

*Gesprek met viroloog prof. dr. Just M. Vlak
over WSSV en de immunologische weerstand van een garnaal*

Hoe - naar modern inzicht - een garnalenkwekerij op te zetten?

door Sietze Leenstra en Jos Scheerboom

Garnalen missen het immuunsysteem zoals vertebraten dat kennen. Toch zijn garnalen in staat in zekere mate weerstand te bieden aan virussen. Dit werd duidelijk na 'vaccinatie' tegen het 'White Spot Syndrome Virus' (WSSV), de veroorzaker van het 'witte vlekken-syndroom': vaccinatie tegen WSSV bood geen totale bescherming tegen virusinfecties. Een ondernemer die van plan is in de tropen garnalen te kweken, doet er daarom goed aan van meet af aan strikte hygiënemaatregelen in acht te nemen. Immers, WSSV veroorzaakte wereldwijd op garnalenkwekerijen een economische schade van 2-4 miljard US \$.

Hierover en over de strategie die een garnalenkweker dient te bewandelen om een uitbraak van virus te voorkomen spraken wij met viroloog en emeritus hoogleraar prof. Just M. Vlak.

Enige karakteristieken van een virus

Prof. Just Vlak: 'WSSV is een van de grootste virussen die wij kennen (zie figuur). De genetische informatie is vervat in

DNA-streng met ca. 300.000 basenparen (de kleinste bacterie bevat ca. 600.000 basenparen). Het grote verschil tussen een bacterie en een virus is dat een bacterie in staat is tot synthese van eiwitten en ATP, iets waartoe een virus niet in staat is. Om zich te kunnen vermenigvuldigen is daarom een virus geheel afhankelijk van een ander levend organisme. Doordat een virus niet in staat is eiwit- en ATP te synthetiseren, is het ook niet mogelijk virusinfecties met AB (antibiotica) te bestrijden.

Wij mogen stellen dat een virus onlosmakelijk met (hoger ontwikkeld) leven is verbonden; niet alleen is het voortbestaan van een virus afhankelijk van 'hoger ontwikkeld' leven, elk 'hoger ontwikkeld' leven, ook elke insecten- en kreeftensoort, of een garnaal, draagt een eigen virus met zich mee. Omdat de insecten- en kreeftenwereld nog maar nauwelijks in kaart is gebracht en wij slechts beschikken over globale schattingen van het aantal werkelijk aanwezige diersoorten, betekent dit dat wij er rekening mee moeten



Prof. dr. Just Vlak op zijn kantoor in Wageningen Noord



Tijdens het interview

houden dat deze wereld honderdduizenden verschillende soorten virussen herbergt, die - als de omstandigheden hiertoe aanleiding geven - tot ontwikkeling kunnen komen. Virussen kunnen gemakkelijk muteren en naar een andere diersoort 'overspringen'. Hierdoor vormen zij continu voor zowel mens als dier een gevaar; zij kunnen een levensbedreigende pandemie veroorzaken. Wat dit betreft - de geschiedenis van mens en dier laat dit ook zien - hebben virussen zich laten gelden als opportunistische en meedogenloze killers.

Virussoorten verschillen in het vermogen om buiten het lichaam van de gastheer te overleven. Er zijn virussen die slechts een paar uur buiten de gastheer kunnen overleven, zoals het mond- en klauwzeer (MKZ)virus (voor koeien en varkens). Andere virussen blijven langer infectieus, bijvoorbeeld in een vochtige omgeving. Zo weten de Brabantse boeren uit ervaring dat het MKZ-virus zich op een mistige ochtend gemakkelijk via de lucht kan verplaatsen van bedrijf naar bedrijf'

Slapend in dragers

'Normaal leiden virussen in een gastheer een 'slapend' bestaan. Zodra de leefomstandigheden gunstig zijn (als de

leefomstandigheden van de gastheer zijn gewijzigd waardoor de immunologische weerstand van de gastheer is verminderd), komt het virus binnen de drager tot vermenigvuldiging en wordt voor zowel gastheer als andere organismen infectieus.

Van nature komen garnalen in Azië voor in mangrovegebieden. Als de omstandigheden ecologisch gezien in evenwicht zijn, blijven virussen hier 'slapend' aanwezig en zullen zij zullen niet tot een voor de gastheer dodelijk verloopende vermenigvuldiging komen. Dat is voor een virus ook de beste strategie, want de dood van een gastheer is immers ook het eind van het bestaan voor het virus. De gastheer zo lang mogelijk in leven houden met hierin een 'slapend' verblijf leiden is daarom voor een virus de beste strategie tot overleven:

Men mag ook uitbraken van een virus verwachten, als de leefomstandigheden voor de gastheer verslechteren.

