY, D.H., u. C.T. RAWLE (1975):

The rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by 'smooth' and 'rough' strains of *Aeromonas salmonicida*.

J. Gen. Microbiol. 86, 185-187.

McCARTHY, D.H., u. R.J. ROBERTS (1980):

Furunculosis of fish - the present state of our knowledge.

in: M.R. Droops & H.W. Jannasch (Hrsg.): Advances in aquatic microbiology.

Academic Press Inc., New York; Vol.2, 293-341.

McCARTHY, D. H., u. P. WHITEHEAD (1977):

An immuno-india ink technique for rapid laboratory diagnosis of fish furunculosis.

J. Appl. Bacteriol. 42, 429 - 431

McINTOSH, D., u. B. AUSTIN (1993):

Potential use of vaccines based on cell-wall-defective or -deficient (L-form) *Aeromonas salmonicida* for the control of furunculosis.

J. Aquat. Anim. Health 5 (4), 254-258.

- MICHEL, C., u. A. DUBOIS-DARNAUDPEYS (1980):
Persistence of the virulence of *Aeromonas salmonicida* strains kept in river sediments.
Ann. Rech. Vét. 11(4), 375-380.
- MITCHELL, H. M. (1992):
Experiences with furunculosis in salmon culture in the bay of Fundy.
Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 16-21
- MORGAN, J.A.W., G. RHODES u. R.W. PICKUP (1993):
Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 874-880
- MOYNER, K., K. ROED, S. SEVATDAL u. M HEUM (1993):
Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced
by *Aeromonas salmonicida* infection.
Fish & Shellfish Immunology. 3, 253 - 265
- MUNN, C.B., E.E. ISHIGURO, W.W. KAY u. T.J. TRUST (1982):
Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*.
Infect. Immun. 36, 1069-1075
- NADALA, E.C.B., Y. LU, P.C. LOH u. J.A. BROCK (1992):
A streptavidin-biotin-enhanced nitrocellulose enzyme immunoassay for the detection of
rhaptovirus of penaeid shrimps from infected animals.
J. Virol. Methods. 39, 227-229
- NAISH, S.J., T. BOENISCH, A.J. FARMILO u. R.H. STEAD (1989):
Handbook of immunochemical staining methods.
DAKO Corporation, Carpintera, USA
- NEEDHAM, T., u. C. RYNES (1992):
Husbandry techniques to reduce the impact of furunculosis in seawater salmon culture.
Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 40 - 46

NESE, L., u. O. ENGER (1993):

Isolation of *Aeromonas salmonicida* from salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* and marine plankton.

Dis. Aquat. Organ. 16, 79 - 81

NIKL, L., L.J. ALBRIGHT u. T.P.T. EVELYN (1992):

Immunostimulants hold in promise in furunculosis prevention.

Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 49 - 52

NISHIKAWA, Y., A. HASE, E. ISHII u. T. KISHI (1990):

Screening of aquatic samples for *Vibrio cholerae* serotype 01 by a dot-blot method and a latex agglutination test.

Appl. Environ. Microbiol. 56(6), 1547-1550.

NOGA, E.J., u. H.A. BERKHOFF (1990):

Pathological and microbiological features of *Aeromonas salmonicida* infection in the American eel (*Anguilla rostrata*).

Fish Pathology 25(3), 127-132.

NOMURA, T., M. YOSHIMIZU u. T. KIMURA (1992):

Detection of *Aeromonas salmonicida* in the coelomic fluid and kidney of mature chum salmon (*Oncorhynchus keta*), pink salmon (*O. gorbuscha*) and masu salmon (*O. masou*).

Gyobyo Kenkyu 27 (2), 69-72

NOONAN, B., u. T.J. TRUST (1995):

The molecular biology of *Aeromonas salmonicida*.

Annual Review of Fish Diseases 5, 95-111.

NOUGAYREDE, P., E. SOCHON u. A. VUILLAUME (1990):

Isolation of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in farmed turbot (*Psetta maxima*) in France.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10(5), 139-140.

O'GRADY, P., u. P. SMITH (1992):

Use of Flumisol bath treatments to eliminate stress inducible furunculosis in salmon smolts.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(6), 201-203.

OLIVIER, G. (1990):

Virulence of *Aeromonas salmonicida*: lack of relationship with phenotypic characteristics.

J. Aquat. Anim. Health 2, 119-127.

OLIVIER, G. (1992):

Furunculosis in the Atlantic Provinces: an overview.

Bull. Aquacul. Assoc. Canada 1, 4-10

OLIVIER, G., C.A. EATON u. N. CAMPBELL (1986):

Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*).

Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 223 - 234

OLIVIER, G., T.P.T. EVELYN u. R. LALLIER (1985):

Immunogenicity of vaccines from a virulent and an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*.

