

Flavobakterien und Forellen – Erkenntnisse aus dem Bakteriosen-Projekt

Januartagung für Fischhaltung und Fischzucht am
19.01.2022

Peter Steinbauer¹, Marcus Zielasko¹, Gregor Schmidt²

¹ Abt. Fischgesundheitsdienst des Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.

² Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Starnberg

Gefördert aus Mitteln des Freistaates Bayern durch das Bayer. Staatsministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie der Fischereiabgabe.

Forschungsvorhaben

„Bakteriosen bei Nutzfischen“

- Gefördert durch das bayerische StMELF aus Mitteln der Fischereiabgabe des Freistaates Bayern
- Laufzeit: Juni 2017- November 2019

Beteiligte:

- Kooperationspartner: Institut für Fischerei, Gregor Schmidt
- Molekularbiologische Untersuchungen: PD Dr. habil. Verena Jung-Schroers, Tierärztliche Hochschule Hannover



Übersicht



- Projektidee und Zielsetzung
- Flavobakterien – kurze Einführung
- Flavobakterien – die wichtigsten Ergebnisse
- Fazit und Erkenntnisse aus der Anwendung der Ergebnisse in der fischmedizinischen Praxis

I. Ausgangslage und Projektidee

Wie kam es zum Projektidee



- Immer häufiger auftretende bakteriell bedingte Bruthausprobleme, verbunden mit geschwürigen Hautentzündungen bei Brut und Setzlingen
- Unbefriedigende bakteriologische Ergebnisse, insb. bei Flavobakterien mittels herkömmlicher biochemischer Methoden
- Erfassung von allen relevanten pathogenen bakteriellen Erregern essentiell für die Therapie-Entscheidung bzw. weiteres Management
- Möglichkeit der Nutzung der MALDITOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

Bakteriosen bei Nutzfischen – Zielsetzungen gesamt

- Verbesserung der Diagnostik auf allen Ebenen (Probenahme, kulturelle Anzucht, Resistenzverhalten, Differenzierung)
- Einsatz der MALDITOF-MS (Protein-Fingerabdruck, „Proteomanalyse“ Fa. Bruker)
- Interpretation von bakteriellen Mischinfektionen / unspezifischen Keimgehalten
- Resistenzverhalten von fakultativ pathogenen Keimen der aquatischen Umwelt
- Fütterungsversuche mit funktionellen Futtermitteln

- Flavobakterien-Komplex:
 - welche Spezies sind nachweisbar und welche sind als pathogen einzustufen
 - Ansteckungsquellen und Übertragungswege
 - Identifizierung von krankheitsbegünstigenden Faktoren
 - > Etablierung entsprechender Management- und Prophylaxe-Maßnahmen

II. Flavobakterien – kurze Einführung

Flavobakterien - Steckbrief

- Familie *Flavobacteriaceae*
- laut Literatur 3 Hauptpathogene: *F. psychrophilum* (=F.p.), *columnare*, *branchiophilum*
- weitere *Flavobacterium* spp. und *Chryseobacterium* spp. (=Flavo spp.), Pathogenität (?)

F. p. als Auslöser von:

- Forellen-Brutsyndrom (RTFS, rainbow trout fry syndrome)/
Kaltwasserkrankheit/Sattelkrankheit

F.p.-Infektion – äußerlich erkennbare Befunde

- Hautrötungen/Hautgeschwüre, oft „wie ausgestanzt“
- Flossenläsionen
- Gewebsverluste, Flossenfraß





- Entzündungen und Gewebsverluste im Kieferbereich
- abstehende „ausgeklappte“ Zungenbeine (v.a. bei Bach- und Seeforellenbrütlingen)

- blasse Kiemen, Anämie
- Milzschwellung, oder unscharfe Milzränder
- selten: Flüssigkeit in der Bauchhöhle



