

Oorzaak massale sterfte marien gekweekte regenboogforellen

door R.W.A. Oorschot, G.H.R. Booms, T. Latscha en J.H. Boon

Deze publikatie is met goedkeuring overgenomen uit het 'Tijdschrift voor Diergeneeskunde', deel 120, aflevering 18, 1995.

Visteelt is belangrijk voor de wereldvoedselproductie. Wereldwijd wordt 10^7 ton vinvis geteeld. De zalm neemt daarbij, vooral in Noorwegen, Schotland, Chili en Canada, een belangrijke plaats in. De Nederlandse wateren zijn ongeschikt voor de teelt van zalmen, maar regenboogforellen (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) kunnen in ons land wel worden geteeld. De regenboogforel is een zoetwatervis welke zich ook aan een zout milieu kan aanpassen. In Nederland zijn ongeveer 25 bedrijven waar op één of andere manier regenboogforellen worden gehouden, hoofdzakelijk in zoetwater. In de Nederlandse kustwateren wordt de teelt van regenboogforellen bemoeilijkt door de (te) hoge watertemperaturen tijdens de zomerperiode. Boven 17°C wordt bij deze vissen het metabolisme dermate bemoeilijkt dat ze sterven, mogelijk door een auto-intoxicatie met CO_2 (3). Het is toch mogelijk gebleken in het Nederlands marien milieu regenboogforellen tot 600 - 1000 gram te kweken: hiertoe wordt na de zomerperiode gestart met forellen van 150 g, welke vervolgens gedurende 10 maanden in kooien op zee worden gehouden. Na het afmesten met caroteenrijk voer worden deze vissen vermarkt onder de naam 'zalmforel'.

De intensieve manier van houden provoceert, in analogie met intensief gehouden warmbloedige (landbouw)huisdieren, ziekte-uitbraken. Infectieuze componenten spelen in de etiologie hiervan een voorname rol. Berucht zijn septicaemiën ten gevolge van virale - en bacteriële infecties (resp. 8 en 1) (Tabel 1). Bij de verspreiding van deze infecties zijn dieren welke symptoomloos drager zijn, de zo genoemde 'carrier state fish', zeer belangrijk (4,5). Het opsporen van laatstgenoemde vissen wordt bemoeilijkt door verschillen in inzicht met be-

trekking tot de diagnostiek tussen de verschillende betrokken wetenschappers (2). In Nederland is er met betrekking tot de in Tabel 1 genoemde virussen nog weinig onderzocht. In 1993 werd er op geen van de 15 onderzochte forellenproductiebedrijven de aanwezigheid van infectieuze hemapoëtische necrose virus (IHNV) en virale hemorrhagische septicaemie virus (VHSV) aangetoond (niet gepubliceerde gegevens). Eveneens is het voorkomen van IPNV in Nederland nog niet eerder beschreven.

Virus

Virale Haemorrhagische Septicaemia (VHS)
 Infectieuze Pancreas Necrose (IPN)
 Infectieuze Haemopoëtische Necrose (IHNV)

Bacterie

Vibrio spp
Aeromonas spp
Yersinia spp

♦ Tabel 1: Belangrijke infectieuze oorzaken van septicaemiën bij salmoniden

In het onderhavige artikel wordt ingegaan op een uitbraak van acute sterfte van pas aangekochte, marien gehouden, jonge regenboogforellen op een viskwekerij in het zuidwesten van ons land.

Materiaal en Methoden

Viskwekerij

De viskwekerij bevindt zich op het voormalige werkeiland 'Neeltje Jans' in de Oosterschelde. Het wateroppervlak van de viskwekerij bedraagt 450 m², verdeeld over 16 kooien met elk een inhoud van 200 m³. De totale productiecapaciteit van het bedrijf is 25 ton vis/jaar. Het water in het bouwdoek heeft een saliniteit van \pm 29 ppt. Ten tijde van de ziekte-uitbraak was de watertemperatuur 10^o C.

