
**Untersuchungen zur Immunantwort des Europäischen Aals
(*Anguilla anguilla*) auf den Schwimmblasen-Nematoden
*Anguillicola crassus***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe
genehmigte
Dissertation

von
Klaus Knopf
aus Bühl
1999

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 1999
Referent: Prof. Dr. H. Taraschewski
Koreferent: Prof. Dr. Dr. P. Kimmig

INHALT

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1.	Serologie von Wildaalen.....	12
2.1.1.	Verwendete Aale.....	12
2.2.	Experimentelle Untersuchungen.....	13
2.2.1.	Aale und Hälterung im Labor.....	13
2.2.2.	Gewinnung der infektiösen Larven und Infektion.....	13
2.2.3.	Immunantwort auf eine experimentelle Infektion mit <i>Anguillicola crassus</i>	14
2.2.4.	Protektive Funktion der Immunantwort.....	15
2.2.4.1.	Reinfektion experimentell infizierter Aale.....	15
2.2.4.2.	Belastungsinfektion immunisierter Aale.....	16
2.3.	Quantifizierung von <i>Anguillicola crassus</i> und von Schwimmblasenschäden	17
2.4.	Serologische Testverfahren.....	19
2.4.1.	Blutentnahme und Gewinnung von Serum.....	19
2.4.2.	Vorbereitung der <i>Anguillicola crassus</i> zur Herstellung der Rohantigene ..	19
2.4.3.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	20
2.4.4.	Kenngrößen zur Bewertung des ELISA.....	22
2.4.5.	Immunoblot.....	23
2.4.6.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT).....	24
2.4.7.	Kreuzreaktivität von Nematoden-spezifischen Antikörpern des Aals	26
2.5.	Migrationstest für Monozyten und Granulozyten.....	27
2.5.1.	Zellgewinnung.....	27
2.5.2.	Testdurchführung.....	27
2.5.3.	Auswertung.....	28
2.6.	<i>In vitro</i> Larvazidität von Leukozyten und Antikörpern.....	30

2.7.	Statistische Auswertung.....	30
2.8.	Rezepte.....	31
3.	ERGEBNISSE.....	32
3.1.	Wildaale	32
3.1.1.	Befunde durch Sektion.....	32
3.1.2.	Serologische Untersuchungen.....	34
3.1.2.1.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
3.1.2.2.	SDS-PAGE und Immunoblot.....	38
3.1.2.3.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT).....	44
3.1.2.4.	Kreuzreaktivität.....	46
3.2.	Immunantwort experimentell infizierter Aale.....	49
3.2.1.	Antikörperantwort.....	49
3.2.2.	Migrationsaktivität von Granulozyten und Monozyten	59
3.3.	Protektive Funktion der Immunantwort.....	61
3.3.1.	Reinfektion experimentell infizierter und therapierter Aale	61
3.3.2.	Immunisierung von Aalen und Belastungsinfektion.....	63
3.3.3.	<i>In vitro</i> Larvazidität von Leukozyten und Antikörpern	66
4.	DISKUSSION	67
4.1.	Serologische Untersuchung von Wildaalen und Bewertung der Testverfahren	67
4.1.1.	Sektionsbefunde bei Wildaalen.....	68
4.1.2.	ELISA	69
4.1.3.	Immunoblot.....	71
4.1.4.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT).....	76
4.1.5.	Kreuzreaktivität.....	77
4.1.6.	Einsatzmöglichkeit der serologischen Testverfahren.....	78
4.2.	Die Immunantwort experimentell infizierter Aale.....	80
4.2.1.	Antikörperantwort.....	80

4.2.2.	Zelluläre Immunantwort.....	85
4.3.	Intraperitoneale Immunisierung.....	90
4.4.	Protektive Funktion der Immunantwort.....	91
4.5.	Die Bedeutung der Immunantwort für das Wirt-Parasit System <i>Anguilla anguilla-Anguillicola crassus</i>	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6.	LITERATURVERZEICHNIS	101
7.	ANHANG	116
8.	DANKSAGUNG.....	138

ABKÜRZUNGEN

BSA:	Bovine Serum Albumin = Rinderserumalbumin
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
IIFT:	Indirekter Immunfluoreszenz-Test
L ₂ :	zweites Larvenstadium
L ₃ :	drittes Larvenstadium
L ₄ :	viertes Larvenstadium
n:	Stichprobenumfang
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	Phosphate-buffered saline = Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
SD:	Standardabweichung
SDS:	Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
\bar{x} :	Mittelwert
x _{min} :	Minimalwert
x _{max} :	Maximalwert

1. EINLEITUNG

Unter den wirtschaftlich genutzten Fischen des Süßwassers nimmt der Aal als katadromer Wanderfisch eine Sonderstellung ein. Bis heute ist sein Lebenszyklus nicht vollständig aufgeklärt und es wurden noch nie laichreife Aale oder frisch abgelegte Eier gefunden (Tesch 1983). Auf die Lage der Laichplätze kann deshalb nur anhand des Vorkommens der jüngsten Larven geschlossen werden. Man vermutet diesen für die atlantischen Aalarten *Anguilla anguilla* (Europäischer Aal) und *Anguilla rostrata* (Amerikanischer Aal) südlich von Bermuda in der Sargassosee (Schmidt 1925, Fricke & Kaese 1995). Die Laichplätze der pazifischen Art *Anguilla japonica* (Japanischer Aal) liegen im Nordäquatorialstrom westlich der Mariana Inseln (Tsukamoto 1992).

Der Lebenszyklus des Aals ist am besten für die beiden atlantischen Arten *A. anguilla* und *A. rostrata* untersucht (Tesch 1983). Den ersten Lebensabschnitt verbringt der Aal pelagisch als *Leptocephalus*-Larve im Meer. Im Bereich des Kontinentalabhangs vollzieht sich die Metamorphose zum Glasaal. Die Glasaale wandern zur Küste, und nach einer Adaptationsphase an das Leben im Süßwasser steigen sie in die Flüsse auf. *A. anguilla* erreicht die Europäischen Küsten nach etwa 3 Jahren. Glasaale von *A. rostrata* erscheinen bereits nach 1 Jahr an der Ostküste des nordamerikanischen Kontinents. Im Süßwasser pigmentieren die Glasaale und wachsen zum sogenannten Gelbaal heran. Als sogenannte Blank- oder Silberaale wandern sie zur Fortpflanzung wieder ins Meer. Bis dahin verbringt der Europäische Aal unter natürlichen Bedingungen 4 bis 12 Jahre im Süßwasser (Tesch 1983).

Der Aal ist einer der begehrtesten Speisefische. Um die Erträge zu steigern, wird der Aalbestand seit über 100 Jahren durch Besatzmaßnahmen gestützt (Tesch 1983). Weitaus höhere Ertragssteigerungen wurden durch die Entwicklung der Intensivzucht in der Teichwirtschaft möglich. So gelang in Japan die Produktion von 36000 bis 40000 t Aalen pro Jahr (Heinsbroek 1991), was den Ertrag natürlicher Gewässer mit etwa 2000 t pro Jahr weit übersteigt (Tesch 1983). In einer ähnlichen Größenordnung liegt die Aalproduktion in Taiwan (Tesch 1983, Heinsbroek 1991). In der japanischen Aquakultur werden überwiegend Japanische Aale (*A. japonica*)

gehalten, der Anteil Europäischer Aale (*A. anguilla*) liegt bei 2 bis 5 % (Heinsbroek 1991). In Europa ist die Intensivhaltung von Aalen bisher vergleichsweise unbedeutend; sie gewinnt aber wegen der günstigen kommerziellen Voraussetzungen zunehmend an Interesse (Tesch 1983, Heinsbroek 1991).

Bei den für den Besatz verwendeten Aalen handelt es sich zwangsläufig immer um Glasaale oder sog. Satzaale, die in großen Mengen beim Aufstieg in die Flüsse gefangen werden (Tesch 1983). Durch Hormonbehandlung gelang es zwar, männliche und weibliche Aale in Gefangenschaft zur Laichreife zu bringen, doch spätestens die Aufzucht der Larven scheiterte nach 5 Tagen (Yamamoto & Yamanchi 1974, Boëtius & Boëtius 1980). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist an eine rentable Zucht von Aalen nicht zu denken.

In den 70er Jahren wurden nur etwa 10 % der in Westdeutschland konsumierten Aale im Inland produziert, den verbleibenden Bedarf deckten Importe unter anderem aus Japan, Taiwan und Neuseeland (Tesch 1983, Koops & Hartmann 1989). Der unkontrollierte weltweite Handel mit lebenden Aalen führte dazu, daß bislang nicht endemische Aalparasiten nach Europa eingeschleppt wurden (Køie 1991, Kennedy 1993). Um das Jahr 1980 gelangten vermutlich mit Aalimporten aus Taiwan der Schwimmblasen-Nematode *Anguillicola crassus* sowie die auf den Kiemen parasitierenden monogenen Trematoden *Pseudodactylogyrus anguillae* und *P. bini* nach Zentraleuropa und konnten sich mit dem Europäischen Aal als Wirt erfolgreich etablieren (Buchmann et al. 1987, Køie 1991). *Anguillicola novaezelandiae* wurde wahrscheinlich im Jahr 1975 mit importierten Aalen aus Neuseeland (*Anguilla australis*) in den italienischen Lago Bracciano eingeschleppt (Moravec & Taraschewski 1988).

Während die Verbreitung von *Anguillicola novaezelandiae* offenbar auf den Lago Bracciano beschränkt blieb (Moravec et al. 1994, a), zeigten sowohl die *Pseudodactylogyrus*-Arten als auch *Anguillicola crassus* eine rasche Verbreitung (Buchmann et al. 1987, Køie 1991, Moravec 1992). Für die Intensivaufzucht des Europäischen Aals brachte dies wirtschaftliche Einbußen, weil sich die genannten

Parasiten als sehr pathogen erwiesen (Køie 1991). Dies deckt sich mit Erkenntnissen, welche bereits einige Jahre zuvor in Japan gewonnen wurden. Seinerzeit hatte man dort wegen zunehmender Probleme bei der Beschaffung ausreichender Mengen an Glasaalen des Japanischen Aals versucht, auch importierte Europäische Aale in der Aquakultur einzusetzen (Egusa 1979, Tesch 1983). Die erzielten Resultate waren zumeist jedoch nicht befriedigend, unter anderem deshalb, weil sich der Europäische Aal sehr empfindlich gegenüber den endemischen Parasiten des Japanischen Aals gezeigt hatte (Egusa 1979). Im Gegensatz hierzu stellt die weite Verbreitung von *Pseudodactylogyrus* spp. und *A. crassus* in Japan kein wirtschaftliches Problem bei der Intensivzucht Japanischer Aale dar (Egusa 1979).

Die von Moravec & Taraschewski (1988) revidierte Gattung *Anguillicola* (Nematoda, Dracunculoidea, Anguillicolidae) umfaßt 5 gültige Arten, die als adulte Nematoden alle in der Schwimmblase von Aalen der Gattung *Anguilla* parasitieren und sich vom Blut ihrer Wirte ernähren. Die Art *Anguillicola crassus* war ursprünglich ein Parasit des Japanischen Aals und in seiner Verbreitung auf Japan, Korea, Taiwan und China beschränkt (Kuwahara et al. 1974, Moravec & Taraschewski 1988, Nagasawa et al. 1994).

Der erste Nachweis von *A. crassus* in Europa erfolgte 1982 in der Weser-Ems-Region (Neumann 1985). Da weibliche *A. crassus* eine Länge von etwa 4 cm erreichen können (Moravec & Taraschewski 1988) und somit sehr auffällig sind, ist davon auszugehen, daß der Erstnachweis und die Einschleppung zeitlich nahe beieinander liegen. In den folgenden 10 Jahren verbreitete sich der Parasit sehr schnell über weite Teile Europas (Moravec 1992) und ist neuerdings auch in Nordafrika zu finden (Maamouri et al. 1999). Lediglich in Skandinavien scheint eine durch die Temperatur bedingte Ausbreitungsgrenze zu bestehen (Höglund et al. 1992, Knopf et al. 1998, Wickström et al. 1998). Die schnelle Ausbreitung des Parasiten wurde sicherlich durch regelmäßige Besatzmaßnahmen und den Lebendtransport von Aalen unterstützt (Belpaire et al. 1989, Kennedy & Fitch 1990). Seit 1994 ist *A. crassus* auch in den südwestlichen USA als Parasit des Amerikanischen Aals nachgewiesen (Johnson et al. 1995, Fries & Williams 1996).

Der indirekte Entwicklungszyklus von *A. crassus* (Hirose et al. 1976, Kim et al. 1989, beide zitiert in Nagasawa et al. 1994, Haenen et al. 1989, Petter et al. 1989, 1990, De Charleroy et al. 1990, Kennedy & Fitch 1990, Blanc et al. 1992, Thomas & Ollevier 1994, Moravec et al. 1993, Moravec et al. 1994, b) ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

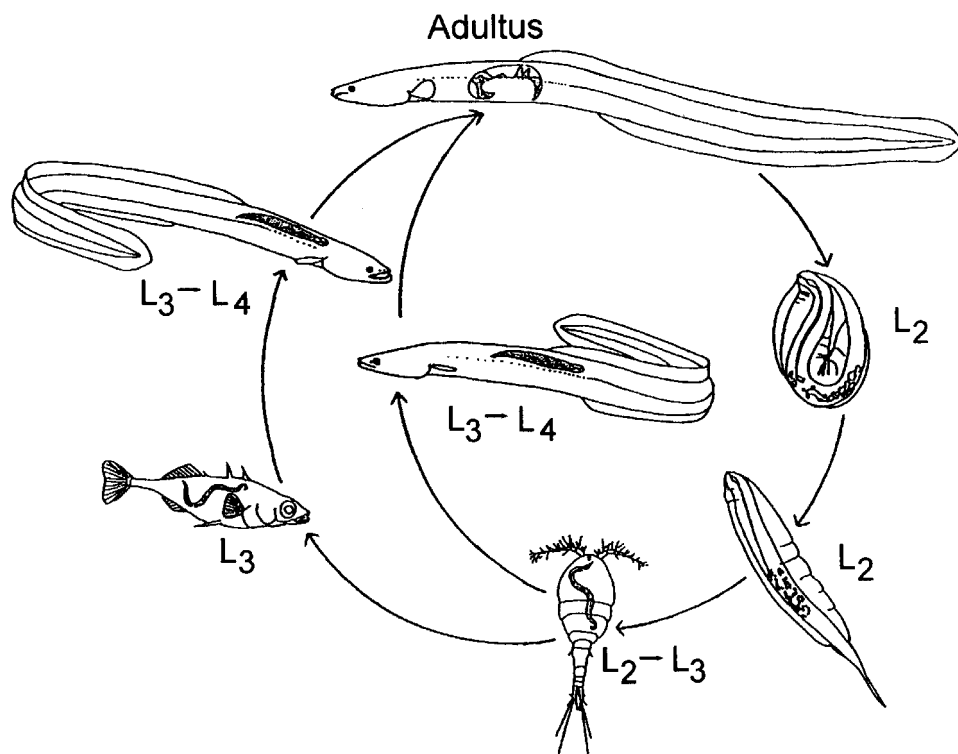


Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Anguillicola crassus* (nach Stemmer 1988, verändert)

Die von den Nematoden abgelegten Eier enthalten bereits das fertig entwickelte zweite Larvenstadium (L_2). Über den Ductus pneumaticus und den Darm des Aals gelangen diese ins freie Wasser. Spätestens hier schlüpfen die L_2 und werden dann von einem Zwischenwirt aufgenommen, in dessen Haemocoel sie sich zu dem für den Aal infektiösen dritten Larvenstadium (L_3) entwickeln (Abb. 2A). Als gesicherte Zwischenwirte wurden verschiedene cyclopoide Copepodenarten beschrieben (De Charleroy et al. 1990, Kennedy & Fitch 1990, Hartmann 1994).

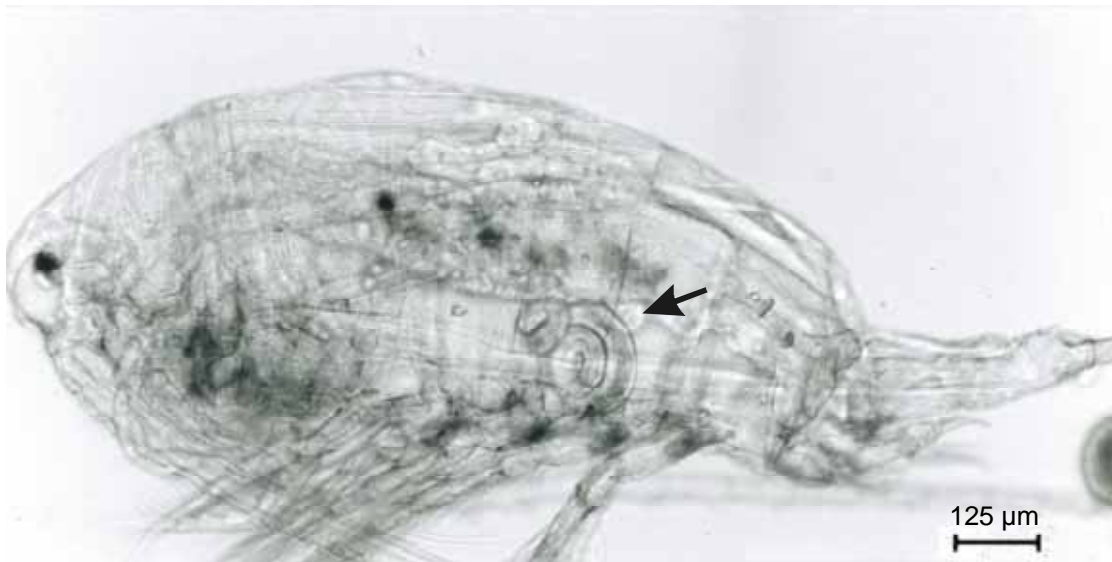


Abb. 2A: *Eudiaptomus* sp. (Calanoida) mit L_3 von *Anguillicola crassus* (Pfeil) im Haemocoel

Auch calanoide Copepoden, Ostracoden und der Amphipode *Gammarus pulex* ließen sich experimentell infizieren, doch ist bei diesen bisher nicht nachgewiesen, ob sich die L_2 tatsächlich zur einer für den Aal infektiösen L_3 entwickelt (Kennedy & Fitch 1990, Bonneau et al. 1991, Hartmann 1994, Moravec & Konecny 1994). Nach oraler Aufnahme durch den Aal wandern die L_3 durch die Darmwand in die Schwimmblasenwand, wo sie sich zum vierten Larvenstadium entwickeln (L_4). Nach

der letzten, vierten Häutung dringt der Parasit in das Schwimmblasenlumen ein und wächst zur Geschlechtsreife heran (Abb. 2B).

In den Entwicklungszyklus von *A. crassus* können zahlreiche Fischarten, die zumindest als Jungtiere in das Beutespektrum des Aals gehören, als paratenische Wirte eingeschaltet sein (De Charleroy et al. 1990, Haenen & Van Banning 1990, Höglund & Thomas 1992, Thomas & Ollevier 1992, Moravec & Konecny 1994, Pazooki & Székely 1994, Reimer et al. 1994, Székely 1994, Székely 1996). Moravec (1996) konnte zeigen, daß auch aquatische Gastropoden als paratenische Wirte dienen können.

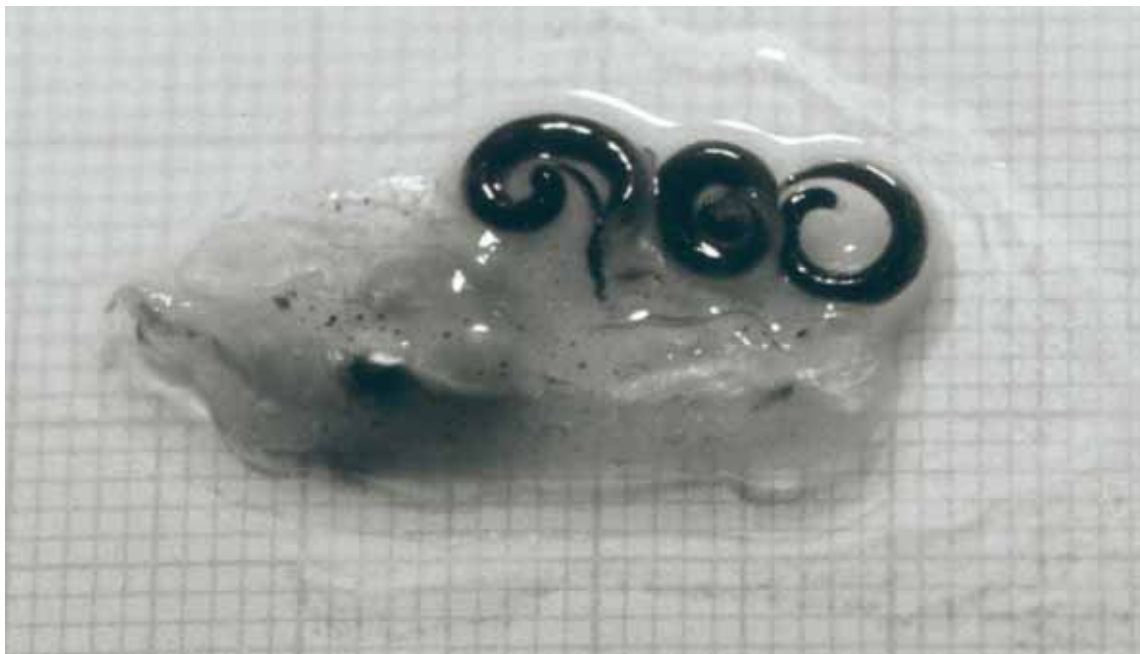


Abb. 2B: Geöffnete Schwimmblase eines Aals mit adulten *Anguillicola crassus*

Beim Europäischen Aal verursacht eine Infektion mit *A. crassus* massive pathologische Gewebeveränderungen der Schwimmblasenwand (Van Banning & Haenen 1990, Molnár et al. 1991, 1993, Hartmann 1994, Molnár 1994, Molnár et al. 1995, Würtz & Taraschewski, im Druck) und eine verminderte Gassekretion in das

Schwimmbblasenlumen (Würtz et al. 1996). Weiterhin zeigten infizierte Europäische Aale eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber sekundären bakteriellen Infektionen (Van Banning & Haenen 1990). Unter experimentellen Bedingungen konnte ein verlangsamtes Wachstum (Boon et al. 1990) und eine reduzierte Schwimmleistung (Sprengel & Lüchtenberg 1991) infizierter Aale nachgewiesen werden. Bei der Intensivhaltung Europäischer Aale verursacht *A. crassus* eine erhöhte Mortalität (Køie 1991, Van Banning & Haenen 1990). Im Plattensee wurde ein Aalsterben auf die Infektion mit *A. crassus* in Verbindung mit einer niedrigen Sauerstoffkonzentration im Wasser zurückgeführt (Molnár et al. 1991, Molnár 1993). Bemerkenswert ist, daß die Infektion mit *A. crassus* beim ursprünglichen Wirt *Anguilla japonica* offensichtlich weitgehend ohne Krankheitssymptome verläuft (Egusa 1979).

Es ist bekannt, daß die zu den Laichplätzen abwandernden Blankaale die bodenorientierte Lebensweise aufgeben und im freien Wasser schwimmen (Tesch 1983, Fricke & Kaese 1995). Angesichts der gestörten Gassekretion in die Schwimmblase und der massiven Gewebeveränderungen bis hin zum vollständigen Funktionsverlust des hydrostatischen Organs bestehen daher berechtigte Zweifel, ob derart geschädigte Aale in der Lage sind, ihre Laichplätze zu erreichen (Würtz et al. 1996). So könnte die Einschleppung von *A. crassus* nach Europa zu einer ernsthaften Gefährdung des Europäischen Aals führen.

Untersuchungen von Haenen et al. (1994a) zeigen, daß die Befallsrate Europäischer Aale bei einer etablierten *A. crassus*-Population im IJsselmeer und Markermeer über 7 Jahre hinweg fluktuierte, und auch 1993 sogar über dem langjährigen Mittelwert noch bei etwa 80% lag. Demgegenüber hatte sich jedoch die mittlere Befallsrate in den beiden Gewässern nach einem Maximum im Jahr 1989 von etwa 14 bzw. 17 auf 5,1 bzw. 4,4 *A. crassus* pro Aal verringert. Diese Befallszahlen stimmen gut mit der aktuellen Situation im Rhein überein (Würtz et al. 1998, Sures et al., im Druck). Ashworth (1994) nimmt an, daß sich die mittlere Befallsintensität nach einiger Zeit bei etwa 4 bis 5 *A. crassus* pro Aal einstellt. Der Rückgang in der Befallsintensität bei freilebenden Europäischen Aalen führte zu der Vermutung, daß hierfür eine protektive Immunität des Aals verantwortlich sein könnte (Haenen et al. 1994a).

Es ist bekannt, daß Fische auf eine parasitäre Infektion sowohl mit der Bildung IgM-ähnlicher Antikörper als auch mit unspezifischen humoralen Abwehrfaktoren und einer zellulären Immunantwort reagieren (Evans & Gratzek 1989, Woo 1992). Zu den unspezifischen Abwehrkomponenten im Serum von Fischen gehören unter anderem das Komplementsystem, C-reaktives Protein, Interferon und Lysozyme (Ingram 1980). Eine erworbene protektive Immunität bei Fischen gegen Parasiten konnte bisher vor allem gegenüber der Infektion parasitischer Protozoen nachgewiesen werden (Woo 1992). Sehr intensiv wurde die Immunantwort und der Mechanismus der protektiven Immunität mit dem Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* untersucht (Evans & Gratzek 1989, Lin et al. 1996, Clark & Dickerson 1997). Was Helminthen betrifft, wurde für monogene Trematoden, die auf der Haut oder den Kiemen ihres Wirtes parasitieren, ein teilweiser, wahrscheinlich durch spezifische Antikörper vermittelter Schutz vor einer Reinfektion beschrieben (Woo 1992). Weiterhin konnte die Immunabwehr des digenen Trematoden *Diplostomum spathaceum* bei der Regenbogenforelle nachgewiesen werden (Whyte et al. 1990). Nur sehr wenige Untersuchungen liegen bisher zur Immunantwort von Fischen auf eine Infektion mit Nematoden vor. Sie beschränken sich auf den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Anisakis simplex* beim Seelachs (*Polachius virens*) und gegen *Philometra lusiana* beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) (Dick & Choudhury 1995) sowie die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zur Immunantwort des Aals auf eine Infektion mit *A. crassus*.

Untersuchungen zur Immunantwort des Aals gegen *A. crassus* wurden fast ausschließlich mit dem Europäischen Aal durchgeführt und beschränken sich weitgehend auf die humorale Immunantwort. Mit der Immunoblot-Technik konnten im Serum natürlich infizierter Aale Antikörper nachgewiesen werden, die mit verschiedenen Antigenen der adulten Nematoden reagieren (Buchmann et al. 1991, Höglund & Pilstöm 1995, Haenen et al. 1996). Erst kürzlich wurden Antigene adulter *A. crassus* als Untereinheiten einer Glutathion-S-Transferase beschrieben (Nielsen & Buchmann 1997). Ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im Serum von Aalen wurde von Höglund & Pilström (1994, 1995) entwickelt. Alle diese Arbeiten erfolgten mit Seren freilebender, also natürlich infizierter Aale, oder mit Seren von Aalen, denen ein

Homogenat adulter *A. crassus* zusammen mit Freund´s Adjuvant intraperitoneal injiziert wurde (Höglund & Pilström 1994, 1995). Bisher war es jedoch nicht möglich, die Antikörperantwort gegen *A. crassus* bei experimentell infizierten Aalen nachzuweisen (Haenen et al. 1996, Van der Heijden et al. 1996).

Die diagnostische Wertigkeit der serologischen Untersuchungsverfahren erscheint bisher fraglich. Die mit der Immunoblot-Technik gewonnenen Resultate stimmen zwar in der Beschreibung einiger klar definierter Banden überein, die Angaben zu deren Spezifität sind jedoch widersprüchlich (Buchmann et al. 1991, Höglund & Pilström 1995, Haenen et al. 1996). Haenen et al. (1996) und Békési (1997) untersuchten Seren von 38 bzw. 21 wild gefangenen Aalen im ELISA und fanden keinen Zusammenhang der Testergebnisse mit dem tatsächlichen Infektionsstatus.

Zweifellos liegt die wesentliche Bedeutung der serologischen Tests nicht in der Anwendung für epidemiologische Studien. Hier liefert die direkte Untersuchung von Schwimmblasen durch Sektion der Aale bei einem geringeren Zeit- und Kostenaufwand und mit sehr hoher Genauigkeit Informationen zur Befallsintensität, den vorhandenen Entwicklungsstadien und den auftretenden Schwimmblasenschäden. Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort des Aals auf eine Infektion mit *A. crassus* sind leistungsfähige serologische Untersuchungsverfahren jedoch essentiell.

Lichtmikroskopische Untersuchungen an Schwimmblasen infizierter Aale zeigten, daß es im Bereich der in der Submucosa migrierenden L₃ zu einer Entzündungsreaktion mit einer massiven Infiltration von inflammatorischen Zellen kommen kann. Diese unspezifische Abwehrreaktion war jedoch keinesfalls immer zu beobachten (Haenen et al. 1989, Van Banning & Haenen 1990, Molnár et al. 1993, Molnár 1994). In einigen Fällen sind auch eingekapselte, tote L₃ im Gewebe des Wirtes zu finden (Molnár, 1994). Würtz & Taraschewski (im Druck) konnten elektronenmikroskopisch keine Schädigung der L₃ und L₄ durch die Phagozyten des Aals beobachten, weshalb sie vermuten, daß die eingewanderten Phagozyten lediglich an der Beseitigung des nekrotischen Gewebes beteiligt sind.

Da die Untersuchung von Wirts-Parasit-Interaktionen mit wild gefangenen Aalen naturgemäß den Nachteil beinhaltet, daß immer nur eine Momentaufnahme erfaßt wird und keine Informationen zur Infektionsgenese vorliegen, sind experimentelle Untersuchungen für eine zuverlässige und umfassende Beschreibung der Immunantwort des Aals auf eine Infektion mit *A. crassus* unerlässlich. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, durch eine experimentelle Infektion von Aalen eine nachweisbare Immunantwort zu induzieren, deren Verlauf zu charakterisieren und zu überprüfen, ob hiermit eine protektive Immunität gegenüber weiterer Infektionen verbunden ist. Hierbei wurde sowohl die spezifische humorale Immunantwort als auch die zelluläre Immunantwort berücksichtigt. Da die L₃ und L₄ von *A. crassus* im Gegensatz zu den adulten Nematoden im Gewebe der Wirtes leben und so in direktem Kontakt zum Immunsystem stehen, war zu vermuten, daß sich eine effektive Immunantwort primär gegen diese Larvenstadien richtet. Im Widerspruch hierzu wurden alle bisher vorliegenden Erkenntnisse zur Antikörperantwort des Aals mit Antigenextrakten adulter *A. crassus* erzielt (Buchmann et al. 1991, Höglund & Pilström 1994, 1995, Haenen et al. 1996, Nielsen & Buchmann 1997) und es war nicht bekannt, ob spezifisch gegen die Invasionslarve gerichtete Antikörper gebildet werden. Aus diesem Grund wurden die L₃ in der vorliegenden Arbeit besonders berücksichtigt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Serologie von Wildaalen

Als Grundlage für die experimentellen Untersuchungen zur Immunantwort des Europäischen Aals auf eine Infektion mit *Anguillicola crassus* wurden die in dieser Arbeit angewendeten immunserologischen Testverfahren zunächst mit Seren natürlich infizierter Aale aufgebaut und optimiert. Bei den Testverfahren handelte es sich um einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), die Immunoblot-Technik und einen indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT).

Die diagnostische Wertigkeit der serologischen Tests wurde anhand eines Screeningkollektivs von 100 Wildaalen überprüft. Als Referenz hierzu dienten der durch die Sektion der Aale bestimmte tatsächliche Infektionsstatus und der Schädigungsgrad der Schwimmblasenwand.

2.1.1. Verwendete Aale

Die verwendeten Wildaale wurden im August 1995 in Nebengewässern des Rheins nördlich von Karlsruhe elektrisch gefischt. Bei den Probestellen handelte es sich um das Hafenbecken von Germersheim und den Leimersheimer Altrhein (Sures et al., im Druck). Die Masse und die Gesamtlänge dieser Aale umfaßte einen Bereich von 24 g bis 502 g bzw. 25 cm bis 65,9 cm.

Die Aale wurden innerhalb von 2 Tagen nach dem Fang durch Genickschnitt getötet. Die herauspräparierten Schwimmblasen wurden auf einen Befall mit *Anguillicola crassus* sowie makroskopisch auf erkennbare Schwimmblasenschäden untersucht. Die Blutentnahme für die serologische Untersuchung erfolgte direkt vor der Tötung der Aale.

2.2. Experimentelle Untersuchungen

2.2.1. Aale und Hälterung im Labor

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Aale von dem Betrieb Limnotherm (Bergheim, Deutschland) bezogen. Die Limnotherm-Anlage ist frei von *Anguillicola crassus*. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, daß das dort verwendete Wasser in den Teichen zuvor als Kühlwasser eines Kohlekraftwerkes diente und somit der Eintrag von Copepoden oder Kleinfischen mit infektiösen L₃ ausgeschlossen ist. Eine parasitologische und bakteriologische Kontrolluntersuchung wurde vor Beginn der Versuche durch Dr. Huwer am Tierhygienischen Institut Freiburg mit 3 Aalen durchgeführt. Außer einem geringfügigen Befall mit *Pseudodactylogyrus* sp. bei einem Aal konnten keine krankhaften Befunde festgestellt werden. Am Ende des Versuchs waren auf den Kiemen der Versuchstieren keine *Pseudodactylogyrus* nachweisbar.

Zur Vermeidung von interspezifischem Streß wurden die Versuchstiere einzeln in einem Wasservolumen von jeweils 40 l gehalten. Ein weiterer Vorteil der Einzelhaltung bestand darin, daß die Tiere individuell beobachtet werden konnten. Als Versteckmöglichkeit stand jedem Aal eine Polypropylenröhre zur Verfügung. Die Wassertemperatur betrug 20°C. Eine optimale Wasserqualität war mit dem Betrieb der Aquarienanlage im Durchlaufsystem mit Karlsruher Leitungswasser gegeben. Die Fütterung der Aale erfolgte 2 mal die Woche mit ca. 0,7 g Pelletfutter pro Tier. Vor Beginn der Experimente wurden die Aale zur Eingewöhnung mindestens 2 Wochen in der Anlage gehältert.

2.2.2. Gewinnung der infektiösen Larven und Infektion

Larven im L₂ Stadium wurden aus dem Schwimmblasenlumen natürlich infizierter Aale gesammelt und an Copepoden verfüttert. Bei den Copepoden handelte sich um der Natur entnommene planktische Arten, im wesentlichen *Thermocyclops* cf. *crassus* und *Mesocyclops leuckarti*. Die Copepoden wurden mit Hefe und der Grünalge

Scenedesmus sp. gefüttert. Nach 20 Tagen bei 20°C erfolgte die Isolierung der L₃ mit der von Haenen et al. (1994b) beschriebenen Methode. Die Copepoden wurden mit Hilfe eines 100 µm Siebes auf ein geringes Volumen konzentriert, in Hepes-gepuffertem RMPI-1640 Zellkulturmedium (Sigma, Deisenhofen) suspendiert und mit Hilfe eines Hand-Homogenisators aus Glas zerquetscht. Die Trennung der Larven von den Resten der Copepoden und von Detritus erfolgte mit einem Vlies-Filter (Nr. 0981, Schleicher & Schuell, Dassel). Das Filterpapier war durch 2 Glasstreifen und Netzgaze (100µm) etwa 1mm über dem Boden einer Petrischale platziert und mit Medium bedeckt. In einer feuchten Kammer bei 20°C wanderten die L₃ nahezu quantitativ durch das Filterpapier und konnten so einfach aus dem Medium aufgesammelt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Larven in RMPI-1640 Medium mit 0,2 % Kanamycin bei 4°C aufbewahrt.

Für die experimentelle Infektion der Aale wurde die benötigte Anzahl an Larven abgezählt und in 100 µl RMPI-1640 Medium suspendiert. Diese Suspension bekamen die Aale mit einer Magensonde (Durchmesser 1,5 mm) oral appliziert.

2.2.3. Immunantwort auf eine experimentelle Infektion mit

Anguillicola crassus

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Aale aus der Limnotherm-Anlage (Bergheim, Deutschland) mit einer Masse von $69,0 \pm 20,9$ g ($\bar{X} \pm SD$). Drei Gruppen von jeweils 9 Aalen wurden experimentell mit *Anguillicola crassus* infiziert. Eine der Gruppen bekam nur zu Beginn des Experiments 40 L₃ appliziert. Die beiden anderen Gruppen wurden über einen Zeitraum von 140 Tagen wiederholt infiziert, um natürliche Bedingungen unter einem hohen Infektionsdruck zu simulieren. Diese Aale bekamen 2 mal pro Woche jeweils 3 L₃ bzw. wöchentlich 20 L₃ appliziert. Eine letzte Infektion mit 25 L₃ erfolgte am Tag 185. Zur Kontrolle bekam eine vierte Gruppe von 9 Aalen 2 mal wöchentlich nur PBS, aber keine L₃ verabreicht.

Von allen Aalen wurde im Abstand von 2 Wochen bis zum Tag 325 nach der ersten Infektion Blutproben von 150 µl zur Gewinnung von Serum genommen. Der

individuelle Verlauf der spezifischen humoralen Immunantwort wurde quantitativ mit einem ELISA (Kapitel 2.4.4.) für L₃ und adulte *A. crassus* bestimmt. Zur qualitativen Beschreibung der gebildeten Antikörper dienten Immunoblots (Kapitel 2.4.6.) mit ausgewählten Seren.

Bei den wiederholt mit 2 mal 3 L₃ pro Woche infizierten Aalen und bei den Kontrolltieren wurde zu Beginn des Experiments und 1 Woche nach der letzten Infektion die Migrationsaktivität der Granulozyten und Monozyten unter dem Einfluß der infektiösen L₃ von *A. crassus* mit der Mikrofilterporentchnik nach Boyden (1962) untersucht siehe (Kapitel 2.5.). Daher mußte sich das Volumen der entnommenen Blutprobe an diesen Tagen auf insgesamt 0,5 ml erhöhen.

2.2.4. Protektive Funktion der Immunantwort

Um der Frage nachzugehen, ob mit der gegen *Anguillicola crassus* gerichteten Immunantwort auch ein Schutz vor einer erneuten Infektion verbunden ist, wurden 2 Versuche durchgeführt. Zum einen wurden die mit 2 mal 3 L₃ pro Woche infizierten Aale und die entsprechenden Kontrolltiere im Anschluß an den oben (Kapitel 2.2.3.) beschriebenen Versuch mit Levamisol (Bayer, Leverkusen) therapiert und anschließend einer Reinfektion ausgesetzt. In einem zweiten Versuch erfolgte eine Belastungsinfektion bei Aalen, die zuvor durch intraperitoneale Injektion von homogenisierten L₃ oder adulten *A. crassus* immunisiert wurden.

2.2.4.1. Reinfektion experimentell infizierter Aale

Um den Erfolg der Reinfektion bei zuvor experimentell infizierten Aalen am Ende des Experiments überprüfen zu können, mußten zunächst alle vorhandenen *Anguillicola crassus* abgetötet werden. Hierfür wurde das Anthelminthikum Levamisol von Taraschewski et al. (1988) als das zweckmäßigste Mittel beschrieben. Allerdings werden hiermit nur die adulten Nematoden, nicht aber die Larvenstadien letal geschädigt (Hartmann 1989).

Um die Entwicklung aller applizierten L₃ zum Adultus zu gewährleisten, erfolgte die Therapie erst 150 Tage nach der letzten Infektion. Diese Zeitspanne entspricht etwa der 1,5-fachen Entwicklungsdauer von *A. crassus* bei 20°C (Knopf et al. 1998). Die Behandlung mit Levamisol wurde mit einer Dosis von 10 mg/l im Dauerbad über 24 Stunden durchgeführt und zur Sicherheit nach 30 Tagen wiederholt. Nach weiteren 35 Tagen erfolgte die Reinfektion mit 25 L₃. Nach nochmals 139 Tagen wurden die Aale durch Genickschnitt getötet. Die Schwimmblasen wurden makroskopisch und mikroskopisch auf einen Befall mit *A. crassus* untersucht.