III. Ergebnisse

Projektteil Flavobakterien - Fragestellungen

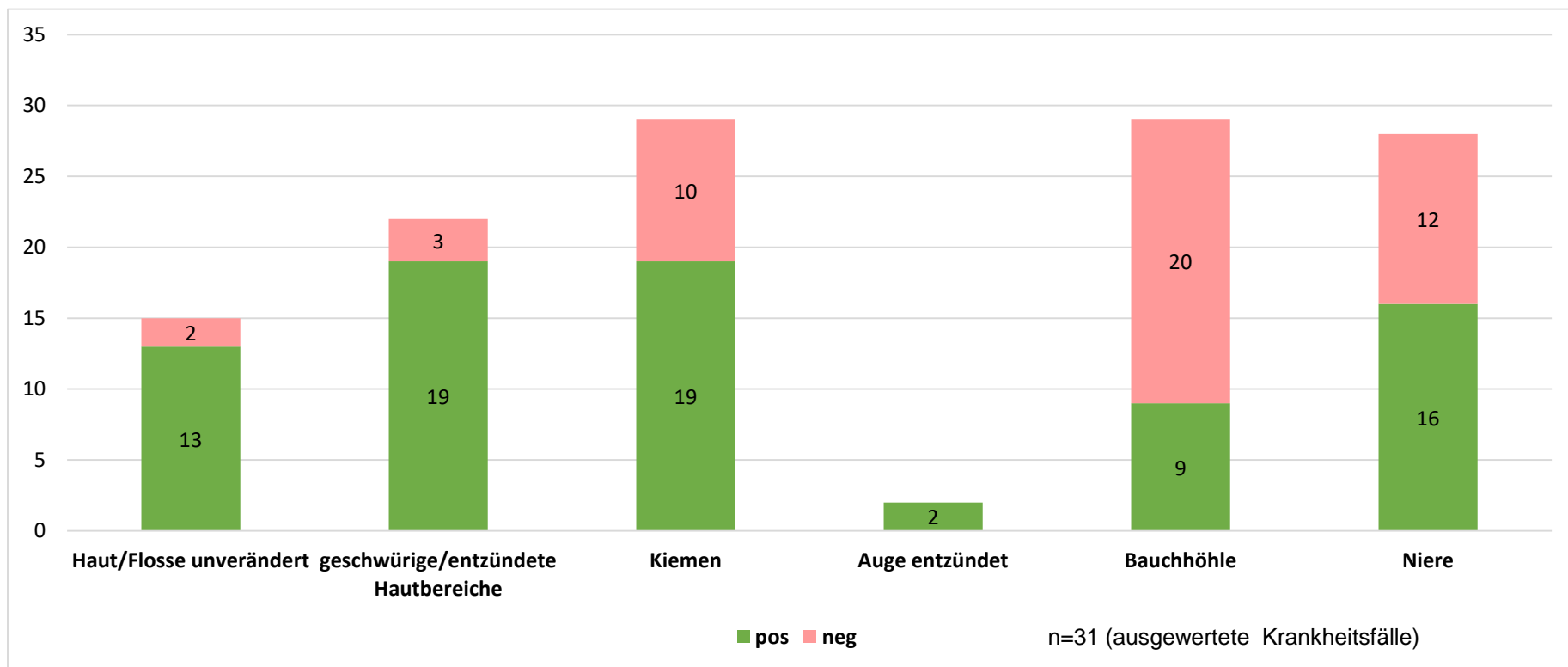


- Wo am Fisch sind Flavobakterien zu finden?
➔ Beprobung nach einem festgelegten Schema („Flavobakterien-Schema“)
- Welche Rolle spielen die Flavo spp.
- Überprüfung der MALDITOF-Ergebnisse mittels 16S-rRNA-Sequenzierung
- Erregerverbreitung/Infektionsherde (Laichprodukte, Haltungsumfeld)
- Verlaufsuntersuchungen während der Aufzucht in 2 Betrieben