Vissen

Na een periode van leegstand werden van een bedrijf in het zuiden van het land 600 regenboogforellen van \pm 1.000 g en 15.000 regenboogforellen van 150 g gekocht. Dit bedrijf kweekt al jaren regenboogforellen van uitstekende kwaliteit. Eerdere partijen forellen afkomstig van ditzelfde bedrijf bleken zeer goed te kunnen groeien in zeewater. De betreffende vissen werden afgeleverd in 4 groepen welke respectievelijk arriveerden in een periode 0 - 4 weken voorafgaande aan de ziekte-uitbraak (week 40 - 43). De grote vissen kwamen op het bedrijf aan in week 41. De twee categorieën vissen werden direct na aankomst in aparte kooien ondergebracht.

Een week na aankomst van de vis werd gestart met voeren (Trouvit nr.4, Trouw B.V., Putten, Nederland) op een voederniveau van 1.0 % van het vers lichaamsgewicht van de vissen.

Tijdens de onderzochte sterfteperiode werd door de bedrijfsbioloog, in overleg met een dierenarts, besloten een monster van de vissen voor sectie en respectievelijk bacteriologisch- en virologisch onderzoek aan te bieden aan het visziektelaboratorium van de Vakgroep Visteelt en Visserij van de Landbouwniversiteit. At random werden 15 nog levende forel-

len gevangen: 5 kleine forellen uit respectievelijk de 2 kooien met de op dat moment grootste sterfte (kooi 3 en 4) en 5 grote forellen. Na de vangst werden de vissen met een kopslag gedood en vervolgens op ijs naar het laboratorium vervoerd. De tijdsduur tussen het doden van de vis en aankomst op het laboratorium was 1.5 uur.

Postmortaal onderzoek

Direct na aankomst van de vissen werd met het onderzoek aangevangen. Na uitwendige en inwendige inspectie werden van alle vissen de diverse organen volgens de gangbare technieken (4) vrijgeprepareerd, geïnspecteerd en geïsoleerd.

Bacteriologisch onderzoek

Tijdens de sectie werd uit de milt, lever en nier in situ direct op drie soorten voedingsbodems, respectievelijk Tryptase Blood Agar Base (TBAB), Tryptone Soya Agar (TSA) en een specifieke Vibrio voedingsbodem, Brain Heart Infusion Agar (BHIA), geënt. Na een incubatieperiode van 24 uur 30^oC bij werd gestart met de identificatie van de geïsoleerde bacteriën met behulp van het API 20 NE systeem (BioMerieux SA, Lyon, Frankrijk). Tegelijkertijd werd een antibioticagevoeligheidstest (Neo-Sensitabs, Rosco, Denemarken) ingezet (24 uur bij 30^oC).

Virologisch onderzoek

Uit alle vissen werd aan het eind van de sectie nierweefsel genomen, direct op ijs gezet en per expres naar een specifiek viruslaboratorium (Intervet, Boxmeer, Nederland) vervoerd. Binnen 20 uur na de sectie, werden daar niermonsters van de 2 x 5 kleine - respectievelijk 5 grote forellen gehomogeniseerd en virologisch onderzocht. Dit werd uitgevoerd m.b.v. (1) celkweek op de cellijn CHSE-214, bij een temperatuur van 20^oC, waarbij op het cytopathogeen effect werd gelet; (2) ELISA's, met behulp van monoclonale antilichamen (MoAb) tegen respectievelijk IPNV (VP3-specifiek), IHNV en VHSV, op het voorkomen van virusan-

tigeen in de gehomogeniseerde niermengsels en supernatant van positieve celkweken. Deze MoAb's waren afkomstig van respectievelijk Dr. Kristie (Intervet Norbio, Bergen, Noorwegen) en Dr. Lorenzen (National Veterinary Laboratory, Arhus, Denemarken)