Der Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen L₃ bzw. adulte *A. crassus* im peripheren Blut der Versuchstiere wurde im zeitlichen Verlauf mit einem ELISA gemessen. Die Blutentnahme erfolgte in einem Rhythmus von 14 Tagen bis zum Ende des Versuchs.

2.2.4.2. Belastungsinfektion immunisierter Aale

Vorversuche zeigten, daß sich eine humorale Immunantwort beim Aal durch die intraperitoneale Injektion von Nematoden-Homogenat auch ohne Zugabe eines Adjuvants induzieren läßt. Um die Versuchstiere möglichst wenig zu strapazieren, wurde daher bei der Immunisierung auf die Verwendung eines Adjuvants verzichtet.

Adulte *Anguillicola crassus* und L₃ wurden im Eisbad mit einem Ultraschall-Homogenisator in PBS homogenisiert (3 x 5 s, 50 W). Zuvor wurde der größte Teil des Darminhalts der adulten Nematoden ausgequetscht, um den relativen Anteil der anderen Komponenten im Homogenat zu erhöhen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte nach Lowry et al. (1951).

Das Homogenat der adulten *A. crassus* war auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Hiervon wurden 0,2 ml intraperitoneal in 10 Aale injiziert. Die Konzentration des L₃-Homogenats war um den Faktor 10 geringer, da die Zahl der zur Verfügung stehenden L₃ begrenzt war. Sieben Aale bekamen das Äquivalent von 570 L₃ (dies entspricht etwa 40 µg Protein) in 0,2 ml PBS injiziert. Zur Kontrolle wurde 7 weiteren Aalen lediglich 0,2 ml PBS injiziert.

Nach 84 Tage erfolgte die Belastungsinfektion aller Aale mit 20 L₃. Während des Versuches wurde der Verlauf des Gehalts an spezifischen Antikörpern gegen L₃ und adulte *A. crassus* im peripheren Blut der Versuchstiere mit einem ELISA gemessen. 120 Tage nach der Infektion wurden die Aale durch Genickschnitt getötet und die Schwimmblasen auf einen Befall mit *A. crassus* untersucht.

2.3. Quantifizierung von *Anguillicola crassus* und von Schwimmblasenschäden

Die Schwimmblasen der Aale wurden makroskopisch und mikroskopisch auf adulte und larvale *Anguillicola crassus* untersucht. Weil die sichere Unterscheidung von L₃ und L₄ lichtmikroskopisch nicht immer möglich ist (Blanc et al. 1992), wurden entsprechend den Angaben von Blanc et al. (1992) alle Larven, die länger als 1,5 mm waren, als L₄ bezeichnet.

Bei den experimentellen Untersuchungen wurde die Masse der Frischsubstanz der adulten *A. crassus* im Schwimmblasenlumen bestimmt. Die Nematoden jeder Schwimmblase wurden nach Geschlecht getrennt zu je einer Probe zusammengefaßt, trockengetupft und gewogen. Aus der Gesamtmasse und der Anzahl der Würmer errechnete sich die mittlere individuelle Masse der männlichen bzw. weiblichen *A. crassus* aus einer Schwimmblase.

Bei der Untersuchung von Wildaalen wurde zusätzlich der Zustand der Schwimmblasenwand makroskopisch beurteilt. Da eine Infektion mit *A. crassus* beim Aal mit hoher Wahrscheinlichkeit pathologische Veränderungen der Schwimmblasenwand verursacht (Van Banning & Haenen 1990, Molnár et al. 1993, Molnár 1994, Haenen et al. 1996, Würtz & Taraschewski, im Druck), sind diese Veränderungen als Indiz für eine überstandene Infektion zu bewerten, auch wenn zum Zeitpunkt der Sektion keine der Parasiten mehr vorzufinden sind. Die Schädigung der Schwimmblase wurde entsprechend Hartmann (1994) mit einer fünfstufigen Skala erfaßt. Die Definitionen der Schadensklassen 1 bis 5 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Zusätzlich zu den von Hartmann (1994) benutzten Kriterien für die

Schadensklasse 2, welche den Beginn der parasitenbedingten Gewebeveränderung beschreibt, wurde hier auch die Pigmentierung der Schwimmblase berücksichtigt, da Melanomacrophagen als integraler Bestandteil des reticuloendothelialen Systems zu betrachten sind und häufig im Bereich von Entzündungsherden aggregieren (Agius 1985, Ellis et al. 1985).

Tabelle 1: Klassifizierung von Schwimmblasenschäden beim Aal (verändert nach Hartmann 1994)

Schadensklasse	Befund
SK 1	Ohne Gewebsveränderung: Schwimmblasenwand dünn und transparent
SK 2	Schwache Verschwartung: Schwimmblasenwand leicht verdickt und eingetrübt, teilweise pigmentiert ¹⁾
SK 3	Starke Verschwartung: Schwimmblasenwand undurchsichtig, Lumen reduziert, aber mit Gas gefüllt
SK 4	Verschwartung und weitere pathologische Effekte: wie SK 3, zusätzlich Hämorrhagien, Entzündungen, Nekrosen, Verwachsungen, Exsudat im Lumen, starke Pigmentierung, eingekapselte <i>A. crassus</i> im Bindegewebe
SK 5	Fortgeschrittene Verschwartung der Schwimmblasenwand: sehr stark verdickt, Lumen zu engem, gaslosem Schlauch eingeengt

¹⁾ Die Melanisierung der Schwimmblasenwand wurde von Hartmann (1994) bei der Einteilung der Schadensklassen nicht berücksichtigt.

2.4. Serologische Testverfahren

2.4.1. Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Blutproben von 150 µl wurden durch Punktion der Caudalvene (Kanüle Nr. 14, 0,60 x 30) gewonnen. Hierzu erfolgte keine Betäubung der Aale. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde das geronnene Blut 5 min bei 2000 x g zentrifugiert, das Serum abpipettiert und zum Entfernen eventueller Verunreinigungen durch Blutzellen nochmals zentrifugiert. Das Serum wurde bei -70°C aufbewahrt.

2.4.2. Vorbereitung der *Anguillicola crassus* zur Herstellung der Rohantigene

Adulte *Anguillicola crassus* wurden aus den Schwimmblasen von natürlich infizierten Aalen gesammelt, in PBS gewaschen und präparativ in die Kompartimente Hautmuskelschlauch, gelatinöse äußere Schicht der dreischichtigen Cuticula (vergl. Taraschewski et al. 1987, 1988), weibliche und männliche Geschlechtsorgane, Darmwand, Darminhalt und den vordersten Körperabschnitt von der Länge des Oesophagus aufgetrennt. Die Reinigung der Darmwand vom Darminhalt erfolgte durch wiederholtes Waschen in PBS.

L₃ von *A. crassus* wurden durch die experimentelle Infektion von Zwischenwirten im Labor gewonnen (siehe Kapitel 2.2.2.). Die Larven wurden wiederholt in PBS gewaschen und über einem Dichtegradienten (Histopaque 1077, Sigma, 2000 x g) aufkonzentriert, bis auch im mikroskopischen Bild (600x) keine Verunreinigungen mehr festzustellen waren. Pellets zu etwa 10000 L₃ wurden bei -70°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Aufgrund ihrer geringen Größe und der benötigten Antigenmenge mußten die L₃ von *A. crassus* komplett für die Herstellung eines Larven-Rohantigens verwendet werden und konnten nicht in einzelne Kompartimente unterteilt werden.

2.4.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Herstellung von Rohantigenextrakten für den ELISA wurden intakte L₃ von *Anguillicola crassus* sowie der Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators in einem 10-fachen Volumen Sarcosyl-TE-Puffer homogenisiert und anschließend 20 min mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehaltes des Antigenextraktes erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951).

Für den ELISA wurde der Antigenextrakt vom Hautmuskelschlauch der adulten *A. crassus* gewählt, da sich bei Vorversuchen mit der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) zeigte, daß dieses Rohantigen mit dem von Höglund & Pilström (1995) beschriebenen „cuticular antigen“ übereinstimmt. Unter den von Höglund & Pilström (1995) untersuchten Fraktionen adulter *A. crassus* hatte sich dieses wegen seiner hohen Sensitivität und geringen Hintergrundreaktion als das Brauchbarste für den ELISA erwiesen. Die optimale Verdünnung für das Rohantigen und die Testseren wurden anhand einer Schachbretttitration ermittelt.

Das Rohantigen wurde mit Beschichtungspuffer auf eine Proteinkonzentration von 1,5 µg/ml verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf Mikrotitermodule aus Polystyren (high binding quality, Nunc, Kamstrup, Dänemark) aufgebracht. Nach der Beschichtung wurde 3 mal mit PBS-T gewaschen, mit PBS-T-BSA 3 h bei 20°C abgeblockt und 4 mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die beschichteten Module 30 min bei 37°C im Vakuum getrocknet, versiegelt und in Kunststoffolie eingeschweißt bei -70°C aufbewahrt.

Für die Durchführung des Tests wurde das Aalserum 1:100 in PBS-T-BSA verdünnt und in den beschichteten Modulen für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Für jedes Serum wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als sekundäre Antikörper wurden monoklonale Antikörper, spezifisch für die schwere Kette des Aal-Immunglobulins (WEI 1, Van der Heijden et al. 1995) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T-BSA verwendet. Als tertiärer Antikörper diente anti-Maus IgG vom Schaf,

konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (AP271, The Binding Site, Birmingham, England) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T-BSA. Beide Antikörper wurden jeweils für 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Kavitäten wurden jeweils mit 75 µl gefüllt und nach jedem Inkubationsschritt wurde 3 mal mit PBS-T gewaschen. Schließlich wurden je 75 µl des Substrates o-Phenylendiamin (OPD, Abbott, Wiesbaden) zugefügt, und die Reaktion wurde nach 15 min durch die Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, Meckenheim).

Als einheitliche Bezugsgröße für die Meßwerte diente ein gepooltes negatives Serum, das bei jeder Messung mitgeführt wurde. Um die inter-assay-Varianz auszugleichen, wurde folgender Quotient ermittelt:

$$Q = \frac{\text{Extinktion des Testserums}}{\text{Extinktion des negativen Kontrollserums}}$$

Um auszuschließen, daß mit dem ELISA Antikörper bestimmt werden, die unspezifisch z.B. auch mit dem zum Abblocken verwendeten BSA reagierten, wurden Kontrollmessungen mit Mikrotiterplatten durchgeführt, die lediglich mit BSA abgeblockt, aber nicht mit Rohantigen von *A. crassus* beschichtet waren.

Bei der statistischen Auswertung des in Kapitel 2.2.3. beschriebenen Versuches ergab sich das Problem, daß bei einer Serumverdünnung von 1:100 die ELISA-Werte einiger Seren jenseits des linearen Meßbereiches (> 2,0) lagen. In solchen Fällen erfolgte eine Wiederholung der Messungen mit einer höheren Serumverdünnung. Der Verdünnungseffekt konnte anschließend mit Hilfe eines Korrekturfaktors ausgeglichen werden. Dieser Faktor wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe solcher Seren ermittelt, die auch bei der Verdünnung 1:100 Extinktionswerte innerhalb des Meßbereiches lieferten und in der Zeitreihe links und rechts der hochwertigen Seren lagen.

2.4.4. Kenngrößen zur Bewertung des ELISA

Als externe Referenz („gold standard“) zur Bewertung des ELISA wurde der tatsächliche Zustand der jeweiligen Schwimmblasen herangezogen, d.h. die Präsenz von *Anguillicola crassus* sowie histologische Veränderungen der Schwimmblasenwand. Die Berechnung der Testparameter erfolgte für 3 verschiedene als „wirklich positiv“ definierte Befunde:

1. bestehende Infektion mit larvalen und/oder adulten *A. crassus* oder pathologische Veränderungen der Schwimmblasenwand
2. bestehende Infektion mit larvalen und/oder adulten *A. crassus*
3. bestehende Infektion mit adulten *A. crassus*.

Der ELISA wurde mit Hilfe eines cut-off Wertes dichotomisiert. Dieser errechnete sich als Summe des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung ($\bar{X} + 3 SD$) der Extinktionswerte der Seren von 43 sicher nicht infizierten Farmaalen (siehe Kapitel 2.2.1.). So konnten die Meßergebnisse des Screeningkollektivs als positives oder negatives Resultat klassifiziert werden. Die diagnostische Wertigkeit des Tests wurde anhand seiner Spezifität, Sensitivität sowie dem positiven und negativen Vorhersagewert beurteilt. Der wichtigste Parameter hiervon ist der Vorhersagewert (Voller & De Savigny 1981), da er sowohl von der Spezifität bzw. Sensitivität des Tests als auch von der Prävalenz des untersuchten Merkmals abhängt. Die Parameter für das Screeningkollektiv errechneten sich entsprechend Abel (1993). Die Gleichungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Präzision des Tests ist als prozentualer Anteil der Standardabweichung am Mittelwert simultaner (intra-assay-Variationskoeffizient) und wiederholter (inter-assay-Variationskoeffizient) Messungen angegeben.

Tabelle 2: Berechnung von Spezifität (Sp), Sensitivität (Se), positivem Vorhersagewert (PVp) und negativem Vorhersagewert (PVn) nach Abel (1993)

Test	Kollektiv	
	wirklich positiv	wirklich negativ
positiv	a	b
negativ	c	d
	Se = Fehler!	Sp = Fehler!
	PVp = Fehler!	PVn = Fehler!

2.4.5. Immunoblot

Die einzelnen Fraktionen von adulten *Anguillicola crassus*, ganze L₃ von *A. crassus* sowie Vollblut nicht infizierter Aale wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer gelöst, für 3,5 min auf 95°C erhitzt und 20 min mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -70°C aufbewahrt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Rohantigenextrakte von den Fraktionen adulter *A. crassus* im Vergleich zu einem Antigenextrakt von ganzen weiblichen Nematoden ein wesentlich klareres Bandenmuster ergeben. Aus diesem Grund wurde der Antigenextrakt von ganzen adulten *A. crassus* im Immunoblot nicht eingesetzt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und der Westernblot erfolgten in einem System zur automatischen Elektrophorese (PhastSystem, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) mit käuflichen homogenen Gelen (12,5 %, Pharmacia LKB). Für die Elektrophorese wurde der Proteingehalt für jedes Rohantigen so eingestellt, daß

eine optimale Auftrennung und Sensitivität zu erreichen war. Die Trennbedingungen waren 220 V, 20 mA bei 15°C; bei 70 VAh wurde die Elektrophorese beendet. Den denaturierten Proteinen wurde anhand von parallel zu den Proben aufgetrennten Markerproteinen (Pharmacia LKB) ein Molekulargewicht zugeordnet. Die Silberfärbung der Gele erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers (Pharmacia LKB). Der Westernblot erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Holzhauer (1988) im „semidry“-PhastSystem (Pharmacia LKB) bei 15°C, 20V und 25mA für 20 min auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Pall Gelman Sciences, Roßdorf). Die Membran wurde 3 mal 10 min in demineralisiertem Wasser gewaschen, in Streifen geschnitten, im Vakuum bei 37°C getrocknet und bei -70°C aufbewahrt.

Die Streifen wurden mit Aalseren in einer Verdünnung von 1:100 in PBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundäre Antikörper dienten für die schwere Kette des Aal-Immunglobulins spezifische monoklonale Antikörper (WEI 1, Van der Heijden et al. 1995) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-T, als tertiäre Antikörper mit Meerrettich Peroxidase konjugierte anti-Maus IgG vom Schaf (AP271, The Binding Site) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T. Beide Antikörper wurden jeweils für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde 3 mal 15 min mit PBS-T gewaschen. Als Substrat wurde eine frisch hergestellte Lösung von Diaminobenzidin (DAB, Sigma) zugegeben. Die Substratreaktion wurde nach 30 min mit demineralisiertem Wasser gestoppt.

2.4.6. Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Für den IIFT wurden Gefrierschnitte von 8 µm Stärke von adulten *Anguillicola crassus* und von L₃ angefertigt. Hierzu wurden die Nematoden in Tissue-Tek II (Lab-Tek Products, Division Miles Laboratories Inc., Naperville, Illinois, USA) eingebettet. Die Schnitte wurden auf Multi-spot Objektträger aufgeklebt, an der Luft getrocknet und 10 min in Aceton fixiert. Getrocknet und in Aluminiumfolie eingewickelt wurden diese Präparate bei -70°C aufbewahrt.

Die Schnitte wurden 45 min mit Aalseren (1:10 in PBS) und jeweils 30 min mit WEI 1 (1:100 in PBS) und FITC markiertem anti-Maus-IgG vom Schaf (1:200 in PBS; F262, Dako, Carpinteria, CA, USA) bei 37°C inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1 % Evans Blue. Nach jedem Inkubationsschritt wurde 2 mal 10 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurde mit Vectashield H-100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

Ganze L₃ wurden 15 min in Aceton-Essigsäure-Methanol (5:1:4, v/v) fixiert. Da die fixierten Larven nur sehr schlecht auf der Oberfläche des Objektträgers hafteten, erfolgte die Inkubation in Aalserum sowie sekundären und tertiären Antikörpern in den Lösungen bei 37°C. Die Verdünnungen und Inkubationszeiten glichen jeweils denjenigen für die Schnitte. Nach dem letzten Waschen wurden die L₃ auf einen Objektträger aufgetropft und mit Vectashield H-100 (Vector Laboratories) eingedeckt.

Die Resultate wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

2.4.7. Kreuzreaktivität von Nematoden-spezifischen Antikörpern des Aals

Da Kreuzreaktivität Nematoden-spezifischer Antikörper in der serologischen Diagnostik ein verbreitetes Problem darstellt (Voller & De Savigny 1981, Maizels et al. 1982, De Leeuw & Cornelissen 1991, Janitschke et al. 1998), wurde wechselseitig die Reaktivität von Antiseren gegen *Anguillicola crassus* und gegen *Raphidascaris acus* mit den entsprechenden Antigenen untersucht. Der anisakide Nematode *R. acus* parasitiert im Darm des Aals und anderer räuberischer Süßwasserfische (Schäperclaus 1990).

Adulte *R. acus* wurden aus dem Darm von Aalen des Screeningkollektivs isoliert und in PBS gewaschen. Die Herstellung der Antigenextrakte von *R. acus* für den ELISA und den Immunoblot erfolgte, wie in Kapitel 2.4.3. für die L₃ von *A. crassus* beschrieben, mit den ganzen Nematoden.

Antiseren gegen adulte *Anguillicola crassus* und adulte *Raphidascaris acus* wurden entsprechend der Vorgehensweise von Höglund & Pilström (1995) durch intraperitoneale Injektion von homogenisierten Nematoden in seronegative, nicht infizierte Aale hergestellt. Vor dem Homogenisieren (Ultraschall 5 x 5 s, 50 W, im Eisbad) wurde der Darminhalt aus den adulten *A. crassus* ausgequetscht, um dessen Anteil am Rohantigen zu reduzieren. Jeweils 3 Aalen von etwa 90 g wurden 0,2 ml einer Suspension homogenisierter Nematoden in PBS mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml injiziert, die in einem gleichen Volumen Freund's vollständigem Adjuvant (Sigma) emulgiert war. Zur Kontrolle dienten 3 Aale, die lediglich PBS und Freund's Adjuvant verabreicht bekamen. Die Blutentnahme erfolgte 25 Tage nach der Injektion. Die Seren der 3 jeweils gleich behandelten Aale wurden gepoolt um die Reaktivität mit Antigenen von *A. crassus* und *R. acus* im ELISA und Immunoblot zu überprüfen.

2.5. Migrationstest für Monozyten und Granulozyten

Die Migration von Monozyten und Granulozyten des Europäischen Aals unter dem Einfluß der L₃ von *Anguillicola crassus* wurde mit der von Boyden (1962) beschriebenen Mikrofilterporentechnik gemessen. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß Leukozyten die Poren einer Membran unter dem Einfluß eines Konzentrationsgradienten durchwandern. Diese Membran trennt eine Kammer (Boyden-Kammer) in 2 Kompartimente. In das obere Kompartiment der Kammer werden die Leukozyten gegeben, in das untere die Testsubstanz. Die Porengröße muß so gewählt werden, daß die untersuchten Zellen die Membran nur durch aktive Migration durchdringen können.

2.5.1. Zellgewinnung

Die Anreicherung von Leukozyten erfolgte aus 200 µl heparinisiertem Vollblut. In den verwendeten Spritzen war Liquemin (Hoffmann-La Roche, Basel) in Hespesgepuffertem RPMI-1640 Medium (Sigma) mit 100 IU ml⁻¹ Blut vorgelegt. Das Blut wurde 1:2 mit Medium verdünnt und über Histopaque 1077 und Histopaque 1119 (Sigma) mit 400 x g bei 20°C zentrifugiert. Die abpipetierten Leukozyten wurden 3 mal in Medium gewaschen und mit 250 x g zentrifugiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Endkonzentration der Monozyten und Granulozyten auf 5 x 10⁵ ml⁻¹ unter Zusatz von Medium eingestellt.

2.5.2. Testdurchführung

Für den Migrationstest wurde eine 10 well Chemotaxis Kammer (Nr. 442000, Costar, Bodenheim) verwendet, die eine Modifikation der Boyden-Kammer darstellt. Die eingesetzte Polycarbonat-Membran (Nr. 155813, Costar) hatte eine Porengröße von 5 µm. Diese Porengröße wurde bereits von Hamers et al. (1992) zur Bestimmung der Migrationsaktivität von Leukozyten des Aals gegen den Acanthocephalen *Paratenuisentis ambiguus* eingesetzt. Klinger (1983) gibt die Größe der Monozyten und

Granulozyten des Aals mit $12,22 \times 10,69 \mu\text{m}$ bzw. $11,97 \times 10,60 \mu\text{m}$ an. Somit ist es auszuschließen, daß diese Zellen die Membran passiv durchdringen.

In das untere Kompartiment wurden 10 lebende L_3 gegeben, es wurde mit Medium aufgefüllt und mit der Membran luftblasenfrei abgedeckt. Das obere Kompartiment wurde mit $200 \mu\text{l}$ der Zellsuspension gefüllt. Dem Medium beider Kompartimente war 5 % autologes Serum und 0,2 % Kanamycin zugefügt. Zur Kontrolle wurde die Spontanbeweglichkeit der Monozyten und Granulozyten ohne L_3 im unteren Teil der Kammer bestimmt. Alle Ansätze wurden doppelt durchgeführt. Die Inkubationszeit der Kammer betrug 1,5 Stunden bei 20°C . Nach der Inkubation erfolgte die Fixierung und panoptische Färbung der luftgetrockneten Membran nach Pappenheim (Schäperclaus 1990).

2.5.3. Auswertung

Der relative Anteil der durch die Membranporen gewanderten Monozyten und Granulozyten wurde durch Zählung der Zellen auf der Oberseite und Unterseite der Membran bei 1200facher Vergrößerung (vergl. Abb. 3) ermittelt. Bei jedem Ansatz wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt. Da der Zellkern von Granulozyten im peripheren Blut des Aals wie bei vielen anderen Teleostei meist bohnenförmig ist (Ellis 1977, Klinger 1983, Blüm et al. 1988, Rowley et al. 1988), war bei der angewendeten Färbung eine Abgrenzung der Monozyten von den neutrophilen Granulozyten schwierig. Daher wurden die Monozyten und Granulozyten wie in der Studie von Hamers et al. (1992) bei der Auswertung zusammengefaßt.

Aus den ermittelten Daten errechnete sich die Migrationsrate (MR) und der Migrationsindex (MI) entsprechend Hamers et al. (1992). Die MR errechnete sich als Quotient der Anzahl von Monozyten und Granulozyten an der Unterseite der Membran und der Gesamtzahl dieser Zellen. Damit die Ergebnisse vergleichbar sind, wurde der MI als Differenz der MR mit L_3 und der MR der Kontrolle ohne L_3 berechnet.

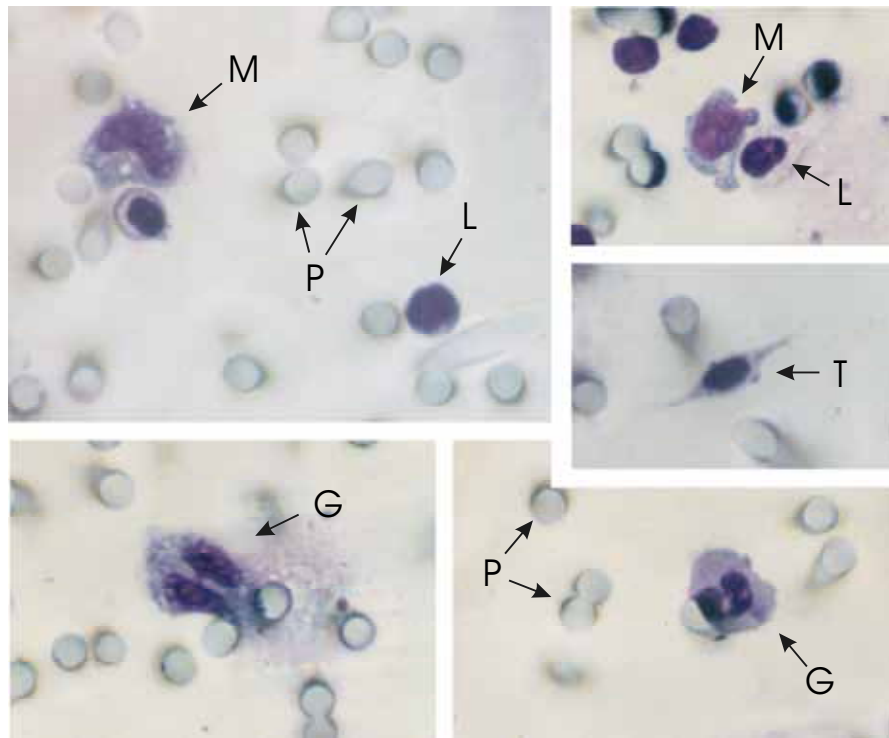


Abb. 3: Nach Pappenheim gefärbte Membran des Leukozyten-Migrationstests.

P = Membranpore (Durchmesser 5 μm) , M = Monozyt, G = Granulozyt, L = Lymphozyt,
T = Thrombozyt

2.6. *In vitro* Larvazidität von Leukozyten und Antikörpern

Etwa 10 L₃ von *Anguillicola crassus* wurden in den Kavitäten einer Mikotiterplatte mit 2×10^4 Monozyten und Granulozyten eines experimentell infizierten und ELISA-positiven Aals bei 20°C inkubiert. Die Anreicherung der Leukozyten erfolgte wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben. Die Überprüfung des Effekts einer Opsonisierung durch spezifische Antikörper erfolgte mit der Zugabe von 25 % gepooltem *Anguillicola*-positivem Serum zu dem Hepes-gepufferten RMPI-1640 Medium (Sigma). Zur Kontrolle wurden L₃ ohne Leukozyten inkubiert, bzw. wurde das positive Serum durch gepooltes Negativserum nicht infizierter Aale ersetzt. Es wurden je 8 parallele Ansätze durchgeführt. Die Mortalität der L₃ wurde nach 4, 12, 18, 24 und 46 Stunden ermittelt.

2.7. Statistische Auswertung

Für den Vergleich einzelner Meßwerte auf signifikante Unterschiede wurden verschiedene nicht-parametrische statistische Testverfahren angewendet (Sachs 1992).

Dies waren für verbundene Stichproben der H-Test (Kruskal-Wallis-Test, bei mehr als 2 Stichproben) und der U-Test (Mann & Whitney, bei 2 Stichproben). Für verbundene Stichproben wurden die Rang-Varianzanalyse nach Friedman (bei mehr als 2 Stichproben) und der Wilcoxon-Test (bei 2 Stichproben) eingesetzt. Zur Prüfung, ob eine Korrelation zwischen zwei Reihen von Meßwerten besteht, wurde der Spearman'sche Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt. Ein signifikanter Unterschied wurde dann angenommen, wenn das Signifikanz-Niveau (p) bei zweiseitiger Fragestellung $\leq 0,05$ war. Die Berechnungen wurden mit dem Programm Winstat (Greulich Software) durchgeführt.

Die zur Überprüfung statistisch signifikanter Zusammenhänge angewandten Testverfahren und die jeweiligen Signifikanz-Niveaus sind in den einzelnen Kapiteln des Ergebnisteils jeweils genannt. Mittelwerte (\bar{X}) sind mit der zugehörigen Standardabweichung (SD) und dem Stichprobenumfang (n) angegeben. Die zugrunde liegenden Daten finden sich im Anhang (Kapitel 7).

2.8. Rezepte

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2:

42,5 g NaCl, 1,0 g KH_2PO_4 , 4,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml A. bidest.

PBS-Tween (0,05 %):

2,5 ml Tween 20 (Fluka) auf 5000 ml PBS

PBS-Tween-Albumin (1 %), pH 7,2-7,4:

10 g bovines Albumin (BSA) auf 1000 ml PBS-Tween

Sarcosyl-TE-Puffer, pH 8,0:

10 mM Tris, 1 mM Titriplex II (EDTA), 2 % N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz in A. bidest.

Carbonatpuffer (Beschichtungs-/Coating-Puffer) für ELISA, pH 9,6:

1,6 g Na_2CO_3 und 2,94 g NaHCO_3 auf 1000 ml A. bidest., pH mit 1 n NaOH einstellen

Probenpuffer für SDS-PAGE (reduzierend):

0,545 g Tris-Base, 10 ml Glycerin, 90 ml A. bidest., 7 g SDS, 30 mg Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA), 17 mg Phenylmethyl-Sulfonylfluorid (PMSF). Kurz vor Gebrauch zu je 5 ml der Lösung 0,15 g Dithithreitol (DTT) geben.

Elektrodenpuffer für Westernblotting:

Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris-Base

Anodenpuffer 2: 25 mM Tris-Base

Kathodenpuffer: 0,05 % SDS, 0,3 % Tris-Base, 0,5 % E-Aminocaprinsäure (EAC)

Substratlösung für Immunoblot:

30 mg Diaminobenzidin (DAB, freie Base) in 500 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen, 100 ml PBS und 40 μl H_2O_2 (30 %ig) zugeben

3. ERGEBNISSE

3.1. Wildaale

3.1.1. Befunde durch Sektion

Die Prävalenz von adulten und larvalen *Anguillicola crassus* in dem Kollektiv von 100 Wildaalen betrug 83%. In 13 der infizierten Aale wurden nur Larven, aber keine adulten *A. crassus* gefunden. Die Abundanz von *A. crassus* betrug $4,6 \pm 4,8$ ($\bar{X} \pm SD$). Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Befallsintensität der infizierten Aale.

Tabelle 3: Befallsintensität (in %) der natürlich infizierten Aale des Screenigkollektivs

	Gesamt (n = 88)	Larvale <i>A. crassus</i> (n = 59)	adulte <i>A. crassus</i> (n = 70)
\bar{X}	5,5	3,3	3,7
SD	4,7	2,8	3,7
X_{min}	1	1	1
X_{max}	26	13	22

Die Häufigkeit der beobachteten Schwimmblasenschäden ist in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Schwimmblasenwand von 88 % der untersuchten Aale wies makroskopisch erkennbare krankhafte Veränderungen auf. Nur einer der Aale war zum Zeitpunkt der Untersuchung weder mit *A. crassus* infiziert, noch war eine Schädigung der Schwimmblasenwand zu erkennen. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der festgestellten Schwimmblasenschädigung und der Anzahl gefundener *A. crassus*, weder mit der Gesamtzahl der Parasiten noch mit der Anzahl der Larven oder der adulten Nematoden (Rangkorrelation nach Spearman, $p > 0,05$).

Tabelle 4: Häufigkeit (in %) pathologischer Veränderungen der Schwimmblase natürlich infizierter Aale des Screenigkollektivs in Abhängigkeit vom Infektionsstatus

Schadens- Klasse ¹⁾	alle Aale (n = 100)		Infektionsstatus			
			nicht infiziert (n = 17)		larvale und/oder adulte <i>A. crassus</i> (n= 83)	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
SK 1	12	(12,0 %)	2	(11,8 %)	10	(12,0 %)
SK 2	59	(59,0 %)	11	(64,7 %)	48	(57,8 %)
SK 3	17	(17,0 %)	2	(11,8 %)	15	(18,0 %)
SK 4	9	(9,0 %)	1	(5,9 %)	8	(9,6 %)
SK 5	3	(3,0 %)	1	(5,9 %)	2	(2,4 %)
SK 2-5	88	(88,0 %)	15	(88,2 %)	73	(88,0 %)

¹⁾Zur Definition der Schadensklassen SK 1 bis SK 5 siehe Tabelle 1

3.1.2. Serologische Untersuchungen

3.1.2.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die mittels ELISA bestimmte Reaktivität der Seren des Screeningkollektivs mit Antigenen vom Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus* umfaßte den ganzen Bereich von eindeutig negativen bis zu hoch positiven Ergebnissen. Der Gehalt an spezifischen Antikörpern im peripheren Blut der wild gefangenen Aale war nicht mit der Anzahl der gefundenen Parasiten korreliert, weder mit der Gesamtzahl noch mit der Anzahl der gefundenen Larven oder der adulten *A. crassus* (Rangkorrelation nach Spearman, $p > 0,05$). Ebenso wenig war der Antikörpergehalt mit dem Grad der Schwimmblasenschädigung korreliert.

Abb. 4 gibt einen exemplarischen Überblick über die Verteilung der Befallsintensität, den Gehalt spezifisch reagierender Antikörper und den Schwimmblasenschäden für die Gesamtzahl der in den Schwimmblasen gefundenen larvalen und adulten Nematoden. Ein ähnliches Bild erhält man auch, wenn man für die Betrachtung jeweils nur die Anzahl der gefundenen Larven oder die der adulten *A. crassus* heranzieht (nicht dargestellt). Da der ELISA ursprünglich im Hinblick auf seine Sensitivität optimiert wurde, überschreiten einige Meßwerte den linearen Meßbereich ($> 2,0$). Gleichwohl können diese Werte als hoch positiv betrachtet werden.

Der intra-assay Variationskoeffizient der ELISA wurde mit 9,1 % bestimmt ($n=80$), die inter-assay Varianz betrug 16,7 % ($n=12$).

Die Messung von Seren 43 nicht infizierter Farmaale ergab eine optische Dichte von $0,300 \pm 0,116$ ($\bar{x} \pm SD$). Hieraus errechnete sich ein cut-off Wert von 0,648. Bei der Verwendung dieses Grenzwertes waren 32 der wild gefangenen Aale aus dem Screeningkollektiv seronegativ, 68 der Aale waren seropositiv (Abb. 4). Zur Evaluierung des ELISA für die Serodiagnostik einer Anguillicolosis wurde dieses Testergebnis den durch Sektion der Aale gewonnenen Befunden gegenübergestellt und die Spezifität, die Sensitivität und die Vorhersagewerte des Tests berechnet (Tabelle 3).

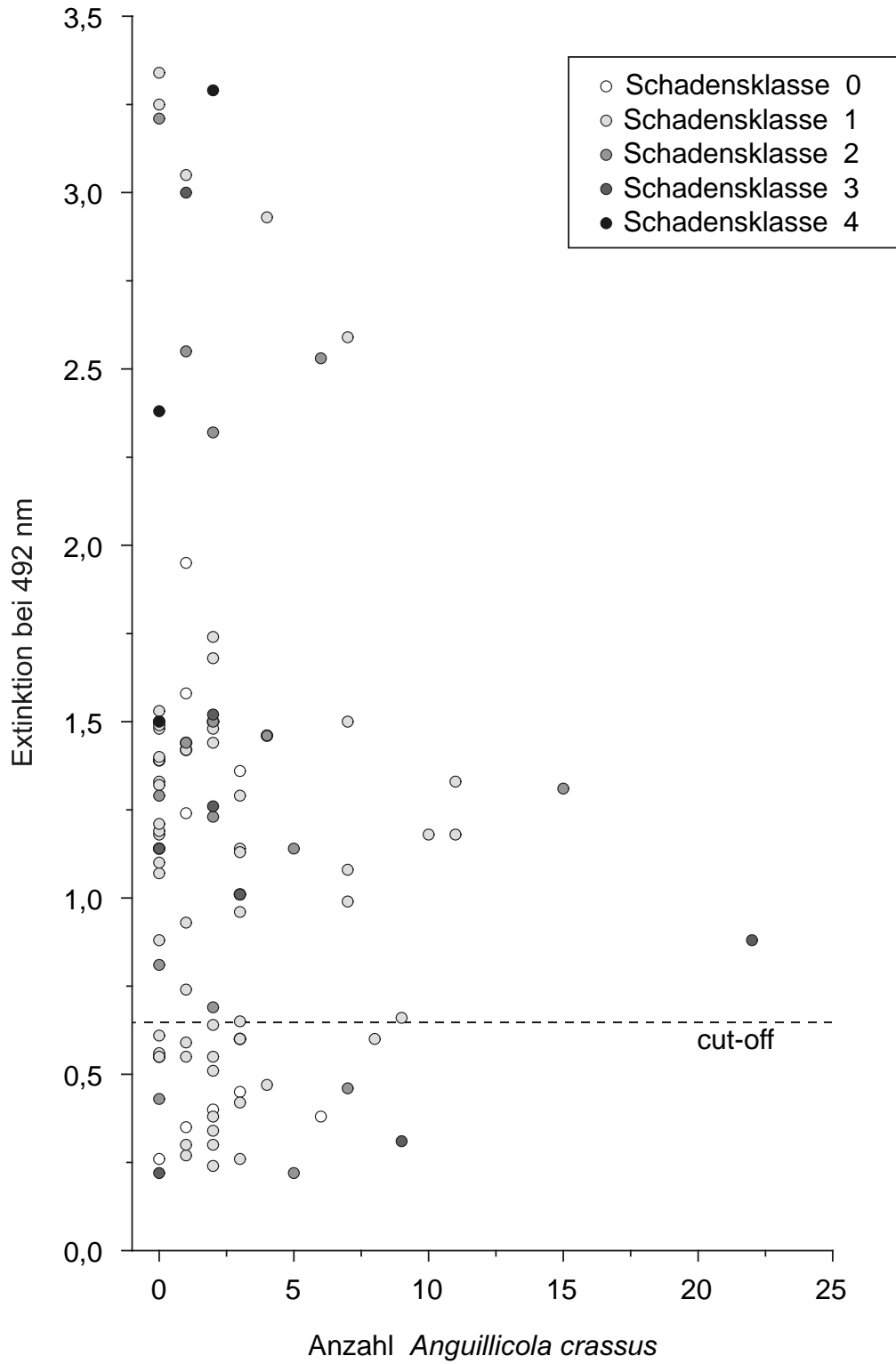


Abb. 4: Resultate des Screenings von Wilddaalen auf Antikörper, die spezifisch mit Antigenen des Hautmuskelschlauchs von *Anguillicola crassus* reagieren. Dargestellt sind die im ELISA gemessenen Extinktionen in ihrer Beziehung zu der Anzahl der gefundenen *A. crassus* (larval und adult) und der festgestellten Schwimmblasenschädigung.

Tabelle 3: Spezifität (Sp), Sensitivität(Se), positiver Vorhersagewert (PVp) und negativer Vorhersagewert (PVn) des ELISA in Bezug zu den Sektionsbefunden der Wildaale

ELISA	Sektionsbefund					
	Infektion und/oder Schwimmblasenschaden		Infektion (Larven und/oder adulte <i>A. crassus</i>)		Infektion (adulte <i>A. crassus</i>)	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
positiv	67	1	55	13	46	22
negativ	32	0	28	4	24	8
	Se = 67,7 % Sp = 0,0 % PVp = 98,5 % PVn = 0,0 %		Se = 66,3 % Sp = 23,5 % PVp = 80,9 % PVn = 12,5 %		Se = 65,7 % Sp = 26,7 % PVp = 67,6 % PVn = 25,0 %	

Die Anzahl der beim ELISA als „falsch positiv“ oder als „falsch negativ“ zu beurteilenden Testergebnisse und damit auch die Sensitivität, die Spezifität und die Vorhersagewerte des Tests hängen erwartungsgemäß davon ab, welcher der Sektionsbefunde als „wirklich positiv“ definiert wird.

