

Op de kwekerij en in het laboratorium

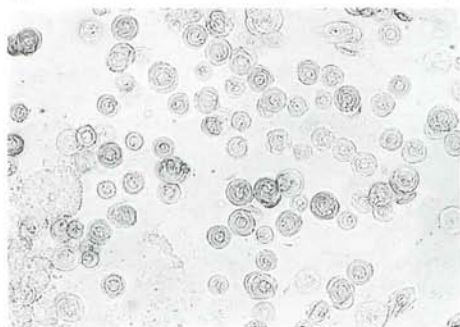
## Zoeken naar de visziekteverwekker

Olga L.M. Haenen, hoofd Visziektenlaboratorium, ID-DLO, Lelystad

Na een reeks van afleveringen over bacteriële visziekten is het hoog tijd om de algemene diagnostiek te bespreken en eens achter de schermen van het visziektekundig lab te kijken. Een aantal ziekten kunnen prima op het visteeltbedrijf zelf worden vastgesteld door de kweker en/of begeleidend dierenarts. Voor sommige problemen is echter nader laboratoriumonderzoek nodig om tot een diagnose te komen. Dit kost tijd en geld, maar meestal kan men uit de diagnose lering trekken ter voorkoming van nog eens die problemen.

### Visziekten

Visziekten kunnen allerlei oorzaken hebben. Zoals Snieszko in 1974 al beschreef is visziekte een samenloop van de omstandigheden waar de vis in verkeert (bijvoorbeeld stress en waterkwaliteit), de conditie van de vis en de ziekteverwekker (parasiet, bacterie, schimmel, virus). Indien je als viskweker de kweekomstandigheden zo optimaal mogelijk houdt en dus vis van goede conditie in je systeem hebt kunnen aanwezige visziekteverwekkers vaak niet eens toeslaan. Als de vis gestresst is of bij-



◆ Een vers afstrijkpreparaat van de huid van paling met massaal de parasiet *Trichodina species* (foto ID-DLO Lelystad).

voorbeeld verzwakt na een koude winter in de vijver kan ziekte wel zijn tol eisen.

### Parasieten

Parasieten komen van nature over de hele wereld in het buitenwater voor. Daar leven ze vaak in een soort evenwicht met de gastheer, de vis. Het zou voor de parasiet ook niet goed zijn, zich te agressief naar de vis toe te gedragen, want dan zou zijn gastheer sneuvelen en hij uiteindelijk dus ook, vanwege gebrek aan voedsel. Op viskwekerijen is echter het evenwicht tussen parasiet en vis vaak weg. Ten eerste worden de vissen daar in veel hogere dichtheden en in monocultuur gehouden en ten tweede vaart de parasiet vaak wel bij het biofilter als nestplek en de hoge watertemperatuur, waarbij hij zich vaak sneller ontwikkelt. Problemen met een overmaat aan parasieten, zoals *Trichodina* (zie foto), komen dan ook regelmatig voor op viskwekerijen.

### Hoe onderzoek je parasieten?

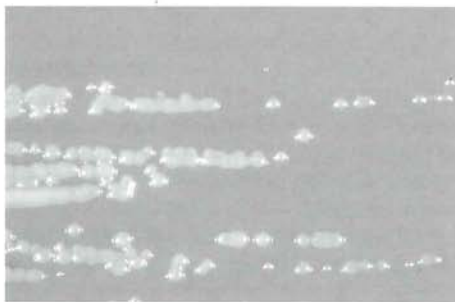
Er zijn allerlei soorten parasieten, van eencellige tot meercellige, van flagellaat tot luis. Parasieten zijn relatief groot en zijn doorgaans met het blote oog of met behulp van een lichtmi-

croscoop te zien. Dit maakt het mogelijk, op het visteeltbedrijf zelf de diagnose te stellen, zonder laboratoriumtesten. Parasieten zitten meestal op de huid, de kieuwen of in de darm, soms in de buikholte of zwemblaas. Een vers huidafstrijkje van de slijmlaag van de vis en een stukje kieuw kunnen direct onder de microscoop bekeken worden op de aanwezigheid van parasieten. Na het openknippen van de buikholte van de vis kan analoog een beetje mest op een objectglaasje worden gebracht en na afdekken met een dekglasje onder de microscoop op parasieten worden gecontroleerd. In de buikholte kunnen zich ook losse parasieten bevinden, zoals lintwormen. En in de zwemblaas van paling de zwemblaasworm, die in volwassen vorm met het blote oog zichtbaar is. De hoeveelheid parasieten per vis is van belang: in de natuur hebben vissen immers ook wel enkele parasieten, zonder dat ze er last van hebben.