Voor garnalen verslechteren de leefomstandigheden, waarbij men een uitbraak van een virus mag verwachten, als er veranderingen optreden in de volgende omstandigheden:

- de dichtheid waarbij garnalen worden gehouden
- aanwezigheid van andere organismen, die als 'dragere' fungeren

- de zuurgraad en de zoutgraad van het water
- de voederomstandigheden
- andere fysieke omstandigheden

Europa heeft het geluk gehad dat het klimaat voor ontwikkeling van WSSV te koud is om zich er blijvend te vestigen.

WSSV heeft zich ook in Afrika niet kunnen vestigen. Dit komt – neemt men aan - omdat naar Afrika (nog) geen illegale importen van garnalen plaatsgevonden; er wordt hier alleen gewerkt met gecertificeerde garnalen. Men vermoedt – maar ik zeg hier meteen bij dat hier geen bewijs voor is - dat bootvluchtelingen uit Vietnam een rol speelden bij de verspreiding van het virus; zij reisden immers onder erbarmelijke omstandigheden met levende have aan boord; de ideale omstandigheden om een virus te laten ont-



White spots' op een met WSSV besmette garnaal

wikkelen en te laten uitbreken.

Voorbeeld van het creëren van ideale omstandigheden voor een virus

In 1988 verscheen van de hand van Allerd Stikker het boekje 'De prijs van een wonder' (2), waarin de teloorgang van de garnalen-industrie op Taiwan staat beschreven. De bomen leken in de 80-er jaren van de vorige eeuw tot de hemel te kunnen groeien en milieuvervuiling leek nog geen probleem. Garnalenvijvers werden geïntensiveerd en men streefde naar maximale winstmarges. Waterzuivering werd nog niet nodig geacht. Zo werden voor een virus ideale omstandigheden gecreëerd om uit te breken.

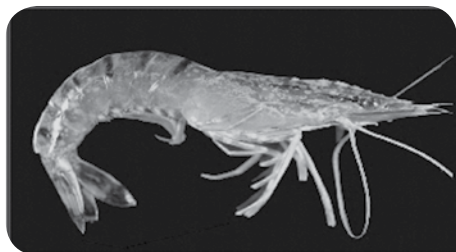
In 1986 implodeerde de voorheen bloeiende garnalenindustrie als een plumpudding: aanvankelijk werd de teelt aangetast door het Baculovirus penaei, later – naar toen bleek - door het 'White Spot Syndrome Virus' (WSSV). Waar het virus oorspronkelijk vandaan kwam, is niet meer te achterhalen, vermoedelijk is het uit China afkomstig.

De 'ontdekking' van WSSV

In 1996 ontdekten wij dat het 'witte vlekensyndroom' wordt veroorzaakt door een geheel nieuw virus, geen 'baculo-virus', een staafvormig virus waar men aanvankelijk van uitging, maar een geheel nieuw virus dat inmiddels is ingedeeld bij de familie der Nimaviridae. Het is bovendien het grootste diervirus dat wij nu kennen: een groot, circulair en dubbelstrengig DNA en op de kop af met 292.967 basenparen.

De optimum temperatuur voor het virus bleek 27o C te zijn, maar ook boven 30o C gedijt het virus goed, evenals bij 24o C.

Omdat garnalen in mangrovebossen leven (leefden), in een hierbij behorend ecologisch evenwicht, vormden uitbraken van virussen bij garnalen voorheen geen groot probleem. Pas nadat garnalen in hoge dichtheden in vijvers werden geteeld,



Tijgergarnaal *Penaeus monodon*, gastheer van WSSV

ontstonden de voor virussen optimale omstandigheden voor groei en ontwikkeling. En WSSV bleek toen de meedogenloze opportunist die leek te wachten op een gunstig moment. Dan kan op een garnalenkwekerij 7 tot 10 dagen na het begin van de uitbraak totale sterfte optreden'

Waarom met WSSV geïnfecteerde garnalen 'witte vlekken' vertonen

Prof. Just Vlak: De 'Witte vlekken' op garnalen ontstaan doordat calcificaties ontstaan als de dieren niet meer in staat zijn Ca^{2+} -ionen weg te pompen: er verschijnen dan op de garnaal (witte) kristallen $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$.