Bewertet man durch Sektion gewonnene Befunde als positiv, bei denen entweder eine aktuelle Infektion mit *A. crassus* oder eine Schädigung der Schwimmblasenwand festgestellt wurde, bleibt von den 100 untersuchten Aalen nur ein Exemplar, das keines dieser Merkmale zeigte. Im ELISA erwies sich dieser Aal aber als seropositiv. Reduziert man die Definition eines positiven Befundes auf eine bestehende Infektion mit larvalen und/oder adulten *A. crassus* oder sogar auf eine bestehende Infektion nur mit adulten *A. crassus*, so erhöht sich die Anzahl der als negativ zu bewertenden Sektionsbefunde. Die meisten der entsprechenden Seren ergaben im ELISA jedoch ein

positives Ergebnis. Infolge der geringen Übereinstimmung negativer Testergebnisse und negativer Sektionsbefunde sind die errechnete Spezifität und der negative Vorhersagewert des Tests für das Screeningkollektiv sehr niedrig. Eine Verbesserung der für eine Serodiagnostik unbefriedigend niedrigen Spezifität des Tests durch das Erhöhen des cut-off Wertes war nicht möglich, ohne daß sich hierdurch die Sensitivität inakzeptabel verringerte.

Unter den untersuchten Seren von 43 Farmaalen ergab nur eines einen Meßwert, der den cut-off Wert von 0,648 überschritt, d.h. der ELISA erreichte für diese Farmaale eine Spezifität von 97,7 %.

3.1.2.2. SDS-PAGE und Immunoblot

Mit der angewendeten SDS-PAGE konnte eine gute Auftrennung der aufgetragenen Proteine erzielt werden. Jeder Rohantigenextrakt ergab ein charakteristisches, komplexes Protein-Bandenmuster. Die verschiedenen Fraktionen von adulten *A. crassus* unterschieden sich, abhängig von deren jeweiligen Proteinzusammensetzung, deutlich voneinander. Die äußere Cuticula war durch 2 breite, unscharfe Banden mit einem Molekulargewicht 105 und 96 kDa sowie eine Lücke im Bandenmuster im Bereich von 56 bis 35 kDa charakterisiert. Das Bandenmuster der L₃ unterschied sich von den Fraktionen der adulten *A. crassus* durch 2 deutliche Banden von etwa 115 kDa (Abb. 5).

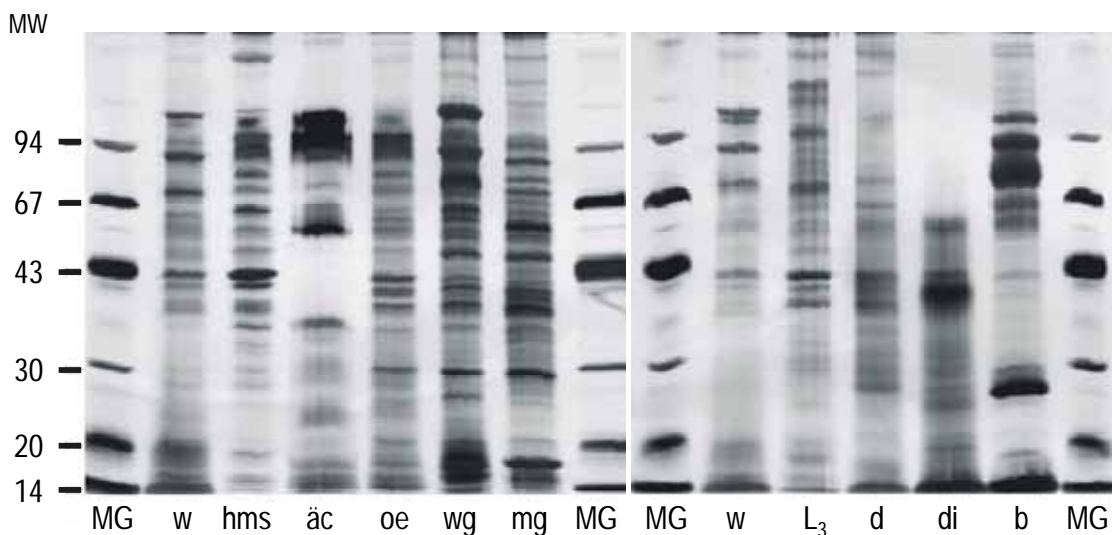


Abb. 5: SDS-PAGE der Rohantigenextrakte von *Anguillicola crassus* und von Vollblut des Aals (Siberfärbung). (MG) Molekulargewichtsmarker, (w) Weibchen total, (hms) Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus*, (äc) äußere Cuticula adulter *A. crassus*, (oe) vorderster Körperabschnitt adulter *A. crassus* von der Länge des Oesophagus, (wg) weibliche Geschlechtsorgane, (mg) männliche Geschlechtsorgane, (L₃) L₃ total, (d) Darmwand adulter *A. crassus*, (di) Darminhalt adulter *A. crassus*, (b) Aalblut. Molekulargewicht (MW) in Kilodalton

Die mit Seren natürlich infizierter Aale und unter Verwendung von Antigenextrakten adulter und larvaler *A. crassus* sowie Aalblut angefertigten Immunoblots sind neben Immunoblots von Negativseren nicht infizierter Farmaalen in Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt. Im Vergleich zu den Negativseren zeigten die positiven Seren der Wildaale grundsätzlich eine erhöhte unspezifische Hintergrundreaktion.

Das vielfältigste Muster an Antigenbanden wurde mit dem Antigenextrakt aus dem Hautmuskelschlauch erzielt, wenn auch keines der getesteten Seren jedes der Antigene erkannte (Abb. 6A). Alle Seren der natürlich infizierten Aale reagierten mit 3 Antigenen im Bereich von 120 bis 135 kDa und 2 weiteren Antigenen von etwa 105 und 94 kDa, die auffällig breite Banden bildeten. Auch 5 der negativen Kontrollseren zeigten eine schwache Reaktion mit diesen beiden Antigenen. Weitere Proteine mit einem niedrigeren Molekulargewicht, darunter 3 deutliche Banden von 71, 43 und 38 kDa wurden nur von einem Teil der getesteten Seren erkannt. Wie auch bei allen anderen Antigenextrakten war auf den Streifen, die zur Kontrolle nur mit sekundären und tertiären Antikörpern inkubiert wurden, keine Reaktion zu erkennen (Abb. 6A).

Die Immunoblots mit Antigenen der äußeren Cuticula von adulten *A. crassus* bestätigten die bei dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch beobachtete starke Reaktion der positiven Wildaalsereen mit Antigenbanden in der Größenordnung von 100 kDa. Bei dem Rohantigen der äußeren Cuticula sind diese Antigenbanden zu einer einzigen, sehr breiten Bande vereinigt. Die meisten Negativseren zeigten in diesem Bereich ebenfalls eine Reaktion, die allerdings sehr viel schwächer als bei den Wildaalsereen war. Zwei Antigene von etwa 58 kDa wurden nicht nur von den Seren der natürlich infizierten Aale erkannt, sondern auch von einigen der negativen Kontrollseren (Abb. 6B).

Immunoblots mit dem Antigenextrakt der vordersten Körperabschnitte adulter *A. crassus* ergaben ein ähnliches Resultat wie diejenigen mit dem Antigenextrakt des Hautmuskelschlauchs, allerdings war das Bandenmuster im Bereich hoher Molekulargewichte sehr unscharf. Antigene mit einem niedrigen Molekulargewicht im Bereich von 14 bis 20 kDa und eine Bande von 28 kDa fanden sich nur bei dieser

Fraktion, doch wurde jede dieser Banden nur von einem Teil der natürlich infizierten Aale erkannt (Abb. 6C).

Antigene der Darmwand und des Darminhalts adulter *A. crassus* wurden nicht von allen ausgewählten Wildaalsereen erkannt; das Bandenmuster der positiv reagierenden Seren war jedoch sehr einheitlich. Bei Verwendung des Rohantigens der Darmwand fanden sich insgesamt 9 Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 135 bis 23 kDa (Abb. 7A). Bei Verwendung des Rohantigens vom Darminhalt war eine schwache Reaktion mit 2 Banden von etwa 120 und 110 kDa sowie eine stärkere Bande von etwa 40 kDa nachzuweisen (Abb. 7B). Seren der Kontrollaale zeigten keine Reaktion mit den Antigenen der Darmwand und des Darminhalts. Bei der Verwendung des Antigenextraktes aus Aalblut trat eine sehr schwache Bande mit etwa 67 kDa auf. Diese schwache Reaktion war auch bei den Kontrollseren von nicht infizierten Farmaalen zu beobachten (Abb. 7C).

Die Reaktion der Wildaalsereen mit Antigenen der Geschlechtsorgane von *A. crassus* war ausgesprochen heterogen und besonders bei den männlichen Geschlechtsorganen auch nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 8A). Die Negativseren zeigten keine Reaktion. Bei Verwendung des Antigenextraktes der weiblichen Geschlechtsorgane, also im wesentlichen des Uterus, traten insgesamt 3 deutliche Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 105, 92 und 78 kDa auf (Abb. 8B).

Die Immunoblots mit den Wildaalsereen und dem somatischen Rohantigen von L₃ zeigten neben einigen sehr schwachen Banden 7 ausgeprägte Banden mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 135 bis 67 kDa (Abb. 8C). Die getesteten Seren unterschieden sich deutlich in ihrer Reaktivität bezüglich der Larvenantigene. Bei keinem der Aale konnten Antikörper gegen jede der beschriebenen Antigenbanden nachgewiesen werden. Bei 2 Aalen traten nur sehr schwache Banden auf und das Serum eines Aals zeigte wie die Negativseren überhaupt keine Reaktion.

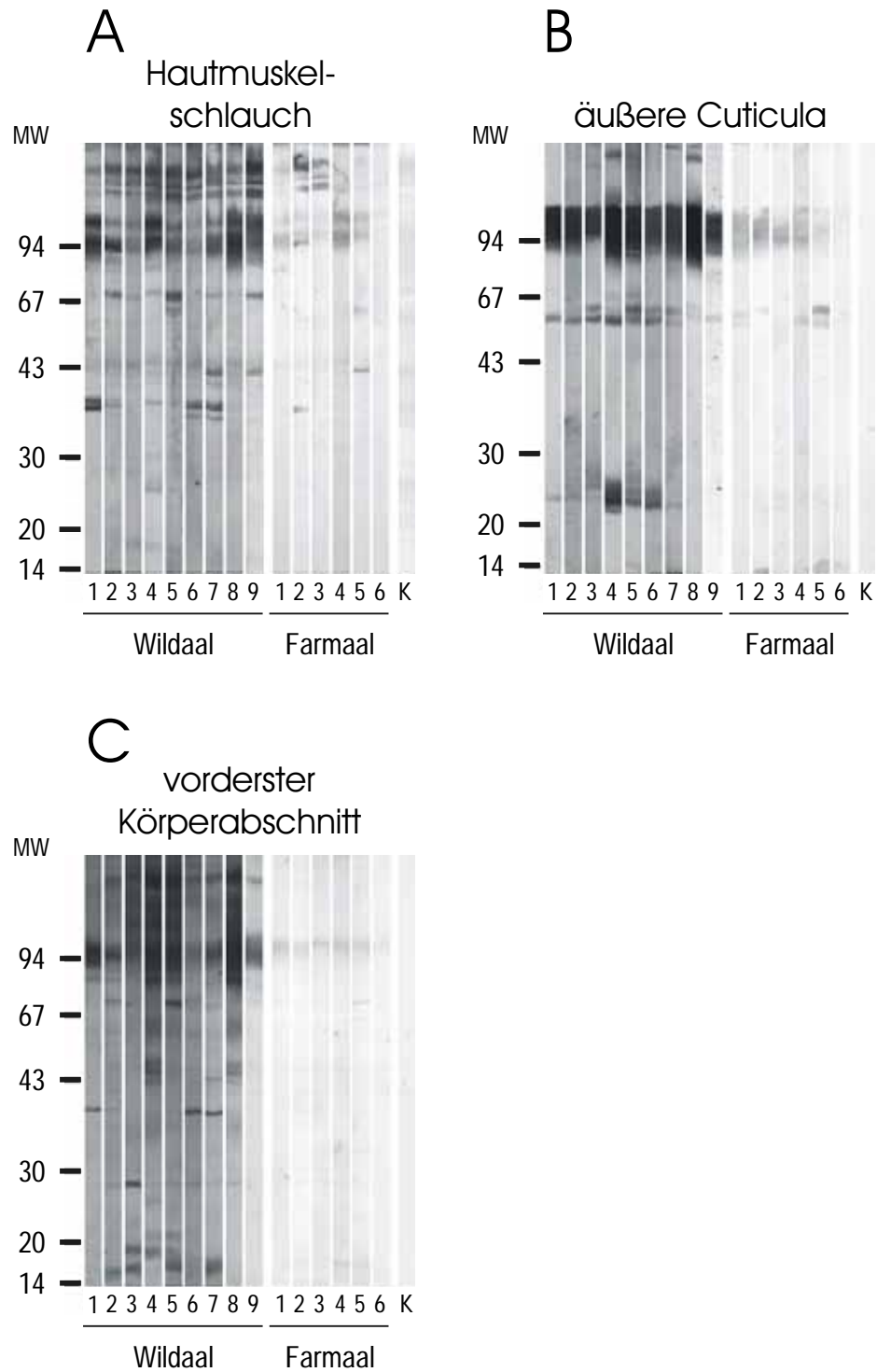


Abb. 6: Immunoblots unter Verwendung der Rohantigenextrakte vom (A) Hautmuskelschlauch, (B) der äußeren Cuticula und (C) den vordersten Körperabschnitten in der Länge des Oesophagus adulter *A. crassus* mit Seren natürlich infizierter Aale (Wildaal 1-9), nicht infizierter Farmaale (Farmaal 1-6) und Kontrollstreifen ohne Inkubation mit Serum (K). Molekulargewicht (MW) in Kilodalton

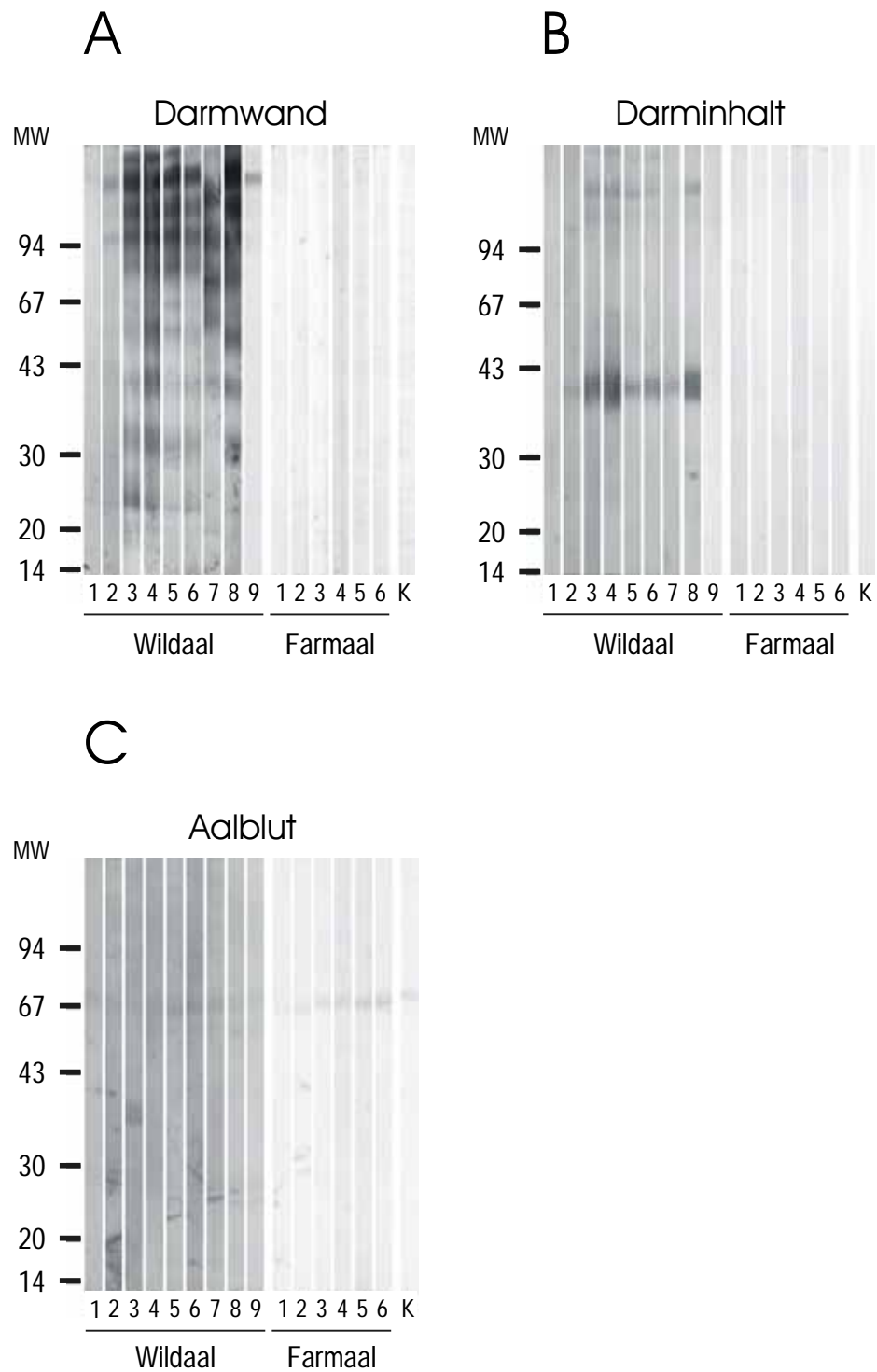


Abb. 7: Immunoblots unter Verwendung der Rohantigenextrakte von (A) Darmwand und (B) Darminhalt adulter *A. crassus* sowie (C) Aalblut mit Seren natürlich infizierter Aale (Wildaal 1-9), nicht infizierter Farmaale (Farmaal 1-6) und Kontrollstreifen ohne Inkubation mit Serum (K). Molekulargewicht (MW) in Kilodalton

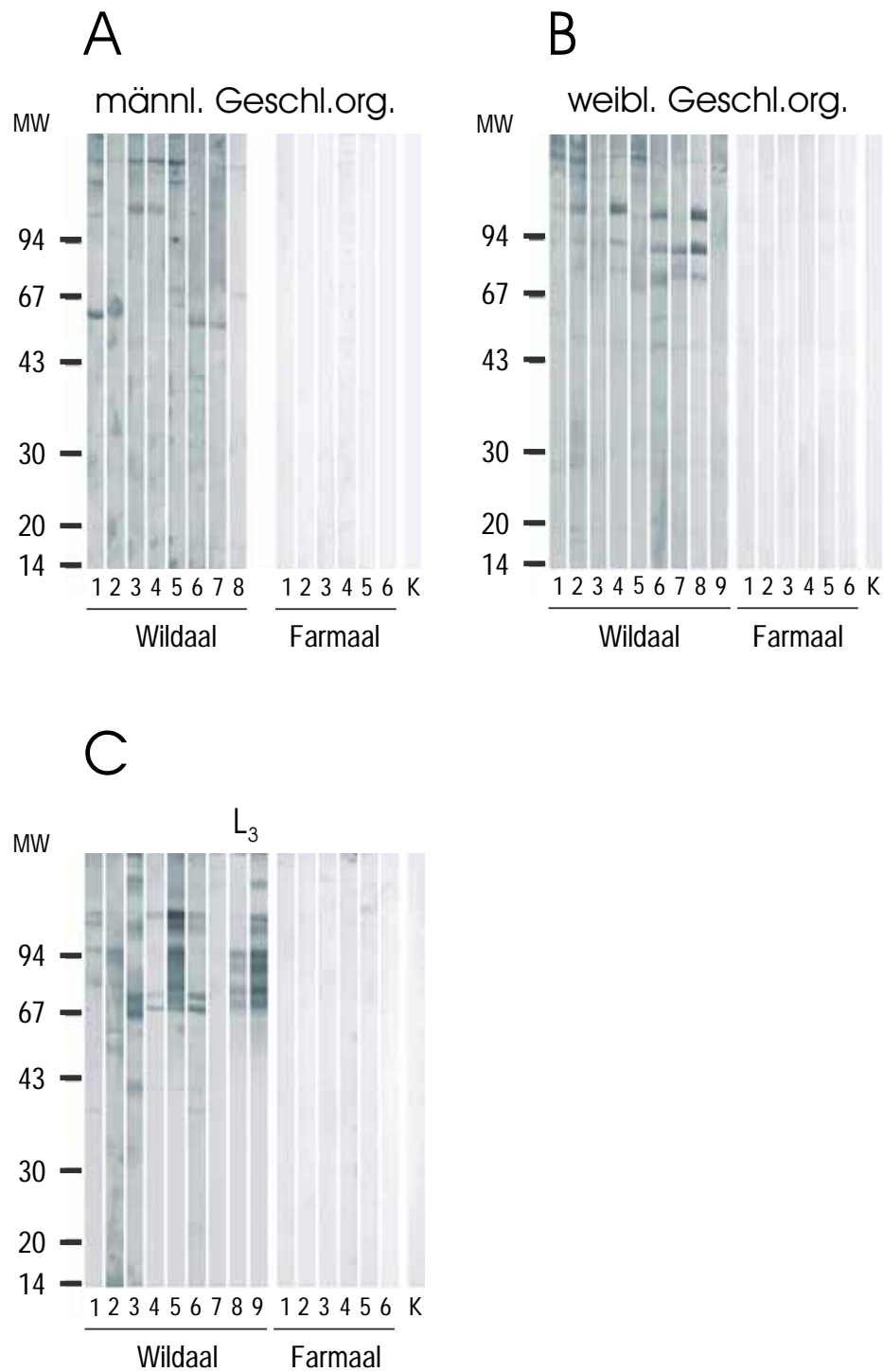


Abb. 8: Immunoblots unter Verwendung der Rohantigenextrakte der **(A)** männlichen Geschlechtsorgane, **(B)** der weiblichen Geschlechtsorgane und **(C)** ganzer L₃ von *A. crassus* mit Seren natürlich infizierter Aale (Wildaal 1-9), nicht infizierter Farmaale (Farmaal 1-6) und Kontrollstreifen ohne Inkubation mit Serum (K). Molekulargewicht (MW) in Kilodalton

3.1.2.3. Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Typische Resultate des IIFT mit Gefrierschnitten von L₃ und adulten *Anguillicola crassus* sowie mit ganzen L₃ zeigen Abb. 9 bis Abb. 11. Als positive Seren wurden solche von natürlich infizierten Aalen eingesetzt, die im ELISA hoch positiv reagierten. Als Negativkontrolle dienten im ELISA negative Seren von nicht infizierten Farmaalen.

Bei den Gefrierschnitten adulter *A. crassus* war sowohl mit positiven als auch mit negativen Seren eine Fluoreszenz der Cuticula zu erkennen (Abb. 9). Wenn auch die Reaktion insbesondere mit der äußeren Cuticula bei einigen der Seren von infizierten Aalen etwas stärker erschien als die der Kontrollseren, war eine einwandfreie Differenzierung der Testergebnisse nicht möglich. In einigen Fällen konnte auch eine positive Reaktion mit der Oberfläche der Muskulatur, der Darmwand und des Uterus sowie mit dem Darminhalt festgestellt werden.

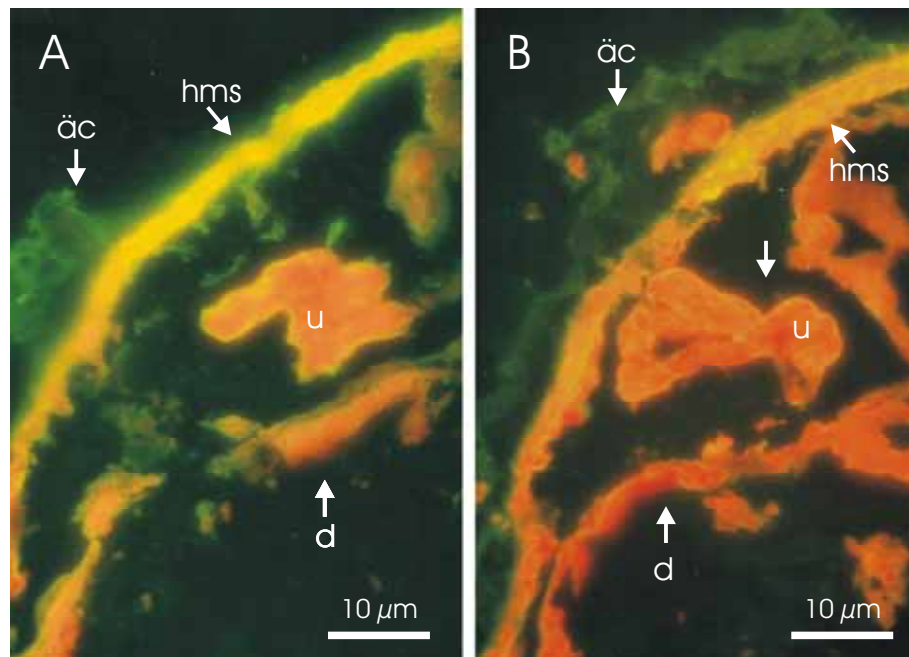


Abb. 9: Gefrierschnitte adulter weiblicher *Anguillicola crassus* im IIFT mit (A) dem Serum eines natürlich infizierten Wildaals und (B) eines nicht infizierten Farmaals. d = Darm, u = Uterus, hms = Hautmuskelschlauch, äc = äußere Cuticula

Bei der Verwendung von Schnitten der L₃ hingegen war die eindeutige Unterscheidung positiver und negativer Testergebnisse möglich (Abb. 10). Positive Seren zeigten insbesondere mit der Cuticula der Larven eine starke Reaktion. Im Gegensatz zu den Schnitten war bei den ganzen, fixierten L₃ keine positive Reaktion zu beobachten. Eine lokale Fluoreszenz an der Oberfläche der Nematoden trat lediglich dann auf, wenn die Cuticula beschädigt oder blasig aufgetrieben war (Abb. 11).

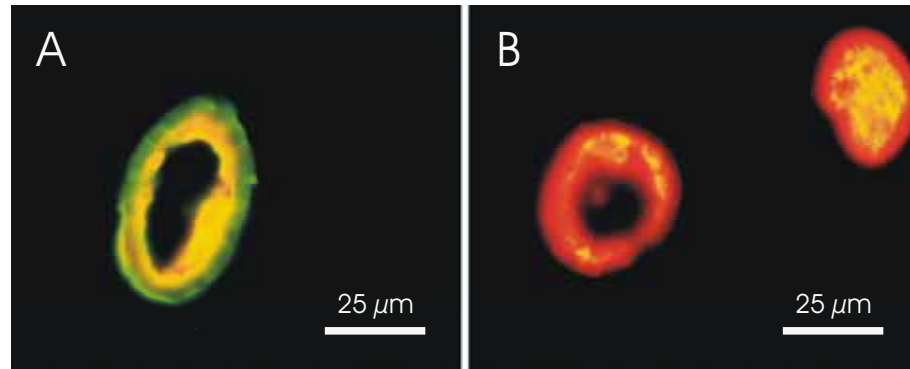


Abb. 10: Gefrierschnitte von L₃ von *Anguillicola crassus* im IIFT mit (A) dem Serum eines natürlich infizierten Wilddaals und (B) eines nicht infizierten Farmaals

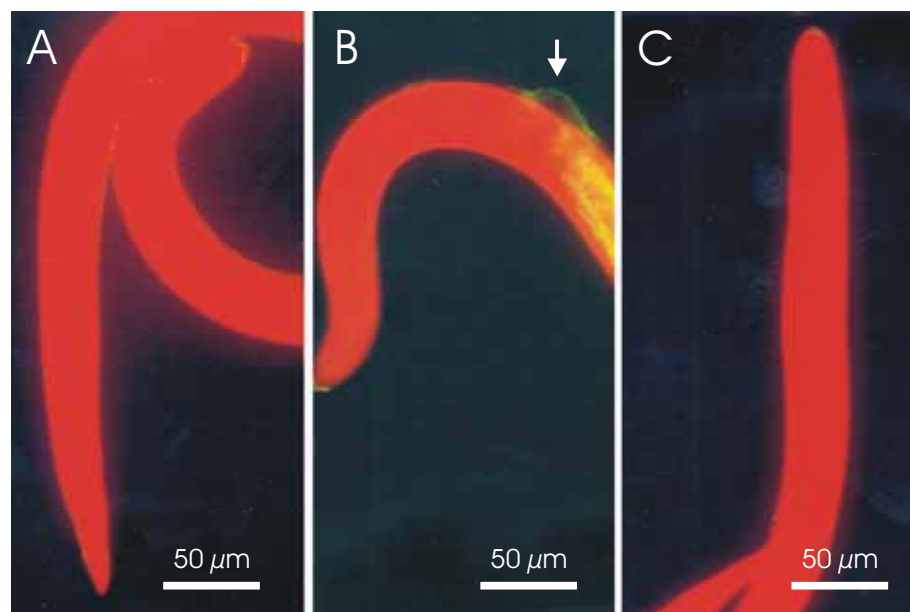


Abb. 11: L₃ von *Anguillicola crassus* im IIFT mit (A,B) dem Serum eines natürlich infizierten Wilddaals und (C) eines nicht infizierten Farmaals. Der Pfeil markiert eine positive Reaktion im Bereich der beschädigten Cuticula.

3.1.2.4. Kreuzreaktivität

Die Reaktivität von Antiseren gegen *Anguillicola crassus* und *Raphidascaaris acus* wurde im ELISA mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauchs von *A. crassus* sowie einem somatischen Rohantigen adulter *R. acus* getestet. Gegen das Rohantigen des Hautmuskelschlauchs von *A. crassus* zeigte das homologe Antiserum die stärkste Reaktion. Auch das Antiserum gegen *R. acus* war deutlich positiv und in seiner Reaktion vergleichbar mit dem positiven Serum eines natürlich infizierten Aales. Bei der Verwendung des Rohantigens von *R. acus* war die gemessene Reaktion des homologen und heterologen Antiserums nahezu gleich und nur geringfügig stärker als die des ausgewählten Serums eines natürlich infizierten Aals. Bei den Seren der Aale, die zur Kontrolle nur Freund's Adjuvant und PBS injiziert bekamen, blieben die ELISA-Werte auf niedrigem Niveau (Abb. 12).

Bei der SDS-PAGE zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Proteinbanden von *A. crassus* und *Raphidascaaris acus* (Abb. 13A). Immunoblots mit Antiseren gegen *A. crassus* und *R. acus* im Vergleich zu Seren natürlich infizierter Aale sind in Abb. 13B dargestellt. Das Antiserum gegen *A. crassus* reagierte mit 3 Antigenen im Bereich von 120 bis 135 kDa und gegen eine Bande von 105 kDa des homologen Rohantigens. Das anti-*Raphidascaaris* Serum erkannte bei dem heterologen *Anguillicola*-Rohantigen 3 Banden von etwa 95, 43 und 38 kDa. Alle diese Banden wurden auch von Seren natürlich infizierter Aale erkannt. Antigene von *R. acus* wurden vom heterologen anti-*Anguillicola* Serum nicht erkannt. Das homologe Serum reagierte mit 2 Banden von etwa 105 und 95 kDa. Antikörper gegen diese Banden fanden sich auch in den Seren der wilden Aale. Die Seren der Aale, die nur mit Freund's Adjuvant und PBS injiziert wurden, zeigten im Immunoblot keinerlei Reaktion (Abb. 13B).

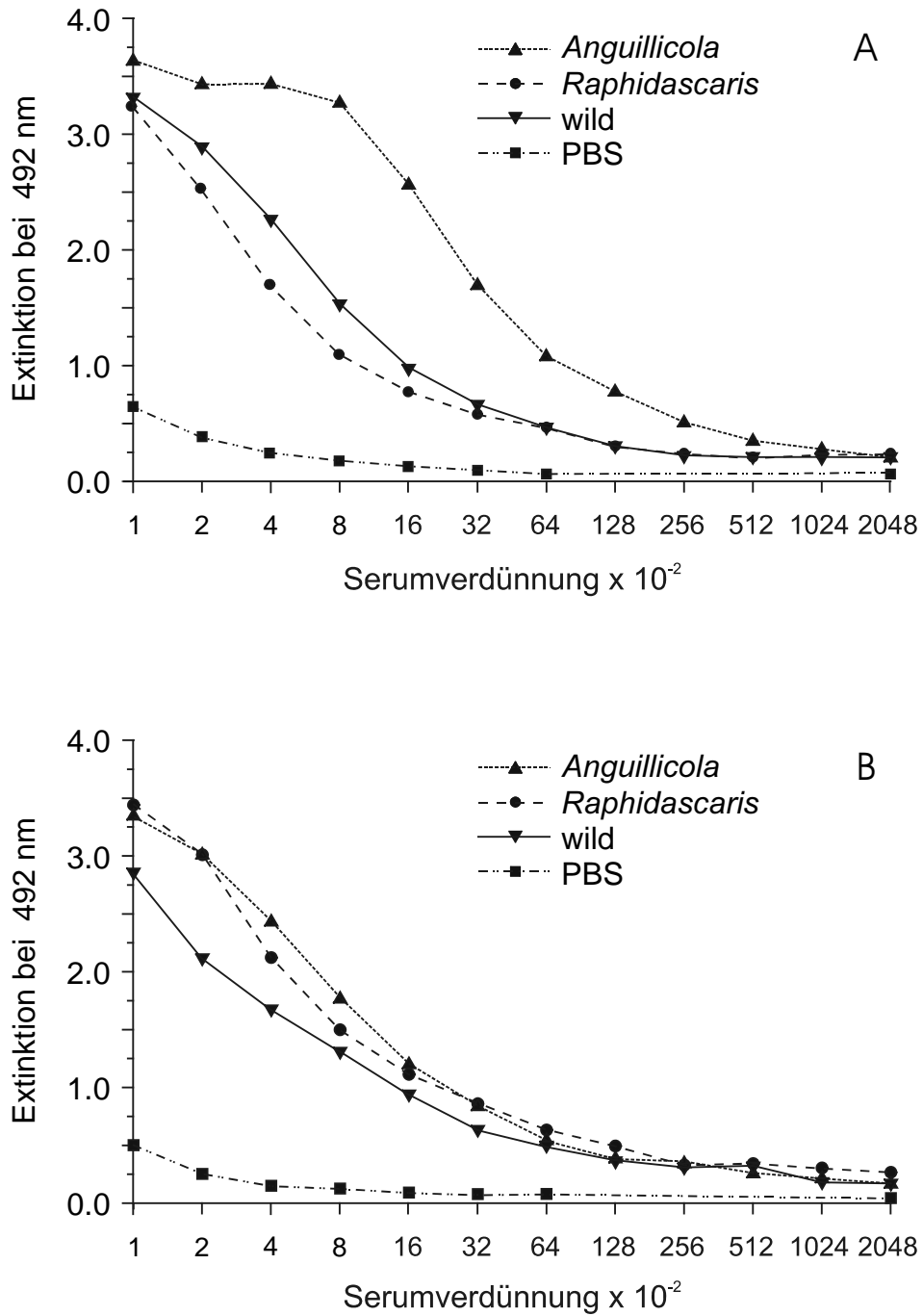


Abb. 12: Im ELISA bestimmte Reaktivität von Antiseren des Aals gegen *A. crassus* und gegen *R. acus*, dem entsprechenden Kontrollserum (PBS) sowie dem Serum eines natürlich infizierten Aals (wild) bei Verwendung eines Antigenextraktes vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* (A) und einem Antigenextrakt von *R. acus* (B).

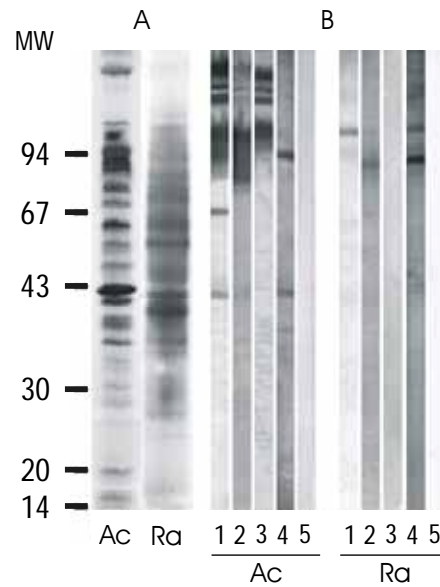


Abb. 14: (A) SDS-PAGE (Silberfärbung) der Proteine des Hautmuskelschlauchs adulter *Anguillicola crassus* (Ac) und ganzer *Raphidascaris acus* (Ra). (B) Immunoblots unter Verwendung eines Rohantigens vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* (Ac) und von ganzen *R. acus* (Ra) mit Seren von 2 natürlich infizierten Aalen (1, 2), Antiserum vom Aal gegen *A. crassus* (3), Antiserum vom Aal gegen *R. acus* (4) und Kontrollserum (5). Molekulargewicht (MW) in kDa

3.2. Immunantwort experimentell infizierter Aale

3.2.1. Antikörperantwort

Sowohl bei den nur einmalig mit 40L₃ infizierten Versuchsaalen als auch bei den Aalen, denen über einen Zeitraum von 125 Tagen 2 mal wöchentlich 3 L₃ bzw. wöchentlich 20 L₃ appliziert wurden, war mit dem ELISA eine Produktion *Anguillicola*-spezifischer Antikörper nachzuweisen. Der Anstieg des Antikörpergehaltes im Serum setzte frühestens 8 Wochen nach der ersten Infektion ein. Die Kontrollaale, denen PBS anstatt der L₃ appliziert wurde, zeigten über den gesamten Versuchszeitraum von 325 Tagen keinen Anstieg der Meßwerte. Zusammenfassend ist der relative Anstieg des im ELISA gemessenen Gehalts an Antikörpern gegen adulte *Anguillicola crassus* und L₃ im peripheren Blut der einmal oder mehrfach infizierten Aale in Abb. 15 als Mittelwert der jeweils gleich behandelten Aale dargestellt.

Unabhängig davon, ob Antigene larvaler oder adulter *A. crassus* verwendet wurden, war der zeitliche Verlauf der gemessenen Antikörperantwort bei den Versuchstieren identisch. Der mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* gemessene Anstieg der Antikörperkonzentration (Abb. 15A) war allerdings immer stärker als die entsprechenden Ergebnisse für das somatische Rohantigen der L₃ (Abb. 15B). Bei Kontrollmessungen mit Mikrotiterplatten ohne *Anguillicola*-Antigene waren keine erhöhten Meßwerte festzustellen (nicht dargestellt). Dies zeigt, daß die Messung *Anguillicola*-spezifischer Antikörper nicht durch eine unspezifische Antikörperreaktion mit dem zum Abblocken verwendeten Rinderalbumin gestört wird.

Sowohl der zeitliche Verlauf als auch die Intensität der Antikörperantwort infolge der Infektion mit *A. crassus* erwies sich innerhalb der Versuchsgruppen als ausgesprochen heterogen. Da diese individuelle Charakteristik der Antikörperantwort bei Betrachtung der gemittelten Werte nicht zum Ausdruck kommt, sind Verläufe, die mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* gemessen wurden, im einzelnen in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt.