Bij het visziektenlab wordt tijdens sectie van de vis ook op parasieten gecontroleerd. In de meeste gevallen is de uitslag hiervan dezelfde dag bekend, omdat het om verse preparaten gaat van de vis. Alleen bij onderzoek naar draaiziekte van jonge salmoniden moeten coupes gemaakt worden van het kraakbeen van de vis. Eerst worden kop en romp gefixeerd in formaline en na enkele dagen worden stukjes ervan in blokjes paraffine ingebed. Met een microtoom worden er dunne coupes van gesneden, die op een objectglaasje worden gebracht en gekleurd, zodat je de verschillende weefsels, in dit geval ook de parasieten, goed kunt onderscheiden. De coupes worden afgedekt met een dekglasje en nader bekeken onder de lichtmicroscoop.

### **Bacteriën en schimmels**

Bacteriën zijn kleine eencellige organismen zonder kern, ter grootte van 200-2000 nanometer, die met de microscoop bij minimaal 200x vergroting te zien zijn. Bij bacteriële aandoeningen vertonen de vissen vaak bloedingen, een opgezette buik met soms schubbenruigheid en hoge sterfte. Het lastige is, dat dit



♦ *Schapenbloedagar met daarop bacteriegroei: elk bolletje is een kolonie, afkomstig van één bacterie oorspronkelijk (foto ID-DLO Lelystad).*

beeld ook wel eens bij virologische aandoeningen voorkomt. Om vast te stellen, wat de oorzaak van de problemen is kan een partij vissen bij een visziektenlab nader worden onderzocht. Daar heeft men de faciliteiten om de ziekteverwekker te kweken en een naam toe te kennen.

Bacteriën komen algemeen in het water en filter voor en ook op de huid van de vis. Is de slijmlaag van de vis intact, dan kan het zich bij een goede conditie verweren tegen de zich hechtende bacteriën. Indien de slijmlaag van huid en kieuwen beschadigd is, bijvoorbeeld als gevolg van het sorteren van de vis, of als er een slechte waterkwaliteit is of andere stress, dan kunnen de al aanwezige bacteriën en andere ziekteverwekkers binnendringen en schade aanrichten.

Schimmels zijn een- of meercellig. Enkele soorten kunnen vissen direct ziek maken, andere vestigen zich meestal pas in tweede instantie op een al aanwezige huidbeschadiging of wond, vaak te zien als watachtige pluizen. Ook bevruchte viseieren kunnen snel door schimmels besmet raken, waardoor de eieren sterven.

### **Onderzoek naar bacteriën en schimmels**

Op het visteeltbedrijf kan men weer door middel van een huid- en kieuwpreparaat en de microscoop vaststellen, of er veel bacteriën en

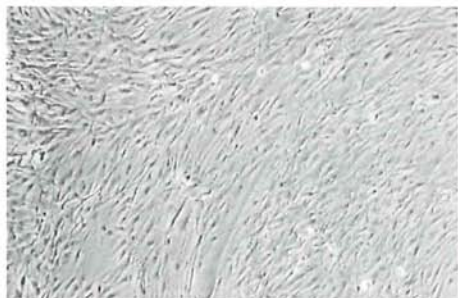
schimmeldraden aanwezig zijn. Uiteraard moet dan ook het 'normaalbeeld' bekend zijn. Dus van gezond ogende vis moeten ook uitstrijkjes worden gemaakt. Dan moet eerst worden nagegaan, of de primaire oorzaak van de problemen ligt in het sorteren, overzetten, transporteren, de waterkwaliteit of een andere stressfactor.