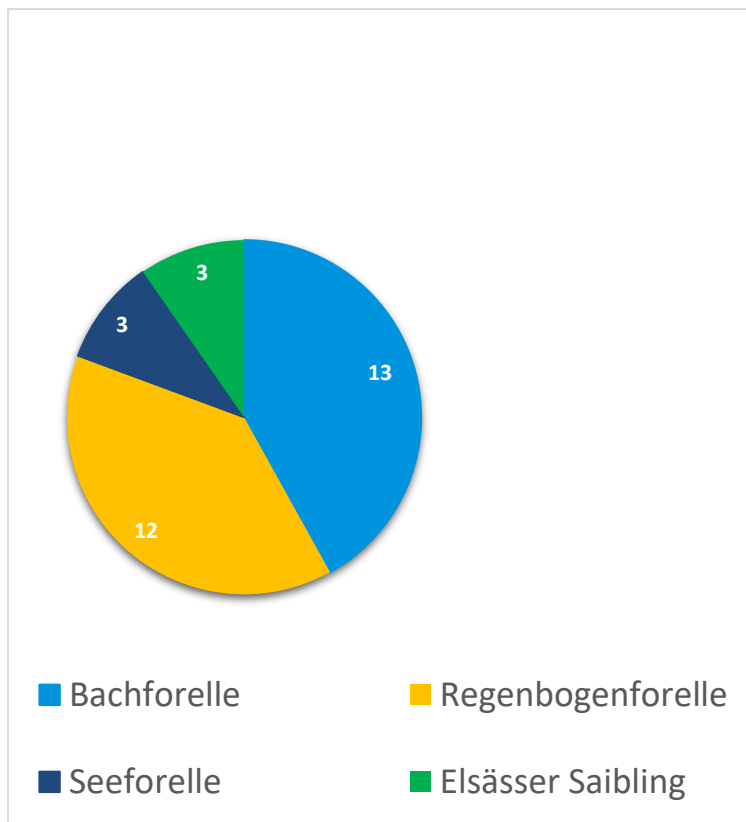
Lokalisationsvergleich der kulturellen Nachweise von *F. psychrophilum*



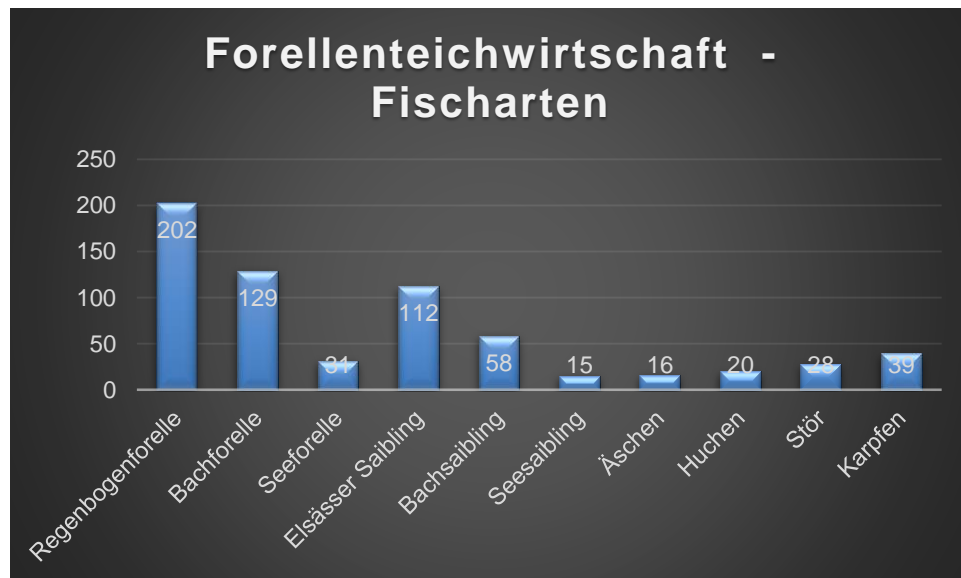
Äußere Lokalisationen	Haut/Flossen unverändert	geschwürige/entzündete Hautbereiche	Kiemen	Auge (bei Entzündung)
Innere Lokalisationen	Bauchhöhle	Niere	-	-



Flavobacterium psychrophilum – Infektionen - betroffene Fischarten



n=31 (ausgewertete Krankheitsfälle)



FGD-Betriebe: gehaltene Fischarten in der Forellenteichwirtschaft (Mehrfachnennungen möglich); 2020: 224 Betriebe, 380 Projektbesuche

Andere Fischarten? Vereinzelte Nachweise bei Stören, Elritzen etc.