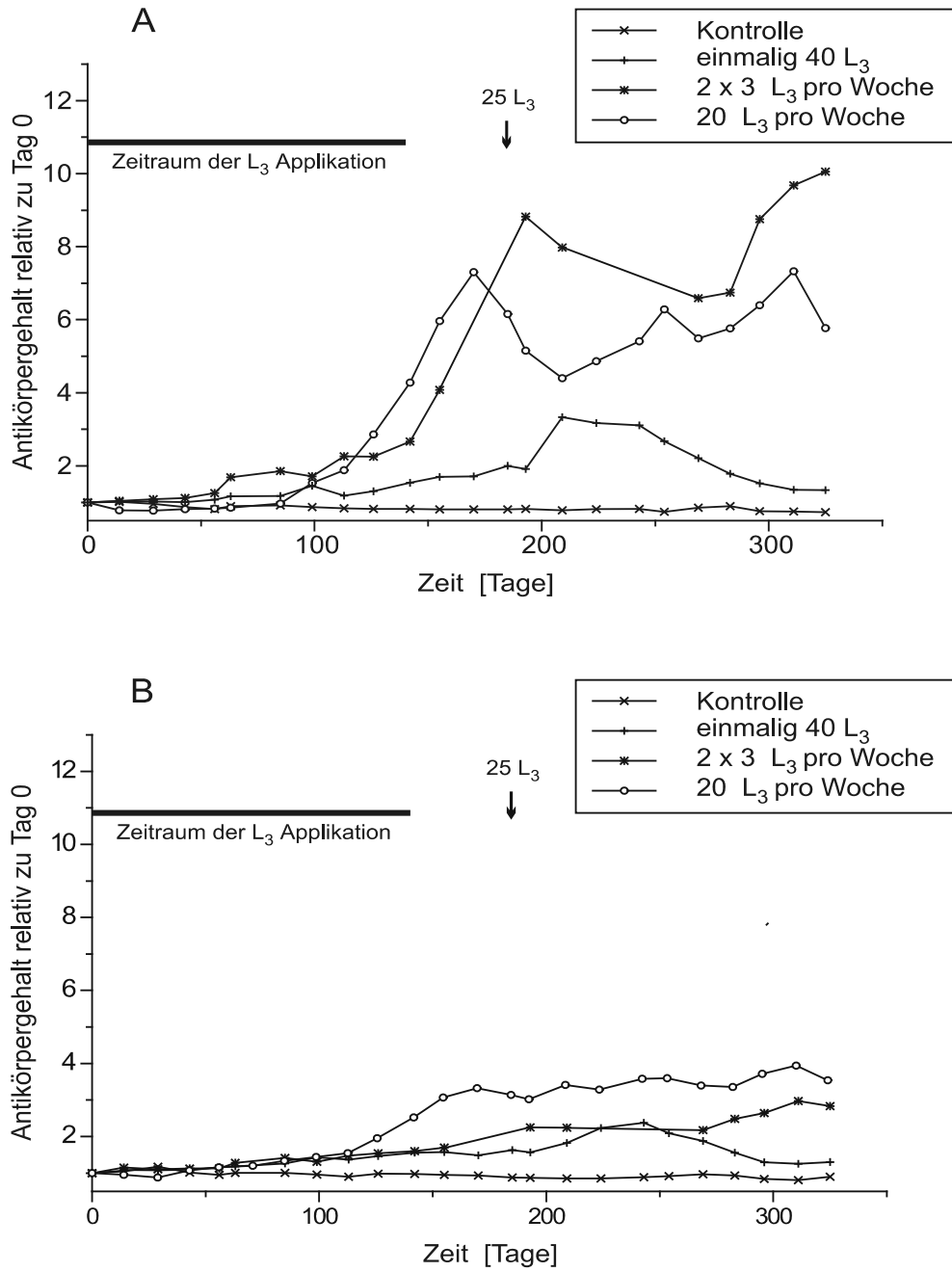


Abb. 15: Im ELISA gemessener zeitlicher Verlauf der Antikörperantwort experimentell mit *Anguillicola crassus* infizierter Aale **(A)** bei Verwendung von Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* und **(B)** bei Verwendung von somatischem Rohantigen der L₃. Dargestellt ist der mittlere Anstieg der Antikörperkonzentration im peripheren Blut relativ zum Ausgangswert am Beginn des Versuchs von jeweils 9 gleich behandelten Aalen.

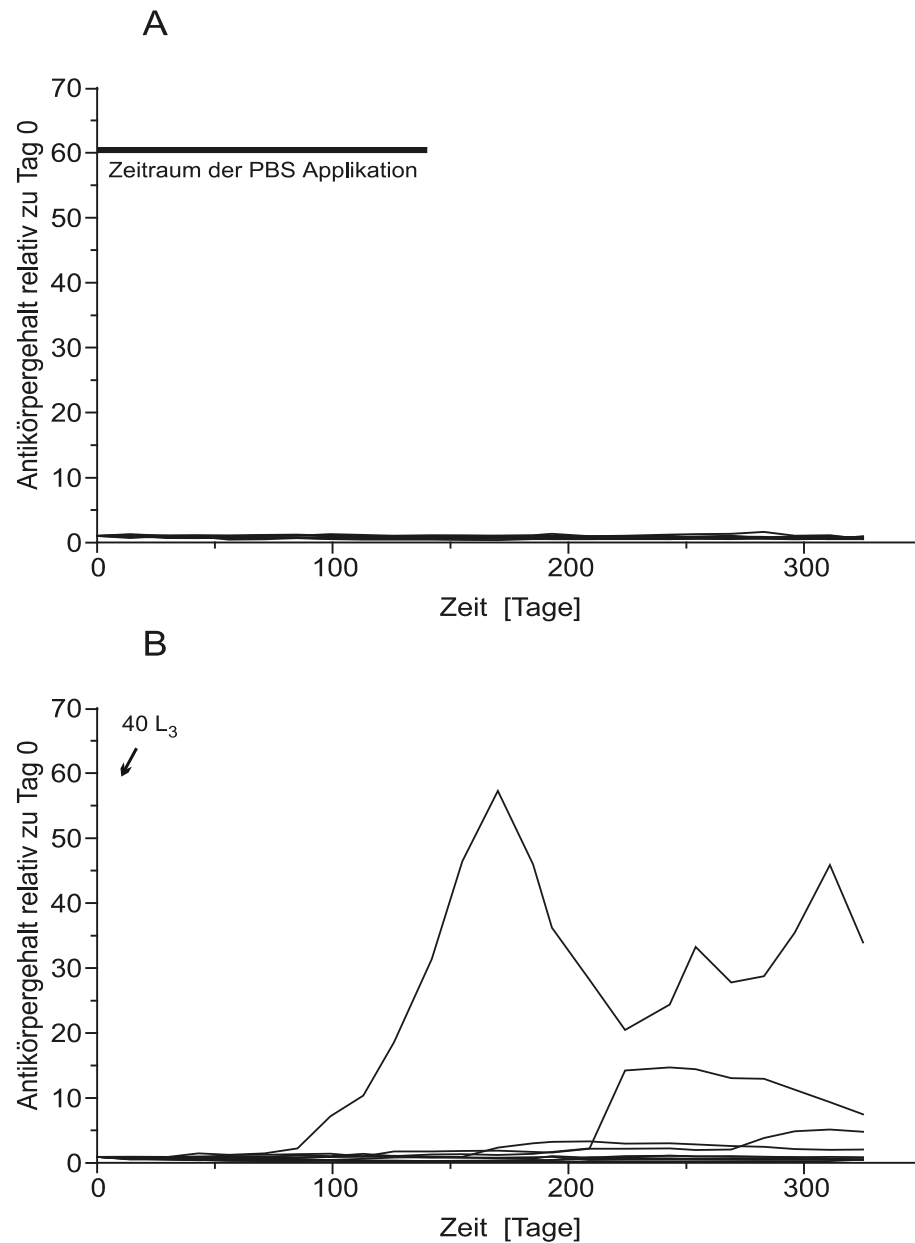


Abb. 16: Im ELISA gemessene individuelle Verläufe der Antikörperantwort experimentell mit *Anguillicola crassus* infizierter Aale bei Verwendung von Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus*. Dargestellt ist der Anstieg der Antikörperkonzentration im peripheren Blut relativ zum Ausgangswert am Beginn des Versuchs. **(A)** Kontrolle, **(B)** einmalige Infektion mit 40 L₃

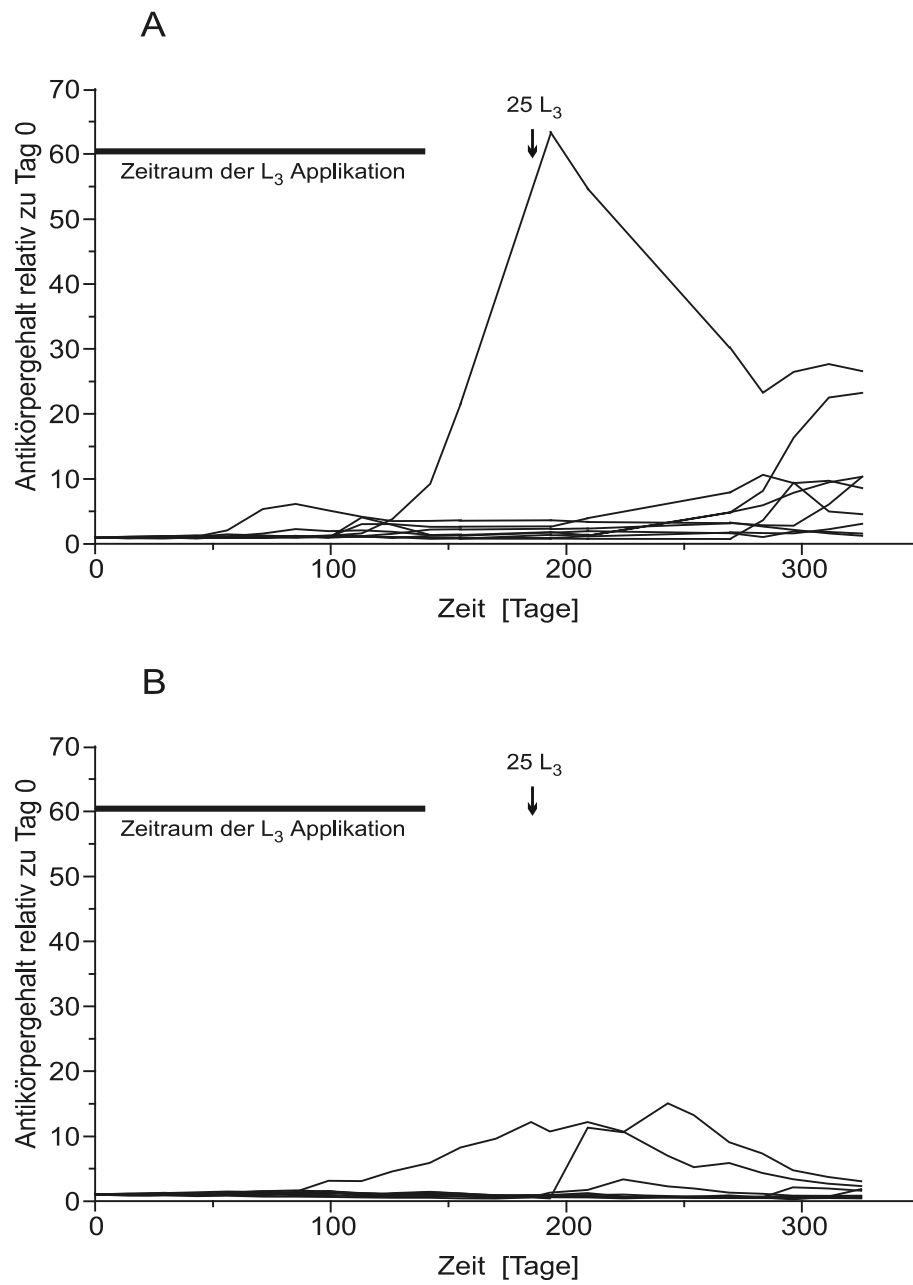


Abb. 16: Im ELISA gemessene individuelle Verläufe der Antikörperantwort experimentell mit *Anguillicola crassus* infizierter Aale bei Verwendung von Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus*. Dargestellt ist der Anstieg der Antikörperkonzentration im peripheren Blut relativ zum Ausgangswert am Beginn des Versuchs. **(A)** Infektion mit 2 mal 3 L₃ pro Woche, **(B)** Infektion mit 20 L₃ pro Woche

Um die Anzahl der Aale zu quantifizieren, die mit einer Antikörperantwort auf die experimentelle Infektion mit *A. crassus* reagierten, wurde ein Grenzwert für den Quotienten aus dem Meßwert des Testserums und demjenigen des negativen Kontrollserums (Q) bestimmt. Dieser Grenzwert berechnete sich aus der Summe vom Mittelwert und der dreifachen Standardabweichung ($\bar{X} + 3 SD$) aller Q zu Beginn des Experimentes. Für die Messungen mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* war dieser Wert 3,025 und für die Messungen mit L₃-Rohantigen 2,818.

Diese Grenzwerte wurden von keinem Serum der Kontrollaale, denen nur PBS appliziert wurde, überschritten. Aus der Abb. 15A ist ersichtlich, daß die Meßwerte aller Kontrollaale über den gesamten Versuchszeitraum hinweg auf dem gleichen niedrigen Niveau blieben wie zu Versuchsbeginn.

Bei Verwendung des Rohantigen adulter *A. crassus* wurde der Grenzwert für Q, der eine positive Antikörperreaktion definiert, von jeweils 4 der nur einmal mit 40 L₃ oder wiederholt mit 20 L₃ pro Woche infizierten Aale mehr oder weniger stark überschritten (vergl. Abb. 15B und Abb. 16C). Unter den Aalen der Versuchsgruppe, die 2 mal wöchentlich mit 3 L₃ infiziert wurden, waren dies 6 Tiere (vergl. Abb. 16A). Ein Aal aus der wöchentlich mit 20 L₃ infizierten Gruppe erwies sich bereits zu Beginn des Experimentes als grenzwertig. Deshalb wurde eine geringfügige Überschreitung des Grenzwertes nicht als positive Reaktion gewertet. Bei den Messungen mit dem Rohantigen der L₃ waren es nur 2 der zu Versuchsbeginn einmalig infizierten Aale und je 4 der wöchentlich mit 2 mal 3 L₃ bzw. mit 20 L₃ infizierten Aale, bei denen Q den Grenzwert im Laufe des Versuchs überschritt.

Die so bestimmte Anzahl der im ELISA mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* positiv reagierenden Aale war ausreichend hoch, um einen signifikanten Unterschied der 3 infizierten Gruppen gegenüber den Kontrollaalen zu bestätigen (Kruskal-Wallis-Test, $p \leq 0,05$). Zwischen den Gruppen der infizierten Aale bestand hinsichtlich der Zahl positiv reagierender Aale kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$).

Bei den Aalen, die eine meßbare Antikörperantwort zeigten, war die Zeitspanne zwischen der Infektion bzw. der ersten Infektion und dem Anstieg des Antikörpergehaltes im peripheren Blut individuell sehr unterschiedlich. Erstmals war eine positive Reaktion mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* 56 Tage nach Versuchsbeginn bei einem wiederholt mit 2 mal wöchentlich mit 3 L₃ infizierten Aal nachweisbar. Bei den mit 20 L₃ pro Woche infizierten Aalen war eine spezifische Antikörperantwort frühestens 85 Tage nach der ersten Infektion nachweisbar, bei der einmalig mit 40 L₃ infizierten Gruppe war dies nach 99 Tagen der Fall. Bei anderen Individuen der 3 Gruppen experimentell infizierter Aale traten die ersten positiven Meßwerte im ELISA in unregelmäßigen Abständen bis fast 300 Tage nach dem ersten Antigenkontakt auf (Tabelle 4). Die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem Infektionsmodus und dem Zeitpunkt, zu dem der Gehalt spezifischer Antikörper anstieg ($p > 0,05$).

Tabelle 4: Zeitspanne zwischen Infektion bzw. erster Infektion und dem im ELISA meßbaren Anstieg *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im peripheren Blut experimentell infizierter Aale bei Verwendung von (A) Rohantigen adulter *A. crassus* und (B) somatischem Rohantigen von L₃.

	Infektionsmodus	Tage nach der Infektion bzw. nach der ersten Infektion				
		→				
A	einmal 40 L ₃	99	185	209	296	
	2 x 3 L ₃ pro Woche	56	113	126	209	269 283
	20 L ₃ pro Woche	85	99	170	209	
B	einmal 40 L ₃	99			209	
	2 x 3 L ₃ pro Woche	63	155	193	269	283
	20 L ₃ pro Woche	85	142	170	209	296

Auch die Intensität der bei den einzelnen Aalen beobachteten Antikörperantwort war ausgesprochen unterschiedlich stark ausgeprägt. Zur deren Beschreibung dienten die höchsten im Verlauf des Versuchs erreichten Werte bei den einzelnen Versuchstieren. Die individuellen Maximalwerte für den Quotienten aus dem Meßwert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums sind für den ELISA mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die individuellen Maxima der mit dem Rohantigen von L₃ gemessenen Verläufe zeigt Tabelle 7. Die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests ergab für die Meßwerte mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,01$) zwischen den infizierten Aalen und der Kontrollgruppe. Zwischen den 3 Gruppen infizierter Aale bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Bei Verwendung des Rohantigen von L₃ ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den infizierten Aalen ($p > 0,05$).

Tabelle 6: Maximaler Quotient aus dem ELISA-Wert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums bei Verwendung des Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*.

Aal Nr.	Kontrolle	Aal Nr.	einmal 40 L ₃	Aal Nr.	2 x 3 L ₃ pro Woche	Aal Nr.	20 L ₃ pro Woche
1	0,884	10	0,991	19	2,977	28	1,311
2	1,663	11	21,249	20	8,251	29	71,062
3	1,805	12	29,935	21	8,395	30	1,763
4	1,611	13	1,607	22	62,001	31	23,019
5	1,270	14	1,341	23	15,615	32	11,427
6	2,433	15	1,286	24	10,361	33	3,876
7	1,236	16	2,499	25	22,559	34	2,334
8	1,629	17	3,227	26	1,555	35	4,610
9	1,359	18	3,225	27	2,938	36	1,703

Tabelle 7: Maximaler Quotient aus dem ELISA-Wert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums bei Verwendung des somatischen Rohantigens der L₃ von *Anguillicola crassus*.

Aal Nr.	Kontrolle	Aal Nr.	einmal 40 L₃	Aal Nr.	2 x 3 L₃ pro Woche	Aal Nr.	20 L₃ pro Woche
1	1,598	10	2,485	19	1,531	28	1,033
2	2,431	11	16,149	20	4,135	29	19,489
3	1,899	12	16,553	21	1,933	30	2,694
4	2,024	13	1,937	22	4,943	31	5,069
5	1,133	14	2,798	23	3,860	32	2,890
6	2,425	15	1,328	24	4,248	33	2,423
7	2,121	16	1,064	25	2,291	34	1,573
8	2,334	17	2,486	26	2,112	35	5,034
9	2,075	18	1,396	27	1,829	36	2,796

Beispiele für den Verlauf der Immunantwort von 3 experimentell infizierten Aalen im Immunoblot bei Verwendung unterschiedlicher Antigenextrakte von *A. crassus* sind in Abb. 17 dargestellt. Die mit dem Serum der experimentell infizierten Aale erhaltenen Bandenmuster entsprachen weitgehend den in Kapitel 3.1.3. beschriebenen Resultaten für die Seren natürlich infizierter Aale.

Es zeigte sich, daß die experimentell infizierten Aale überwiegend Antikörper gegen solche Antigene gebildet hatten, die mit dem Hautmuskelschlauch bzw. der äußeren Cuticula adulter *A. crassus* assoziiert sind. Wenn auch bereits zu Beginn des Versuches einige schwache Banden mit einem Molekulargewicht um 100 kDa und höher auftraten, ist die starke Erhöhung der Reaktionsintensität in diesem Bereich auffällig. Wie bei den Seren wilder Aale zeigte sich bei der Verwendung des Rohantigens der äußeren

Cuticula eine sehr kräftige und breite, aber auch unscharfe Bande im Bereich von 100 kDa. Bei den Immunoblots mit dem Antigenextrakt vom ganzen Hautmuskelschlauch waren in diesem Bereich mindestens 2 verschiedene Banden zu erkennen. Gleichzeitig steigerte sich auch die Reaktionsintensität mit 3 Antigenbanden im Bereich von 120 bis 135 kDa und es traten weitere Banden mit einem Molekulargewicht von 71 und 38 kDa auf. Die Reaktion mit den Antigenbanden von etwa 83 kDa und 43 kDa war bereits vor der Infektion zu erkennen. Die Intensität dieser Banden erhöhte sich schon während der ersten 2 Monate in der früheren Infektionsphase. Bei Verwendung des Rohantigens der L₃ traten diese Banden jedoch nicht auf (Abb. 17).

Von insgesamt 5 getesteten Aalen hatten nur 2 Tiere Antikörper gegen Antigene der Darmwand adulter *A. crassus* gebildet. Einer dieser Aale zeigte auch eine Reaktion mit einem Antigen des Darminhalts und eine sehr schwache Reaktion mit Antigenen der Geschlechtsorgane von *A. crassus* (Abb. 17).

Es konnten keine für das L₃-Stadium spezifischen Banden nachgewiesen werden. Alle Banden, welche bei Verwendung des Rohantigens der L₃ auftraten, waren auch bei Verwendung des Rohantigens vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* zu beobachten (Abb. 17).

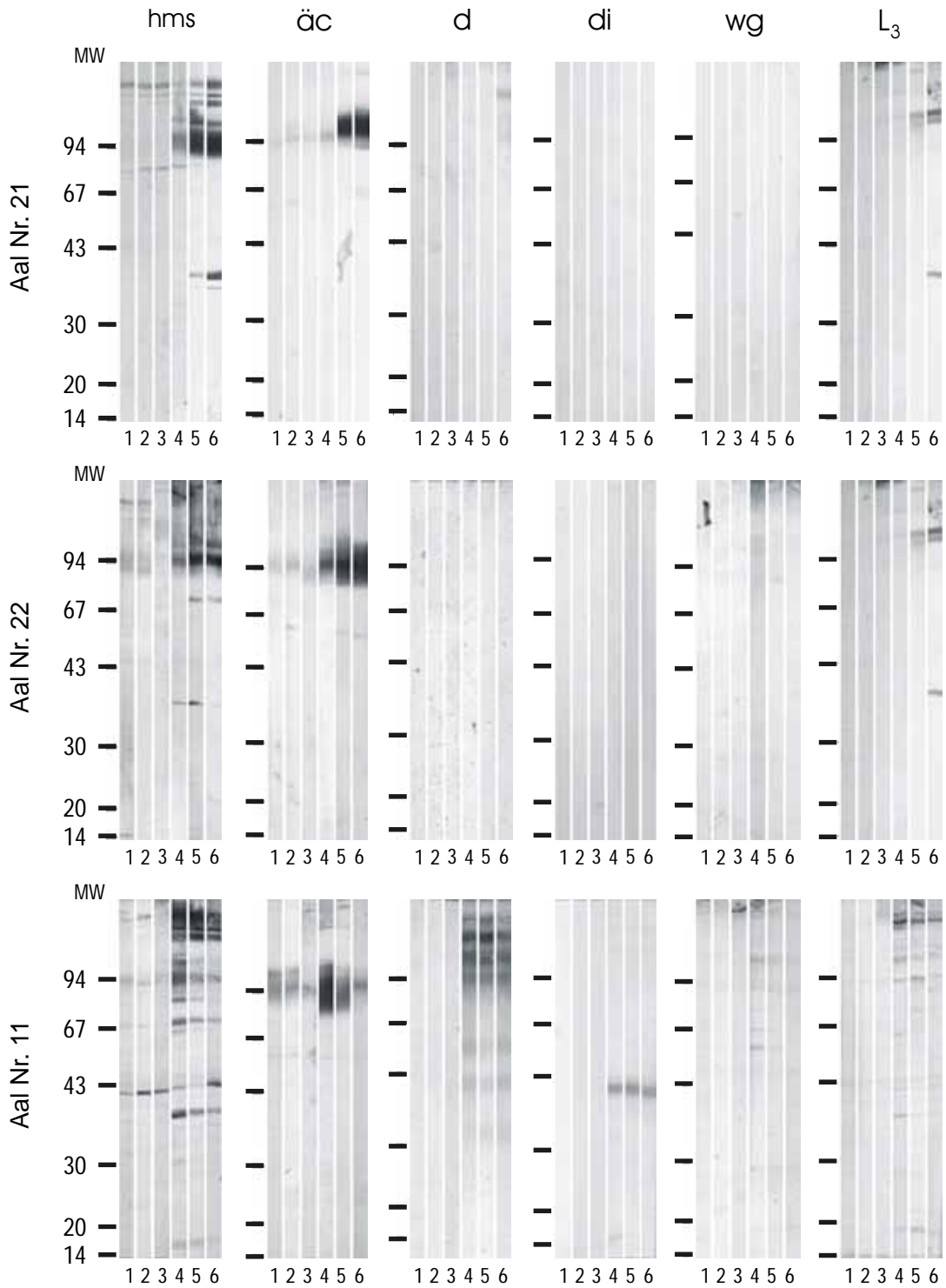


Abb. 17: Verlaufsbeobachtung der Antikörperantwort von 3 experimentell mit *A. crassus* infizierten Aalen im Immunoblot bei Verwendung folgender Rohantigenextrakte: (hms) Hautmuskelschlauch, (äc) äußere Cuticula, (d) Darmwand, (di) Darminhalt, (wg) weibliche Geschlechtsorgane und (L₃) L₃ total. Die Streifen 1 bis 6 entsprechen Tag 0, 56, 113, 224, 283 und 325. Molekulargewicht (MW) in Kilodalton

3.2.2. Migrationsaktivität von Granulozyten und Monozyten

Die Migrationsaktivität von Granulozyten und Monozyten unter dem Einfluß der L₃ von *Anguillicola crassus* wurde für die über einen Zeitraum von 140 Tage 2 mal wöchentlich mit 3 L₃ infizierten Aale und die Kontrollaale bestimmt. Der Test erfolgte 193 Tage nach Versuchsbeginn und 1 Woche nachdem die Aale der infizierten Gruppe abschließend mit 25 L₃ infiziert wurden. Die Mittelwerte der bestimmten Migrationsraten und der hieraus berechneten Migrationsindices sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Die Granulozyten und Monozyten des Aals reagieren sowohl bei nicht infizierten wie auch bei infizierten Tieren auf die Gegenwart der L₃ mit einer im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne L₃ signifikant erhöhten Migrationsaktivität (Wilcoxon-Test, $p \leq 0,05$). Die statistische Auswertung der Ergebnisse mit der Rangvarianzanalyse nach Friedman ergab einen hochsignifikanten Anstieg des Migrationsindex ($p \leq 0,001$) infolge der experimentellen Infektion mit *A. crassus*. Die ermittelten Migrationsindices zu Versuchsbeginn und der für die Kontrollgruppe bestimmte Migrationsindex am Versuchsende waren nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$).

Um zu prüfen, ob die erhöhte Migrationsaktivität der Granulozyten und Monozyten möglicherweise durch Antigen-Antikörperkomplexe ausgelöst wird, wurde der für die einzelnen Aale ermittelte Migrationsindex dem mit dem L₃-Rohantigen bestimmten ELISA-Wert des zugegebenen autologen Serums gegenübergestellt (Abb. 18). Es zeigte sich, daß kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Migrationsaktivität und dem im ELISA gemessenen Antikörpergehalt besteht (Rangkorrelation nach Spearman, $p > 0,05$).

Tabelle 8: In der Boyden-Kammer bestimmte Migrationsraten und Migrationsindices der Granulozyten und Monozyten in Gegenwart der L₃ von *Anguillicola crassus*.

	Kontrolle ¹⁾				infiziert ¹⁾			
	Tag 0		Tag 193		Tag 0		Tag 193	
	ohne L ₃	mit L ₃	ohne L ₃	mit L ₃	ohne L ₃	mit L ₃	ohne L ₃	mit L ₃
MR	23,8	27,6	19,9	27,5	37,4	43,3	19,6	44,7
SD ²⁾	14,2	11,5	8,8	14,9	9,6	10,5	8,2	11,1
MI	4,2		7,7		5,9		25,1	
SD ²⁾	5,2		9,8		6,1		8,9	

¹⁾ n = 9

²⁾ Standardabweichung

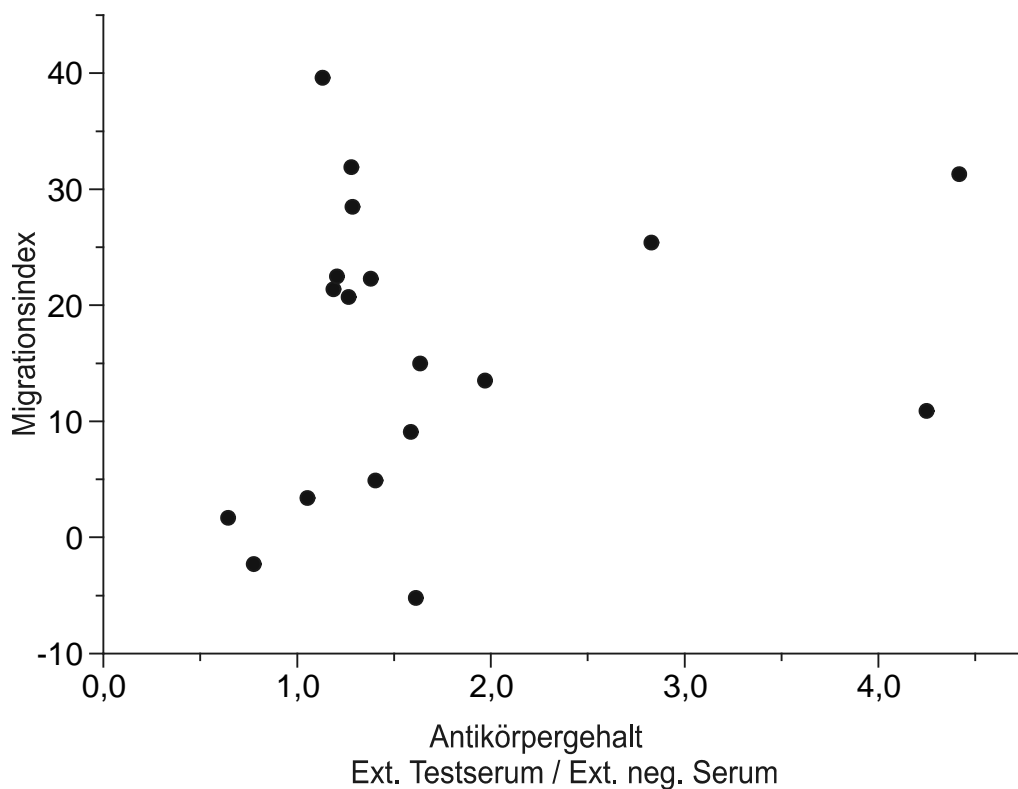


Abb. 18: Gegenüberstellung des Migrationsindex und des im ELISA mit L₃-Rohantigen bestimmten Quotienten aus dem Meßwert des Testserums und des negativen Kontrollserums.

3.3. Protektive Funktion der Immunantwort

3.3.1. Reinfektion experimentell infizierter und therapierter Aale

Der Verlauf des Gehaltes *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im peripheren Blut der zuvor experimentell infizierten Aale während der Therapie mit Levamisol und der anschließenden Reinfektion wurde im ELISA mit dem Rohantigen adulter *A. crassus* gemessen. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um die Kontrollgruppe und die 2 mal wöchentlich mit 3 L₃ infizierten Aale des in Kapitel 2.2.3. und 3.2. beschriebenen Versuchs. Da nicht genügend Rohantigen der L₃ zur Verfügung stand, konnten nicht alle Seren getestet werden. Für 4 ausgesuchte Aale wurde gezeigt, daß die Meßwerte zum gleichen Zeitpunkt ansteigen, gleichgültig ob der ELISA mit dem Rohantigen von L₃ oder von adulten *A. crassus* durchgeführt wurde (nicht dargestellt). Zwei Aale, die während des Versuchs starben, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Wie schon während der vorausgegangenen Verlaufsbeobachtung (vergl. Kapitel 3.2.1.) war der zeitliche Verlauf und die Intensität der Immunreaktion individuell sehr unterschiedlich. Im Anschluß an die Behandlungen mit Levamisol (335 und 365 Tage nach der ersten Infektion) zeigte sich bei 4 der zuvor infizierten Aale ein deutlicher Anstieg der Meßwerte im ELISA, der noch vor der Reinfektion (400 Tage nach der ersten Infektion) einsetzte. Ein erneuter Anstieg *Anguillicola*-spezifischer Antikörper war erstmals 11 Wochen, aber auch 15 und 18 Wochen nach der Reinfektion, nachzuweisen. Der zweigipfelige Verlauf des Gehaltes *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im Blut der Versuchsaale wird trotz der individuellen Unterschiede durch den in Abb. 19 dargestellten Mittelwert der Einzelverläufe gut charakterisiert.

Bei den Aalen der Kontrollgruppe, die zuvor keinen Antigenkontakt hatten, war nach der Behandlung mit Levamisol keine signifikante Zunahme *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im Serum nachzuweisen ($Q \leq 3,025$, vergl. Kapitel 3.2.1.). Ebenso wenig war bei diesen Aalen eine Antikörperantwort infolge der Infektion mit *A. crassus* festzustellen (Abb. 19).

In Tabelle 9 sind die 139 Tage nach der Reinfektion ermittelten Wiederfindungsraten, der Entwicklungsstand der Parasiten und die Massen der adulten *A. crassus* zusammengestellt. Die statistische Auswertung mit dem U-Test ergab für keines der ermittelten Merkmale einen signifikanten Unterschied zwischen den Aalen mit erstem Antigenkontakt (Kontrollgruppe) und den zuvor wiederholt infizierten Aalen ($p > 0,05$). Anhand des beschriebenen Versuches ergeben sich somit keine Hinweise darauf, daß mit der durch eine Infektion mit *A. crassus* ausgelösten Immunantwort des Aals ein Schutz vor einer erneuten Infektion einhergeht.

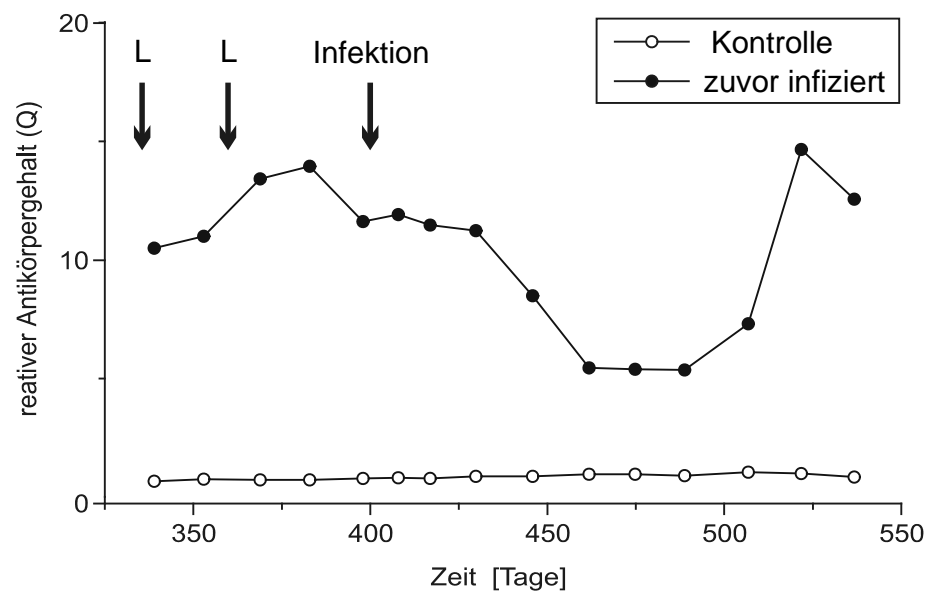


Abb. 19: Im ELISA gemessener zeitlicher Verlauf der Antikörperantwort während der Therapie mit Levamisol und anschließender Reinfektion zuvor experimentell infizierter Aale. Dargestellt ist der Mittelwert des Quotienten aus dem Meßwert des Testserums und des negativen Kontrollserums (Q) von je 8 Aalen. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Levamisol-Therapie (L) und der Infektion.

Tabelle 9: Sektionsbefund zuvor experimentell infizierter Aale nach Therapie und Reinfektion mit 25 L₃. Der Stichprobenumfang ist in Klammern angegeben.

	Kontrolle		infiziert	
WF [%] ¹⁾	20,6 ± 19,3	(8)	24,0 ± 13,9	(8)
L₃ [%] ²⁾	17,3 ± 30,2	(7)	14,3 ± 22,6	(8)
L₄ [%] ²⁾	6,0 ± 15,7	(7)	23,4 ± 25,0	(8)
adult [%] ²⁾	76,8 ± 37,2	(7)	62,3 ± 45,1	(8)
Masse M. [mg] ³⁾	1,0 ± 1,2	(3)	3,0 ± 3,7	(3)
Masse W. [mg] ⁴⁾	28,1 ± 22,7	(6)	29,7 ± 17,9	(6)

¹⁾ Wiederfindungsrate

²⁾ prozentualer Anteil der Entwicklungsstadien

³⁾ Masse der Frischsubstanz männlicher *A. crassus*

⁴⁾ Masse der Frischsubstanz weiblicher *A. crassus*

3.3.2. Immunisierung von Aalen und Belastungsinfektion

Die durch die intraperitoneale Injektion homogener *Anguillicola crassus* induzierte Antikörperantwort zeigte bei den einzelnen Aalen eine hohe Übereinstimmung in ihrem zeitlichen Verlauf. Bei den mit homogenisierten adulten *A. crassus* immunisierten Aalen stieg der Ig-Gehalt im peripheren Blut nach 5 Tagen steil an und erreichte bei allen Tieren nach 23 Tagen den Maximalwert. Etwa 17 Wochen nach der Injektion war die Antikörperantwort wieder abgeklungen (Abb. 20A). Bei den mit homogenisierten L₃ immunisierten Aalen verlief der Anstieg der Antikörperantwort flacher und erreicht das etwas geringere Maximum nach 33 Tagen (Abb. 20B). Bei den Kontrolltieren führte die Injektion von PBS zu keinem Anstieg der Extinktionswerte (Abb. 20C).

Die gewonnenen Antiseren reagierten im ELISA gleichermaßen mit dem Rohantigen von L₃ wie dem Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus*, gleichgültig, ob die Aale homogenisierte L₃ oder adulte Nematoden injiziert bekamen (Abb. 20).

Die Belastungsinfektion der Aale erfolgte 12 Wochen nach der Injektion zu einem Zeitpunkt, als die Antikörperantwort weitgehend abgeklungen war. Infolge der oralen Infektion erfolgte über 8 Wochen kein Anstieg der Extinktionswerte. Bei 3 Aalen zeigte sich 61 Tage nach der Infektion eine Zunahme *Anguillicola*-spezifischer Antikörper. Es handelte sich um 2 Aale aus der Kontrollgruppe und 1 Aal, der mit homogenisierten L₃ immunisiert worden war. Die Erhöhung der Extinktionswerte war sowohl bei Verwendung des Rohantigens von L₃ als auch bei Verwendung des Rohantigens von adulten *A. crassus* zu messen (Abb. 20).

Die 119 Tage nach der Infektion ermittelten Wiederfindungsraten, der Entwicklungsstand der Parasiten und die Massen der adulten *A. crassus* sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Die statistische Auswertung mit dem U-Test ergab für keines der ermittelten Merkmale einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, den mit homogenisierten L₃ immunisierten Aalen und den mit homogenisierten adulten *A. crassus* immunisierten Aalen ($p > 0,05$). Es zeigte sich also, daß mit der intraperitonealen Immunisierung der Aale zwar eine Immunreaktion ausgelöst wurde, aber kein Immunschutz vor einer Infektion mit *A. crassus* bewirkt werden konnte.

Tabelle 10: Sektionsbefund immunisierter Aale nach der Belastungsinfektion mit 20 L₃. ($\bar{X} \pm SD$). Der Stichprobenumfang ist in Klammern angegeben.