Resultaten

Klinische verschijnselen

De kleine forellen stopten in week 42 met voedselopname en vertoonden draaibewegingen om de lengte-as. Bovendien trad er bij deze groep binnen enkele dagen na het begin van de klinische verschijnselen een aanzienlijke sterfte op, welke startte 2 weken na aankomst van de eerste partij forellen (Figuur 1). De volgorde van optreden van de mortaliteit kwam overeen met de volgorde van aankomst per kooi. In de kooien 1 en 2 waren er twee duidelijke pieken te onderscheiden terwijl in de kooien 3 en vooral 4 één mortaliteitspiek (week 46, respectievelijk 47) werd waargenomen. De totale cumulatieve mortaliteit was $\pm 50\%$. De grote forellen vertoonden tijdens de ziekteperiode van de kleine forellen geen klinische verschijnselen en aten gewoon door.

Postmortaal onderzoek

Bij uitwendige inspectie bleken bij enkele kleine forellen ongeveer gulden grote huidulcera aanwezig te zijn. Na opening van de lichaamsholte kwam bij de kleine forellen een gelige vloeistof vrij. Daarnaast werden bij deze vissen puntbloedingen in de lever en het anteriore deel van de intestinae vastgesteld. De lever

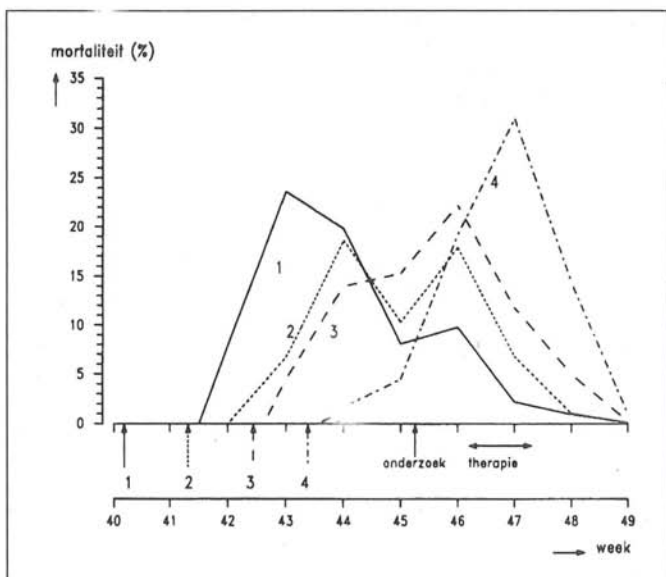
was bovendien te bleek. De milt was bij dezelfde dieren te groot. In de nieren werden kleine bleke haardjes gevonden. Bij alle grote forellen werd een te grote milt met te bolle randen vastgesteld.

Bacteriologisch onderzoek

Uit milt, lever en nier werden na 24 uur bij 9 kleine forellen op de drie voedingsbodems bacteriële reïnculturen gekweekt, welke micro-organismen op grond van de morfologische, culturele en biochemische eigenschappen als *Vibrio parahaemolyticus* konden worden geïdentificeerd. De bacterie bleek gevoelig voor furazolidone, chloramphenicol en flumequine, matig gevoelig voor trimetoprim en resistent tegen ampicilline en penicilline.

Virologisch onderzoek

In de niermonsters van kleine en grote forellen



◆ Figuur 1: Wekelijkse sterfte regenboogforellen (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), gehouden in marien milieu met een temperatuur van 10°C. Sterfte is weergegeven als percentage van het aantal aanwezige dieren. De pijlen 1-4 duiden op het moment van aankomst van de respectieve groepen jonge forellen op het bedrijf.

werd de aanwezigheid van het IPNV type VP3 aangetoond.

Diagnose

Op grond van het mortaliteitsverloop, de klinische verschijnselen, het sectiebeeld en respectievelijk het bacteriologisch en virologisch onderzoek werd de diagnose 'primaire IPNV-infectie met secundaire Vibriosis' gesteld.