J. Fish Dis. 8, 43-55

PHIPPS, B.M., T.J. TRUST, E.E. ISHIGURO u. W.W. KAY (1983):

Purification and characterization of the cell surface virulent A protein from *Aeromonas salmonicida*.

Biochem. 22, 2934-2939

POPOFF, M. (1984):

Genus III. *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936

in: N.R. KRIEG u. J.G. HOLT (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1., Verlag Williams und Wilkins, Baltimore. S. 545-548.

POUMARAT, F., B. PERRIN u. D. LONGCHAMBON (1991):

Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot).

Vet. Microbiol. 29, 329-338.

PUND, R.P., u. E.-M. BERNOTH (1993):

The standardization of rearing brown trout (*Salmo trutta f. fario*) fingerlings in recirculation water systems for experimental infection with *Aeromonas salmonicida* via water.

VI. internationale Tagung der EAAP (European Association of Fish Pathologists) "Diseases of fish and shellfish" in Brest, Frankreich, 5.-10. September 1993.

PUND, R.P., S. LEHR u. E. HENRION (1994):

Wirkung unterschiedlicher Haltungsbedingungen auf das Blutbild der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*).

Tagungsband der European Association of Fish Pathologists, Wolfegg, 14. u. 15. September 1994; S. 163-171.

RISTOW, S.S., N. LORENZEN u. P.E. VESTERGARD JÖRGENSEN (1991):

Monoclonal-antibody-based immunodot assay distinguishes between Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV).

J. Aquat. Anim. Health 3, 176-180.

ROBERTS, R. J. (1989):

The pathophysiology and systemic pathology of teleosts.

in: ROBERTS, R.J. (Hrg.): Fish pathology.

2. Aufl.; Verlag Baillière Tindall, London, UK, S. 56-134

ROBERTS, R.J., u. H.-J. SCHLOTFELDT (1985):

Grundlagen der Fischpathologie. *Aeromonas salmonicida* in: Vibrionaceae.

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 191-197.

RODGERS, C.J., u. B. AUSTIN (1985):

Oral immunization against furunculosis: an evaluation of two field trials.

in: MANNING, M.J. u. M.F. TATNER (Hrsg.): Fish Immunology.

Academic Press, London, Orlando; S. 185-194

ROMEIS, B. (1989)

Mikroskopische Technik

Verlag Urban u. Schwarzenberg, München, Wien, S. 252 - 261; S. 398-399; S. 421

ROSE, A.S., A.E. ELLIS u. A. ADAMS (1989a):

An assessment of routine *Aeromonas salmonicida* carrier detection by ELISA.

Bull.Eur. Ass. Fish Pathol. 9 (3), 65 - 67

ROSE, A.S., A.E. ELLIS u. A.L.S. MUNRO (1989b):

The infectivity by different routes of exposure and shedding rates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., held in sea water.

J. Fish Dis. 12, 573-578.

ROSE, A.S., A.E. ELLIS u. A.L.S. MUNRO (1990):

The survival of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in sea water.

J. Fish. Dis. 13, 205 - 214

ROSS, K., A.M. THOMSON, W.T. MELVIN u. A.L.S. MUNRO (1991):

Sensitive confirmation of infectious Pancreatic Necrosis Virus by dot blot using monoclonal antibodies.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11 (4), 137-139.

RÜBSAMEN u. WEIS (1985):

Nachweis von Enteric Redmouth Disease bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri* Richardson, in Südbaden.

Tierärztliche Umschau 12, 995-998

SAKAI, D.K. (1979):

Invasive routes of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Scientific reports of the Hokkaido Fish Hatchery 34, 1-6

SAKAI, D.K., u. T. KIMURA (1985):

Relationship between agglutinative properties of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from fish in Japan and their resistance to mechanisms of host defense.

Fish Pathol. 20, 9-21.

SAKAI, M., N. AMAAKI, S. ATSUTA u. M. KOBAYASHI (1987):

Comparative sensitivity of dot blot methods used to detect *Renibacterium salmoninarum*.

J. Fish Dis. 10, 415 - 418

SAKAI, M., S.ATSUTA u. M. KOBAYASHI (1986):

Comparative sensitivities of several diagnostic methods used to detect fish furunculosis.

Kitasato Arch. of Exp. Med. 59, 3, 43 - 48

SAKAI, M., S. ATSUTA u. M KOBAYASHI (1989):

Comparison of methods used to detect *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of Bacterial Kidney Disease.

J. Aquat. Anim. Health 1, 21-24.

SCHILL, W.B., G.L. BULLOCK u. D.P. ANDERSON (1989):

Serology.

in: AUSTIN, B., and D.A. AUSTIN (Hrsg): Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Verlag Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, S. 98 - 140

SCHLOTTFELDT, H.-J. (1991):

Frühjahr 1991: Zeit zur Schutzimpfung.