	Immunisierung mit Homogenat von		
	Kontrolle	L ₃	adulte <i>A. crassus</i>
WF [%] ¹⁾	17,0 ± 11,7 (7)	25,2 ± 24,1 (7)	23,4 ± 20,7 (10)
L₃ [%] ²⁾	6,5 ± 10,7 (6)	0,0 (7)	1,9 ± 4,0 (10)
L₄ [%] ²⁾	0,0 (6)	15,4 ± 37,4 (7)	1,5 ± 4,0 (10)
adult [%] ²⁾	93,5 ± 10,7 (6)	84,6 ± 37,4 (7)	96,6 ± 7,7 (10)
Masse M. [mg] ³⁾	3,6 ± 6,2 (4)	6,5 ± 5,7 (4)	4,8 ± 5,4 (9)
Masse W. [mg] ³⁾	36,1 ± 20,0 (5)	41,6 ± 21,9 (4)	76,2 ± 32,0 (6)

¹⁾ Wiederfindungsrate

²⁾ prozentualer Anteil der Entwicklungsstadien

³⁾ Masse der Frischsubstanz männlicher (M.) bzw. weiblicher (W.) *A. crassus*

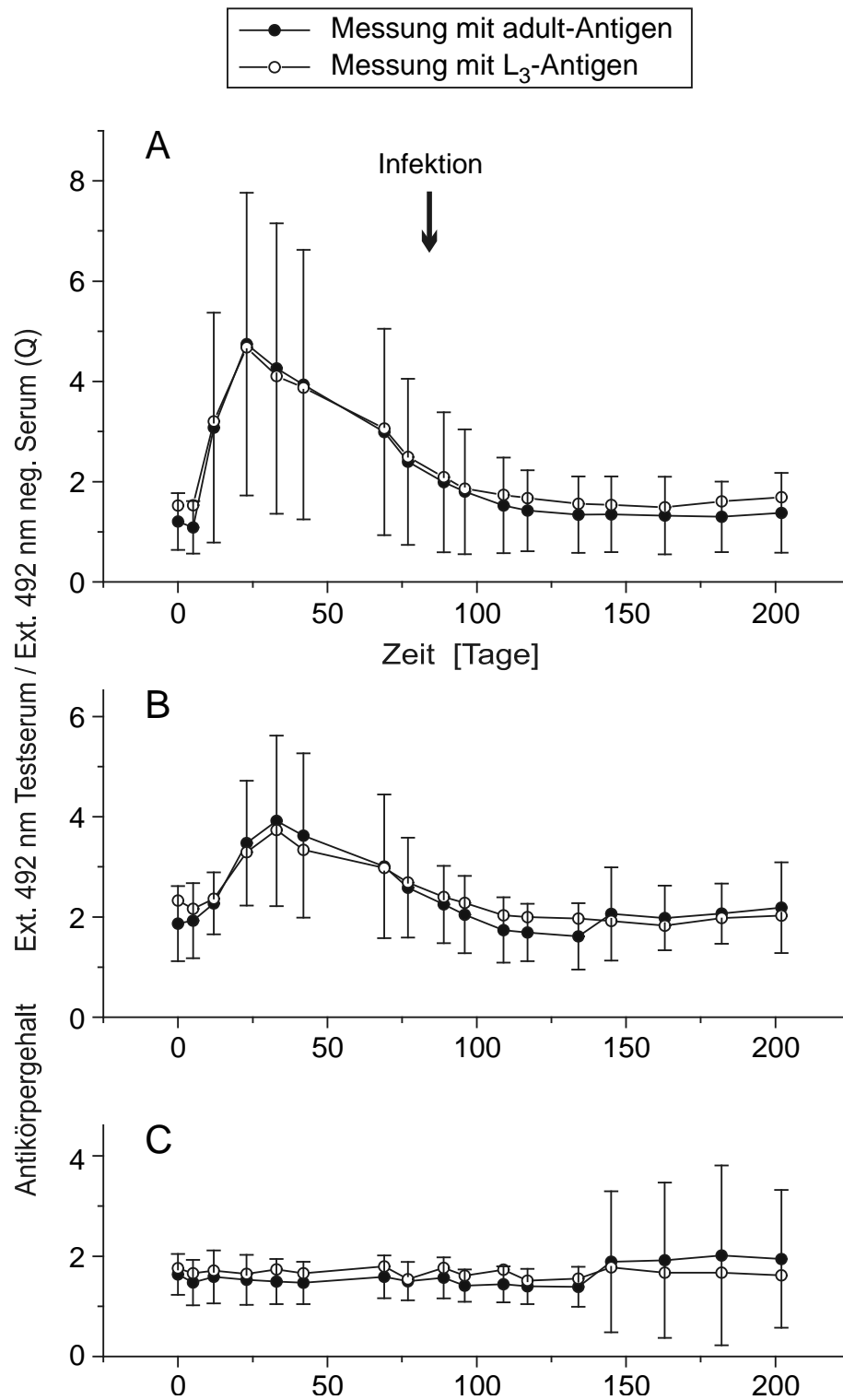


Abb. 20: Verlauf der Antikörperantwort während der Immunisierung und der anschließenden Belastungsinfektion ($\bar{X} \pm SD$). **(A)** Immunisierung mit Homogenat adulter *Anguillicola crassus* **(B)** Immunisierung mit L₃-Homogenat, **(C)** Kontrolle

3.3.3. *In vitro* Larvazidität von Leukozyten und Antikörpern

Die mittleren Mortalitätsraten der L₃ von *A. crassus* während der Inkubation mit Leukozyten eines infizierten Aals in Gegenwart von *Anguillicola*-positivem und *Anguillicola*-negativem Serum sowie mit den Seren ohne Zugabe der Leukozyten sind in Tabelle 11 angegeben. Die Rangvarianzanalyse nach Friedman bestätigte zu keinem Beobachtungszeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den 4 Versuchsansätzen ($p > 0,05$). Es zeigte sich somit, daß *in vitro* weder *Anguillicola*-spezifische Antikörper noch die Abwehrzellen des Aals toxisch auf die L₃ wirkten.

Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der Mortalitätsraten der L₃ von *Anguillicola crassus* in Gegenwart von Leukozyten eines experimentell infizierten Aals und *Anguillicola*-positivem oder *Anguillicola*-negativem Serum ($\bar{X} \pm SD$, n = 8)

inkubiert mit	Inkubationszeit				
	4 h	12 h	18 h	24 h	46 h
neg.-Serum	4,9 ± 9,5	4,9 ± 9,5	7,4 ± 10,6	7,4 ± 10,6	9,0 ± 10,3
Leukozyten, neg.-Serum	2,5 ± 7,1	2,5 ± 7,1	2,5 ± 7,1	7,7 ± 10,9	8,1 ± 12,6
pos.-Serum	1,8 ± 5,1	4,3 ± 8,1	4,3 ± 8,1	4,3 ± 8,1	6,1 ± 8,6
Leukozyten, pos.-Serum	1,8 ± 5,1	1,8 ± 5,1	1,8 ± 5,1	1,8 ± 5,1	3,6 ± 6,6

4. DISKUSSION

Um die Immunantwort des Europäischen Aals auf eine Infektion mit *Anguillicola crassus* zu studieren, wurden die in dieser Arbeit angewendeten immunserologischen Testverfahren mittels Seren natürlich infizierter Wildaale aufgebaut und optimiert. Wenngleich die immunserologischen Verfahren nur von geringer diagnostischer Bedeutung sind (vergl. Kapitel 4.1.), bieten sie jedoch ein unverzichtbares Werkzeug, um die Genese einer Immunreaktion bei immunologisch naiven Aalen zu studieren, die unter kontrollierten Bedingungen mit einer *A. crassus* Infektion konfrontiert wurden (vergl. Kapitel 4.2.).

4.1. Serologische Untersuchung von Wildaalen und Bewertung der Testverfahren

Mit der immunserologischen Untersuchung von Wildaalen wurde eine Vergleichsbasis für die in dieser Arbeit erzielten Resultate mit den bisher in der Literatur publizierten Arbeiten zur Serologie von Wildaalen (Buchmann et al. 1991, Höglund & Pilström 1995, Haenen et al. 1996, Békési et al. 1997) geschaffen. Weiterhin war es möglich, die serologischen Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen mit den serologischen Befunden von Wildaalen zu vergleichen, da die selben serologischen Testverfahren unter gleichen Bedingungen angewendet wurden.

Die Wertigkeit serologischer Untersuchungsverfahren für die Diagnose einer Anguillicolosis beim Aal wurde in der Literatur (Buchmann et al. 1991, Höglund & Pilström 1995, Haenen et al. 1996, Békési et al. 1997) bisher nicht befriedigend dargestellt. Gleichwohl äußerten Buchmann et al. (1991) die Hoffnung, daß mit der Immunoblot-Technik ein Verfahren zur Serodiagnose gegeben ist. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine kritische Evaluierung der serologischen Testverfahren.

4.1.1. Sektionsbefunde bei Wildaalen

Für die Bewertung der serologischen Testverfahren wurde die Prävalenz und Befallsintensität von *Anguillicola crassus* bei einem Wildaalkollektiv aus dem Rhein bestimmt. Die hierbei erhaltenen Werte für die Befallssituation der Rheinaale entsprechen den von Würtz et al. (1998) angegebenen Werten für Aale aus der gleichen Region, die auch im gleichen Jahr gefischt wurden. Die mittlere Befallsintensität liegt mit 5,5 *A. crassus* pro Aal in einer Größenordnung, von der Ashworth (1994) aufgrund von Freilandstudien annimmt, daß sie sich längerfristig für das Wirt-Parasit-System einstellen wird. Über die Mechanismen, die einer solchen Regulierung der Befallsintensität von *A. crassus* zugrunde liegen, ist nichts bekannt (Ashworth 1994).

Der in dieser Arbeit mit 88 % ermittelte Anteil der Aale, die eine pathologische Veränderung der Schwimmblase aufweisen, erscheint widersprüchlich zu den Angaben von Würtz et al. (1998), die eine Schädigung der Schwimmblasenwand bei nur 28,4 % der untersuchten Wildaale beschrieben. Die Ursache für diese Diskrepanz ist neben der subjektiven Komponente bei der Klassifizierung der beobachteten Gewebeveränderungen vor allem darin zu sehen, daß bei der vierstufigen Bewertungsskala von Würtz et al. (1998) die ersten, leichten Anzeichen einer Gewebeveränderung nicht erfaßt wurden. Die Schadensklassen 3 bis 5 (vergl. Kapitel 2.3.), welche ein fortgeschrittenes Stadium der Schädigung beschreiben, waren in Übereinstimmung mit Würtz et al. (1998) bei 29 % der Aale festzustellen. Interessant ist, daß der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anteil der Rheinaale mit Schwimmblasenschäden von 88 % sehr gut mit den Angaben von Hartmann (1994) übereinstimmt, der mit der fünfstufigen Bewertungsskala bei 86 % der Aale in der Elbe eine Schädigung der Schwimmblasenwand diagnostiziert hatte.

Der scheinbare Widerspruch bei der Beurteilung der Schwimmblasenschädigung von Aalen, die im gleichen Jahr im selben Gewässerabschnitt gefischt wurden, ist folglich auf eine unterschiedliche Skalierung zurückzuführen. Bei zukünftigen Studien sollte die Erfassung der Schwimmblasenschäden daher nach einem standardisierten Schema erfolgen. Als Grundlage hierfür bietet sich die mit Fotos dokumentierte fünfstufige Skala von Hartmann (1994) an.

Es überrascht nicht, daß die Intensität der Schwimmblasenschädigung bei den Wildaalen des untersuchten Screeningkollektivs nicht mit dem aktuellen *A. crassus* Befall korrelierte, da die Gewebeveränderungen ja die Folge des zurückliegenden Krankheitsverlaufes sind.

Die auslösenden Faktoren für die von *A. crassus* verursachten massiven pathologischen Gewebeveränderungen, z.B. die Hyperplasie des Epithels der Schwimmblase sowie eine Fibrotisierung des gesamten Schwimmblasengewebes, sind bisher unbekannt (Würtz & Taraschewski, im Druck). Neben der von Würtz & Taraschewski (im Druck) genannten mechanischen Schädigung durch die migrierenden Larven und die blutsaugenden adulten Würmer sowie der direkten pathologischen Wirkung exkretierter bzw. sekretierter Substanzen spielen immunpathologische Reaktionen des Wirtes bei der Anguillicolosis wie auch bei anderen Nematodeninfektionen (Parkhouse et al. 1987) sicherlich eine wesentliche Rolle (Molnár et al. 1993). Es ist davon auszugehen, daß die im Schwimmblasengewebe auftretende starke Entzündungsreaktion (Haenen et al. 1989, Molnár et al. 1993) auch schwere Gewebeschäden beim Wirt verursacht (Janeway & Travers 1995).

4.1.2. ELISA

Für die Ermittlung der Leistungsfähigkeit eines diagnostischen Tests ist zunächst die klare Definition des Ziels der Diagnose erforderlich. Das entsprechende Merkmal muß möglichst fehlerfrei durch ein externes Kriterium, den „gold standard“, beschrieben werden (Abel 1993).

Eine bestehende Infektion von Aalen mit *Anguillicola crassus* sowie eine Schädigung der Schwimmblasenwand sind durch die makroskopische und mikroskopische Untersuchung herauspräparierter Schwimmblasen problemlos und mit absoluter Sicherheit festzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde der diagnostische Wert des ELISA anhand von 3 verschiedenen Definitionen eines „wirklich positiven“ Sektionsbefundes überprüft, die im Folgenden begründet werden:

1. Eine bestehende Infektion mit larvalen oder adulten *A. crassus* ist selbstredend als positiver Sektionsbefund zu definieren.

2. Pathologische Veränderungen der Schwimmblasenwand können als Indiz für eine überstandene Infektion und somit zusätzlich zu einer bestehenden Infektion mit larvalen und/oder adulten *A. crassus* als positiver Sektionsbefund gewertet werden, selbst wenn keine Infektion nachzuweisen ist. Dies ist gerechtfertigt, da pathologische Veränderungen der Schwimmblasenwand normalerweise wohl durch eine Infektion mit *A. crassus* verursacht sein dürften (Hartmann 1994, Molnár et al. 1993, Würtz & Taraschewski, im Druck). Bakterielle oder virale Erreger für eine Schwimmblasenentzündung wie z.B. beim Karpfen sind in der einschlägigen Literatur für den Aal nicht beschrieben (Amlacher 1986, Roberts & Schlotfeld 1985, Schäperclaus 1990). Diese erweiterte Definition eines positiven Sektionsbefundes berücksichtigt die Eigenschaft Antikörper-abhängiger Testverfahren, auch nach einer überstandenen Infektion ein positives Resultat zu ergeben, solange ein erhöhter Antikörpergehalt fortbesteht (Voller & De Savigny 1981).

3. Beschränkt man die Definition eines „wirklich positiven“ Sektionsbefundes auf eine bestehende Infektion mit adulten *A. crassus*, werden frische Infektionen mit L₃ nicht berücksichtigt. Hiermit sollte der Nachteil einer Antikörper-abhängigen Serodiagnostik ausgeschlossen werden, daß wegen der naturgemäßen Verzögerung zwischen dem Zeitpunkt der Erstinfektion und dem Aufkommen eines meßbaren Gehaltes an im Blut zirkulierenden spezifischen Antikörpern sehr frische Infektionen entgegen der tatsächlichen Situation in der Serodiagnose immer ein falsch negatives Resultat ergeben (Voller & De Savigny 1981).

Bei der Anwendung des ELISA zur Untersuchung der Seren von 100 Wildaalen zeigte sich, daß der Test für keine der beschriebenen Definitionen eines positiven Sektionsbefundes zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Auch Haenen et al. (1996) und Békési et al. (1997) konnten mit kleineren Kollektiven von 38 bzw. 21 Wildaalen keinen Zusammenhang zwischen den gemessenen ELISA-Werten und dem Infektionsstatus der untersuchten Aale feststellen.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Sensitivität und Spezifität des ELISA mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* ist für eine brauchbare Serodiagnose zu gering. Der positive Vorhersagewert für eine bestehende oder überstandene Infektion ist zwar mit 98,5 % recht hoch; dies beruht jedoch auf der hohen Prävalenz von *A. crassus* bzw. der Häufigkeit von Schwimmblasenschäden und nicht auf der Differenzierungsfähigkeit des Tests. Wenngleich bei der Messung der negativen Seren von Farmaalen eine sehr gute Spezifität von 97,7 % festgestellt wurde, war die Spezifität bei der Verwendung von Wildaalseren gering und ermöglichte es nicht, die wenigen nicht infizierten Aale aus einer hochgradig infizierten Population zu erkennen. Selbstverständlich könnten auch Aale mit negativem Sektionsbefund infolge einer vorangegangenen Infektion seropositiv sein. Hierfür steht allerdings kein externes Kriterium zur Verfügung; und unter dieser Prämisse ist eine Beurteilung des Tests deshalb nicht möglich. Sehr wahrscheinlich ist die unbefriedigende Spezifität des ELISA bei der Untersuchung von Wildaalseren nicht unerheblich durch kreuzreagierende Antikörper bedingt (siehe Kapitel 4.2.3.). Die Reproduzierbarkeit des angewendeten ELISA, ausgedrückt als inter-assay-Variationskoeffizient und intra-assay-Variationskoeffizient, erwies sich mit 16,7 % bzw. 9,1 % als zufriedenstellend.

4.1.3. Immunoblot

Gegenüber dem ELISA hat das Immunoblot-Verfahren den großen Vorteil, daß durch die elektrophoretische Auftrennung der Antigenextrakte der Nachweis von Antikörpern gegen einzelne Antigene verschiedenen Molekulargewichts möglich ist.

Bei dem in dieser Arbeit erstmals verwendeten Rohantigen von der äußeren Cuticula fällt eine starke Reaktion der Seren natürlich infizierter Aalen mit einer dominierenden Antigenbande im Bereich von 100 kDa auf. Bei den Immunoblots mit dem Rohantigen des ganzen Hautmuskelschlauches ist zu erkennen, daß mindestens 3 verschiedene Antigene zu dieser breiten, für die äußere Cuticula typischen Bande vereinigt sind. Jedoch zeigten auch Seren der nicht infizierten Farmaale eine schwache Reaktion mit den in der äußeren Cuticula lokalisierten Antigenen. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion sogenannter natürlicher Antikörper handelt, die

bei Fischen zu finden sind und die entgegen der gängigen Definition für Antikörper sehr unspezifisch reagieren (Ingram 1980, Ellis & Schlotfeld 1985). Der deutliche Unterschied in der Intensität der Reaktion der Seren von infizierten und nicht infizierten Aalen spricht gleichwohl dafür, daß die Antigene der äußeren Cuticula immunologisch bedeutsam sind. Dies stimmt grundsätzlich mit den Ergebnissen von Höglund & Pilström (1995) überein, die mit ihrem sogenannten Cuticula-Antigen im ELISA und Immunoblot die besten Resultate erzielten. Das von Höglund & Pilström (1995) mit der SDS-PAGE erhaltene Proteinmuster zeigt allerdings im Vergleich zu demjenigen, welches in Kapitel 3.1.2.2. dieser Arbeit dargestellt ist, daß die Autoren nicht mit einem Rohantigen der äußeren Cuticula gearbeitet hatten, sondern sehr wahrscheinlich den ganzen Hautmuskelschlauch als Cuticula bezeichneten.

Die unscharfe Begrenzung der oben genannten Banden im Bereich von 100 kDa läßt vermuten, daß diese durch hydrophobe Antigene gebildet werden (vergl. Westermeier 1990). Hydrophobe Substanzen wie Polyphenole oder Lipide sind als geringer Bestandteil der Cuticula von Nematoden bekannt (Smyth 1994, Mehlhorn & Piekarski 1995) und haben ihre Bedeutung in der Regulation der Permeabilität (Lee & Atkinson 1976, Chitwood & Chitwood 1977). Wahrscheinlich ist, daß es sich bei den beschriebenen Antigenen um Glycoproteine mit hydrophoben Eigenschaften handelt, da diese in der Regel die spezifischen Oberflächenantigene von Nematoden darstellen (Parkhouse et al. 1987).

Eine Bande von etwa 43 kDa, die bei der Verwendung des Antigenextraktes vom ganzen Hautmuskelschlauch auftrat, ist wahrscheinlich mit dem von Nielsen & Buchmann (1997) als Glutathion-S-Transferase identifizierten Antigen identisch. Buchmann et al. (1991) beschrieben die Reaktion von Wilddaalseren mit einem 43 kDa Antigen als sehr spezifisch und vermuteten, daß die Antikörperantwort des Aals hauptsächlich gegen dieses Antigen gerichtet ist. Haenen et al. (1996) fanden diese Bande jedoch auch bei Immunoblots mit Seren nicht infizierter Aale und auch die vorliegenden Resultate können weder die Spezifität noch die Sensitivität des 43 kDa Antigens bestätigen.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Untersuchung Immunoblots mit den vordersten Körperabschnitten adulter *A. crassus* von der Länge des Oesophagus durchgeführt, um nach sekretorischen Antigenen zu suchen, die möglicherweise vom Oesophagus und den assoziierten Drüsen ausgeschieden werden (Wakelin 1994). Es ist bekannt, daß Nematoden eine ganze Reihe sehr immunogener exkretorischer und sekretorischer Antigene ausscheiden (Lightowlers & Rickard 1988). Die Antigenität von oesophagealen Substanzen wurde beispielsweise für *Trichinella spiralis* und *Ancylostoma caninum* nachgewiesen (Castro 1991, Wakelin 1994). Polzer & Taraschewski (1993) identifizierten im vordersten Fünftel des Körpers adulter *A. crassus* eine Proteinase, bei der es sich sehr wahrscheinlich um eine Aspartat-Proteinase zur Degradierung von Hämoglobin handelt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen hat diese ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa. Bei einigen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wildaalsereen traten bei den Immunoblots mit dem Antigenextrakt der vordersten Körperabschnitte unter reduzierenden Bedingungen Banden in einem Bereich von 14 bis 28 kDa auf, die bei keiner der anderen Fraktionen des Parasiten nachweisbar waren. Diese Banden waren allerdings von geringer Intensität und unscharf. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob diese Banden tatsächlich von oesophagealen Substanzen gebildet werden, die möglicherweise über die Mundöffnung sekretiert werden. Anhand von Immunoblots mit nativ getrennten, also nicht denaturierten Enzymen könnte die antigene Eigenschaft der erwähnten Aspartat-Proteinase überprüft werden.

Anhand der Immunoblots mit dem Antigenextrakt von Aalblut und vom Darminhalt adulter *A. crassus* kann gezeigt werden, daß der Test nicht durch eine unerwünschte Reaktion der monoklonalen sekundären Antikörper mit Immunglobulinen des Aals im Darminhalt des Parasiten gestört wird. Solche Probleme wurden von Buchmann et al. (1991) und Höglund & Pilström (1995) beschrieben, die mit polyklonalem anti-Aal-Immunglobulin gearbeitet hatten. Bei der Verwendung des Antigenextraktes vom Aalblut trat nur eine sehr schwache Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa auf, die bei dem Antigenextrakt vom Darminhalt der Nematoden nicht nachweisbar war. Bei dieser Bande handelt es sich wahrscheinlich um die schwere

Kette des Aal-Immunglobulins, da diese ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa aufweist (Buchmann et al. 1992, Van der Heijden et al. 1995, Hung et al. 1996).

Zum ersten Mal werden in dieser Arbeit Immunoblots mit einem somatischen Rohantigen von L₃ dargestellt. Es zeigte sich, daß die von den einzelnen Seren erzeugten Banden bei der Verwendung des L₃-Rohantigens nicht vollständig mit den Banden in Übereinstimmung zu bringen sind, die bei Verwendung der Rohantigene adulter *A. crassus* auftraten. Die L₃ unterscheiden sich also hinsichtlich ihrer Antigene von adulten *A. crassus*.

Aufgrund der völlig unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsweise sowie der unterschiedlichen Morphologie überraschen diese Unterschiede nicht. Es ist bekannt, daß sowohl die Oberflächenantigene als auch andere sekretorische und exkretorische Antigene von Nematoden stadienspezifisch sein können (Parkhouse et al. 1987). Von *A. crassus* ist bekannt, daß sich die adulten und larvalen Parasiten hinsichtlich ihrer Proteinasen unterscheiden (Polzer & Taraschewski 1993). Die L₃ besitzt eine Trypsin-ähnliche Proteinase, die ihr offenbar die Migration durch das Schwimmblasengewebe ermöglicht. Adulte *A. crassus* hingegen verfügen über eine Aspartat-Proteinase, womit sie das Hämoglobin Ihres Wirtes verdauen können. Polzer & Taraschewski (1993) geben das Molekulargewicht der L₃-spezifischen Proteinase unter nicht reduzierenden Bedingungen mit 25 kDa an. Wenngleich die SDS-PAGE in der vorliegenden Arbeit unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde und so kein direkter Vergleich der Molekulargewichte möglich ist, ergibt sich aus dem Fehlen von Banden im Bereich von 25 kDa oder von noch geringerem Molekulargewicht kein Hinweis auf die antigenen Eigenschaften der Trypsin-ähnlichen Proteinase der L₃. Wie bereits oben für die Aspartat-Proteinase adulter *A. crassus* vorgeschlagen, sollte dieser Sachverhalt anhand von Immunoblots mit nativ getrennten Enzymen in Zukunft detaillierter untersucht werden.

Im Aufbau der Cuticula unterscheiden sich die adulten *A. crassus* von den Larvenstadien durch die gelatinöse äußere Cuticula (Taraschewski et al. 1987, Blanc et al. 1992). Diese stellt möglicherweise eine Anpassung an das Leben im

Schwimmblasenlumen dar, das bei gesunden Aalen zu etwa 50 Vol. % mit Sauerstoff gefüllt ist (Würtz et al. 1996). Während die Cuticula der im Gewebe lebenden L₃ einen Schutz vor den Angriffen des Immunsystems des Aals gewährleisten muß, besteht eine wesentliche Funktion der Cuticula adulter *A. crassus* sicherlich im Schutz vor der oxidativen Wirkung des Sauerstoffs und seiner freien Radikale. Dieser Schutz könnte von der von Nielsen & Buchmann (1997) bei adulten *A. crassus* gefundene Glutathion-S-Transferase vermittelt sein. Dieses bei Eukaryoten verbreitete Enzym vermittelt allgemein einen Schutz vor oxidativem Stress und konnte z.B. bei *Schistosoma mansoni* auch extrazellulär im Tegument nachgewiesen werden (Sharp et al. 1991b). Die charakteristischen unscharfen Banden im Bereich von 100 kDa, welche bei den Immunoblots mit den Antigenextrakten vom Hautmuskelschlauch und von der äußeren Cuticula adulter *A. crassus* auftreten, sind bei den Immunoblots mit dem L₃-Rohantigen nicht zu identifizieren. Möglicherweise werden diese Banden also von Antigenen gebildet, die spezifisch für das adulte Stadium sind.

Die Immunoblot-Analysen ergaben, daß die mit den Geschlechtsorganen, der Darmwand oder dem Darminhalt adulter *A. crassus* assoziierten Antigene keinen diagnostischen Wert besitzen, da sie nur teilweise von Antikörpern der natürlich infizierten und im ELISA seropositiven Aale erkannt wurden. Ebenso verhält es sich mit dem Rohantigen der L₃. Nur die Antigenextrakte vom Hautmuskelschlauch und dem äußeren, gelatinösen Anteil der Cuticula adulter Nematoden beinhalteten Antigene, die von jedem der 9 getesteten positiven Wildaalsereen erkannt wurden und nur eine schwache Reaktion mit Seren nicht infizierter Farmaale zeigten. Diese Antigene sind potentiell für die Serodiagnose geeignet.

Generell ist beim Immunoblot mit Seren von Wildaalen eine im Vergleich zu den Farmaalen stärkere Hintergrundreaktion festzustellen. Offensichtlich findet sich bei den Wildaalen ein höherer Gehalt an unspezifisch reagierenden Antikörpern. Dies ist damit zu begründen, daß freilebende Aale permanent einer großen Vielfalt an Pathogenen ausgesetzt sind. Die verwendeten Farmaale hingegen wuchsen in einer Umgebung auf, die möglichst von Krankheitserregern frei gehalten wird.

4.1.4. Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Der IIFT mit Gefrierschnitten hat gegenüber den Tests mit Antigenextrakten den Vorteil, daß die Struktur der Proteine nicht durch Hitze, Detergenzien oder reduzierende Agenzien zerstört wird und prinzipiell die Lokalisierung einer Antigen-Antikörper Reaktion im Gewebe des Parasiten möglich ist. Ein Nachteil der Methode ist in der zwangsläufig subjektiven Beurteilung der Fluoreszenz zu sehen (Voller & De Savigny 1981).

Die Beobachtung, daß mit den ELISA-positiven Wildaalseren auf der Oberfläche intakter L₃ keine Fluoreszenz nachzuweisen war, bei einer beschädigten Cuticula oder bei den Schnitten der L₃ jedoch eine deutliche Reaktion auftrat, ist ein Hinweis darauf, daß die Oberfläche intakter L₃ vom Immunsystem des Wirtes nicht erkannt wird. Die unter der Epicuticula liegenden Antigene der Cuticula und der Muskulatur, welche im IIFT von Antikörpern erkannt wurden, sind für die Immunabwehr des Aals erst dann erreichbar, wenn die L₃ tot ist und sich in Zersetzung befindet. Da der IIFT mit den Gefrierschnitten von L₃ eine deutlich positive Reaktion ergab, ist anzunehmen, daß die nachgewiesenen Antikörper gegen tote L₃ gebildet wurden. Die diagnostische Wertigkeit des IIFT mit Gefrierschnitten der L₃ wurde wegen des im Vergleich zum ELISA und der Immunoblot-Technik hohen Bedarfs an L₃ nicht weiter untersucht.

Der IIFT mit Schnitten adulter *A. crassus* ist aufgrund der unspezifischen Reaktion negativer Seren unter diagnostischen Gesichtspunkten nicht einsetzbar. Die vor allem bei der Verwendung von Wildaalseren sichtbare deutliche Fluoreszenz der äußeren Cuticula bestätigt das mit der Immunoblot-Technik erzielte Resultat, daß dort immunologisch wichtige Antigene lokalisiert sind. Die bei einigen Seren zu beobachtende Fluoreszenz an der Oberfläche aller Organe und auch des Darminhalts bestätigt weiterhin die mit der Immunoblot-Technik nachgewiesene Vielfalt *Anguillicola*-spezifischer Antikörper im Serum natürlich infizierter Aale.

4.1.5. Kreuzreaktivität

Eine spezielle Schwierigkeit bei der Serodiagnostik von Helminthosen stellt die Kreuzreaktivität von Antikörpern dar, so daß häufig keine artspezifischen Aussagen möglich sind (Mehlhorn & Piekarski 1995). Insbesondere sind die Antigene von Nematoden dafür bekannt, daß sie bei der Serodiagnose Probleme bereiten (z.B. Voller & De Savigny 1981, Maizels et al. 1982, Parkhouse et al. 1987, De Leeuw & Cornelissen 1991, Wakelin 1994). Die Ursache hierfür liegt in der großen Anzahl konservativer und sehr immunogener Antigene der Helminthen begründet, die vielen Arten gemeinsam sind (Parkhouse et al. 1987).

Erwartungsgemäß war in der vorliegenden Arbeit eine Kreuzreaktivität auch für Antikörper des Aals gegen die Nematoden *A. crassus* und *Raphidascaris acus* nachzuweisen. Mindestens 3 im Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* lokalisierte Antigene wurden von anti-*Raphidascaris* Seren erkannt, darunter das 43 kDa Protein, welches möglicherweise mit der von Nielsen & Buchmann (1997) nachgewiesenen Glutathion S-Transferase identisch ist. Bei einem derart verbreiteten und konservativen Enzym (Sharp et al. 1991b, Hofer & Lackner 1995) wäre eine Kreuzreaktion nicht überraschend. Weitere Kreuzreaktionen von Antikörpern, die gegen die Antigene anderer Parasiten gerichtet sind und hier nicht untersucht wurden, sind zu erwarten. Wie bereits für die Resultate des ELISA (Kapitel 4.2.1.) diskutiert, sind kreuzreagierende Antikörper eine wahrscheinliche Ursache für die geringe Spezifität des Tests beim Screening von Wildaalsseren.

Während die Kreuzreaktivität von Antikörpern im Hinblick auf eine protektive Immunität vorteilhaft sein kann, erfordert die exakte Serodiagnostik dringend artspezifische, möglichst sogar stadienspezifische Antigen-Antikörper Systeme. Um die Spezifität serologischer Tests zu verbessern, müssen die meist verwendeten Rohantigenextrakte durch gereinigte, artspezifische Antigene ersetzt werden. Vielversprechende Möglichkeiten einer spezifischen und sensitiven Serodiagnostik von Parasitosen eröffnen sich mit der Verwendung von nicht kreuzreagierenden, rekombinanten Antigenen. Solche spezifischen Antigene wurden schon für

verschiedene Babesienarten (Böse et al. 1994), aber auch den Nematoden *Onchocerca volvolus* (Soboslay et al. 1994) beschrieben.

4.1.6. Einsatzmöglichkeit der serologischen Testverfahren

Eine wesentliche Fehlerquelle in der parasitologischen Serologie besteht in der - mangels besserer Alternativen - üblichen Verwendung ganzer Organismen oder deren Rohextrakte als immundiagnostisches Antigen. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung solcher Rohantigene wird die Spezifität und die Sensitivität der Tests durch unspezifische und kreuzreagierende Antikörper bzw. durch den hohen Gehalt nicht oder nur schwach immunogener Bestandteile vermindert (Voller & De Savigny 1981, Parkhouse et al. 1987). Aus diesen Gründen ist beispielsweise eine spezifische Diagnostik humanpathogener Helminthosen alleine mit immunserologischen Testverfahren bis heute nicht möglich (Kimmig et al. 1991, Janitschke et al. 1998).

Die genannte Problematik besteht erwartungsgemäß auch beim Nachweis *Anguillicola*-spezifischer Antikörper beim Aal. Eine Verbesserung gegenüber der Verwendung des Rohantigens ganzer *A. crassus* ist mit der von Höglund & Pilström (1995) vorgeschlagenen mechanischen Isolierung einzelner Komponenten von adulten Nematoden möglich. Gleichwohl handelt es sich bei diesen isolierten Rohantigenen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, natürlich noch immer um das Gemisch einer Vielzahl von Proteinen und keineswegs um klar definierte Antigene. Vor diesem Hintergrund ist der geringe diagnostische Wert immunserologischer Tests zum Nachweis einer Anguillicolosis nicht überraschend.

Die unterschiedliche Intensität der unspezifischen Reaktivität der Seren von Wild- und Farmaalen im Immunoblot verdeutlicht außerdem, wie wichtig es ist, eine geeignete Referenzgruppe zu der untersuchten Population auszuwählen (Voller & De Savigny 1981). Wenn serologische Tests für Wildaale angewendet werden sollen, dürfte es angesichts der weiten Verbreitung von *A. crassus* jedoch schwierig oder sogar

unmöglich sein, eine vergleichbare und doch definitiv nicht mit *A. crassus* befallene Aalpopulation zu finden.

Für epidemiologische Fragestellungen steht aber mit der Sektion von Aalen und der anschließenden Untersuchung der Schwimmblasen ohnehin eine schnelle, kostengünstige und zuverlässige Methode zur Erfassung einer aktuellen Infektion mit *A. crassus* zur Verfügung. Allerdings besteht ein möglicher Vorteil immunserologischer Methoden darin, daß auch eine zurückliegende Infektion mit *A. crassus* zu diagnostizieren wäre. Um jedoch beurteilen zu können, ob ein positives serologisches Testergebnis bei einem negativen Sektionsbefund tatsächlich eine zurückliegende Infektion anzeigt, müßten die Tests mit definierten, *Anguillicola*-spezifischen Antigenen durchgeführt werden.

Vielversprechende Einsatzmöglichkeiten für die immunologischen Tests sind überwiegend bei der experimentellen Untersuchung der Immunantwort des Aals auf eine Infektion mit *A. crassus* gegeben. Die durch unspezifische oder kreuzreagierende Antikörper bedingten Fehlerquellen bei der Interpretation der Versuchsergebnisse sind im Experiment unerheblich, da der Immunstatus der Aale vor der Infektion bekannt ist und Kontrollversuche möglich sind. Unerlässlich für experimentelle Untersuchungen sind Versuchstiere, welche wie die in dieser Arbeit verwendeten Aale vor Versuchsbeginn nicht mit *A. crassus* infiziert sind. Mit den Seren dieser Aale erreichte der ELISA eine hohe Spezifität, und mit der guten Reproduzierbarkeit der Tests sind die Voraussetzungen gegeben, die humorale Immunantwort experimentell infizierter Aale zu beschreiben, deren Infektionsgenese genau bekannt ist. Da für die serologischen Tests nur geringe Probenvolumen benötigt werden und Hoffmann & Lommel (1984) zumindest für die Forelle zeigten, daß die wiederholte Entnahme von 5-10% des Blutvolumens keinen oder nur einen minimalen Einfluß auf das weiße Blutbild hat, ist es auch möglich, den zeitlichen Verlauf einer Immunantwort mit einer wiederholten Blutentnahme zu untersuchen.

4.2. Die Immunantwort experimentell infizierter Aale

4.2.1. Antikörperantwort

Die infolge einer experimentellen Infektion mit *A. crassus* ausgelöste Immunantwort erwies sich in ihrem quantitativen und qualitativen Verlauf bei den einzelnen Versuchsaalen als sehr heterogen. Eine Ursache für die ausgeprägten individuellen Unterschiede ist in der genetischen Variabilität der Versuchstiere zu sehen. Da die Zucht von Aalen nicht möglich ist, handelte es sich bei den im Versuch eingesetzten Farmaalen zwangsläufig um ursprüngliche Wildtiere, die zufällig aus einer natürlichen Population entnommen wurden. Hung et al. (1996) fanden bei natürlich mit *Pleistophora anguillarum* infizierten Aalen ebenfalls individuelle Unterschiede im Reaktionsmuster von Serum-Antikörpern gegen Sporenproteine dieser Mikrosporidien. Auch Dunier (1985) geht von einer ausgeprägten individuellen genetischen Heterogenität innerhalb einer Population von Regenbogenforellen (*Onchorhynchus mykiss*) aus.

Bei Säugetieren sind individuelle Unterschiede in der Immunantwort infolge einer Infektion in der Regel quantitativer Art, gelegentlich können sie aber auch qualitativ sein (Hänsch 1986, Wakelin 1996). Allgemein läßt sich sagen, daß deutliche individuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit und Resistenz gegenüber vielen parasitären Infektionen mit der genetischen Variabilität innerhalb der Wirtspopulation zu erklären sind (Wakelin 1996). Vom Menschen ist z.B. bekannt, daß Bewohner in endemischen Gebieten auf eine Filarieninfektion sowohl immunologisch als auch klinisch sehr unterschiedlich reagieren (Soboslay et al. 1994).

Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, daß die Immunantwort der einzelnen Versuchsaale infolge einer intraperitonealen Immunisierung sehr viel gleichförmiger verläuft als dies bei den experimentell infizierten Aalen zu beobachten war. Daher ist anzunehmen, daß mehr noch als die genetische Variabilität des Wirtsorganismus auch Unterschiede im Infektionsverlauf ursächlich für die ausgeprägten individuellen Unterschiede der Immunantwort experimentell infizierter Aale sind.

Die Beobachtung, daß eine ausgeprägte Antikörperproduktion bei den infizierten Aalen zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten, vor allem oft erst viele Monate nach der Infektion, einsetzte, wäre mit dem zeitlich unterschiedlich eintretenden Tod einzelner adulter *A. crassus* zu erklären. Dies zumal deshalb, weil abgestorbene und in der Schwimmblase sich zersetzende *A. crassus* mit Sicherheit eine sehr effektive Antigenquelle darstellen. Mit dieser Annahme steht in Einklang, daß Antikörper auch gegen somatische Komponenten von *A. crassus*, z.B. dessen Muskulatur, nachgewiesen werden konnten, die dem Immunsystem des Aals nicht zugänglich sind, solange der Parasit lebendig ist.

Aus der Verlaufsbeobachtung der humoralen Immunantwort der experimentell mit *A. crassus* infizierten Aale ergeben sich die nachfolgend aufgeführte Hinweise darauf, daß die gemessene Antikörperantwort nicht gegen die Invasionslarve (L_3), sondern erst gegen die adulten Nematoden im Lumen der Schwimmblase gerichtet ist:

1. Im ELISA war kein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Antikörperantwort gegen L_3 und gegen adulte Nematoden ersichtlich. Eine spezifisch gegen L_3 -Antigene gerichtete Antikörperantwort war nicht nachzuweisen. Weil die mit dem Rohantigen der L_3 und die mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* gemessenen zeitlichen Verläufe der Immunantwort übereinstimmen, ist anzunehmen, daß die im ELISA gemessenen Antikörper mit solchen Antigenen reagieren, die den L_3 und den adulten Nematoden gemeinsam sind. Anhand der Intensität der bestimmten Antigen-Antikörper Reaktionen ist zu erkennen, daß der relative Anteil der Hauptantigene am Gesamtprotein im Rohantigen vom Hautmuskelschlauch der adulten Würmer höher ist als im L_3 -Rohantigen.

2. Im ELISA war ein Anstieg spezifischer Antikörper im peripheren Blut infizierter Aale frühestens 8 Wochen nach der ersten Infektion nachzuweisen. Infolge der intraperitonealen Injektion homogenisierter *A. crassus* trat eine meßbare Antikörperproduktion jedoch bereits innerhalb von 5 bis 12 Tagen ein. Das Immunsystem des Aals ist also durchaus in der Lage, bei einer Wassertemperatur von 20°C kurze Zeit nach der Antigenstimulation im Serum nachweisbare Antikörper zu

produzieren. Die Ursache für die spät einsetzende Antikörperantwort der infizierten Aale ist demnach in den immunogenen Eigenschaften der lebenden Parasiten zu sehen. Offensichtlich präsentiert die im Gewebe lebende L₃ dem Aal entweder überhaupt keine immunogenen Substanzen, oder deren Konzentration ist zu gering, um eine meßbare Antikörperproduktion auszulösen. Da die Entwicklung von *A. crassus* von der Infektion des Aals bis zum Auftreten der ersten adulten Nematoden im Schwimmblasenlumen bei 20°C etwa 50 Tage beansprucht (Nagasawa et al. 1994, Haenen et al. 1996, Knopf et al. 1998) und eine Induktionsphase von etwa 1 Woche anzunehmen ist, scheint die 8 Wochen nach der Infektion gemessene Antikörperantwort von den ersten adulten *A. crassus* induziert zu sein.