In eerste instantie ging men er van uit dat alleen de garnalensoort *Penaeus monodon* gevoelig is voor het virus. Men is toen op grote schaal begonnen met de teelt van een andere garnalensoort: de Pacifische, witte garnaal *Litopenaeus vannamei*. Men ging er van uit dat *L. vannamei* ongevoelig zou zijn voor WSSV, maar toen bleek deze soort net zo gevoelig te zijn!

Wat moet worden verstaan onder 'zekere' immunologische weerstand van een garnaal tegen virus?

Just Vlak: 'In het proefschrift van Jeroen Witteveldt is de mortaliteit van de garnaal beschreven, als deze na immunisatie wordt blootgesteld aan WSSV (= 'challenge'). Witteveldt toonde aan dat een garnaal, na te

Mensen- en vissenleed dat door een virus werd veroorzaakt

Prof. Just Vlak: 'De mens kent o.a. het herpesvirus dat, als de immunologische weerstand is verlaagd en als het virus slapend in ons aanwezig is, tot vermeerdering komt. De aanwezigheid van het virus blijkt dan uit het verschijnen van een z.g. 'koortslip' of uit zich als 'gordelroos'. Hiernaast kennen we het verschijnsel 'seizoensgriep': in het jaargetijde waarin bij veel mensen de immunologische weerstand is verlaagd, breekt de nieuwste variant van het griepvirus uit. De variant is vaak uit Azië afkomstig, omdat poly-cultuur hier veel voorkomt; mens en dier leven hier nauw met elkaar samen, zodat virussen gemakkelijk kunnen 'overspringen' en 'recombineren'.

Voor de 20e en 21e eeuw komt hierbij dat het internationale verkeer een uitbraak gemakkelijk tot een pandemie maakt. Dat was de eerste dagen na 11 september 2001 duidelijk te zien: men verwachtte toen de uitbraak van een griep epidemie, maar deze bleef uit toen na de aanslag op het WTC en het Pentagon het internationale vliegverkeer was platgelegd. De griep epidemie kwam pas op gang, nadat in het najaar het vliegverkeer werd hervat.

Virussen hebben in het verleden voor zowel mens als dier veel ellende gebracht, zoals bij de uitbraak van de Spaanse Griep na de Eerste Wereldoorlog (het virus was uit Azië afkomstig en vond voedingsbodem in een door een oorlog verzwakte, Europese bevolking; het virus maakte meer slachtoffers dan de oorlogshandelingen van 1914-1918. En jaarlijks moeten nu ouderen en immunologisch zwakkeren onder ons met een 'griep prik' worden beschermd tegen een mutant van het griepvirus.

Bij rundvee- en in de varkenshouderij kennen wij regelmatig uitbraken van MKZ en vlisters weten dat zij alert dienen te zijn voor uitbraken van VHS, IPN en IHN bij forel, KHV bij karper en 'Red Spot Disease' bij paling.

Eerste enting tegen een virus: die tegen pokken

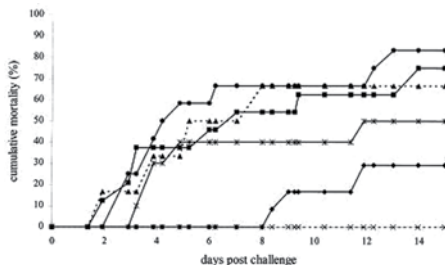
Journalist Simon Rosenthal (van Elsevier weekblad) herinnerde ons (in de uitgave van 26 november 2011) aan de eerste vaccinatie tegen (naar pas later bleek) een griepvirus. De Engelse plattelandarts Edward Jenner voerde deze rond 1800 uit tegen pokken:

'Jenner constateerde dat melkmeisjes minder vaak pokken kregen. Hij kwam toen tot de gedachte dat die meisjes via de uiers in contact kwamen met de virussen die koepokken veroorzaakten en dat deze besmetting hen beschermde tegen menselijke pokken.