Fischer & Teichwirt 6, 195-197

SCHLOTTFELDT, H.-J., u. D.J. ALDERMAN (1995):

What should I do ? A practical guide for the fresh water fish farmer.

Suppl. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15 (4).

SCHLOTFELDT, H.-J., V. ALVARADO, D. STANISLAWSKI u. K.H. BÖHM (1989):
Schutz-Vakzinierung gegen die Furunkulose der Forellen und geschwürige "Karpfen-
Furunkulose" (Erythrodermatitis/ED): Feldversuche 1988/89 in Niedersachsen - erste
Ergebnisse.

Fischer & Teichwirt 9, 258-260

SCHRÖTER, W., K.H. LAUTENSCHLÄGER, H. BIBRACK u. W. STÄDTLER (1969):
Chemie - Fakten und Gesetze. Kap. 27.3.

Buch- und Zeitverlagsgesellschaft mbH Köln, S. 291

SECOMBES, C. J., u. T.C. FLETCHER (1992):

The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.

Ann. Rev. Fish Dis., 53 - 71

SHEPPARD, M.E. (1992):

Clinical impressions of furunculosis in British Columbian waters.

Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 29 - 30

SHOTTS, E.B., F.D. TALKINGTON, D.G. ELLIOTT u. D.H. McCARTHY (1980):

Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): characterization of
the causative agent.

J. Fish Dis. 3, 181-186

SMITH, P. D. (1981):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Aeromonas salmonicida* in
diseased fish tissue.

in: D. P. ANDERSON u. W. HANNESSEN (Hrsg): Proc. Int. Symp. Fish Biologies:
Serodiagnosis and Vaccines. Verlag S. Karger, Basel, S. 97 - 100

SMITH, P., u. S. DAVEY (1993):

Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-
inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad.

J. Fish Dis. 16, 521 - 524

SONG, Y.L., S.P. LEE, Y.T. LIN u. C.C. CHEN (1992):

Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis.

Dis. aquat. Org. 14, 43 - 50

STANISLAWSKI, D. (1989):

Untersuchungen zur Entwicklung eines enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis von *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* im Fischgewebe.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Fachbereich für Mikrobiologie und Tierseuchen.

STREEFKERK, J.G. (1972):

Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol.

J. Histochem. Cytochem. 20, 829 - 831

SUTHERLAND, D.W., u. V. INGLIS (1992):

Multiple antibiotic sensitivity patterns of *Aeromonas salmonicida* within diagnostic specimens from outbreaks of furunculosis.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12 (5), 163-165

SZALAI, A.J., J.E. BLY und L.W. CLEM (1994):

Changes in serum concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) phosphorylcholine-reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature-shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp.

Fish & Shellfish Immunology 4, 323-336

TAMPLIN, M.L., A.L. MARTIN, A.D. RUPLÉ, D.W. COOK u. C.W. KASPAR (1991):

Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment and oysters.

Appl. Environ. Microbiol. 57 (4), 1235 - 1240

TESKA, J., u. R.C. CIPRIANO (1993):

Nonselective nature of Coomassie Brilliant Blue agar for the presumptive identification of *Aeromonas salmonicida* in clinical specimens.

Dis. Aquat. Organ. 16, 239 - 242

THORNTON, J.C., R.A. GARDUNO u. W.W. KAY (1992):

An attenuated mutant of *Aeromonas salmonicida* as a live vaccine for salmonid furunculosis.

Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 92-1, 53 - 57

THORNTON, J.C., R.A. GARDUNO u. W.W. KAY (1994):

The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*.

J. Fish Dis. 17, 195-204

THORPE, J.E., u. R.J. ROBERTS (1972):

An aeromonad epidemic in the brown trout (*Salmo trutta* L.).

J. Fish Biol. 4, 441 - 451

THUVANDER, A., U.P. WICHARDT u. L.J. REITAN (1993):

Humoral antibody response of brown trout *Salmo trutta* vaccinated against furunculosis.

Dis. aquat. Org. 17, 17-23

TREASURER, J.W., u. L.A. LAIDLER (1994):

Aeromonas salmonicida infection on wrasse (Labridae), used as cleaner fish, on an Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farm.

J. Fish Dis. 17, 155-161

TRUST, T.J., W.W. KAY u. E.E. ISHIGURO (1983):

Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*.

Curr. Microbiol. 9, 315-318

TRUST, T.J., B. NOONAN, S. CHU, P. LUTWYCHE u. E. UMELO (1996):
A molecular approach to understanding the pathogenesis of *Aeromonas salmonicida*:
relevance to vaccine development.
Fish & Shellfish Immunol. 6, 269-276.