3. Im Immunoblot war eine starke Reaktion gegen Antigene adulter *A. crassus* nachzuweisen. Die Immunantwort war vor allem gegen solche Antigene gerichtet, die im Hautmuskelschlauch der adulten Nematoden lokalisiert sind. Auffällig war wie auch bei den getesteten Wildaalsereen eine sehr kräftige, breite und unscharfe Bande im Bereich von 100 kDa, die bei dem Rohantigen der äußeren Cuticula auftrat. Bei Verwendung des Rohantigens der L₃ traten keine oder nur sehr schwache Banden auf. Diese waren dann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit identisch mit Banden, die auch bei den Immunoblots mit dem Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* zu beobachten waren.

Die Anwendung der Immunoblot-Technik in der vorliegenden Arbeit zeigt, daß die Qualität der gegen adulte *A. crassus* gerichteten Antikörper bei den experimentell infizierten Aalen mit derjenigen von natürlich infizierten Aalen übereinstimmt. Die bei den natürlich infizierten Aalen gefundenen Antikörper gegen L₃-Antigene konnten im Experiment aber nicht nachgewiesen werden. Es ist prinzipiell möglich, daß die Antikörperproduktion der Versuchsaale durch den im Experiment unweigerlich induzierten Streß unterdrückt wird (Roberts 1985, Van Muiswinkel 1995). Da jedoch eine starke Antikörperantwort gegen Antigene der adulten Nematoden nachzuweisen war, erscheint es unwahrscheinlich, daß von der durch einen angenommenen Streß bedingten Immunsuppression selektiv die Antikörperantwort gegen die Larven

betroffen ist. Wahrscheinlicher ist, daß kreuzreagierende Antikörper im Serum der Wildaale mit L₃-Antigenen reagierten.

Beim Vergleich der 3 Versuchsgruppen, die entweder nur einmalig mit 40 L₃ oder über einen Zeitraum von 140 Tagen wiederholt mit 2 mal 3 L₃ bzw. 20 L₃ pro Woche infiziert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied der Antikörperantwort nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß die beschriebenen Charakteristika der Antikörperantwort von Aalen auf die Infektion mit *A. crassus*, nämlich die sehr spät einsetzende Antikörperproduktion und das Ausbleiben von nachweisbaren L₃-spezifischen Antikörpern, in einem weiten Bereich unabhängig vom Infektionsdruck sind.

Wenn die lebenden L₃ im Schwimmblasengewebe tatsächlich keine Antikörperantwort auslösen, müssen sie über Mechanismen verfügen, der spezifischen Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Von Filarien weiß man, daß sie ihre Oberflächenstruktur verändern und immunsupprimierende Substanzen ausscheiden können (Soboslay et al. 1994). Eine hervorragende Anpassung an einen Wirt stellt die zuerst bei Schistosomen beschriebene molekulare Mimikri dar, bei der wirtseigene Proteine und Glycolipide des Wirtes in die Oberfläche eingelagert werden (Lucius & Loos-Frank 1997). Auch Filarien können ihre Oberfläche mit Serumalbumin des Wirtes maskieren und so der Immunabwehr des Wirtes entgehen (Soboslay et al. 1994). Möglicherweise schützen sich auch die Larvenstadien von *A. crassus* mit solchen Evasionsmechanismen. Die Resultate des IIFT mit ganzen L₃ stützen die Hypothese, daß die Körperoberfläche intakter L₃ keine immunogenen Substanzen enthält.

Für *A. crassus* würde ein wirksamer Evasionsmechanismus der Larvenstadien zum Unterlaufen der Immunabwehr des Aals eine sinnvolle Strategie darstellen, da diese bei der Migration vom Darmlumen in die Schwimmblasenwand und während der gesamten Larvalentwicklung in engem Gewebekontakt mit ihrem Wirt (Haenen et al. 1989, De Charleroy et al. 1990). Im Gegensatz zu den adulten Parasiten, die im Schwimmblasenlumen leben, sind die Larven somit direkt den Angriffen durch Antikörper, Komplementsystem und zytotoxische Zellen ausgesetzt. Der Erfolg einer Infektion wird also entscheidend dadurch beeinflußt, wie erfolgreich sich die Larven

während der Migrations- und Entwicklungsphase vor der Immunabwehr des Aals schützen.

Offen bleibt die Frage, warum keine gegen die exkretorischen und sekretorischen Substanzen der Larven gerichteten Antikörper nachzuweisen waren, obwohl Nematoden im allgemeinen eine große Vielfalt solcher Substanzen ausscheiden, die sehr immunogen sind (Wakelin 1994) und bei L₃ von *A. crassus* eine Penetrationsproteinase nachgewiesen wurde (Polzer & Taraschewski 1993). Von *Trichinella spiralis* ist bekannt, daß sekretierte Proteine in den infizierten Wirten nicht zwingend immunogen sind (Parkhouse et al. 1987), was natürlich auch für Larven von *A. crassus* gelten kann. Möglicherweise ist aber auch einfach der Anteil dieser Substanzen im Antigengemisch des aus ganzen L₃ gewonnenen Rohantigens zu gering als daß sie nachgewiesen werden konnten.

Die im Schwimmblasenlumen lebenden adulten *A. crassus* stehen nur während der Nahrungsaufnahme in direktem Gewebekontakt mit ihrem Wirt. Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten des Immunsystems, den Parasiten im Schwimmblasenlumen zu erkennen und gegen diesen vorzugehen, leben die adulten *A. crassus* wesentlich sicherer vor der Immunabwehr ihres Wirtes als die im Gewebe lebenden Larvenstadien. Eine humorale Immunantwort des Aals ist gegen exkretorische und sekretorische Substanzen des Parasiten zu erwarten, die das Schwimmblasenepithel passieren können oder eventuell während der Nahrungsaufnahme in das Gewebe des Wirtes gelangen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit den Seren natürlich infizierter Aale gewonnen wurden, richtet sich die Antikörperantwort der experimentell infizierten Aale überwiegend gegen Antigene, die im Hautmuskelschlauch bzw. der äußeren Cuticula lokalisiert sind. Dies weist darauf hin, daß die immunogenen Substanzen des Teguments sekretiert werden, da sie sonst keine Antikörperantwort auslösen könnten. Ferner wurden bei einigen Aalen Antikörper gefunden, die mit Antigenen des Darminhalts und der Darmwand adulter *A. crassus* reagierten. Bemerkenswerter Weise haben sich auch bei einigen human- bzw. veterinärmedizinisch wichtigen parasitischen Nematoden wie

Onchocerca volvolus, *Trichinella spiralis* und *Parafilaria bovicola* von der Cuticula sekretierte Antigene als sehr immunogen und spezifisch erwiesen (Cabrera & Parkhouse 1987, Parkhouse et al. 1987, Sundquist et al. 1988, 1989). Philipp et al. (1980) konnten nachweisen, daß *Trichinella spiralis* stadienspezifische Proteine der Cuticula in das umgebende Medium sekretiert.

Im Gegensatz zu den natürlich infizierten Aalen zeigte sich bei den experimentell infizierten Aalen bestenfalls eine sehr schwache Antikörperreaktion mit Antigenen der weiblichen Geschlechtsorgane. Es ist davon auszugehen, daß das Uterusgewebe selbst dem Immunsystem des Aals nicht zugänglich ist, solange die Parasiten am Leben sind. Die ausgeschiedenen Eier bzw. schon in der Schwimmblase geschlüpfte L₂ wirken möglicherweise erst dann immunogen, wenn sie versehentlich in das pathologisch veränderte Schwimmblasengewebe eingeschlossen werden. Um solche eingeschlossenen L₂ ist auch eine intensive Entzündungsreaktion festzustellen (Van Banning & Haenen 1990, Molnár et al. 1993, Molnár et al. 1995).

4.2.2. Zelluläre Immunantwort

Neben den humoralen Abwehrmechanismen spielt auch die zelluläre Komponente des Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr von parasitischen Helminthen (Wakelin 1994). Als wichtige Effektorzellen bei der Abwehr von Schistosomulae bei Säugetieren sind Makrophagen und eosinophile Granulozyten beschrieben (Ruppel 1994). Voraussetzung für die zytotoxische Wirkung der Effektorzellen ist allerdings, daß die Oberfläche der Parasiten mit spezifischen Antikörpern und/oder Komplement opsonisiert ist (Ruppel 1994). Auch bei der Abwehr verschiedener Mikrofilarien konnte eine solche antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität beobachtet werden, wobei Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten als Effektorzellen wirken können. Diese lagern sich an der Oberfläche der Parasiten an, degranulieren und können so die Epicuticula und Cuticula angreifen (Soboslay et al. 1994).

Im Blut von Fischen sind generell die gleichen Typen an Leukozyten zu finden wie bei Säugetieren und anderen höheren Vertebraten (Rowley et al. 1988). Parasitäre Infektionen können bei Fischen eine Entzündungsreaktion auslösen, die derjenigen von Säugetieren ähnelt (Rowley et al. 1988, Sharp et al. 1992).

Bei der Regenbogenforelle (*Onchorhynchus mykiss*) führt eine Infektion mit den Plerocercoiden verschiedener *Diphyllbothrium*-Arten zu einer Entzündungsreaktion, bei der vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen beteiligt sind und in deren Folge die Parasiten nach etwa 6 Wochen eingekapselt, aber nicht abgetötet werden (Sharp et al. 1992). Für diese Wirt-Parasit Systeme zeigten Sharp et al. (1991a), daß die Leukozyten der Regenbogenforelle auf wirtseigene Mediatoren mit einer gerichteten Migration reagieren (Chemotaxis), während die Reaktion auf Substanzen des Parasiten eine ungerichtete Steigerung der Migrationsaktivität war (Chemokinese). Neutrophile Granulozyten des Lachses (*Salmo salar*) reagieren chemotaktisch und mit der Produktion von O_2^- auf *Aeromonas salmonicida*, wobei eine Opsonisierung der Bakterien mit Antikörpern und Komplement die stärkste Antwort auslöst (Lamas & Ellis 1994). Hamers et al. (1992) konnten *in vitro* zeigen, daß die unterschiedlich ausgeprägte unspezifische zelluläre Immunantwort von Karpfen (*Cyprinus carpio*), Regenbogenforelle und Europäischem Aal gegenüber dem Acanthocephalen *Paratenuisentis ambiguus* möglicherweise ausschlaggebend für die Wirtsspezifität des Parasiten ist.

Histologische Untersuchungen natürlich infizierter Europäischer Aale zeigen, daß es in der Schwimmblasenwand um die L_3 von *A. crassus* zu einer Entzündung mit einer Infiltration von Makrophagen und Granulozyten kommen kann (Haenen et al. 1989, Molnár et al. 1993, Würtz & Taraschewski, im Druck). In einigen Fällen werden die Larven auch durch Bindegewebe eingekapselt (Molnár et al. 1993). Warum die Entzündungsreaktion nicht immer eintritt, ist unbekannt. Möglicherweise ist dies wie auch die individuellen Unterschiede in der humoralen Immunantwort in der genetischen Disposition der Wirte begründet. Offen ist auch die Frage, ob die Phagozyten lediglich das von der migrierenden Larve zerstörte Gewebe beseitigen und abgestorbene Larven

einkapseln, oder ob sie auch in der Lage sind, die lebenden Parasiten aktiv zu bekämpfen.

Mit dem Zellmigrationstest nach Boyden (1962) konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, daß die Granulozyten und Monozyten von Aalen, die mit *A. crassus* infiziert sind, auf die Gegenwart von L₃ mit einer signifikanten Steigerung ihrer Migrationsaktivität reagieren. Da sich die erhöhte Migrationsaktivität nur bei den Phagozyten infizierter Aale nachweisen lies, ist davon auszugehen, daß die Infektion zu einer Aktivierung der Abwehrzellen führte. Hinweise auf den möglichen Mechanismus dieser Aktivierung geben die Untersuchungen von Davidson et al. (1991). Sie konnten *in vitro* nachweisen, daß aus dem Darm der Regenbogenforelle isolierte Leukozyten nach experimenteller Stimulation chemotaktisch aktive Substanzen und einen Makrophagen-aktivierenden Faktor produzieren. Es ist denkbar, daß ebenso auch in der Mucosa der Schwimmblasenwand lokalisierte Leukozyten eine entscheidende Rolle beim Auslösen einer Entzündungsreaktion spielen, zumal bei Fischen wahrscheinlich ein autonomes mucöses Immunsystem existiert (Davidson et al. 1993).

Als chemotaktische Faktoren sind bei Säugetieren viele Substanzen beschrieben worden, die sowohl vom Infektionserreger als auch vom Wirt stammen können (Hänsch 1986). IgM-Antikörper können mittelbar über den klassischen Komplementweg eine Chemotaxis auslösen, in dem sie die Komplementkomponente C5a freisetzen (Roitt 1993, Janeway & Travers 1995). Der klassische Komplementweg ist auch bei Fischen gut dokumentiert (Ellis & Schlotfeld 1985). Der Leukozyten-Migrationstest mit den L₃ von *A. crassus* ergab jedoch keinen Hinweis darauf, daß die Migrationsaktivität der Monozyten und Granulozyten mit der spezifischen humoralen Immunantwort des Aals korreliert ist. Dies war auch nicht zu erwarten, da bei der serologischen Untersuchung der experimentell infizierten Aale keine gegen die L₃ gerichtete Antikörperantwort nachzuweisen war.

Da für den Test lebende L₃ eingesetzt wurden, ist davon auszugehen, daß die gesteigerte Migrationsaktivität der Monozyten und Granulozyten aus dem Blut infizierter Aale durch Substanzen ausgelöst wird, die von den Larven in das umgebende Medium

abgegeben werden. Die immunserologischen Untersuchungen zeigen, daß diese Substanzen offenbar keine Antikörperantwort induzieren können. Wahrscheinlich sind sie zu niedermolekular, um eine immunogene Eigenschaft zu besitzen (Janeway & Travers 1995). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß es sich bei wirksamen Chemokinen sowohl der Fische (Rowley et al. 1988, Sharp et al. 1992) als auch der Säugetiere (Hänsch 1986, Janeway & Travers 1995) wie z.B. Interleukinen oder Leukotrienen um niedermolekulare Proteine und somit ineffektive Immunogene handelt.

Es ist bekannt, daß Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen von Säugetieren als Effektorzellen der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität eine direkte Funktion bei der Elimination von parasitären Helminthen haben (Lucius & Loos-Frank 1997). Die Phagozyten können die Würmer abtöten, indem sie sich an deren mit Antikörpern und/oder Komplement markierten Oberfläche anlagern und toxische Produkte abgeben. Die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffmetabolite wird unter dem Begriff „respiratory burst“ zusammengefaßt. Daneben besitzen die Phagozyten noch eine ganze Reihe Sauerstoff-unabhängiger zytotoxischer Substanzen wie z.B. Proteasen, welche die Oberfläche der Parasiten angreifen können (Janeway & Travers 1995).

Bei Fischen konnte die toxische Wirkung von Phagozyten gegenüber einem Helminthen erstmals von Whyte et al. (1989) nachgewiesen werden. Diese Autoren konnten zeigen, daß Diplostomulae von *Diplostomum spathaceum* bei Makrophagen der Regenbogenforelle einen respiratory burst auslösen können und abgetötet werden. Eine signifikante Mortalität der Larven wurde bereits nach 24 h festgestellt. Bei aktivierten Makrophagen ließ sich die *in vitro* Larvazidität durch die Opsonisierung mit spezifischen Antikörpern steigern. Hamers et al. (1992) konnten *in vitro* beobachten, daß sich Granulozyten von Karpfen auch ohne Opsonisierung an das Tegument von Larven des Acanthocephalen *Paratenuisentis ambiguus* anlagern. Die nach 48 h durch die Granulozyten verursachte Schädigung des Teguments ist mit elektronenmikroskopischen Bildern dokumentiert.

Bei der Inkubation der L₃ von *A. crassus* mit Leukozyten eines experimentell infizierten Aals konnte keine larvazide Wirkung festgestellt werden, gleichgültig ob dem Medium *Anguillicola*-negatives oder positives Serum zugegeben wurde. Dieses *in vitro* erzielte Ergebnis deckt sich damit, daß auch *in vivo* keine Zerstörung der Larven durch Makrophagen oder Granulozyten festzustellen war (Würtz & Taraschewski, im Druck). Die Ursache für diese Resistenz der L₃ besteht wahrscheinlich darin, daß die dicke, collagenhaltige Cuticula der Nematoden widerstandsfähig genug ist, um die Immunabwehr abzuweisen (Wakelin 1994, Smyth 1994). Neben dem physikalischen Schutz ist auch denkbar, daß anti-oxidierende Enzyme eine wichtige Rolle bei der Abwehr toxischer Oxidantien aus den Phagozyten des Wirtes spielen. Wie auch bei anderen parasitischen Helminthen von Säugetieren konnte nämlich Schnieder (1994) bei larvalen und adulten *Dictyocaulus viviparus* Superoxid-Dismutasen nachweisen, welche die Parasiten vor den Sauerstoff-abhängigen Abwehrmechanismen der Phagozyten schützen. Diese Bedeutung könnte auch der Glutathion-S-Transferase zukommen, welche Nielsen & Buchmann (1997) bei adulten *A. crassus* fanden. Ob sich dieses Enzym allerdings auch extrazellulär in der Cuticula der L₃ findet, ist bisher nicht bekannt.

Möglicherweise können sich die Phagozyten aber auch nicht an der Oberfläche der L₃ anlagern, weil diese nicht mit spezifischen Antikörpern opsonisiert ist. Diese Vermutung wird durch die Resultate der immunserologischen Untersuchungen gestützt, bei denen keine gegen die Oberfläche der L₃ gerichteten Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Opsonisierung der L₃ mit Komplement war in diesem Versuch mit der Zugabe von Serum prinzipiell möglich. Es ist aber nicht bekannt, ob das Komplementsystem an der Körperoberfläche der L₃ aktiviert wird. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob und unter welchen Voraussetzungen sich die Phagozyten des Aals an der Oberfläche der L₃ von *A. crassus* anlagern können.

4.3. Intraperitoneale Immunisierung

Im Gegensatz zu der von einer Infektion mit *A. crassus* ausgelösten Immunantwort zeigte die infolge der intraperitonealen Injektion von homogenisierten L₃ bzw. adulten *A. crassus* ausgelöste Antikörperantwort bei den einzelnen Aalen einen sehr einheitlichen zeitlichen Verlauf. Der Grund hierfür ist darin zu sehen, daß mit der intraperitonealen Injektion der homogenisierten Parasiten bei allen Versuchstieren eine einheitliche Antigenstimulation mit einer hohen Antigen dosis realisiert wird. Außerdem werden durch die Homogenisierung wohl Antigene freigesetzt, die bei lebenden Nematoden dem Immunsystem nicht zugänglich sind. Bei einer oralen Infektion mit L₃ von *A. crassus* hingegen ist die Qualität und Quantität der Antigenstimulation vom individuellen Infektionsverlauf abhängig.

Der im Vergleich zu der Immunisierung mit adulten *A. crassus* etwas flacher verlaufende Anstieg der Antikörperproduktion infolge der Injektion von L₃-Homogenat ist möglicherweise mit der geringeren applizierten Antigen dosis zu erklären. Die Reaktivität der Antiseren, die durch die Injektion von homogenisierten L₃ bzw. homogenisierten adulten *A. crassus* erzeugt wurden, war mit dem ELISA bei Verwendung der jeweils homologen bzw. heterologen Rohantigene nicht zu unterscheiden. Hieraus ist zu schließen, daß die somatischen Hauptantigene, welche sicherlich im Homogenat der larvalen und der adulten Nematoden überwiegen, nicht stadienspezifisch sind.

Es ist bekannt, daß die Immunantwort bei Fischen wie bei allen wechselwarmen Wirbeltieren temperaturabhängig ist (z.B. Ellis & Schlotfeld 1985). Infolge der intraperitonealen Immunisierung der Aale mit einem *A. crassus*-Homogenat waren in dieser Arbeit bei einer Wassertemperatur von 20°C nach 5 bis 12 Tagen im peripheren Blut zirkulierende Antikörper nachweisbar. Eine vergleichbare Dauer der induktiven Phase bis zum Auftreten im Blut zirkulierender Antikörper zeigen Karpfen, die bei 20°C gehältert werden (Van Muiswinkel 1995). Diese Temperatur liegt in dem für die Antikörperbildung beim Karpfen optimalen Temperaturbereich von 18-27°C (Amlacher 1986). Bei Regenbogenforellen liegt die optimale Temperatur für die Antikörperbildung bei etwa 17°C (Amlacher 1986). Infolge der intraperitonealen Injektion eines

synthetischen Antigens (Dinitrophenol-Haemocyanin) mit Freund's Adjuvant waren bei Regenbogenforellen, die bei einer Temperatur von 14-15°C gehalten wurden, nach 13 Tagen spezifische Antikörper im Serum nachzuweisen (Dunier 1985). Im Gegensatz hierzu fanden Whyte et al. (1987), die Regenbogenforellen intraperitoneal mit homogenisierten Cercarien und Diplostomulae des Trematoden *Diplostomum spathaceum* zusammen mit Freund's Adjuvant immunisierten, bei einer Wassertemperatur von 14°C die ersten Antikörper im Serum aber erst nach 6 Wochen. Aus der vergleichsweise kurzen induktiven Phase der Antikörperantwort bei den in der vorliegenden Arbeit mit homogenisierten *A. crassus* immunisierten Aalen ist zu schließen, daß die gewählte Hälterungstemperatur von 20°C im Bereich der Optimumtemperatur für die Antikörperbildung des Europäischen Aals liegt.

4.4. Protektive Funktion der Immunantwort

Mit der Reinfektion der experimentell infizierten und anschließend therapierten Aale sollte unter kontrollierten experimentellen Bedingungen überprüft werden, ob mit der nachgewiesenen Immunantwort auch eine schützende Immunität vor einer erneuten Infektion einhergeht. Die Existenz eines immunologischen Gedächtnisses mit einer typischen verstärkten Sekundärantwort ist bei Knochenfischen nachgewiesen (Schäperclaus 1990, Van Muiswinkel 1995), ist aber offenbar nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Säugetieren (Van Muiswinkel 1995). Im Gegensatz zu der humoralen Immunantwort bei Säugetieren findet sich bei Fischen jedoch kein Wechsel des Immunglobulin Isotyps und die Affinitätsreifung der Antikörper nach einer Primärexposition ist vergleichsweise gering (Van Muiswinkel 1995).

Infolge der Therapie mit Levamisol war bei den infizierten Aalen ein Anstieg *Anguillicola*-spezifischer Antikörper festzustellen. Der Grund hierfür ist wohl darin zu sehen, daß mit dem Tod und der Zersetzung der Parasiten im Schwimmblasenlumen eine große Menge immunogener Substanzen freigesetzt wird. Die Immunantwort wurde wahrscheinlich zusätzlich durch die immunstimulierende Wirkung des Levamisols (Roitt 1993) verstärkt. Die infolge der Reinfektion einsetzende Antikörperantwort war dann in ihrer Intensität und in ihrem zeitlichen Verlauf vergleichbar mit der

Antikörperantwort auf eine Erstinfektion. Ein Anstieg des Antikörpergehaltes im peripheren Blut der Aale war frühestens 11 Wochen nach der Reinfektion festzustellen. Somit konnten die für ein immunologisches Gedächtnis charakteristische Sekundärantwort, die sich durch eine im Vergleich zur Primärantwort verstärkte und schnellere Antikörperproduktion auszeichnet (Janeway & Travers 1995, Van Muiswinkel 1995), nicht nachgewiesen werden.

Da die Antikörperantwort der untersuchten Aale infolge der Reinfektion mit *A. crassus* wie auch nach einer Erstinfektion erst mit dem Ende der Larvalentwicklung des Parasiten einsetzte und, wie in Kapitel 3.2.1. diskutiert, wohl gegen die adulten Nematoden gerichtet war, kann eine primäre Bedeutung der nachgewiesenen spezifischen Antikörper bei der immunologischen Infektionabwehr ausgeschlossen werden.

Die abschließende Sektion der Aale ergab keine signifikanten Unterschiede der Wiederfindungsrate oder des Entwicklungszustandes von *A. crassus* in den Schwimmblasen der reinfizierte Gruppe bzw. der erstmals infizierten Kontrollgruppe. Aus diesem Reinfektionsversuch ergibt sich also kein Hinweis auf eine protektive Immunität. Angesichts der erwarteten genetischen Variabilität der Aale und der Tatsache, daß der Immunstatus der Versuchstiere nach der vorangegangenen Infektion und Therapie individuell sehr unterschiedlich war, ist die Anzahl von 8 Aalen pro Gruppe jedoch möglicherweise zu gering, um eine definitive Aussage zu machen. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Reinfektionsversuches konnten auch Haenen et al. (1996) anhand der Wiederfindungsrate applizierter *A. crassus* nach einer einmaligen Infektion bzw. nach zwei Infektionen im Abstand von 56 Tagen keine protektive Immunität des Europäischen Aals gegenüber einer Infektion mit *A. crassus* nachweisen.

Mit der intraperitonealen Injektion homogener *A. crassus* gelang es, eine bei allen Aalen sehr einheitliche und innerhalb von 5 bis 12 Tagen einsetzende Primärantwort auszulösen. Durch die Belastungsinfektion der immunisierten Aale konnte dagegen keine schnell einsetzende Antikörperantwort induziert werden. Unabhängig von der Immunisierung waren im Serum nach etwa 8 Wochen Antikörper nachzuweisen, die

gleichermaßen mit dem Rohantigen von L₃ und von adulten *A. crassus* reagierten. Dieser Verlauf zeigt deutlich, daß sich mit der Belastungsinfektion keine Sekundärantwort induzieren ließ, sondern daß die Antikörperantwort derjenigen nach einer Erstinfektion gleicht. Die 119 Tage nach der Belastungsinfektion ermittelte Wiederfindungsrate und der Entwicklungszustand der Parasiten gaben keinen Hinweis auf eine schützende Immunität.

Bei der intraperitonealen Immunisierung ist zu bedenken, daß diese nicht einer natürlich erworbenen Immunität infolge einer Infektion gleichzusetzen ist. Bei der Suche nach geeigneten Vakzinen zur Impfung von Rindern gegen den Nematoden *Dictyocaulus viviparus* stellte sich nämlich heraus, daß die Produkte des lebenden Parasiten essentiell für eine Immunitätsbildung sind (Schnieder 1994). Daher eignet sich die Reinfektion therapierter Aale besser als die Belastungsinfektion intraperitoneal immunisierter Aale zur Klärung der grundlegenden Frage nach der Existenz einer protektiven Immunität des Aals gegen *A. crassus*.

Über die Vakzinierung von Fischen gegen parasitäre Infektionen im Allgemeinen liegen noch weitaus weniger Informationen vor, als dies bei den Säugetieren der Fall ist. Erfolge bei der Vakzinierung von Fischen gegen Parasiten wurden bisher nur bei dem Flagellaten *Cryptobia salmositica* und dem Ciliaten *Ichthyophirius multifiliis* erzielt (Midtlyng 1997). Als geeignetste Applikationsweise der Vakzine bei Fischen erwies sich die auch in der vorliegenden Arbeit angewendete intraperitoneale Injektion (Schäperclaus 1990).

4.5. Die Bedeutung der Immunantwort für das Wirt-Parasit System

Anguilla anguilla-Anguillicola crassus

Bei der wechselseitigen Wirt-Parasit-Beziehung spielt das Immunsystem des Wirtes eine entscheidende Rolle, da es die Möglichkeiten einer sehr effektiven Infektionsabwehr bietet. Im Gegenzug entwickelten die Parasiten vielfältige Evasionsmechanismen, um der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen (Lucius & Loos-Frank 1997). Die Kenntnis der Immunbiologie einer Infektion ist daher essentiell, um

ein Wirt-Parasit System zu verstehen (Smyth 1994). Nicht selten führt eine gegen Parasiten gerichtete Immunantwort auch zu einer Schädigung des Wirtes, wobei die immunpathologischen Effekte die direkte Schädigung durch den Parasiten übertreffen können (Lucius & Loos-Frank 1997).

Die Abwehr von Nematoden ist bei Säugetieren über die antikörperabhängige Adhäsion von Phagozyten möglich (Lucius & Loos-Frank 1997). Dieser Mechanismus kommt wahrscheinlich auch bei der Regenbogenforelle bei der Abwehr des Trematoden *Diplostomum spathaceum* zum tragen (Whyte et al. 1989). Die exakte Bedeutung der Immunantwort bei der Abwehr von metazoen Parasiten ist bei Fischen allerdings noch nicht geklärt (Woo, 1992, 1995).

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit belegen, daß der Europäische Aal sowohl mit einer spezifischen humoralen als auch einer unspezifischen zellulären Immunantwort auf die Infektion mit *A. crassus* reagiert. Eine protektive Immunität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Aus den Versuchsergebnissen kann gefolgert werden, daß die im Gewebe des Aals lebende Invasionslarve (L₃) Evasionsmechanismen besitzt, mit denen sie erfolgreich die spezifische und unspezifische Immunantwort des Wirtes unterläuft. Gleichwohl ergeben sich aus den Befunden histologischer Untersuchungen von befallenen Schwimmblasen einige offene Fragen. Es ist völlig unklar, warum bei ein und dem selben Wirt manche L₃ eine starke Entzündungsreaktion auslösen und andere nicht (Molnár 1994). In Übereinstimmung damit, daß in der vorliegenden Arbeit eine *in vitro* Larvazidität der Leukozyten des Aals nicht nachweisbar war, konnten auch Molnár (1994) und Würtz & Taraschewski (im Druck) keine Schädigung der Larven im Entzündungsgewebe der Schwimmblasenwand feststellen. Andererseits sind in der Darm- und Schwimmblasenwand natürlich infizierter Aale eingekapselte tote L₃ zu finden (Molnár et al. 1993, Molnár 1994). Fraglich bleibt, ob der Aal in der Lage ist, eine migrierende L₃ einzukapseln oder ob dies erst bei geschwächten bzw. toten Larven möglich ist. Sharp et al. (1992) vermuten, daß Plerocercoiden von *Diphyllbothrium dendriticum* in

der Regenbogenforelle erst dann eingekapselt werden können, wenn ihre Mobilität nach der Migrationsphase abnimmt.

Die im Schwimmblasenlumen lebenden adulten Parasiten sind, abgesehen von der Nahrungsaufnahme, vor dem direkten Angriff der Immunabwehr geschützt und können es sich offenbar leisten, mit Antigenen, die sie ins Schwimmblasenlumen exkretieren bzw. sekretieren, eine starke Antikörperantwort auszulösen. Von parasitischen Nematoden bei Säugetieren weiß man, daß die exkretorischen und sekretorischen Substanzen auch der Stimulus für die pathologische Wirkung einer Infektion sein können (Parkhouse et al. 1987). Dies könnte auch für von der Cuticula adulter *A. crassus* sekretierte Antigene zutreffen, da experimentell nachgewiesen werden konnte, daß sowohl die funktionelle Beeinträchtigung der Schwimmblase in Form einer gestörten Gassekretion (Würtz et al. 1996) als auch massive pathologische Veränderungen der Schwimmblasenwand (Würtz & Taraschewski, im Druck) von den adulten Parasiten, nicht aber von den L₃ hervorgerufen werden.

Die von den adulten *A. crassus* verursachte Fibrosierung des Schwimmblasengewebes (Würtz & Taraschewski, im Druck) könnte dazu führen, daß die Mobilität der im Gewebe migrierenden L₃ vermindert und somit die Möglichkeit einer Einkapselung erhöht wird. Ein solcher physikalischer Mechanismus der Resistenzbildung wäre vergleichbar mit der erworbenen Resistenz von Ratten gegenüber einer Infektion mit *Trichinella spiralis*. Dort wird die Resistenzbildung nicht infolge einer Schädigung der Parasiten durch immunologische Effektormechanismen, sondern durch die Veränderung des Darmepithels erreicht. Die zum Abgang gezwungenen Parasitenlarven erwiesen sich nach der Ausscheidung durch den Wirt als weiterhin infektionstüchtig (Castro 1991).

In der Aquakultur gewonnene Erfahrungen zeigen, daß *A. crassus* beim Europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) und beim Amerikanischen Aal (*Anguilla rostrata*) deutlich pathogener wirkt als beim Japanischen Aal (*Anguilla japonica*), bei dem es sich um den ursprünglichen Endwirt handelt (Egusa 1979, Ooi et al. 1996). Diese Beobachtung entspricht der akzeptierten Auffassung, daß bei phylogenetisch alten Parasit-Wirt-

Beziehungen in der Regel nur eine geringe Schadwirkung zu beobachten ist, weil es für den Parasiten von Vorteil ist, seinen Wirt möglichst wenig zu beeinträchtigen (Lucius & Loos-Frank 1997). Gemäß Egusa (1979) erreicht *A. crassus* beim Europäischen Aal auch eine deutlich höhere Befallsrate und Befallsintensität als beim Japanischen Aal. Die Ursachen für die artspezifischen Unterschiede in der Empfindlichkeit der 3 Aalarten gegenüber *A. crassus* sind wahrscheinlich in der Immunantwort des Wirtes zu sehen, da die Art und die Balance der komplexen immunologischen Wechselwirkungen nicht nur entscheidend für den Aufbau einer protektiven Immunität, sondern auch für das Ausmaß pathologischer Schäden ist (Parkhouse et al. 1987).

Erste Untersuchungen zur Immunantwort des Japanischen Aals gegen *A. crassus* führte Nielsen (1997) durch. Er konnte zeigen, daß die Immunisierung mit Rohantigenen adulter *A. crassus* beim Japanischen Aal zu einer signifikant stärkeren Antikörperantwort führt, als beim Europäischen Aal. Ob hiermit allerdings auch eine effektivere Abwehr des Parasiten bei einer Infektion einhergeht, wurde nicht untersucht. Weitergehende, vergleichende Studien zur Immunbiologie von *A. crassus* sollten unbedingt mit dem Japanischen Aal als dem ursprünglichen Endwirt des Parasiten durchgeführt werden, da es sich dabei um ein adaptiertes Wirt-Parasit System handelt. Die grundlegenden Arbeiten von Haenen et al. (1994b), Buchmann et al. (1991) und Höglund & Pilström (1994, 1995) sowie die vorliegende Arbeit sind eine gute Basis, auf der weitere experimentelle Untersuchungen mit einem standardisierten Verfahren zur Gewinnung der L₃, mit aussagekräftigen immunologischen Testverfahren und mit einem praktikablen Versuchsplan durchgeführt werden können.

Ein interessantes Modell zur vergleichenden Untersuchung der Infektiosität und dem Kolonisierungspotential von Parasiten ist möglicherweise dadurch gegeben, daß mindestens 3 Aalarten, nämlich *A. anguilla*, *A. japonica* und *A. rostrata* als Wirt für *A. crassus* dienen können (Nagasawa et al. 1994, Johnson et al. 1995). Zusätzlich läßt sich der Europäische Aal experimentell mit mindestens 3 verschiedenen *Anguillicola*-Arten infizieren: *A. crassus*, *A. novaezealandiae* (Moravec et al. 1994 a) und *A. papernai* (Knopf & Taraschewski, unpubl.). Ansatz für eine vergleichende immunologische Studie unter dem Gesichtspunkt des Kolonisierungspotentials neozoeer Parasiten könnte

beispielsweise die eingangs genannte Beobachtung sein, daß sich im Gegensatz zu *A. crassus* der zweite nach Europa eingeschleppte Schwimmblasen-Nematode des Europäischen Aals, *A. novaezelandiae*, als nicht kolonisierende Spezies erwiesen hat.

Von großem Interesse ist schließlich auch die Frage, welche Rolle dem Immunsystem des Aals bei der Regulation des *Anguillicola* Wirt-Parasit-Systems beim ursprünglichen Endwirt, dem Japanischen Aal, zukommt. Betrachtet man den Entwicklungszyklus von *A. crassus*, der zusätzlich zum obligaten Zwischenwirt auch noch paratenische Wirte umfassen kann, wird klar, daß neben der Immunantwort des Endwirtes noch viele weitere Faktoren das Wirt-Parasit-System regulieren können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zu Beginn der 80er Jahre wurde der Schwimmblasen-Nematode *Anguillicola crassus* von Ostasien nach Europa eingeschleppt und konnte sich erfolgreich als Parasit des Europäischen Aals (*Anguilla anguilla*) etablieren. Es zeigte sich, daß *A. crassus* beim Europäischen Aal eine deutlich höhere Prävalenz und Befallsintensität erreichte, als dies vom ursprünglichen Endwirt, dem Japanischen Aal (*Anguilla japonica*), bekannt war. Ferner erwies sich *A. crassus* beim Europäischen Aal im Gegensatz zum Japanischen Aal als sehr pathogen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der sichere Nachweis *Anguillicola*-spezifischer Antikörper bei freilebenden Aalen mit immunserologischen Tests und der Verwendung von Rohantigenen nicht möglich ist. Als eine Ursache für die geringe Spezifität des Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) konnten mit Antigenen eines anderen Nematoden (*Raphidascaris acus*) kreuzreagierende Antikörper identifiziert werden. Gleichwohl stellte sich bei der Untersuchung von Wildaalseren mit der Immunoblot-Technik heraus, daß möglicherweise für adulte *A. crassus* spezifische Antigene mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa in der äußeren, gelatinösen Schicht der Cuticula lokalisiert sind. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um lipophile Glycoproteine. Wenn auch immunserologische Testverfahren in ihrer gegenwärtigen Form nicht für diagnostische Fragestellungen einsetzbar sind, so stellen sie doch ein unverzichtbares Werkzeug dar, um die Immunantwort des Aals auf eine experimentelle Infektion mit *A. crassus* unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden Europäische Aale entweder einmalig oder auch wiederholt über einen Zeitraum von 140 Tagen unter kontrollierten Bedingungen mit L3 Larven von *A. crassus* infiziert. Nachfolgend konnte dann erstmals die Immunantwort des Aals auf eine *A. crassus* - Infektion im Labor unter kontrollierten Bedingungen in ihrem zeitlichen und qualitativen Verlauf beschrieben werden. Die Intensität der Antikörperantwort wie auch der Zeitpunkt des ersten Auftretens von spezifischen Antikörpern im Serum der Versuchstiere erwies sich bei den untersuchten

Aalen als vom Infektionsmodus und der Anzahl der applizierten *A. crassus* unabhängig, doch zeigten die Aale individuell große Unterschiede im Verlauf der Antikörperantwort. Mittels eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) konnten *Anguillicola*-spezifische Antikörper im Blut Europäischer Aale frühestens 8 Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden. In ihrem zeitlichen Verlauf war die Reaktion mit einem somatischen Rohantigen dritter Larvenstadien (L₃) nicht von der gegen ein Rohantigen vom Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus* zu unterscheiden. Mit der Immunoblot-Technik konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper der experimentell infizierten Aale überwiegend mit Antigenen des Hautmuskelschlauches, insbesondere der äußeren Cuticula adulter *A. crassus* reagieren. Eine spezifisch gegen die Invasionslarve gerichtete Antikörperantwort war nicht nachzuweisen. Aus diesen Untersuchungsergebnissen wird gefolgert, daß nicht die infektiösen L₃, sondern erst die adulten Parasiten die spezifische Immunantwort des Aals stimulieren.

Im Gegensatz zur oralen Infektion konnten infolge einer intraperitonealen Injektion homogenisierter *A. crassus* schon innerhalb von 5 bis 12 Tagen spezifische Antikörper im Serum der Aale nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich beim indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT) mit positiven Wildaalsereen keine Antikörper-Antigen Reaktion an der Oberfläche intakter L₃. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, daß lebende L₃ über einen wirksamen Evasionsmechanismus verfügen, um der spezifischen Immunabwehr des Aals zu entgehen.

Die Migrationsaktivität der Granulozyten und Monozyten experimentell infizierter Aale in Gegenwart der L₃ von *A. crassus* wurde mit der Mikroporenfiltertechnik nach Boyden untersucht. Es zeigte sich, daß von der L₃ exkretierte und/oder sekretierte Substanzen die Migrationsaktivität der Phagozyten erhöhen. Gleichwohl war *in vitro* kein larvazider Effekt der Abwehrzellen auf die Parasiten nachzuweisen.