Überprüfung der MALDITOF-Ergebnisse mittels 16S-rRNA-Sequenzierung



Genus Flavobacterium		Genus Chryseobacterium	
MALDITOF-MS (TGD)	16S-rRNA-Sequenzierung (TiHo)	MALDITOF-MS (TGD)	16S-rRNA-Sequenzierung (TiHo)
96 Nachweise	60 Isolate untersucht	55 Nachweise	35 Isolate untersucht
11 Spezies	22 Spezies	7 Spezies	9 Spezies
saccharophilum	saccharophilum	chaponense	chaponense
hydatis	hydatis	indologenes	indologenes
hibernum	hibernum	scophthalmum	piscis/balustinum
piscis	piscis	piscium	panacis
plurextorum	plurextorum	oranimense	vietnamense
flevense	tractae	oncorhynchi	haifense
pectinovorum	branchiarum	sp.	yeoncheonense/aahli/ limigenitum
oncorhynchi	branchiicola		indotheticum
araucanum	collinsii		antarcticum
johnsoniae	sinopsychotolerans		
gelidilacus	glacieie		
sp.	frigidimaris		
	succinicans		
	chungonense		
	hydrophilum		
	terriphilum		
	limicola		
	micromati		
	aquidureense		
	cerinum		
	fluvii		
	algicola		

Übereinstimmungen der beiden Methoden			
	F. psychrophilum	Genus Flavobacterium	Genus Chryseobacterium
Überprüfte Isolate	60	60	35
Gattung bestätigt	57	55	34
Spezies bestätigt	56	6	25
Abweichend	4	54	10

Flavobacterium spp. -Bewertung



- Nachweise mehrheitlich in + bis ++ Keimgehalten und sowohl in klinisch auffälligen Beständen als auch in klinisch unauffälligen, verlustfreien
- Äußerlich (Haut oder Kiemen): häufige Nachweise, mit + bis ++, selten +++ Gehalten
- Innerlich (Bauchhöhle, Niere): bis auf eine Ausnahme (++) maximal +
- Lokalisation Niere: nur in 1 Fall überhaupt ein Nachweis (*F. gelidilacus*, +), ansonsten keine Flavo spp. nachweisbar; in keinem Fall waren *Chryseobacterium* spp. nachweisbar (!)
- selten als primäre Krankheitserreger anzusehen, in den meisten Fällen sekundär bzw. Co-Infektionen?
- bei klinisch gesunden Beständen möglicherweise als Teil der normalen Keimflora der Kiemen und der Haut anzusehen

Untersuchung von Laichprodukten – PCR-Untersuchungen auf F.p.



Fischart/ Streif-Zeitraum	Anzahl Rogner	F.p. – PCR	Anzahl Milchner	PCR-Resultat
RF/2017	30	1x schwach positiv	16	negativ
BF/2017	10	negativ	5	negativ
BS/2017	20	negativ	-	
Ä/2018	10	1x zweifelhaft	-	
RF/2018	23	18x positiv *	-	

* andere Methodik

RF: Regenbogenforelle, BF: Bachforelle, BS: Bachsaibling, Ä: Äsche

Laichfischbeprobungen - Ergebnisse der kulturellen Anzucht



	F. p.	Flavo spp.	andere pathogene Bakterien	andere fakultativ pathogene Bakterien
Nachweise bei Laichprodukten, Haut bzw. Kiemen	keine (!)	<i>F. hydatis</i> <i>F. flevense</i> <i>F. araucanum</i> <i>F. saccharophilum</i> <i>F. pectinovorum</i> <i>F. johnsoniae</i> <i>F. plurextorum</i> <i>F. piscis</i> <i>F. hibernum</i> <i>C. piscis</i> <i>C. scophthalmum</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas sobria</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> <i>Acinetobacter iwofii</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia fonticola</i>

F.: *Flavobacterium*; C.: *Chryseobacterium*

Laichfischbeprobungen - Fazit



- In Ovarialflüssigkeit bzw. Sperma konnten F.p. (PCR), *Flavo* spp sowie weitere (fakultativ) pathogene Bakterien nachgewiesen werden
- Der vertikale Übertragungsweg über die Laichprodukte ist ein grundsätzliches potentiell Übertragungsrisiko für die Weitergabe von Pathogenen von den Elterntieren auf die Nachkommenschaft.
- bewiesenermaßen führen selbst mehrmalige Ei-Desinfektionen nicht in jedem Fall zu einer vollständigen Abtötung von fischpathogenen Bakterien
 ➔ über Ei(hülle) Übergang auf die Folgegeneration
- selbst die Einhaltung strengster Biosicherheitsmaßnahmen im Brutbereich kann nicht 100% vor der Einschleppung von (bakteriellen) Fischpathogenen schützen (andere Beispiele: BKD, IPN)