Therapie

Naar aanleiding van de gevoeligheidstest werd na consultatie van de lokale dierenarts-prakticus een therapie met Flumequine ingesteld (50 g per kg voer gedurende 7 dagen).

Discussie

Diagnostiek

De diagnostiek van visziekten kan met behulp van dezelfde technieken worden uitgevoerd als de diagnostiek van ziekten van warmbloedige dieren. Men moet echter wel oppassen met het onderzoek van door ziekte reeds gestorven dieren. Door postmortale autolyse gaan bij koudbloedige dieren al zeer snel normale structuren verloren en kan een contaminatie met micro-organismen uit de omgeving (schimmels) en digestie-apparaat (bacteriën) optreden. Hoewel het beter is representatieve levende zieke vissen ter onderzoek aan te bieden, blijkt uit het onderhavige onderzoek dat vers gedode dieren, na een snel transport op ijs naar een laboratorium, nog betrouwbare resultaten op kunnen leveren. In geval van een bacteriële infectieziekte kan in het algemeen binnen 24 uur een voorlopige diagnose worden gegeven, met na nog eens 24 uur de resultaten van een gevoeligheidstest.

De klinische verschijnselen (draaien) en de snelle toename van de sterfte van alleen de kleine forellen in water van 10°C, deden een virusinfectie vermoeden. Aangezien op dit bedrijf de grote dieren (in belendende kooien) vrij van sterfte bleven, neigde de verdenking in de richting van IPNV of IHNV, omdat bij VHSV ook grote forellen kunnen sterven aan sepsis (4). Het virologisch onderzoek bevestigde dit ver-

moeden. De grote forellen bleken wél positief voor het IPN virus maar de infectie werd bij deze groep dieren niet gevolgd door ziekteverschijnselen.

De sepsisverschijnselen welke bij de sectie gevonden werden, kunnen eveneens veroorzaakt zijn door de gediagnostiseerde *Vibrio* infectie (4). Het ziekteverloop is dus een schoolvoorbeeld van een primaire virusinfectie gevolgd door een secundaire bacteriële. Kennelijk heeft de IPNV infectie de kleine forellen dermate verzwakt dat de *Vibrio*'s konden toeslaan. Het is echter niet uitgesloten dat in kooi 4 tijdens de sterftepiek het virus de belangrijkste factor was. Immers er is daar 'maar' sprake van één sterftepiek. Mogelijk heeft de medicamenteuze interventie de expressie van de Vibriosis in kooi 4 voorkomen. *Vibrio spp.* komen overal ter wereld in zout water voor. Ze zijn vaak de oorzaak van ziekte-uitbraken bij allerlei soorten aquatische organismen. Uit zowel vinvis alswel schaal- en schelpdieren worden regelmatig bij ziekte-uitbraken *Vibrio spp.* gekweekt. *V. parahaemolyticus* kan ook bij de mens ziekten, meestal van gastro-intestinale aard, veroorzaken. Het lijkt raadzaam op het onderhavige bedrijf de vis vlak voor verkoop te testen op aanwezigheid van deze bacterie.

Therapie en preventie

Bij de bestrijding van bacteriële visziekten heeft men de keuze uit het gebruik van antibacteriële middelen welke ook in de meer traditionele intensieve dierhouderij worden gebruikt. In het onderhavige geval viel de keus naar aanleiding van de gevoeligheidstest op flumequine. Op grond van de snelle daling van de sterfte na toepassing van de flumequine lijkt dit een goede keus geweest te zijn. Aan het gebruik van antibiotica in de visteelt kleven echter enige bezwaren:

- door herhaalde behandelingen kan resistentie van de betreffende bacteriën tegen de gebruikte middelen optreden, welke bacteriën na consumptie van de behandelde vis het humane circuit kunnen penetreren;
- de gebruikte middelen kunnen, al of niet ge-

deeltelijk en/of gemetaboliseerd, in het oppervlaktewater terecht komen. Resistentie-
vorming van de daar aanwezige micro-organismen, met moeite in te schatten oecologische gevolgen, kan dan het gevolg zijn; ook is er voor sommige antibiotica een suppressieve werking op het immuunsysteem van de vis beschreven (7). Dit kan de vis meer vatbaar maken voor overige infecties.