Um zu überprüfen, ob mit der nachgewiesenen Immunantwort des Aals auch ein Immunschutz vor einer erneuten Infektion mit *A. crassus* verbunden ist, wurden experimentell infizierte Aale therapiert und anschließend erneut infiziert. In einem zweiten Versuch erfolgte eine Belastungsinfektion intraperitoneal immunisierter Aale,

wobei sowohl homogenisierte L₃ als auch adulte *A. crassus* als Antigenquelle eingesetzt wurden. Bei keinem der beiden Versuche war eine für ein immunologisches Gedächtnis typische sekundäre Antikörperantwort nachzuweisen, und aus den abschließenden Sektionsbefunden ergaben sich keine Hinweise auf eine protektive Immunität bei den untersuchten Aalen.

Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit unter kontrollierten Laborbedingungen über viele Monate hinweg die Immunantwort des Aals auf eine experimentelle Infektion mit *A. crassus* untersucht werden. Die Anwendung und Validierung immunologischer Arbeitstechniken im Rahmen dieser experimentellen Untersuchungen sowie die eigentlichen Ergebnisse zur Immunantwort bieten die Voraussetzung für weitergehende, vergleichende immunologische Arbeiten über die Wirt-Parasit-Beziehungen zwischen den verschiedenen Arten der Gattung *Anguilla* und den Schwimmblasen-Nematoden der Gattung *Anguillicola*.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abel, U. (1993): Die Bewertung diagnostischer Tests. Hippokrates Verlag, Stuttgart
- Agius, C. (1985): The melano-macrophage centres of fish: a review. In: Manning, M.J., Tatner, M.F. (Eds.): Fish Immunology. Academic Press, London, S. 85-106
- Amlacher, E. (1986): Taschenbuch der Fischkrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Ashworth, S.T. (1994): Possible regulation in the *Anguillicola crassus* host-parasite system. In: Pike, A.W., Lewis, J.T. (Eds.): Parasitic diseases. Samara Publishing Ltd, Tresaith, S. 141-150
- Békési, L., Hornok, S., Székely, Cs. (1997): Attempts to analyse *Anguillicola crassus* infection and the humoral host response in eels (*Anguilla anguilla*) of Lake Balaton, Hungary. Acta Vet. Hung. 45: 439-445
- Belpaire, C., De Charleroy, D., Thomas, K., Van Damme, P., Ollevier, F. (1989): Effects of eel restocking on the distribution of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in Flanders, Belgium. J. Appl. Ichthyol. 5: 151-153
- Blanc, G., Bonneau, S., Biagianti, S., Petter, A.J. (1992): Description of the larval stages of *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) using light and scanning electron microscopy. Aquat. Living. Resour. 5: 307-318
- Blüm, V., Casado, J., Lehmann, J., Mehring, E. (1988): Farbatlas der Histologie der Regenbogenforelle. Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen (Hrsg.). Springer Verlag, Berlin
- Böse, R., Schelp, Ch., Friedhoff, K.T. (1994): Babesiosen. In: Röllinghoff, M., Rommel, M. (Hrsg.): Immunologische und molekulare Parasitologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 127-144
- Boëtius, J., Boëtius, I. (1980): Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. Dana 1: 1-28

-
- Bonneau, S., Blanc, G., Petter, A.J. (1991): Étude sur biologie des premiers stades larvaires d'*Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea): spécificité de l'hôte intermédiaire et influence de la température sur la durée du développement. Bull. Fr. Pêche Piscic. 320: 1-6
- Boon, J.H., Augustijn, H., Cannaerts, V.M., Lokin, C.J., Machiels, M.A., Ollevier, F. (1990): The suitability of experimental inoculations with infective larvae of *Anguillicola crassus* and their effects on the growth and mortality of the European eel (*Anguilla anguilla*). Aquaculture 87:111-120
- Boyden, S. (1962): The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med. 115: 453-466
- Buchmann, K., Mellergaard, S., Kjøie, M. (1987): *Pseudodactylogyru*s infections in eel: a review. Dis. Aquat. Org. 3: 51-57
- Buchmann, K., Pedersen, L.Ø., Glamann, J. (1991): Humoral immune response of European eel *Anguilla anguilla* to a major antigen in *Anguillicola crassus* (Nematoda). Dis. Aquat. Org. 12: 55-57
- Buchmann, K., Pedersen, L.Ø., Glamann, J. (1992): Affinity purification of antigen-specific serum immunoglobulin from the European eel (*Anguilla anguilla*). Scand. J. Immunol. 20: 1047-1054
- Carbrera, Z., Parkhouse, R.M.E. (1987): Isolation of an antigenic fraction for diagnosis of Ochocerciasis. Parasite Immunology 9: 39-48
- Castro, G.A. (1991): A physiological perspective: physiological adaptations in host-parasite systems. In: Toft, C.A., Aeschlimann, A., Bolis, L. (Hrsg.): Parasite-host associations: coexistence or conflict? Oxford University Press, New York, S. 356-374
- Chitwood, B.G., Chitwood, M.B. (1977): Nematology. 2. Aufl., University Park Press, Baltimore

- Clark, T.G., Dickerson, H.W. (1997): Antibody-mediated effects on parasite behavior: Evidence of a novel mechanism of immunity against a parasitic protist. *Parasitol. Today* 13: 477-480
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J. (1991): Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 14: 651-659
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J. (1993): Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 17: 373-376
- De Charleroy, D., Grisez, L., Thomas, K., Belpaire, C., Ollevier, F. (1990): The life cycle of *Anguillicola crassus*. *Dis. Aquat. Org.* 8: 77-84
- De Leeuw, W.A., Cornelissen, J.B.W.J. (1991): Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*. *Vet. Parasitol.* 39: 137-147
- Dick, T.A., Choudhury, A. (1995): Phylum Nematoda. In: Woo, P.T.K. (Hrsg.): *Fish diseases and disorders. Vol. 1 Protozoan and metazoan Infections.* CAB International, Wallingford, S. 415-446
- Dunier, M. (1985): Absence of anamnestic antibody response to DNP-Haemocyanin and DNP-Ficoll in rainbow trout. In: Manning, M.J., Tatner, M.F. (Eds.): *Fish immunology.* Academic Press, London, S. 171-184
- Egusa, S. (1979): Notes on the culture of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Japanese eel-farming ponds. In: Thorow, F. (Ed.), *Eel Research and Managment. Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 174: 51-58
- Ellis, A.E. (1977): The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* 11: 453-491
- Ellis, A.E., Roberts, R.J., Tytler, P. (1985): Die Anatomie und Physiologie der Knochenfische. In: Roberts, R.J., Schlotfeld, H.J. (Hrsg.): *Grundlagen der Fischpathologie.* Verlag Paul Parey, Berlin, S. 23-63

-
- Ellis, A.E., Schlotfeld, H.-J. (1985): Immunologie der Knochenfische. In: Roberts, R.J., Schlotfeld, H.J. (Hrsg.): Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, Berlin, S. 98-111
- Evans, D.L., Gratzek, J.B. (1989): Immune defense mechanisms in fish to protozoan and helminth infections. *Amer. Zool.* 29: 409-418
- Fricke, H., Kaese, R. (1995): Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso Sea and the problem of the eel's spawning site. *Naturwissenschaften* 82: 32-36
- Fries, L.T., Williams, D.J. (1996): Occurrence of *Anguillicola crassus*, an exotic parasitic swim bladder nematode of eels, in the southeastern United States. *Trans Am Fish Soc* 125: 794-797
- Haenen, O.L.M., Grisez, L., De Charleroy, D., Belpaire, C., Ollevier, F. (1989): Experimentally induced infections of European eel *Anguilla anguilla* with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and subsequent migration of larvae. *Dis. Aquat. Org.* 7: 97-101
- Haenen, O.L.M., Van Banning, P. (1990): Detection of larvae of *Anguillicola crassus* (an eel swimbladder nematode) in freshwater fish species. *Aquaculture* 87: 103-109
- Haenen, O.L.M., Van Banning, P., Dekker, W. (1994a): Infection of eel *Anguilla anguilla* (L.) and smelt *Osmerus eperlanus* (L.) with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) in the Netherlands from 1986-1992. *Aquaculture* 126: 129-229
- Haenen, O.L.M., Van Wijngaarden, T.A.M., Borgsteede, F.H.M. (1994b): An improved method for the production of infective third-stage juveniles of *Anguillicola crassus*. *Aquaculture* 123: 163-165

- Haenen, O.L.M., Van Wijngaarden, T.A.M., Van der Heijden, M.H.T., Höglund, J., Cornelissen, J.B.J.W., Van Lengoed, L.A.M.G., Borgsteede, F.H.M., Van Muiswinkel, W.B. (1996): Effects of experimental infections with different doses of *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) on European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 141: 41-57
- Hänsch, G.M. (1986): Einführung in die Immunbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Hamers, R., Lehmann, J., Stürenberg, F.-J., Taraschewski, H. (1992): *In vitro* study of the migratory and adherent responses of fish leucocytes to the eel-pathogenic acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* (van Claeve, 1921) Bullock et Sqamuel, 1975 (Eoacanthocephala: Tenuisentidae). *Fish Shellfish Immunol.* 2: 43-51
- Hartmann, F. (1989): Investigations on the effectiveness of Levamisol as a medication against the eel parasite *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Dis. Aquat. Org.* 7: 185-190
- Hartmann, F. (1994): Untersuchungen zur Biologie, Epidemiologie und Schadwirkung von *Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi und Itagaki 1994 (Nematoda), einem blutsaugenden Parasiten in der Schwimmblase des Europäischen Aals (*Anguilla anguilla*). Dissertation, Shaker Verlag, Aachen
- Heinsbroek, L.T.N. (1991): A review of eel culture in Japan and Europe. *Aquaculture and Fisheries Management* 22: 57-72
- Höglund, J., Andersson, J., Wickström, H., Reizenstein, M. (1992): The distribution of *Anguillicola* in Sweden and its association with thermal discharge areas. *Irish Fish Invest* 36: 143-150
- Höglund, J., Pilström, L. (1994): Purification of adult *Anguillicola crassus* whole-worm extract antigens for detection of specific antibodies in serum from the European eel (*Anguilla anguilla*) by ELISA. *Fish Shellfish Immunol.* 4: 311-319
- Höglund, J., Pilström, L. (1995): Mechanical isolation and characterization of antigens from adult *Anguillicola crassus*. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 51-60

- Höglund, J., Thomas, K. (1992): The black goby *Gobius niger* as a potential paratenic host for the parasitic nematode *Anguillicola crassus* in a thermal effluent of the Baltic. *Dis. Aquat. Org.* 13: 175-180
- Hofer, R., Lackner, R. (1995): *Fischtoxikologie - Theorie und Praxis*. Fischer Verlag, Jena
- Hoffmann, R., Lommel, R. (1984): Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. *J. Fish Biol.* 24: 245-251
- Holzhauer, M. (1988): *Biochemische Labormethoden*. Springer, Berlin
- Hung, H.-W., Lo, C.-F., Tseng, C.-C., Kou, G.-H. (1996): Humoral immune response of Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, to *Pleistophora anguillarum* Hoshina, 1951 (Microspora), *J. Fish Dis.* 19: 243-250
- Ingram, G.A. (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection-A review. *J. Fish Biol.* 16: 23-60
- Janeway, C.A., Travers, P. (1995): *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Janitschke, K., Kimmig, P., Seitz, H.M., Frosch, M., Groß, U., Hlobil, H., Reiter-Owona, I. (1998): *MiQ: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. 4. Parasitosen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Johnson, S.K., Fries, L.T., Williams, J., Huffman, D.G. (1995): Presence of the parasitic swim bladder nematode, *Anguillicola crassus*, in Texas aquaculture. *World Aquaculture* 26: 35-36
- Kennedy, C.R. (1993): Introductions, spread and colonization of new localities by fish helminth and crustacean parasites in the British Isles: a perspective and appraisal. *J. Fish Biol.* 43: 287-301

- Kennedy, C., Fitch, D.J. (1990): Colonization, larval survival and epidemiology of the nematode *Anguillicola crassus*, parasitic in the eel, *Anguilla anguilla*, in Britain. J Fish Biol 36: 117-131
- Kimmig, P., Naser, K., Frank, W. (1991): Seroepidemiologische Untersuchungen zur Toxokariasis des Menschen. Zbl. Hyg. 191: 406-422
- Klinger, H. (1983): Grundlagen und Anwendung hämatologischer und morphologischer Methoden zur Diagnose von Stress in der Fischhaltung unter besonderer Berücksichtigung des Aals (*Anguilla anguilla* L.). Dissertation, Universität Hamburg
- Knopf, K., Würtz, J., Sures, B., Taraschewski, H. (1998) Impact of low water temperature on the development of *Anguillicola crassus* in the final host *Anguilla anguilla*. Dis Aquat Org 33: 143-149
- Køie, M. (1991): Swimbladder nematodes (*Anguillicola* spp.) and gill monogeneans (*Pseudodactylogyrus* spp.) parasitic on the European eel (*Anguilla anguilla*). J. Cons. int. Explor. Mer. 47: 391-398
- Koops, H., Hartmann, F. (1989): *Anguillicola*-infestations in Germany and in German eel imports. J. Appl. Ichthyol. 1: 41-45
- Kuwahara, A., Niimi, A., Itagaki, H. (1974): Studies on a nematode parasitic in the air bladder of the eel. I. Description of *Anguillicola crassa* n. sp. (Philometridae, Anguillicolidae). Jap. J. Parasitol. 23:275-279
- Lamas, J., Ellis, A.E. (1994): Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 4: 201-219
- Lee, D.L., Atkinson, H.J. (1976): Physiology of nematodes. 2. Aufl., The Macmillan Press LTD, London
- Lightowlers, M.W., Rickard, M.D. (1988): Excretory-secretory products of helminth parasites: effect on host immune response. Parasitology 96: 123-166

- Lin, T.L., Clark, T.G., Dickerson, H. (1996): Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 64: 4085-4090
- Lowry, O.L., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lucius, R., Loos-Frank, B. (1997): *Parasitologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Maamouri, F., Gargouri, L., Ould Daddah, M., Bouix, G. (1999): Occurrence of *Anguillicola crassus* (Nematode, Anguillicolidae) in the Ichkeul Lake (Northern Tunisia). *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 19: 17-19
- Maizels, R.M., Philipp, M., Ogilvie, B.M. (1982): Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* 61: 109-137
- Mehlhorn, H., Piekarski, G. (1995): *Grundriß der parasitenkunde*. 4. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Midtlyng, P.J. (1997): Novel vaccines & new vaccination strategies for fish. *Bull. Eur. Fish Pathol.* 17: 239-244
- Molnár, K. (1993): Effect of decreased oxygen content on eels (*Anguilla anguilla*) infected by *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea). *Acta Vet. Hung.* 41: 349-360
- Molnár, K. (1994): Formation of parasitic nodules in the swimbladder and intestinal walls of the eel *Anguilla anguilla* due to infections with larval stages of *Anguillicola crassus*. *Dis Aquat Org* 20: 163-170
- Molnár, K., Baska, F., Csaba, Gy., Glávits, R., Székely, Cs. (1993): Pathological and histopathological studies of the swimbladder of eels *Anguilla anguilla* infected by *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea). *Dis Aquat Org* 15: 41-50

-
- Molnár, K., Szakolczai, J., Vetési, F. (1995): Histological changes in the swimbladder wall of eels due to abnormal location of adult and second stage larvae of *Anguillicola crassus*. Acta Vet. Hung. 43: 125-137
- Molnár, K., Székely, Cs., Baska, F. (1991): Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11: 211-212
- Moravec, F. (1992): Spreading of the nematode *Anguillicola crassus* (Dracunculoidea) among eel populations in Europe. Folia Parasitol 39: 247-248
- Moravec, F. (1996): Aquatic invertebrates (snails) as new paratenic hosts of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) and the role of paratenic hosts in the life cycle of this parasite. Dis. Aquat. Org. 27: 237-237
- Moravec, F., Di Cave, D., Orecchia, P., Paggi, L. (1993): Studies on the development of *Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi et Itagaki, 1974 (Nematoda, Dracunculoidea) in the intermediate host. Folia Parasitol. 35: 25-146
- Moravec, F., Di Cave, D., Orecchia, P., Paggi, L. (1994, a): Present occurrence of *Anguillicola novaezealandiae* (Nematoda: Dracunculoidea) in Europe and its development in the intermediate host. Folia Parasitol. 41: 203-208
- Moravec, F., Di Cave, D., Orecchia, P., Paggi, L. (1994, b): Experimental observations on the development of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) in its definitive host, *Anguilla anguilla* (Pisces). Folia Parasitol. 41: 138-148
- Moravec, F., Konecny, R. (1994): Some new data on the intermediate and paratenic hosts of the nematode *Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi et Itagaki, 1974 (Dracunculoidea), a swimbladder parasite of eels. Folia Parasitol. 41: 65-70
- Moravec, F., Taraschewski, H. (1988): Revision of the genus *Anguillicola* Yamaguti, 1935 (Nematoda: Anguillicolidae) of the swimbladder of eels, including descriptions of two new species, *A. novaezealandiae* sp. n. and *A. papernai* sp. n. Folia Parasitol 35: 125-146

- Nagasawa, K., Kim, Y.G., Hirose, H. (1994): *Anguillicola crassus* and *Anguillicola globiceps* (Nematoda: Dracunculoidea) parasitic in the swimbladder of eels (*Anguilla japonica* and *A. anguilla*) in East Asia. *Folia Parasitol* 41: 127-137
- Neumann, W. (1985): Schwimmblasenparasit *Anguillicola* bei Aalen. *Fischer und Teichwirt* 11: 322
- Nielsen, M.E. (1997): Enhanced humoral immune response against *Anguillicola crassus* in Japanese eel: A comparative study of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and the European eel, *Anguilla anguilla*. In: Nielsen, M.E.: *Anguillicola crassus* en parasitisk nematod hos ål. Dissertation, Copenhagen, S. 71-83
- Nielsen, M.E., Buchmann, K. (1997): Glutathione-S-transferase is an important antigen in the eel nematode *Anguillicola crassus*. *J. Helminthol.* 71: 319-324
- Ooi, H.-K., Wang, W.-S., Chang, H.-Y., Wu, C.-H., Lin, C.-C., Hsieh, M.-T. (1996): An epizootic of Anguillicolosis in cultured American eels in Taiwan. *J. Aquatic Animal Health* 8: 163-166
- Parkhouse, R.M.E., Almond, M.M., Carbrera, Z., Harnett, W. (1987): Nematode antigens in protection, diagnosis and pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17: 313-324
- Pazooki, J., Székely, Cs. (1994): Survey of the paratenic hosts of *Anguillicola crassus* in Lake Velence, Hungary. *Acta Vet. Hung.* 42: 87-97
- Petter, A.J., Cassone, J., Le Belle, N. (1990): Observations sur la biologie des premiers stades larvaires d'*Anguillicola crassus*, nématode parasite d'anguille. *Ann Parasitol Hum Comp* 65: 28-31
- Petter, A.J., Fontaine, Y.A., Le Belle, N. (1989): Étude du développement larvaire de *Anguillicola crassus* (Dracunculoidea, Nematoda) chez un cyclopidae de la région parisienne. *Ann Parasitol Hum Comp* 64: 347-355
- Philipp, M., Parkhouse, R.M.E., Ogilvie, B.M. (1980): Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature* 287: 538-540

-
- Polzer, M., Taraschewski, H. (1993): Identification and characterization of the proteolytic enzymes in the developmental stages of the eel-pathogenic nematode *Anguillicola crassus*. Parasitol. Res. 79: 24-27
- Reimer, L.W., Hildebrand, A., Scharberth, D., Walter, U. (1994): *Anguillicola crassus* in the Baltic Sea: fiels data supporting transmission in brackish waters. Dis. Aquat. Org. 18: 77-79
- Roberts, R.J. (1985): Pathophysiologie und systematische Pathologie der Knochenfische. In: Roberts, R.J., Schlotfeld, H.-J. (Hrsg.): Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, S. 64-97
- Roberts, R.J., Schlotfeld, H.-J. (1985): Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, Hamburg
- Roitt, I.M. (1993): Leitfaden der Immunbiologie. 4. Aufl., Blackwell Wissenschaft, Berlin
- Rowley, A.F., Hunt, T.C., Page, M., Mainwaring, G. (1988): Fish. In: Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A. (Hrsg.): Vertebrate blood cells. Cambridge University Press, Cambridge, S. 19-127
- Ruppel, A. (1994): Schisosomen. In: Röllinghoff, M., Rommel, M. (Eds.): Immunologische und molekulare Parasitologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 145-165
- Sachs, L. (1992): Angewandte Statistik. 7. Aufl., Springer Verlag, Berlin
- Schäperclaus, W. (1990): Fischkrankheiten. 5. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin
- Schmidt, J. (1925): The breeding places of the eel. A. Rep. Smithonian Inst. 1924, 279-316
- Schnieder, T. (1994): Dictyocaulose. In: Röllinghoff, M., Rommel, M. (Eds.): Immunologische und molekulare Parasitologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. S. 207-213

- Sharp, G.J.E., Pike, A.W., Secombes, C.J. (1991a): Leucocyte migration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* [Walbaum]): Optimization of migration conditions and responses to host and pathogen (*Diphyllbothrium dendriticum* [Nitzsch]) derived chemoattractants. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 295-305
- Sharp, G.J.E., Pike, A.W., Secombes, C.J. (1992): Sequential development of the immune response in rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)] to experimental plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). *Parasitology* 104: 169-178
- Sharp, P.J., Smith, D.R.J., Bach, W., Wagland, B.M., Cobon, G.S. (1991b): Purified glutathione S-transferases from parasites as candidate protective antigens. *Int. J. Parasitol.* 21: 839-846
- Smyth, J.D. (1994): Introduction to animal parasitology. 3. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge
- Soboslay, P.T., Schulz-Key, H., Lucius, R. (1994): Filariose. In: Röllinghoff, M., Rommel, M. (Hrsg.): Immunologische und molekulare Parasitologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S.215-237
- Sprengel, G., Lüchtenberg, H. (1991): Infection by endoparasites reduces maximum swimming speed of European smelt *Osmerus eperlanus* and European eel *Anguilla anguilla*. *Dis. Aquat. Org.* 11: 31-35
- Stemmer, B. (1988): Untersuchungen der Larvalentwicklung von *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) in verschiedenen Zwischenwirten. Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum.
- Sundquist, B., Bech-Nielsen, S., Zakrisson, G., (1989): Characterisation and purification of *Parafilaria bovicola* antigens by chromatofocusing to enhance specificity in serodiagnosis. *Vet. Parasitol.* 33: 309-318
- Sundquist, B., Zakrisson, G., Bech-Nielsen, S., Bianco, A.E. (1988): Preparation and evaluation of the specificity of *Parafilaria bovicola* antigen for detection of specific antibodies by ELISA. *Vet. Parasitol.* 28: 223-235

-
- Sures, B., Knopf, K., Würtz, J., Hirt, J. (im Druck): Richness and diversity of parasite communities in European eels (*Anguilla anguilla*) of the river Rhine, Germany with special respect to helminth parasites. Parasitol. Today
- Székely, Cs. (1994): Paratenic hosts for the parasitic nematode *Anguillicola crassus* in Lake Balaton, Hungary. Dis. Aquat. Org. 18: 11-20
- Székely, Cs. (1996): Experimental studies on the infectivity of *Anguillicola crassus* third-stage larvae (Nematoda) from paratenic hosts. Folia Parasitol. 43:305-311
- Taraschewski, H., Moravec, F., Lamah, T., Anders, K. (1987): Distribution and morphology of two helminths recently introduced into European eel populations: *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala, Tenuisentidae). Dis Aquat Org 3: 167-176
- Taraschewski, H., Renner, C., Mehlhorn, H. (1988): Treatment of fish parasites. 3. Effect of levamisole HCl, metrifonate, fenbendazole, mebendazole and ivermectin on *Anguillicola crassus* (nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. Parasitol. Res. 74: 281-289
- Tesch, F.W. (1983): Der Aal, Biologie und Fischerei. 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Hamburg
- Thomas, K., Ollevier, F. (1992): Paratenic hosts of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus*. Dis. Aquat. Org. 13: 165-174
- Thomas, K., Ollevier, F. (1994): Hatching, survival, activity and penetration efficiency of second-stage larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). Parasitology 107: 211-217
- Tsukamoto, K. (1992): Discovery of the spawning area for Japanese eel. Nature 356: 789-791

- Van Banning, P., Haenen, O.L.M. (1990): Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), Pathology in marine science, Academic Press, inc., New York. Proceedings of the 3rd International Colloquium on Pathology in marine aquaculture, Gloucester Point, Virginia, Oct 2-6, 1988. S. 317-330
- Van der Heijden, M.H.T., Rooijackers, J.B.M.A., Booms, G.H.R., Rombout, J.H.W.M., Boon, J.H. (1995): Production, characterization and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L.,1758) immunoglobulin. Vet. Immunol. Immunopathol. 45: 151-164
- Van der Heijden, M.H.T., Helders, G.M., Booms, G.H.R., Huisman, E.A., Rombout, J.H.W.M., Boon, J.H. (1996): Influence of flumequine and oxytetracycline on the resistance of European eel against the parasitic swimbladder nematode *Anguillicola crassus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 52: 127-134
- Van Muiswinkel, W.B. (1995): The piscine immune system: Innate and aquired Immunity. In: Woo, P.T.K. (Hrsg.): Fish diseases and disorders. Vol. 1 Protozoan and metazoan Infections. CAB International, Wallingford, S. 729-750
- Voller, A., De Savigny, D. (1981): Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. J. Immunol. Meth. 46: 1-29
- Wakelin, D. (1994): Immunoparasitology. In: Smyth, J.D.: Introduction to animal parasitology, 3. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge. S. 460-490
- Wakelin, D. (1996): Immunoparasitology. In: Smyth, J.D.: Introduction to animal parasitology. 3. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge, S. 460-490
- Westermeier, R. (1990): Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Whyte, S.K., Allan, J.C., Secombes, C.J., Chappell, L.H. (1987): Cercariae and diplostomules of *Diplostomum spathaceum* (Digenea) elicit an immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 31: 185-190

- Whyte, S.K., Chappell, L.H., Secombes, C.J. (1989): Cytotoxic reactions of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, macrophages for larvae of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* (Digenea). J. Fish Biol. 35: 333-345
- Whyte, S.K., Chappell, L.H., Secombes, C.J. (1990): Protection of rainbow Trout, *Onchorhynchus mykiss* (Richardson) against *Diplostomum spathaceum* (Digenea): The role of specific antibody and activated macrophages. J. Fish Dis. 13: 281-291
- Wickström, H., Clevestam, P., Höglund, J. (1998): The spreading of *Anguillicola crassus* in freshwater lakes in Sweden. Bull. Fr. Pêche Piscic, 349: 215-221
- Woo, P.T.K. (1992): Immunological responses of fish to parasitic organisms. Ann. Review Fish Dis. 2: 339-367
- Woo, P.T.K. (1995): Fish diseases and disorders. Vol. 1: Protozoan and metazoan Infections. CAB International, Wallingford
- Würtz, J., Knopf, K., Taraschewski, H. (1998): Distribution and prevalence of *Anguillicola crassus* (Nematoda) in eels (*Anguilla anguilla*) of the rivers Rhine and Naab, Germany. Dis Aquat Org 32: 137-143
- Würtz, J., Taraschewski, H. (im Druck): Histopathological changes in the swimbladder wall of the European eel *Anguilla anguilla* due to infections with *Anguillicola crassus*. Dis. Aquat. Org.
- Würtz, J., Taraschewski, H., Pelster, B. (1996): Changes in gas composition in the swimbladder of the European eel (*Anguilla anguilla*) infected with *Anguillicola crassus* (Nematoda). Parasitology 112: 233-238
- Yamamoto, K., Yamanchi, K. (1974). Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature 251:220-222

7. ANHANG

Tabelle 12: ELISA-Werte von nicht infizierten Farmaalen die zur Ermittlung des cut-off dienen. Rohantigen: Extrakt vom Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm
1	0,391	17	0,431	33	0,376
2	0,214	18	0,290	34	0,303
3	0,300	19	0,290	35	0,353
4	0,414	20	0,286	36	0,355
5	0,248	21	0,395	37	0,298
6	0,268	22	0,211	38	0,376
7	0,169	23	0,229	39	0,268
8	0,160	24	0,239	40	0,282
9	0,294	25	0,144	41	0,357
10	0,171	26	0,241	42	0,295
11	0,611	27	0,680	43	0,152
12	0,191	28	0,164	\bar{X}	0,300
13	0,230	29	0,359	SD	0,116
14	0,191	30	0,214	3 x SD	0,348
15	0,237	31	0,537	Cut-off	0,648
16	0,377	32	0,298		

Tabelle 13: Meßwerte, die zur Bestimmung der inter-assay Varianz des ELISA dienen. Rohantigen: Extrakt vom Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm
1	0,407	6	0,406	11	0,378
2	0,367	7	0,418	12	0,426
3	0,436	8	0,357	\bar{X}	0,375
4	0,41	9	0,209	SD	0,063
5	0,378	10	0,312	Varianz	16,7 %

Tabelle 14: Meßwerte, die zur Bestimmung der inter-assay Varianz des ELISA dienen.
Rohantigen: Extrakt vom Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm	Aal Nr.	Extinktion bei 492 nm
1	0,578	29	0,664	57	0,624
2	0,595	30	0,749	58	0,643
3	0,605	31	0,74	59	0,623
4	0,569	32	0,754	60	0,615
5	0,598	33	0,667	61	0,598
6	0,689	34	0,659	62	0,664
7	0,749	35	0,618	63	0,681
8	0,655	36	0,675	64	0,678
9	0,613	37	0,75	65	0,623
10	0,541	38	0,652	66	0,641
11	0,586	39	0,747	67	0,631
12	0,558	40	0,676	68	0,685
13	0,637	41	0,559	69	0,69
14	0,626	42	0,504	70	0,628
15	0,703	43	0,628	71	0,722
16	0,701	44	0,672	82	0,672
17	0,63	45	0,618	73	0,678
18	0,522	46	0,73	74	0,632
19	0,561	47	0,698	75	0,697
20	0,574	48	0,727	76	0,65
21	0,626	49	0,607	77	0,589
22	0,68	50	0,583	78	0,734
23	0,747	51	0,608	79	0,751
24	0,706	52	0,654	80	0,707
25	0,618	53	0,645	\bar{X}	0,648
26	0,613	54	0,667	SD	0,059
27	0,597	55	0,656	Varianz	9,1 %
28	0,545	56	0,685		

Tabelle 15: Masse, Länge, Sektionsbefunde und Resultate des ELISA der natürlich infizierten Aale des Screeningkollektivs

Aal Nr.	Masse [g]	Länge [cm]	Befund durch Sektion				ELISA Extinktion bei 492 nm
			Anzahl <i>Anguillicola crassus</i>			Schwimmblaste	
			L ₃	L ₄	adult	Schadensklasse	
1	130	45,0	1	2	1	1	0,353
2	196	50,0	1	0	2	1	0,399
3	184	50,5	5	5	6	1	0,383
4	82	39,2	0	0	1	1	1,947
5	260	58,0	0	0	2	2	0,242
6	128	43,8	9	4	0	1	0,262
7	102	42,2	0	0	0	4	0,224
8	90	42,6	3	2	0	2	1,069
9	194	50,8	0	0	0	2	3,247
10	130	44,3	0	0	0	2	3,337
11	276	54,1	0	0	0	2	1,175
12	24	26,7	2	0	1	3	2,554
13	110	40,8	0	0	0	5	2,360
14	114	44,9	0	0	0	3	3,213
15	114	43,7	0	0	4	2	2,930
16	126	43,7	0	0	1	2	3,046
17	128	44,2	3	2	7	2	2,590
18	360	57,2	0	0	11	2	1,183
19	306	55,2	1	1	6	3	2,526
20	124	44,6	2	2	1	2	0,554
21	144	45,6	1	1	2	3	2,317
22	108	40,9	0	0	0	2	0,878
23	72	37,2	0	0	5	3	1,135
24	46	33,0	2	0	0	3	0,428
25	26	28,4	2	0	1	2	0,741
26	106	43,6	1	1	10	2	1,181
27	108	46,4	1	0	1	4	3,000
28	158	46,2	6	0	3	4	1,009
29	94	39,4	0	1	0	2	0,611
30	88	42,1	0	0	0	2	0,559
31	98	39,8	1	0	0	4	1,498
32	366	54,7	3	2	2	2	1,484
33	302	53,2	0	0	2	2	0,302
34	122	43,2	1	0	1	2	0,586
35	74	38,5	4	6	0	5	0,641
36	28	28,1	0	0	3	1	0,446

Tabelle 15: Fortsetzung

Aal Nr.	Masse [g]	Länge [cm]	Befund durch Sektion				Schwimmblase Schadensklasse	ELISA Extinktion bei 492 nm
			Anzahl <i>Anguillicola crassus</i>			Schwimmblase		
			L ₃	L ₄	adult			
37	84	40,9	1	0	0	2	1,528	
38	128	48,4	2	1	9	4	0,314	
39	62	37,2	0	1	1	2	0,265	
40	24	29,5	0	0	0	2	1,327	
41	164	51,6	4	2	1	2	1,425	
42	146	48,4	0	1	2	5	1,401	
43	58	35,4	3	3	2	4	1,519	
44	88	42,3	5	4	3	2	0,596	
45	502	63,4	2	2	22	4	0,878	
46	260	54,7	0	0	2	3	1,231	
47	316	56,5	0	1	0	3	1,287	
48	98	39,7	0	1	1	3	1,442	
49	144	46,3	1	2	0	3	1,140	
50	302	53,6	1	1	3	2	1,141	
51	94	40,5	2	0	0	2	1,317	
52	140	47,2	0	1	3	2	0,597	
53	358	59,1	1	2	7	3	0,458	
54	92	40,5	0	0	3	2	0,422	
55	42	33,0	1	2	2	2	0,338	
56	196	49,2	0	0	0	3	0,807	
57	182	56,4	0	0	4	2	0,468	
58	246	52,8	0	0	1	2	0,297	
59	292	58,5	1	0	0	2	1,397	
60	28	29,3	0	1	5	3	0,225	
61	24	25,0	0	0	2	3	1,502	
62	200	52,4	3	1	15	3	1,312	
63	184	48,4	3	6	2	3	0,689	
64	112	44,6	0	1	1	1	1,437	
65	106	43	1	1	2	2	1,444	
66	330	57	0	1	11	2	1,329	
70	196	50	0	0	2	2	1,738	
71	54	34,6	0	0	0	2	1,187	
72	138	47,2	0	0	7	2	1,499	
73	96	40,8	0	0	1	2	0,927	
74	176	46,7	0	0	0	2	1,211	
75	210	53,2	1	3	1	1	1,580	
76	198	49,6	0	0	1	1	1,241	
77	60	36,9	0	0	0	2	1,478	
78	116	44,1	0	0	2	2	1,681	

Tabelle 15: Fortsetzung

Aal Nr.	Masse [g]	Länge [cm]	Befund durch Sektion				Schwimmblaste Schadensklasse	ELISA Extinktion bei 492 nm
			Anzahl <i>Anguillicola crassus</i>					
			L ₃	L ₄	adult			
67	208	53,8	4	3	7	2	1,083	
68	270	53,7	1	2	3	2	0,965	
69	190	51,7	1	1	3	2	1,128	
79	246	55,7	0	0	3	2	1,292	
80	490	65,9	0	1	7	2	0,992	
81	66	38,5	0	1	2	2	0,510	
82	424	63,6	0	1	2	2	1,495	
83	180	48,5	0	0	2	2	0,381	
84	264	57,4	0	0	2	2	0,643	
85	192	51,4	2	0	2	2	0,550	
86	52	33,8	0	0	3	2	0,652	
87	94	39	4	4	9	2	0,658	
88	230	52,2	0	0	1	2	1,425	
89	198	49,7	0	0	0	2	1,101	
90	318	59,8	2	3	2	4	1,256	
91	130	46	0	1	8	2	0,596	
92	450	62,6	1	2	0	4	1,141	
93	46	37,5	0	0	4	3	1,456	
94	114	42,3	0	3	3	2	1,008	
95	210	49,7	0	0	0	1	0,550	
96	160	47	3	0	3	1	1,356	
97	126	43	6	0	0	2	1,493	
98	114	42,4	0	0	0	1	1,394	
99	138	45,8	1	0	3	2	0,261	
100	60	34,7	0	0	0	2	0,547	

Tabelle 16: Resultate des ELISA mit Seren experimentell infizierter Aale. Angegeben ist der Quotient aus dem Extinktionswert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums (Q)

A. Kontrollgruppe, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0	0,684	1,606	1,772	1,611	1,040	2,138	0,747	1,228	1,099	1,325	0,488
14	0,800	1,121	1,796	1,354	1,037	2,141	0,852	1,629	1,043	1,308	0,458
29	0,687	1,663	1,805	1,367	1,156	2,127	0,536	1,254	0,963	1,284	0,521
43	0,711	1,148	1,383	1,161	1,186	2,275	0,508	1,124	0,882	1,153	0,500
56	0,633	1,061	1,211	1,164	1,149	2,192	0,695	0,590	0,821	1,057	0,490
63	0,700	1,151	1,244	1,326	1,224	2,289	0,863	0,636	0,937	1,152	0,492
85	0,719	1,050	1,326	1,202	1,270	2,433	0,859	0,866	0,899	1,181	0,513
99	0,884	0,861	1,063	1,237	1,093	2,073	0,811	0,877	0,863	1,085	0,397
113	0,815	0,715	1,337	1,446	1,039	1,949	0,642	0,797	0,917	1,073	0,427
126	0,699	0,742	1,372	1,459	1,100	1,838	0,637	0,804	0,865	1,057	0,415
142	0,698	0,715	1,381	1,323	1,169	1,850	0,698	0,749	0,882	1,052	0,406
155	0,711	0,676	1,342	1,287	1,148	1,800	0,694	0,734	0,851	1,027	0,392
170	0,703	0,611	1,213	1,247	1,089	1,758	0,776	0,762	0,946	1,012	0,360
185	0,580	0,848	1,096	1,253	1,108	1,738	0,842	0,809	0,917	1,021	0,334
193	0,617	0,875	1,006	1,231	1,054	1,697	1,011	0,755	0,942	1,021	0,309
209	0,622	0,846	0,998	1,248	1,002	1,748	0,735	0,748	0,982	0,992	0,339
224	0,650	0,911	1,076	1,287	0,964	1,940	0,789	0,720	1,020	1,040	0,389
243	0,722	0,882	1,108	1,090	0,876	1,862	0,922	0,685	1,104	1,028	0,350
254	0,528	1,088	1,085	1,273	0,854	1,998	0,974	0,712	0,157	0,963	0,514
269	0,635	1,272	1,015	1,180	0,700	2,234	0,995	0,695	1,163	1,099	0,485
283	0,608	1,370	1,096	1,164	0,739	1,434	1,236	0,830	1,359	1,093	0,300
296	0,393	1,503	0,911	1,034	0,748	1,393	0,792	0,702	1,226	0,967	0,357
311	0,394	1,561	1,046	1,269	0,752	1,138	0,851	0,696	0,961	0,963	0,343
325	0,429	1,177	1,154	1,386	0,851	1,159	0,404	1,196	0,924	0,964	0,347

Tabelle 16: Fortsetzung

B. Kontrollgruppe, Rohantigen: L₃

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0	1,216	2,398	1,899	1,924	1,092	1,089	1,348	1,776	1,528	1,586	0,447
14	1,030	1,800	1,858	1,584	0,962	2,131	1,253	2,334	1,373	1,592	0,478
29	1,257	2,431	1,725	1,571	1,115	2,425	1,136	2,325	2,075	1,785	0,548
43	1,393	1,936	1,445	1,416	1,088	2,081	0,966	1,957	1,439	1,525	0,389
56	1,235	1,766	1,317	1,243	1,069	2,191	0,931	1,774	1,236	1,418	0,405
63	1,529	1,769	1,303	1,474	1,074	2,168	1,007	1,729	1,422	1,497	0,361
85	1,385	1,666	1,278	1,523	1,061	2,102	1,010	2,160	1,315	1,500	0,412
99	1,535	1,218	1,014	1,334	1,133	1,930	1,007	1,978	1,465	1,402	0,362
113	1,518	1,015	0,934	1,675	0,817	1,549	0,844	2,051	1,686	1,343	0,448
126	1,458	1,132	1,245	1,614	0,997	1,831	0,907	2,087	1,854	1,458	0,416
142	1,429	1,299	1,081	1,426	0,954	1,905	0,975	2,007	1,890	1,441	0,409
155	1,409	1,163	1,052	1,443	0,882	1,921	0,958	2,001	1,825	1,406	0,427
170	1,370	1,118	1,038	1,528	0,920	1,549	1,102	2,089	1,843	1,395	0,394
185	1,253	0,604	1,061	1,482	0,821	1,522	1,147	2,061	1,722	1,297	0,452
193	1,380	0,644	1,054	1,587	0,777	1,404	1,188	1,969	1,612	1,291	0,422
209	1,326	0,629	1,068	1,594	0,769	1,532	0,955	1,908	1,627	1,268	0,435
224	1,444	0,744	1,129	1,820	0,731	1,585	0,796	1,497	1,692	1,271	0,429
243	1,544	0,804	1,192	1,807	0,684	1,712	0,992	1,326	1,744	1,312	0,420
254	1,525	1,169	1,229	1,907	0,622	1,799	1,142	1,092	1,792	1,364	0,422
269	1,516	1,545	1,288	2,024	0,564	1,983	1,245	0,996	1,858	1,447	0,481
283	1,426	2,256	1,086	1,842	0,588	1,134	2,121	0,947	1,678	1,453	0,563
296	1,598	2,188	1,022	1,432	0,573	1,084	1,404	0,912	1,465	1,297	0,466
311	1,554	2,135	0,657	1,596	0,724	1,080	1,496	1,010	1,606	1,317	0,482
325	1,561	1,777	1,454	1,815	0,759	1,107	0,447	1,203	1,637	1,307	0,469