Hij haalde uit de pokken van koeien pus en entte daar mensen mee in. In de term 'vaccinatie' leven de koeien van Jenner voort (la vache in het Frans en 'vacca' in het Latijn). Het was een groots idee en het werkte: de pokken waaraan ca. 10 % van de bevolking stierf, werd de eerste virale infectie die is uitgeroeid. Maar het was een schokkende ingreep:

Het injecteren van koeienpus in de bloedbaan van gezonde mensen! En dat in een tijd dat medici en wetenschappers eigenlijk nog niets van bacteriën, virussen en besmettelijkheid begrepen. Vermoedelijk zou het vandaag de dag niet meer zo gemakkelijk kunnen; het vaccin zou niet op de markt mogen worden gebracht, omdat het onvoldoende in dubbelblinde, placebogecontroleerde klinische trials was getest'

zijn geïmmuniseerd, over een kort geheugen beschikt. Als de garnaal is geïmmuniseerd, geeft een 'challenge' met WSSV die 7 tot 11 dagen later wordt aangebracht, een duidelijk lagere mortaliteit. Hierbij werden de garnalen geïmmuniseerd via het voer. Bijgaande grafiek laat de mortaliteit van de



geïmmuniseerde garnalen zien, nadat zij aan WSSV waren blootgesteld. De conclusie is dat een garnaal in ieder geval beschikt over een korte termijn geheugen zoals ook insecten dit hebben. Deze immunologische afweer is wel onvergelijkbaar met het systeem waarover vertebraten (vissen en warmbloedige) kunnen beschikken. Met het 'korte geheugen' is een garnaal in ieder geval in staat 'zekere weerstand' te bieden aan virusinfecties.

(in het hierbij geplaatst kaderstukje wordt ingegaan op de bevinding van Jeroen Witteveldt)

Sietze Leenstra: 'Just, hoeveel dissertaties en afgestudeerden heb je afgelopen jaren mogen begeleiden?'

Het antwoord, na enig nadenken: 'Over WSSV zijn nu vijf proefschriften geschreven waarbij ik als promotor mocht optreden, aan nog eens 3 dissertaties wordt nog gewerkt. De recente proefschriften worden geschreven vanuit de epidemiologische invalshoek: hoe ontstaat een virus epidemie onder garnalen en hoe kan men dit voorkomen? Verder hebben een 30-tal studenten door aan het virus te werken een afstudeervak bij mij gedaan'

Hoe zou naar het nieuwste inzicht een professionele garnalenkwekerij moeten worden opgezet?

Prof. Just Vlak: 'Als men een garnalenkwekerij wenst op te zetten, dient de ondernemer continu rekening te houden met de

Jeroen Witteveldt beschreef op pag. 123 van zijn proefschrift (1) hoe hij garnalen tegen WSSV immuniseerde:

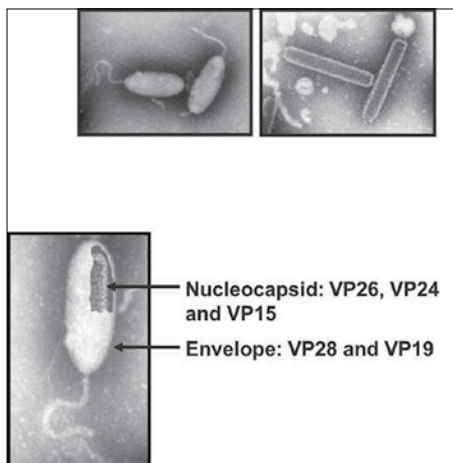
'Het succes van vaccinatie valt of staat met het opwekken van een immuunrespons en immunologisch geheugen, gereguleerd door het adaptief immuunsysteem. Helaas hebben garnalen, net als alle andere ongewervelde dieren, ogenschijnlijk geen adaptief immuunsysteem, met als gevolg dat vaccineren in garnalen wellicht niet zal werken.

Ondanks dat zijn er de laatste jaren verschillende fenomenologische aanwijzingen naar voren gekomen die op de aanwezigheid van afweersystemen in ongewervelde dieren wijzen, analoog aan die van gewervelde dieren. Met dit in het achterhoofd zijn tijdens het onderzoek experimenten uitgevoerd om vast te stellen of garnalen via vaccinatie toch tegen WSSV kunnen worden beschermd. De eiwitten VP28 en VP19 (envelop-eiwitten) werden geselecteerd als belangrijkste kandidaten voor vaccinatie- en challenge-experimenten.

Om een gecontroleerde en reproduceerbare toediening van antigeen en virus te waarborgen werd voor de eerste vaccinatie en challenge experimenten voor injectie van garnaal gekozen. Injectie met recombinant VP19 gefuseerd met het maltose-bindingsproteïne (MBP) of een combinatie van MBP-V19 en His-VP 28 (V 28 met een histidinstaat) resulteerde in een significante daling en vertraging van mortaliteit na een challenge met WSSV. Dit duidt op een mogelijke rol van VP 19 in de systemische afweerreactie van de garnaal.