Bij de preventie van infectieuze visziekten moet gedacht worden aan een streng aankoopbeleid. Het verdient de voorkeur vis aan te kopen van specifiek vispathogeen-vrije bedrijven. Het onderhavige bedrijf moet echter als besmet met IPNV worden beschouwd. Het verdient daarom aanbeveling om op dit bedrijf tot de aankoop van tegen IPNV gevaccineerde vissen over te gaan. Binnenkort zal er ook in Nederland, een effectief IPN-vaccin voorhanden zijn. Commerciële vaccins tegen enkele *Vibrio spp* bij vissen zijn reeds beschikbaar (6). Officieel is het gebruik van antimicrobiële middelen en vaccins in de visteelt in Nederland niet mogelijk omdat er voor vissen geen medicijnen zijn geregistreerd. De betreffende instanties laten echter het gebruik van diergeneesmiddelen, zoals antibiotica, in de visteelt toe.

Epizootiologie

Hoe de IPN-infectie op het bedrijf in zuidwest Nederland is geïntroduceerd is niet helemaal duidelijk. Gedurende de 10 jaar dat er op het onderhavige bedrijf forellen worden gekweekt, zijn er op grond van klinische verschijnselen of post mortaal onderzoek, nooit aanwijzingen geweest voor een IPNV-infectie. Overdracht via wilde en/of ontsnapte 'carrier state' vis is echter niet uit te sluiten, maar infecties van vis met IPNV in Nederland zijn nog niet eerder beschreven. Import via de aangekochte forellen is een andere mogelijkheid. Uit het gelijktijdig uitgevoerd virologisch onderzoek van het forellenbestand van het bedrijf in zuid Nederland waar de forellen van afkomstig waren bleek dat uit deze dieren ook het IPNV virus geïsoleerd kon worden.

Het transport van de vis direct gevolgd door de overgang van zoet naar zout water kan voor de, reeds met het IPNV geïnfecteerde, jonge forellen net te veel zijn geweest. Een infectie met altijd in het water aanwezige (voor)vaardelijk pathogene bacteriën, zoals *Vibrio spp*, wordt dan gevolgd door sepsis en mortaliteit.

Literatuur

1. Austin B. & Austin D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 2nd edn. Ellis Horwood, Chichester.
2. Davis, P.J., Laidler, L.A., Perry, P.W., Rosington, D. & Alcock, R., 1994. The detection of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic carrier fish by an integrated cell-culture and ELISA technique. *J. Fish Dis.*, 17: 99-110.
3. Oorschot, R.W.A. en Boon, J.H., 1993. mortality in of marine cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) during the summer in The Netherlands. *Aquaculture and Fisheries Management* 24 : 191-198
4. Post, G., Textbook of Fish Health, revised and expanded edition, 1987. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey, USA.
5. Yamatomoto, T. en Kilistoff, J. 1979. Infectious pancreatic necrosis virus: quantification of carriers in a lake population during a six year period. *J. Fisheries Board of Canada* 31: 397-402
6. Santos, Y., Bandin, I., Nunez, S. Gravningen, K. and Toranzo, A.E., 1991. Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *J. Fish Dis.*, 14: 407-411.
7. Van der Heijden, M.T.H., Van Muiswinkel, W.B., Grondel, J.L. and Boon, J.H., 1992. Immunostimulating effects of antibiotics. *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality.* (Editors: C. Michel and D.J. Alderman), 219-231.
8. Wolf, K., Snieszko, S.K., Dunbar, C. E. & Pyle, E., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 104: 105-108