Tabelle 16: Fortsetzung

C. Einmalige Infektion mit 40 L₃, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
0	0,694	1,743	1,992	0,863	0,862	0,851	1,676	1,540	0,973	1,244	0,488
14	0,729	1,891	1,946	0,876	0,734	0,914	1,976	1,647	0,960	1,297	0,552
29	0,709	1,720	1,867	0,876	0,741	0,827	2,059	1,927	0,901	1,292	0,580
43	0,700	1,715	1,525	0,856	0,874	0,893	2,235	1,703	0,812	1,257	0,546
56	0,619	1,588	1,639	0,811	0,957	1,095	2,499	1,930	0,922	1,340	0,615
63	0,644	1,699	1,375	1,033	1,088	1,286	2,352	2,319	0,999	1,422	0,593
85	0,732	2,487	1,384	0,747	1,176	1,083	1,910	2,552	1,073	1,461	0,695
99	0,966	5,399	1,271	0,805	1,341	1,277	2,363	2,259	1,075	1,862	1,433
113	0,586	5,369	1,102	0,576	0,818	1,046	1,477	1,848	1,200	1,558	1,486
126	0,835	7,945	1,026	0,589	0,601	0,939	1,447	1,658	0,996	1,782	2,338
142	0,991	10,247	1,010	0,655	0,683	0,955	1,823	2,049	0,869	2,142	3,078
155	0,808	14,412	0,853	0,606	0,665	0,857	1,653	1,786	0,722	2,485	4,493
170	0,606	16,714	0,767	0,445	0,609	0,747	1,426	1,387	0,667	2,596	5,305
185	0,510	21,249	1,065	0,549	0,619	0,795	1,475	1,136	0,586	3,109	6,810
193	0,571	18,679	0,820	0,493	0,801	0,793	1,349	1,071	1,271	2,872	5,935
209	0,510	21,217	22,484	0,457	1,051	0,804	1,258	0,940	1,683	5,600	9,226
224	0,382	18,640	21,061	0,381	0,629	0,869	1,052	0,955	3,225	5,244	8,347
243	0,422	12,086	29,935	0,484	0,512	0,661	0,954	0,959	2,197	5,357	9,948
254	0,337	9,131	26,397	0,575	0,503	0,621	0,843	1,068	1,895	4,597	8,635
269	0,395	10,200	18,028	0,526	0,426	0,558	0,790	1,394	1,262	3,731	6,214
283	0,353	7,530	14,584	0,463	0,436	0,565	0,773	0,867	1,109	2,965	4,921
296	0,378	5,887	9,510	0,216	0,479	0,632	0,722	3,227	0,837	2,432	3,246
311	0,408	4,708	7,376	0,590	0,469	0,571	0,758	2,982	0,786	2,072	2,477
325	0,482	4,061	6,028	1,607	0,449	0,609	0,701	2,484	0,803	1,914	1,955

Tabelle 16: Fortsetzung

D. Einmalige Infektion mit 40 L₃, Rohantigen: L₃

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
0	2,403	1,433	2,470	1,020	1,822	0,944	0,720	1,684	0,933	1,492	0,649
14	2,331	1,675	2,321	1,012	2,164	0,921	0,868	1,765	1,219	1,586	0,601
29	2,105	1,431	2,297	1,071	2,113	0,923	0,933	2,077	1,067	1,558	0,582
43	2,003	1,751	2,175	1,008	2,504	0,959	0,890	1,951	1,035	1,586	0,616
56	2,012	1,590	2,264	1,262	2,798	1,075	1,044	1,947	0,995	1,665	0,632
63	2,154	1,836	1,846	1,294	2,766	1,157	0,922	2,174	1,037	1,688	0,624
85	2,350	2,513	2,050	1,530	2,533	1,135	0,796	2,486	1,030	1,825	0,706
99	2,485	4,084	1,846	1,739	2,291	1,328	0,966	2,104	1,166	2,001	0,934
113	2,330	4,451	1,628	1,601	2,518	1,238	0,714	2,007	1,037	1,947	1,108
126	2,179	6,836	1,537	1,380	2,428	1,120	0,762	1,759	0,836	2,093	1,866
142	2,246	7,789	1,659	1,269	2,441	1,160	0,945	1,671	0,835	2,224	2,158
155	1,775	9,033	1,363	1,161	2,380	1,027	0,987	1,519	0,727	2,219	2,602
170	1,256	9,399	1,172	0,943	1,865	0,876	1,064	1,355	0,645	2,064	2,772
185	1,049	11,379	1,376	1,075	1,814	0,822	1,014	1,300	0,571	2,267	3,435
193	1,008	11,156	1,174	1,044	1,596	0,810	0,902	1,227	0,623	2,171	3,381
209	0,837	13,325	3,197	1,072	1,725	0,847	0,826	1,203	0,653	2,632	4,086
224	0,880	16,149	7,152	1,284	1,944	0,827	0,766	1,139	0,580	3,413	5,199
243	0,999	12,885	16,553	1,414	1,678	0,649	0,692	1,085	0,642	4,066	6,119
254	0,745	9,576	16,098	1,616	1,657	0,604	0,595	1,067	0,642	3,622	5,488
269	0,810	10,745	9,780	1,596	1,563	0,552	0,609	1,098	0,543	3,033	4,125
283	0,724	7,037	8,163	1,439	1,370	0,551	0,731	0,468	1,396	2,431	2,967
296	0,760	5,672	5,838	0,827	1,470	0,609	0,706	2,123	0,472	2,053	2,160
311	0,824	4,791	3,980	1,753	1,553	0,587	0,760	2,018	0,486	1,861	1,541
325	0,904	4,147	3,437	1,937	1,466	0,654	0,655	1,857	0,475	1,726	1,297

Tabelle 16: Fortsetzung

E. Infektion mit 2 mal 3 L₃ pro Woche, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
0	0,884	0,868	0,803	0,973	1,492	0,965	0,965	0,770	0,932	0,961	0,212
14	0,939	0,927	0,747	0,903	1,694	0,907	0,988	0,841	1,082	1,003	0,275
29	1,079	0,929	0,807	1,030	1,869	0,852	1,004	0,796	1,144	1,057	0,328
43	1,036	0,961	0,797	1,052	1,743	1,017	0,861	0,940	1,291	1,078	0,285
56	1,330	0,935	0,781	0,926	3,196	1,033	1,140	0,875	1,144	1,262	0,744
63	1,199	1,033	0,764	0,937	8,141	1,135	1,158	0,982	1,528	1,875	2,359
85	1,050	0,970	1,055	1,006	9,278	0,987	1,151	0,969	2,217	2,076	2,730
99	1,206	1,077	0,796	1,258	7,799	1,049	1,148	0,773	1,882	1,888	2,240
113	1,135	1,038	3,358	1,660	6,361	2,999	1,107	0,945	2,018	2,291	1,761
126	1,414	0,957	2,403	3,759	5,334	3,018	1,072	0,749	1,792	2,278	1,525
142	2,027	0,727	1,143	9,086	5,398	2,622	0,999	1,018	1,321	2,705	2,794
155	2,056	0,763	1,198	21,246	5,522	2,587	0,948	1,039	1,389	4,083	6,602
170											
185											
193	2,077	0,765	1,107	62,001	5,563	2,616	0,903	1,371	1,769	8,686	20,046
209	2,150	0,739	1,192	53,428	5,145	3,897	1,224	1,555	1,276	7,845	17,155
224											
243											
254											
269	2,977	0,693	3,974	29,611	4,934	7,720	4,715	1,343	1,718	6,409	8,966
283	2,434	3,214	4,840	22,785	4,420	10,361	7,978	0,850	1,609	6,499	6,824
296	1,989	8,251	6,386	25,900	4,285	9,129	15,886	1,516	1,560	8,322	8,055
311	1,501	4,381	7,688	27,122	9,191	9,484	21,875	1,476	2,170	9,432	9,188
325	1,168	4,037	8,395	26,037	15,615	8,377	22,559	1,264	2,938	10,043	9,296

Tabelle 16: FortsetzungF. Infektion mit 2 mal 3 L₃ pro Woche, Rohantigen: L₃

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
0	0,782	0,890	0,926	1,316	1,358	0,909	0,914	0,643	0,630	0,930	0,257
14	0,784	1,116	1,051	1,319	1,565	1,030	1,143	0,672	0,847	1,058	0,275
29	0,686	1,191	0,990	1,276	1,134	0,869	1,099	0,700	0,997	0,993	0,208
43	0,722	1,293	1,087	1,137	1,251	1,092	1,180	0,567	0,911	1,027	0,245
56	0,772	1,175	1,044	1,123	1,721	0,874	1,252	0,580	0,847	1,043	0,332
63	0,728	1,354	1,030	1,071	2,890	0,893	1,361	0,561	1,029	1,213	0,680
85	0,852	1,465	1,188	1,018	3,452	0,982	1,084	0,793	1,210	1,338	0,818
99	0,935	1,221	1,022	1,203	2,891	0,961	1,188	0,547	1,159	1,236	0,655
113	0,784	1,308	1,766	1,452	2,869	1,243	1,095	0,752	1,256	1,392	0,637
126	0,869	1,175	1,509	2,135	2,783	1,394	1,363	0,864	1,125	1,469	0,624
142	1,134	1,330	1,238	2,765	2,650	1,385	0,920	1,075	1,124	1,513	0,691
155	1,147	1,308	1,217	3,339	2,702	1,924	0,983	1,355	1,231	1,690	0,813
170											
185											
193	1,205	1,132	1,266	4,417	2,829	4,248	1,286	1,635	1,280	2,144	1,345
209	1,267	1,095	1,287	4,582	2,546	3,991	1,232	1,733	1,214	2,105	1,322
224											
243											
254											
269	1,531	1,003	1,298	4,943	2,226	3,372	1,168	1,733	1,263	2,060	1,303
283	1,442	3,087	1,488	4,643	2,177	3,826	1,600	1,663	1,111	2,337	1,232
296	1,137	3,791	1,756	4,881	2,065	3,702	1,633	2,112	1,132	2,468	1,330
311	1,093	4,135	1,926	4,625	3,336	4,189	2,203	2,091	1,497	2,788	1,302
325	0,714	3,662	1,933	4,179	3,860	3,836	2,291	1,768	1,829	2,675	1,228

Tabelle 16: Fortsetzung

G. Infektion mit 20 L₃ pro Woche, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
0	1,135	1,240	1,763	1,558	2,196	3,175	2,334	1,350	1,703	1,828	0,647
14	0,804	1,163	1,127	1,191	2,250	2,423	1,479	1,065	1,243	1,416	0,552
29	0,828	1,183	1,083	1,461	2,216	2,258	1,565	1,014	0,950	1,395	0,531
43	0,885	1,925	0,900	1,704	2,011	2,087	1,208	1,053	0,876	1,405	0,519
56	1,126	1,650	0,995	1,686	2,850	1,795	1,021	1,100	0,673	1,433	0,651
63	1,069	1,922	1,350	1,542	2,915	1,635	0,942	1,125	0,624	1,458	0,672
85	1,072	2,859	1,002	1,921	3,107	2,038	0,895	1,113	0,664	1,630	0,894
99	1,138	9,023	0,937	1,781	3,261	1,546	0,903	1,371	0,673	2,292	2,637
113	1,194	12,906	1,229	2,280	2,367	1,263	0,620	1,516	0,739	2,679	3,881
126	1,115	23,121	1,610	1,758	4,008	1,319	0,611	1,563	0,673	3,975	7,249
142	0,989	38,984	1,738	2,139	4,038	1,107	0,665	1,385	0,631	5,742	12,509
155	1,023	57,692	1,577	2,184	4,193	1,347	0,585	1,352	0,594	7,839	18,727
170	0,879	71,062	1,515	2,006	4,302	1,364	0,737	3,254	0,664	9,531	23,106
185	0,863	57,119	1,694	2,296	3,888	1,685	0,714	4,183	0,716	8,129	18,416
193	1,267	45,006	1,756	2,764	3,641	1,493	0,668	4,444	0,884	6,880	14,354
209	0,999	35,012	0,918	3,617	4,956	2,968	0,769	4,610	1,237	6,121	10,957
224	1,274	25,460	1,024	22,289	4,956	2,756	0,646	4,122	1,308	7,093	9,658
243	1,311	30,313	1,065	23,019	5,094	3,876	0,735	4,181	1,339	7,881	10,916
254	1,208	41,344	1,032	22,592	4,508	3,461	0,656	3,946	1,192	8,882	13,973
269	1,262	34,549	0,937	20,441	4,703	3,222	0,662	3,611	1,208	7,844	11,767
283	1,168	35,763	0,973	20,283	8,529	3,161	0,740	3,439	1,204	8,362	12,041
296	1,086	44,058	1,043	17,683	10,838	3,019	0,746	2,973	1,214	9,184	14,293
311	1,132	56,942	1,054	14,644	11,427	2,395	0,891	2,825	1,065	10,264	18,225
325	1,067	42,183	1,178	11,790	10,738	1,921	1,368	2,861	0,929	8,226	13,425

Tabelle 16: Fortsetzung

H. Infektion mit 20 L₃ pro Woche, Rohantigen: L₃

Tag	Aal Nr.									\bar{X}	SD
	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
0	0,907	1,017	1,182	0,547	0,728	1,003	1,573	1,384	1,648	1,110	0,372
14	0,732	0,989	1,161	0,460	0,827	1,242	1,211	1,585	1,092	1,033	0,328
29	0,917	0,929	0,944	0,437	0,645	0,985	1,309	1,489	0,967	0,958	0,312
43	0,950	2,232	1,062	0,510	0,592	1,107	0,962	1,729	1,235	1,153	0,539
56	0,791	2,581	1,174	0,480	1,370	1,161	0,896	1,358	0,931	1,194	0,593
63	0,703	2,514	1,373	0,669	1,419	1,097	0,720	1,526	0,902	1,214	0,588
85	0,801	3,334	1,880	0,750	0,983	1,040	0,743	2,057	0,895	1,387	0,878
99	0,714	4,832	1,901	0,876	0,880	0,829	0,714	1,800	0,703	1,472	1,344
113	0,895	5,360	1,970	0,850	0,885	0,781	0,597	2,168	0,781	1,588	1,521
126	1,033	7,536	2,439	0,825	1,369	0,786	0,642	2,703	0,727	2,007	2,208
142	0,920	12,017	2,694	0,880	1,462	0,826	0,879	2,938	0,714	2,592	3,632
155	1,004	17,248	2,519	1,218	1,365	0,824	0,576	2,365	0,699	3,091	5,354
170	0,701	19,489	1,997	1,152	1,394	0,644	0,599	3,860	0,784	3,402	6,120
185	0,703	17,227	2,033	1,103	1,495	0,481	0,481	4,686	0,976	3,243	5,404
193	0,697	14,804	1,727	1,458	1,184	1,416	0,390	5,034	1,273	3,109	4,586
209	0,714	12,768	1,382	4,646	1,126	1,342	0,437	4,841	1,744	3,222	3,926
224	0,807	9,980	1,500	4,738	1,248	2,116	0,459	4,679	2,354	3,098	3,005
243	0,887	11,599	1,441	5,069	1,434	1,988	0,411	4,768	2,796	3,377	3,485
254	0,997	13,100	1,461	4,649	1,306	1,956	0,455	4,481	2,295	3,411	3,917
269	0,916	12,382	1,240	4,322	1,303	1,929	0,425	4,280	2,295	3,233	3,700
283	0,876	11,996	1,217	3,676	2,357	2,020	0,451	3,805	2,269	3,185	3,497
296	0,778	14,954	1,760	3,685	2,880	1,914	0,415	3,282	1,929	3,511	4,424
311	0,826	18,031	1,556	3,426	2,853	1,615	0,447	3,026	2,040	3,758	5,444
325	0,803	14,804	1,659	2,827	2,890	2,423	0,736	3,077	1,295	3,390	4,373

Tabelle 17: In der Boyden-Kammer bestimmte Migrationsraten der Granulozyten und Monozyten der Kontrollaale (Aal Nr. 1 bis 9) und der 2 mal wöchentlich mit 3 L₃ infizierten Aale (Aal Nr. 19 bis 27).

A. Kontrolle

Aal Nr.	vor Infektion		nach Infektion	
	ohne L ₃	mit L ₃	ohne L ₃	mit L ₃
1	45,5	52,2	33,3	55,6
2	47,9	46,3	15,6	36,9
3	43,1	38,8	23,7	37,3
4	20,8	25,7	15,6	10,3
5	11,0	13,8	33,6	35,4
6	20,1	28,5	21,1	24,4
7	22,6	30,2	10,0	19,2
8	13,8	26,0	13,8	11,5
9	10,8	11,9	12,3	17,2
\bar{X}	23,8	27,6	19,9	27,5
SD	14,2	11,5	8,8	14,9

B. Infiziert

Aal Nr.	vor Infektion		nach Infektion	
	ohne L ₃	mit L ₃	ohne L ₃	mit L ₃
19	32,5	31,7	15,0	37,4
20	31,5	33,8	16,7	56,3
21	38,9	38,6	28,8	49,5
22	43,1	47,0	10,5	41,8
23	44,9	60,9	35,1	60,5
24	47,5	50,3	12,7	23,7
25	28,6	36,5	13,9	42,4
26	20,8	35,5	24,9	39,9
27	48,7	55,8	19,1	51,0
\bar{X}	37,4	43,3	19,6	44,7
SD	9,6	10,5	8,2	11,1

Tabelle 18: Resultate des ELISA mit Seren zuvor infizierter Aale während der Levamisol-Therapie und Reinfektion. Angegeben ist der Quotient aus dem Extinktionswert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums (Q). Die Nummerierung der Aale kennzeichnet die gleichen Versuchstiere wie in Tabelle 17.

A. Kontrolle, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.								\bar{X}	SD
	1	2	3	4	5	6	7	9		
339	0,370	1,202	1,102	1,320	0,750	1,111	0,457	0,861	0,897	0,349
353	0,336	1,700	1,026	1,177	0,810	1,072	0,466	1,518	1,013	0,472
369	0,354	1,315	0,836	1,116	0,914	1,055	0,521	1,593	0,963	0,403
383	0,327	1,314	0,885	1,186	0,676	1,125	0,531	1,727	0,971	0,457
398	0,313	1,447	0,841	1,145	0,799	1,322	0,467	2,085	1,052	0,573
408	0,310	1,210	0,980	1,101	0,825	1,247	0,430	2,536	1,080	0,682
417	0,284	0,965	0,777	1,218	0,786	1,072	0,432	2,527	1,008	0,688
430	0,308	1,199	0,735	1,164	0,860	1,113	0,461	3,067	1,113	0,854
446	0,354	1,233	0,697	1,031	0,817	1,157	0,803	2,700	1,099	0,704
462	0,446	1,841	0,635	1,056	1,584	1,249	0,559	2,454	1,228	0,702
475	0,428	1,584	0,653	0,901	1,681	1,293	0,657	2,367	1,196	0,658
489	0,424	1,473	0,860	0,942	1,329	1,269	0,754	2,093	1,143	0,514
507	0,494	1,559	1,231	1,069	1,201	1,303	0,593	3,219	1,334	0,842
522	0,457	1,522	1,008	1,082	0,985	1,291	0,572	3,046	1,245	0,806
537	0,456	1,599	1,074	(1,0) *	0,815	1,189	0,564	2,650	1,168	0,813

*geschätzter Wert

Tabelle 18: Fortsetzung**B. Zuvor infiziert, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus***

Tag	Aal Nr.								\bar{X}	SD
	19	20	22	23	24	25	26	27		
339	0,943	3,109	30,262	21,825	7,031	16,214	3,761	4,402	10,943	10,627
353	0,882	2,548	34,391	27,392	5,822	12,306	3,893	6,216	11,681	12,466
369	0,833	1,869	37,262	52,231	7,779	12,834	3,213	5,339	15,170	19,063
383	0,847	1,498	45,340	50,201	9,592	10,795	2,377	4,355	15,625	20,209
398	0,807	0,939	47,661	26,345	6,918	11,066	1,655	3,516	13,775	16,954
408	1,426	0,891	39,797	12,581	8,894	29,162	1,160	2,484	12,049	14,738
417	2,758	0,851	37,964	9,222	4,172	32,941	1,214	2,413	11,442	15,105
430	2,119	0,961	33,597	11,935	3,722	35,807	1,034	1,617	11,349	14,861
446	1,531	0,785	22,494	(12,0)*	2,325	28,021	0,724	1,803	8,710	10,957
462	1,070	0,777	9,835	13,474	1,581	17,754	0,611	1,568	5,834	6,848
475	1,283	0,746	7,926	12,959	7,405	13,419	0,561	1,651	5,744	5,437
489	1,075	0,833	6,261	9,245	13,185	10,980	0,547	2,234	5,545	5,074
507	1,042	0,963	3,650	8,519	9,660	30,887	1,319	2,910	7,369	10,079
522	1,150	0,893	5,891	15,632	5,167	83,022	3,087	2,979	14,728	27,989
537	1,225	0,735	8,915	18,765	2,691	63,971	1,813	4,974	12,886	21,490

*geschätzter Wert

C. Zuvor infiziert, Rohantigen: L₃

Tag	Aal Nr.			
	19	20	22	24
339	0,695	2,882	2,858	3,209
353	0,735	2,628	3,564	2,635
369	0,677	1,917	3,447	3,511
383	0,689	1,654	3,808	3,846
398	0,710	1,129	3,763	3,141
408	1,126	1,182	3,520	1,941
417	1,709	1,097	3,374	1,837
430	1,427	1,258	3,258	1,946
446	1,197	1,267	2,892	1,538
462	0,902	1,372	2,408	1,075
475	1,007	1,300	2,073	0,624
489	1,025	1,260	2,197	2,802
507	1,029	1,601	1,110	2,117

Tabelle 19: Sektionsbefunde nach der Reinfektion zuvor experimentell infizierter Aale. Angegeben sind die Wiederfindungsrate (WF), der prozentuale Anteil der L₃, L₄ und adulten *Anguillicola crassus* sowie die mittlere individuelle Masse der adulten männlichen (M) und weiblichen (W) Nematoden.

A. Kontrolle

Aal Nr.	WF [%]	L ₃ [%]	L ₄ [%]	Adult [%]	Masse M [mg]	Masse W [mg]
1	16,7	0,0	0,0	100,0	-	46,2
2	0,0	-	-	-	-	-
3	48,0	33,3	41,7	25,0	0,6	0,3
4	52,0	7,7	0,0	92,3	0,1	-
5	12,0	0,0	0,0	100,0	-	40,2
6	4,0	0,0	0,0	100,0	-	55,3
7	12,0	0,0	0,0	100,0	2,3	22,4
9	20,0	0,0	0,0	20,0	-	4,4
\bar{X}	20,6	17,3	6,0	76,8	1,0	28,1
SD	19,3	30,2	15,7	37,2	1,2	22,7

B. Zuvor infiziert

Aal Nr.	WF [%]	L ₃ [%]	L ₄ [%]	Adult [%]	Masse M [mg]	Masse W [mg]
19	40,0	0,0	0,0	100,0	-	-
20	36,0	0,0	0,0	100,0	9,4	40,1
22	12,0	0,0	0,0	100,0	0,5	49,8
23	40,0	0,0	10,0	90,0	2,3	31,4
24	20,0	0,0	20,0	80,0	2,3	24,5
25	8,0	50,0	50,0	0,0	-	-
26	28,0	14,3	57,1	28,6	0,7	2,5
27	8,0	50,0	50,0	0,0	-	-
\bar{X}	24,0	14,3	23,4	62,3	3,0	29,7
SD	13,9	22,6	25,0	45,1	3,7	17,9

Tabelle 20: Resultate des ELISA mit Seren intraperitoneal immunisierter Aale. Angegeben ist der Quotient aus dem Extinktionswert des Testserums und dem des negativen Kontrollserums (Q).

A. Kontrolle, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.							\bar{X}	SD
	1	2	3	4	5	6	7		
0	0,873	1,543	1,975	1,568	1,523	2,129	1,846	1,637	0,410
5	0,883	1,269	1,994	1,123	1,277	2,058	1,729	1,476	0,453
12	0,914	1,383	1,914	1,173	1,348	2,440	1,938	1,587	0,529
23	0,877	1,318	1,790	1,148	1,382	2,382	1,800	1,528	0,501
33	0,969	1,488	1,753	1,086	1,280	2,298	1,591	1,495	0,449
42	0,873	1,623	1,531	1,160	1,255	2,188	1,655	1,470	0,423
69	0,917	1,944	1,969	1,284	1,360	2,065	1,597	1,591	0,427
77	0,833	1,796	2,012	1,321	1,354	1,655	1,538	1,502	0,382
89	1,040	1,793	2,191	1,216	1,406	1,917	1,425	1,570	0,410
96	1,056	1,309	1,914	1,228	1,329	1,822	1,246	1,415	0,323
109	1,667	1,182	1,815	1,037	1,031	1,855	1,495	1,440	0,357
117	1,420	1,096	1,660	0,957	1,098	1,849	1,714	1,399	0,353
134	1,599	1,056	1,593	0,852	1,858	1,738	1,043	1,391	0,397
145	2,552	0,917	1,302	0,778	0,991	4,742	1,954	1,891	1,409
163	2,639	1,006	1,117	0,765	0,846	5,065	2,006	1,921	1,548
182	2,688	1,012	1,173	0,728	0,877	5,775	1,862	2,017	1,793
202	3,549	1,077	1,599	0,809	0,938	4,240	1,415	1,947	1,372

B. Kontrolle, Rohantigen: L₃

0	1,091	1,439	2,078	1,673	1,484	2,248	2,304	1,759	0,460
5	1,106	1,257	2,135	1,205	1,376	2,245	2,310	1,662	0,540
12	1,081	1,475	1,917	1,221	1,406	2,463	2,414	1,711	0,561
23	1,075	1,361	1,797	1,299	1,370	2,294	2,330	1,647	0,502
33	1,657	1,584	1,875	1,268	1,305	2,330	2,128	1,735	0,400
42	1,117	1,766	1,865	1,273	1,305	2,242	2,037	1,658	0,429
69	1,340	1,610	2,410	1,455	1,298	2,239	2,206	1,794	0,474
77	1,034	1,423	1,808	1,423	1,302	1,861	1,952	1,543	0,338
89	1,122	1,745	2,919	1,408	1,318	2,021	1,829	1,766	0,598
96	1,673	1,153	2,197	1,345	1,308	2,001	1,627	1,615	0,381
109	2,982	1,086	2,094	1,190	1,149	2,001	1,620	1,732	0,687
117	2,052	1,065	1,875	1,044	1,214	1,838	1,516	1,515	0,416
134	2,171	1,070	1,979	1,034	1,513	1,809	1,295	1,553	0,447
145	2,390	0,982	1,834	0,925	1,038	3,166	2,108	1,777	0,849
163	1,969	0,862	1,501	0,857	1,044	3,234	2,239	1,672	0,875
182	1,797	0,862	1,543	0,826	1,038	3,293	2,369	1,675	0,905
202	1,792	0,935	1,740	0,857	1,044	2,671	2,297	1,620	0,706

Tabelle 20: Fortsetzung**C. Immunisierung mit homogenisierten L₃, Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter***Anguillicola crassus*

Tag	Aal Nr.							\bar{X}	SD
	8	9	10	11	12	13	14		
0	2,826	2,700	1,156	2,301	1,070	1,220	1,793	1,867	0,749
5	2,837	2,359	1,296	2,870	1,045	1,603	1,484	1,928	0,751
12	3,048	2,867	1,956	2,839	1,628	1,728	1,837	2,272	0,616
23	4,019	4,159	3,241	5,662	2,758	2,071	2,397	3,472	1,242
33	3,726	5,663	3,237	6,814	3,327	2,274	2,386	3,918	1,700
42	3,419	5,270	2,919	6,493	2,862	2,288	2,114	3,624	1,639
69	2,844	4,311	2,022	5,662	2,152	2,035	2,043	3,010	1,435
77	2,248	3,215	2,185	4,603	1,901	2,068	1,875	2,585	0,998
89	1,952	2,848	2,093	3,701	1,420	1,870	1,864	2,250	0,770
96	1,833	2,704	1,852	3,459	1,175	1,647	1,658	2,047	0,773
109	1,463	2,322	1,452	2,918	0,986	1,538	1,495	1,739	0,653
117	1,485	2,270	1,315	2,617	0,930	1,552	1,663	1,690	0,574
134	1,185	2,381	1,148	2,625	0,831	1,527	1,598	1,614	0,663
145	1,211	2,770	1,844	1,918	3,820	1,307	1,554	2,061	0,932
163	1,259	2,896	1,767	2,344	2,631	1,329	1,630	1,979	0,646
182	1,189	2,693	1,344	2,041	2,648	2,119	2,433	2,067	0,600
202	1,093	3,685	1,244	2,074	1,919	2,430	2,859	2,186	0,906

D. Immunisierung mit homogenisierten L₃, Rohantigen: L₃

0	3,593	4,539	0,997	1,624	0,906	2,071	2,563	2,327	1,348
5	3,476	3,353	0,958	2,093	0,947	1,797	2,515	2,163	1,028
12	3,575	3,425	1,210	1,959	1,857	1,827	2,709	2,366	0,890
23	4,216	4,105	2,117	4,203	3,009	2,182	3,201	3,290	0,917
33	3,746	5,611	2,180	4,962	3,662	2,726	3,262	3,735	1,204
42	3,554	4,859	1,874	4,681	3,101	2,501	2,804	3,339	1,107
69	2,659	4,207	1,626	3,824	2,619	2,832	3,083	2,978	0,848
77	2,132	3,635	2,269	3,233	2,135	2,511	2,889	2,686	0,585
89	2,108	2,916	2,228	2,792	1,780	2,338	2,638	2,400	0,404
96	1,907	2,614	2,296	2,572	1,984	2,047	2,534	2,279	0,301
109	1,620	2,240	2,183	2,539	1,830	1,742	2,080	2,033	0,321
117	1,563	2,150	2,048	2,404	1,719	1,757	2,340	1,997	0,325
134	1,365	2,090	2,165	2,393	1,648	1,761	2,340	1,966	0,383
145	1,569	1,907	2,066	1,890	2,154	1,818	2,028	1,919	0,193
163	1,659	1,620	2,102	1,907	1,643	1,657	2,184	1,825	0,239
182	1,569	1,829	1,392	2,153	2,524	2,039	2,353	1,980	0,409
202	1,572	1,877	1,407	2,186	1,949	2,356	2,829	2,025	0,483

Tabelle 20: Fortsetzung**E. Immunisierung mit homogenisierten adulten *Anguillicola crassus*,**Rohantigen: Hautmuskelschlauch adulter *A. crassus*

Tag	Aal Nr.										\bar{X}	SD
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
0	1,110	0,816	1,384	1,494	0,605	1,234	2,019	1,820	1,571	1,437	1,205	0,566
5	1,023	0,751	1,068	1,435	0,534	0,994	1,770	1,686	1,257	1,510	1,090	0,524
12	2,602	2,246	2,636	3,568	1,025	2,071	4,280	8,582	2,004	3,637	3,078	2,293
23	2,740	4,314	5,277	6,845	1,347	3,746	6,146	10,682	2,667	6,225	4,745	3,021
33	2,379	3,593	5,220	6,373	0,918	3,220	4,797	10,096	2,295	5,870	4,260	2,898
42	2,455	3,212	4,455	6,579	0,814	2,760	4,299	9,107	2,000	5,546	3,936	2,689
69	2,218	2,263	3,328	4,819	0,644	1,794	3,410	7,077	2,107	4,248	2,993	2,059
77	2,150	1,678	2,319	3,853	0,537	1,336	2,770	5,705	2,019	3,490	2,397	1,657
89	1,528	1,540	1,946	2,918	0,528	1,220	2,398	5,077	1,617	2,600	1,989	1,396
96	1,336	1,379	1,754	2,811	0,489	1,161	2,050	4,467	1,487	2,431	1,801	1,243
109	1,186	1,251	1,477	2,288	0,460	1,071	1,889	3,464	1,222	2,042	1,526	0,955
117	0,944	1,339	1,486	2,260	0,492	1,136	1,697	2,843	1,023	1,893	1,422	0,808
134	0,912	1,175	1,523	1,890	0,381	1,124	1,632	2,663	0,920	1,972	1,340	0,761
145	0,867	1,223	1,551	2,446	0,381	1,119	1,636	2,134	0,778	2,003	1,349	0,752
163	0,777	1,045	1,678	2,593	0,401	1,186	1,418	2,119	0,751	1,887	1,324	0,772
182	0,867	1,082	1,675	2,169	0,390	1,212	1,360	2,027	0,866	2,085	1,300	0,706
202	0,650	1,246	1,955	2,186	0,407	1,155	1,556	2,165	0,920	2,337	1,379	0,793

F. Immunisierung mit homogenisierten adulten *Anguillicola crassus*,Rohantigen: L₃

0	1,248	1,835	2,627	1,704	0,946	1,989	2,016	1,909	2,142	0,832	1,525	0,725
5	1,516	2,114	3,020	1,744	0,843	1,499	1,902	1,729	1,749	0,792	1,531	0,796
12	3,681	3,783	5,031	3,470	1,248	2,906	3,838	6,173	2,255	1,769	3,205	1,779
23	4,285	6,433	6,991	7,066	1,852	4,507	4,776	7,557	2,361	3,181	4,680	2,434
33	4,006	4,746	6,068	6,604	1,208	4,017	4,244	7,004	2,288	3,035	4,108	2,214
42	4,006	5,407	5,299	5,966	1,174	3,709	3,825	6,226	2,175	3,028	3,879	2,006
69	3,117	3,863	4,792	4,405	0,877	2,684	3,306	4,982	2,494	2,448	3,062	1,597
77	4,239	2,678	3,316	3,442	0,752	2,194	2,867	3,180	2,335	2,097	2,492	1,249
89	2,496	2,439	3,174	2,946	0,752	1,943	2,408	3,113	1,836	1,506	2,093	1,014
96	2,285	2,319	2,467	2,610	0,746	1,783	2,075	2,874	1,776	1,286	1,860	0,875
109	2,251	2,467	2,553	2,205	0,638	1,499	2,009	2,481	1,583	1,121	1,737	0,848
117	1,521	2,558	2,558	2,256	0,678	1,937	1,922	2,042	1,018	1,097	1,672	0,805
134	1,413	2,114	2,524	1,960	0,581	1,664	2,002	2,109	0,945	1,093	1,561	0,752
145	1,350	1,852	2,387	2,433	0,547	1,749	2,002	1,836	0,818	1,049	1,536	0,757
163	1,157	2,217	2,274	2,217	0,564	1,584	1,823	1,843	0,845	1,079	1,491	0,734
182	1,350	2,000	2,467	1,937	0,553	1,647	1,796	1,796	0,951	2,365	1,606	0,742
202	1,151	2,382	2,923	1,886	0,547	1,630	1,743	1,796	1,058	2,686	1,689	0,883

Tabelle 21: Sektionsbefunde nach der Belastungsinfektion intraperitoneal immunisierter Aale. Angegeben sind die Wiederfindungsrate (WF), der Anteil der L₃, L₄ und adulten *Anguillicola crassus* sowie die mittlere individuelle Masse der adulten männlichen (M) und weiblichen (W) Nematoden.

A. Kontrolle

Aal Nr.	WF [%]	L ₃ [%]	L ₄ [%]	Adult [%]	Masse M [mg]	Masse W [mg]
1	21,1	0,0	0,0	100,0	1,4	52,6
2	5,0	0,0	0,0	100,0	-	25,5
3	35,0	14,3	0,0	85,7	12,8	57,3
4	0,0	-	-	-	-	-
5	10,5	0,0	0,0	100,0	< 0,1	-
6	10,5	0,0	0,0	100,0	-	36,7
7	20,0	25,0	0,0	75,0	< 0,1	8,5
\bar{X}	17,0	6,5	0,0	93,5	3,6	36,1
SD	11,7	10,7	-	10,7	6,2	20,0

B. Immunisierung mit homogenisierten L₃

Aal Nr.	WF [%]	L ₃ [%]	L ₄ [%]	Adult [%]	Masse M [mg]	Masse W [mg]
8	25,0	0,0	0,0	100,0	7,9	55,8
9	68,4	0,0	7,7	100,0	13,5	64,1
10	15,0	0,0	0,0	100,0	-	17,9
11	47,4	0,0	0,0	100,0	4,6	-
12	10,5	0,0	0,0	100,0	-	28,6
13	5,0	0,0	100,0	0,0	-	-
14	5,0	0,0	0,0	100,0	< 0,1	-
\bar{X}	25,2	0,0	15,4	84,6	6,5	41,6
SD	24,1	-	37,4	37,4	5,7	21,9

Tabelle 21: Fortsetzung**C. Immunisierung mit homogenisierten adulten *Anguillicola crassus***

Aal Nr.	WF [%]	L₃ [%]	L₄ [%]	Adult [%]	Masse M [mg]	Masse W [mg]
15	15,0	0,0	0,0	100,0	10,0	116,2
16	15,0	0,0	0,0	100,0	0,1	-
17	5,0	0,0	0,0	100,0	5,6	-
18	20,0	0,0	0,0	100,0	0,2	72,4
19	41,2	0,0	0,0	100,0	-	37,5
20	15,0	0,0	0,0	100,0	13,8	99,7
21	5,0	0,0	0,0	100,0	0,5	-
22	5,0	0,0	0,0	100,0	< 0,1	-
23	65,0	7,7	15,4	76,9	8,0	55,3
24	47,4	11,1	0,0	88,9	3,5	251,8
\bar{X}	23,4	1,9	1,5	96,6	4,8	76,2
SD	20,7	4,0	4,9	7,7	5,4	32,0

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. H. Taraschewski für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes,

Herrn Prof. Dr. Dr. P. Kimmig für für die Übernahme des Koreferats und die Arbeitsmöglichkeit am Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg,

Frau Dr. K. Naser (Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg) für die praktische Einführung in die serologischen Arbeitsmethoden und ihre keineswegs selbstverständliche stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft,

der Arbeitsgruppe am Institut für Zoologie I / Ökologie, besonders C. Haug, Dr. B. Sures und Dr. J. Würtz, sowie den technischen Assistentinnen des Landesgesundheitsamtes, insbesondere Frau D. Bachofer und Frau B. Künzer, für die Unterstützung und das sehr angenehme Arbeitsklima,

Herrn Dr. M.H.T. van der Heijden (Landbau-Universität Wageningen, Niederlande) für die zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper und hilfreiche Diskussionen,

Herrn Prof. Dr. H.G. Heumann, der es mir ermöglichte, das Epifluoreszenzmikroskop am Botanischen Institut I zu nutzen,

Herrn Dr. M. Huwer (Tierhygienisches Institut, Freiburg) für die bakteriologische Kontrolluntersuchung der Versuchsaale,

Herrn Dr. P.-J. Enzmann (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen) für hilfreiche Diskussionen,

dem Anglerverein Karlsruhe e.V., insbesondere Herrn Schwarz, für die tatkräftige Unterstützung beim Fang der Copepoden,

Herrn Dr. G. Kuhn, Herrn J. Decker und Herrn P. Roth für die Überlassung von Aalen bzw. Aaleingeweiden.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die meine Arbeit während der vergangenen Jahre hilfreich unterstützt haben.