TURGEON, Y., u. Y. ELAZHARY (1992):
Furunculosis control with anti-*Aeromonas salmonicida* hyperimmune serum (SHAAS).
Bull. Aquacul. Assoc. Canada. 1, 64 - 67

UDEY, L.R., u. J.L. FRYER (1978):
Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*.
Marine Fisheries Review 40(3), 12-17.

VEERMAN, G.M., R. KELMAN, J. COLLEY u. J.G. PIKE (1990):
Rapid confirmatory identification of *Mycobacterium bovis* using a dot blotting immuno
detecting technique.
Vet. Microbiol. 22, 335-340.

WALTMAN, W.D., u. E.B. SHOTTS (1984):
A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*.
Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 804-806

WHITTINGTON, R.J., u. B. CULLIS (1988):
The susceptibility of salmonid fish to an atypical strain of *Aeromonas salmonicida* that
infects goldfish, *Carassius auratus* (L.), in Australia.
J. Fish Dis. 11, 461-470

WICHARDT, U.-P., N. JOHANSSON u. O. LJUNGBERG (1989):
Occurrence and distribution of *Aeromonas salmonicida* infections on Swedish fish farms,
1951-1987.
J. Aquat. Anim. Health 1, 187-196

WIEDEMANN, H. (1981):

Direkte Immunfluoreszenz zum Nachweis der *Aeromonas-salmonicida*-Infektion bei Süßwasserfischen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 153-155.

WIKLUND, T. (1990):

Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from ulcers of pike, *Esox lucius* L.

J. Fish Dis. 13, 541-544

WIKLUND, T., u. G. BYLUND (1991):

A cytochrome oxidase negative bacterium (presumably an atypical *Aeromonas salmonicida*) isolated from ulcerated flounders (*Platichthys flesus* (L.)) in the Northern Baltic sea.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11 (2), 74-76

WILLUMSEN, B. (1990):

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* isolated from Atlantic cod and coalfish.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10 (3), 62-63

WOLKE, R. E.(1992):

Piscine macrophage aggregates: a review.

Annual Rev. Fish Dis., 91 - 108

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Grund danke ich für die Akzeptierung des Dissertationsthemas, seine jahrelange Geduld und das interessante Gespräch.

Dank gebührt insbesondere Herrn Prof. Dr. Hildebrandt für seine Bereitwilligkeit, die mühevollen Arbeit als erster Gutachter so kurzfristig zu übernehmen, und für seine ausführliche und sehr hilfreiche Manuskriptkritik.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Körting und Herrn Prof. Dr. Gerlach, Tierärztliche Hochschule Hannover, bedanke ich mich für ihre bereitwillige Begutachtung des Dissertationsentwurfes.

Herzlich gedankt sei auch Frau Dr. Eva-Maria Bernoth für die Anregung zu diesem Thema, für die ständige Gesprächsbereitschaft, die stets gewährten fachlichen und praktischen Ratschläge und vor allem für ihre Geduld und Unterstützung während unserer Zusammenarbeit.

Besonders dankbar bin ich den derzeitigen und früheren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fischkrankheiten des BgVV, insbesondere Frau Elke Henrion, aber auch Annemarie Schultze, Ralf-Peter Pund, Nicolai Denzin, Barbara Burger, Katrin Rupprecht, Peyman Najand, Carola Amann und Stefan Lehr, für die unschätzbare praktische und moralische Unterstützung.

Herrn G. Friedmann-Marohn, BgVV, möchte ich für die Anfertigung der Fotos herzlich danken.

Werner, meiner Familie und allen meinen Freunden, die mich und meine fachlichen Probleme geduldig versucht haben zu verstehen und immer um Rat und gute Laune bemüht waren, kann ich gar nicht genug danken.

Lebenslauf

Name Stefanie Christiane Astrid Banneke

Geburtsdatum, -ort 31.10.1962 in Essen

Schulbesuch

1969 - 1973 Grundschule am Oemberg in Mülheim a.d. Ruhr

1973 - 1982 Gymnasium Broich in Mülheim a.d. Ruhr; Abitur

Studium

1982 - 1983 Studium der Chemie an der Ruhruniversität Bochum

1983 - 1988 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

Juni 1989 Approbation als Tierärztin in Berlin

weiterer Werdegang

April 1989 Hospitantin am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin BgVV, Berlin, Abteilung für Fischkrankheiten

Dezember 1989 Doktorantin am Institut für Mikrobiologie und Tierhygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Januar 1991 Änderung des Dissertationsthemas

1993 - 1995 wissenschaftliche Angestellte am BgVV im Rahmen des Deutsch-Israelischen Kooperationsprogrammes "Improving the knowledge base in modern aquaculture Part V"

Projekte: "orale Vakzinierung von Nutzfischen"

"Streptokokken-Meningitis bei Fischen"

1995 Wiederaufnahme der Hospitantentätigkeit im BgVV

25. 4.1997 Tag der Promotion