Echter: de gebruikte injectietechniek is in een kweeksituatie onpraktisch en onbruikbaar. Vandaar dat de mogelijkheid om via orale vaccinatie van dezelfde eiwitten garnalen te beschermen is getest. P. monodon garnalen werden gevaccineerd door het aanbieden van voerkorrels bedekt met geïnactiveerde bacteriën die VP19 of V28 tot overexpressie brengen. Om een natuurlijke infectieroute na te bootsen en het virus bloot te stellen aan het gehele immunologische repertoire van de gastheer werden de garnalen via immersie in zeewater 'gechallenged'. Wanneer de challenge drie dagen na de zevendaagse vaccinatieperiode werd uitgevoerd, resulteerde vaccinatie met VP28 in een significant lagere mortaliteit vergeleken met bacteriën zonder VP29 (RPS van 61 %), terwijl vaccinatie met VP19 geen significant verschil met de controles liet zien.

Om ook bij deze vaccinatiemethode het begin en duur van het vaccinatiegeheugen vast te stellen werden garnalen drie, zeven en eenentwintig dagen na vaccinatie 'gechallenged' met WSSV. Een significant hogere overleving werd gevonden wanneer de 'challenge' drie tot zeven na vaccinatie plaatsvond. (RPS van resp. 64 % en 77 %); bij een 'challenge' eenentwintig dagen na vaccinatie was het effect gereduceerd tot een RPS van 29 %. Deze resultaten duiden wederom op de aanwezigheid van een specifiek immuunrespons en de mogelijkheid tot het verhogen van de overleving van de garnalen via vaccinatie, na infectie met 'WSSV'.



Microscopische afbeelding van WSSV

mogelijkheid dat tijdens de teelt een voor garnalen dodelijk verlopende virusinfectie uitbreekt.

Om dit te voorkomen is nodig:

Zo nodig: een vijver vooraf desinfecteren met een chloormiddel.

Ga uit van gegarandeerd virusvrij uitgangsmateriaal, dus van SPF ('Specific Pathogen Free') gekweekte dieren, zoals wordt geleverd door gecertificeerde kwekerijen of door kwekerijen op Hawaï.

De voor de garnalenteelt in te richten vijver dient vrij te zijn van pathogenen. Men dient hierbij speciale aandacht te besteden aan krabben en polychaeten die, indien aanwezig, dragers, dus bronnen, kunnen zijn van virus.

Het water dat men op de kwekerij inneemt, dient vrij te zijn van ziekteverwekkers.

Regelmatig dient men te controleren op de afwezigheid van virus.

Kweek zo mogelijk garnalen in een zo kort mogelijke cyclus (binnen ca. 3 maanden). Een korte verblijftijd verkleint immers de kans op een dodelijk verlopende uitbraak van een virus.

Hoe hoger de dichtheid, hoe groter de kans op een infectie

Breng rond de vijvers van de kwekerij 'fences' aan, dus gaas- of hekwerk, zodat vogels niet in de gelegenheid zijn met poten en veren pathogenen over te brengen (ook honden en kikkers zijn hiertoe goed in staat, J.S.)

Ten slotte: Selectie op resistentie,

Prof. Just Vlak: 'Omdat uit ons onderzoek bleek dat vaccinatie van garnalen tegen VSSV slechts beperkt bruikbaar is, rest de garnalensector alleen maar (langdurige) selectie op resistentie. Het is echter nu nog te vroeg om aan te geven welke mogelijkheden de selectie op weerstand biedt; er zijn namelijk te weinig bedrijven die in een selectieprogramma kunnen participeren. Bovendien zal uitvoering van dit programma zeker een 10 tot 15 jaren duren.

Sietze Leenstra eindigde de reportage met een dankwoord: 'Om het betreffende onderzoek te doen slagen was heel wat extra en nieuw werk nodig van het team van De Haar Vissen/WUR. Wij wisten immers niets van garnalen af maar mede door ons netwerk hebben wij voor het onderzoek goede resultaten kunnen bereiken. Zo was het een groot probleem om de garnalen vanaf 3-5 PI (postlarvale stadium) te laten groeien maar wij hebben resultaten kunnen boeken door met name de adviezen van Job Munten en de medewerkers van Coppens, die ons de goede voeders hebben geleverd'

Met dank aan prof. Just M. Vlak voor het kritisch nalezen van de tekst

Literatuur:

- Jeroen Witteveldt. On the vaccination of shrimp against white spot syndrome virus (2006). Proefschrift WUR.
- Allerd Stikker. De prijs van een wonder. Uitgeverij Bres (1986)