Verlaufsuntersuchungen während der Brutaufzucht in 2 ausgewählten Betrieben

- Fragestellung: ab wann und in welchen Phasen (frühzeitig bereits vor dem Auftreten von Verlusten?) sind Flavobakterien nachweisbar?
- Auswahl von 2 Betrieben, in denen F.p. bereits in der Vergangenheit im Betrieb nachgewiesen wurde
- Untersucht wurden Regenbogen-, Bach- und Seeforellen
- Beginn der Beprobungen: Mitte Januar (Betrieb A) bzw. Ende Januar (Betrieb B), im 14-tägigen Turnus, ab Spätsommer anlassbezogen
- Welche weiteren bakteriellen Erreger oder Parasiten waren nachweisbar?

Verlaufsuntersuchungen – die wichtigsten Ergebnisse



- Bereits 5 Wochen (RF) bzw. 8 Wochen (BF) nach der Anfütterung war F.p. (+ bis ++) im Bestand nachweisbar (verlustfrei und klinisch unauffällig); Nachweisrate + bis ++
- Bei den Seeforellen war F.p. nach 7 Monaten bei klinisch auffälligen Fischen nachweisbar (++++)
- Nachweisrate bei klinisch auffälligen, erkrankten Beständen ++ bis +++
- In einigen Fällen waren zusätzlich *A. salmonicida* bzw. andere fakultativ pathogene Erreger (Mischinfektionen) nachweisbar
- Krankheitsausbrüchen gingen stets Manipulationsmaßnahmen (Um/Aussetzen, Sortieren, Chargen zusammenführen)
- Ektoparasiten waren nur vereinzelt nachweisbar und haben in diesem Fall keine Rolle gespielt
- Nicht in jedem Fall einer Hauterkrankung war zwangsläufig F.p. beteiligt (*A. salmonicida*, Mischinfektionen); relevant für die Therapieauswahl (!)

IV. Erkenntnisse aus der täglichen Arbeit

Erkenntnisse aus der Anwendung der Projektergebnisse in der täglichen Arbeit

- ist F.p. die primäre Krankheitsursache, können sie zuverlässig und in hohen Befallsgraden (Flavobakterien-Schema) nachgewiesen werden
- mittlerweile ist F. p. der häufigste bakt. Krankheitserreger in der bayerischen Forellenteichwirtschaft
- mehrmalige Infektionen pro Jahrgang sind mittlerweile leider häufig
- beinahe ubiquitäre Verbreitung in den Teichwirtschaften feststellbar
- mittlerweile ganzjährig auftretende Krankheitsfälle, auch bei Temperaturen $> 14\text{ °C}$ „psychrophil“? Verschiebung der Problematik vom Bruthaus in Richtung Außen-Teiche
- Setzlinge sind bis 120g Schnittgewicht betroffen, als Sekundärerreger (z.B. Erdbeerkrankheit) auch bei Speisefischen (!) nachgewiesen
- die eingesetzten Therapeutika sind gut wirksam
- andere Flavo spp. werden regelmäßig nachgewiesen, i.d.R. Kiemen oder Haut; Sekundärerreger (?)
- die Symptome ähneln oft der Furunkulose; auch Doppelinfektionen sind möglich

Danksagung



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

- Projektförderung durch das StMELF aus Mitteln der Fischereiabgabe des Freistaates Bayern (LFV, Förderbeirat, Dr. Reinhard Reiter, StMELF)
- Bernhard Feneis, VDBA, ehemals FGD
- Dr. Helmut Wedekind, IFI Starnberg
- den Mitarbeitern der Bakteriologie des TGD Bayern e.V.
- PD Dr. Verena Jung-Schroers (TiHo)

veröffentlicht im Fischer & Teichwirt
Ausgabe 11/2020: Bakteriosen Teil I
Ausgabe 12/2020: Bakteriosen Teil II