Op het visziektenlab worden ook deze uitstrijkjes gemaakt tijdens sectie. Indien er duidelijke verdenking is op een bacteriële uitwendige en/of inwendige infectie, wordt er wat materiaal van de huid en/of de organen (met name milt, lever en nier) met een steriel wattenstaafje genomen en op een steriele voedingsbodem uitgestreken. Bacteriën hebben de eigenschap, zich snel te delen: een bacterie vormt al gauw een hele kolonie. Na een of meer dagen in de stoof bij 22°C zie je dan ook allerlei kolonies op de voedingsbodem (zie foto). Een kolonie (in feite een kloon) wordt vervolgens in suspensie gebracht en getest op biochemische eigenschappen in zgn. 'bonte rijen'. Dit zijn reeksen van buizen met verschillende groeimedia en een te testen chemisch stofje, zoals druivensuiker of gelatine. Elke bacteriesoort heeft unieke eigenschappen met betrekking tot het omzetten van die stofjes. Ook worden sommige bacteriën gemengd met specifiek antiserum tegen een bepaalde bacterie: als er klontering optreedt herkent de bacterie zijn tegenpool en kan benoemd worden. Na het aflezen van de testen worden de resultaten vergeleken met de gegevens uit de literatuur, zodat de bacterienaam gevonden wordt.

Voor schimmelonderzoek worden op het lab specifieke media gebruikt. Typering gebeurt na aankweken en voornamelijk op basis van uiterlijke kenmerken van de schimmel, met behulp van een lichtmicroscop.

### **Antibiogram: gevoeligheid voor antibiotica**

Van een bacteriekolonie wordt een suspensie gemaakt en deze wordt op een steriele voedingsbodem uitgestreken, waarop vervolgens



♦ Een onbesmette Rainbow Trout Gonad (RTG-2) cellijn zonder virus (foto ID-DLO Lelystad).

kleine viltjes, geïmpregneerd met verschillende antibiotica worden gebracht. Na een dag in de stoof zie je bacteriegroei op de voedingsbodem en soms een grote ring zonder groei rond zo'n viltje. Door nu de diameter van die zgn. remzone te meten kun je bepalen, of de bacterie gevoelig is voor dat antibioticum. De uitslag van de geteste antibiotica wordt na aflezen aan de dierenarts of kweker doorgegeven. Met die gegevens kan eventueel een gerichte visbehandeling worden gestart met antibiotica.

### **Virussen**

Virusdeeltjes zijn een stuk kleiner dan bacteriën: 20-300 nanometer. Ze bestaan grofweg uit ingepakte stukjes DNA of RNA in een bepaalde configuratie, al dan niet met een eiwitkapsel. Virussen kunnen zichzelf niet voortplanten zonder gebruik te maken van gastheercellen. Het is te vergelijken met als de mens verkouden is: het virus maakt gebruik van het erfelijke materiaal uit de slijmvliescellen om zich te vermenigvuldigen en maakt daarmee de cellen kapot, waardoor een snotterreactie ontstaat. Bij vissen kunnen virussen dan ook flinke schade aanrichten: een algemeen kenmerk van virusinfecties is veelvuldige bloedingen doordat de cellen van o.a. wanden en membranen kapot worden gemaakt. Er zijn geen medicijnen tegen virussen bekend. Wel kan een kweker soms de watertemperatuur wijzi-

gen naar een traject waarin minder sterfte optreedt.

### **Virusisolatie**

Virussen zijn niet met een gewone microscoop te zien, maar wel met een elektronenmicroscoop, maar ook dan alleen, als er zeer veel virus in het monster aanwezig is. Voor diagnostiek van virussen kijk je allereerst op het bedrijf naar de ziekteverschijnselen. Daar is allerlei literatuur over en ik zal er in de toekomst in deze rubriek ook nader op ingaan. Naar aanleiding van de ziekteverschijnselen wordt een verdenking op virus of bacterie geuit. Voor virusonderzoek is de kweker aangewezen op een visziektenlab. Virusinfecties in vis worden aangetoond door middel van het kweken van het virus op een vissencellijn. Om virus aan te tonen worden uit grote vissen organen (lever, milt, nier, soms hersenen) verzameld. Van kleine vissen wordt de hele vis minus de staart bemonsterd. Per 10 stuks worden de organen/visjes bij elkaar gevoegd tot een pool. Ook viseieren kunnen getest worden. De pools worden met steriel zand verweven tot een pasta. Deze wordt per pool in een steriel flesje met op de bodem daarvan een cellijn gebracht (zie foto) en bij de optimumtemperatuur van het te kweken virus gedurende 7-10 dagen geïncubeerd (vissoort/virus afhankelijk). Indien virus in de vis aanwezig is gaat het virus zich in de cellen vermeerderen en vernietigt de cellen meestal binnen 7-10 dagen (zie foto). Indien de orgaansuspensie virusvrij was worden de cellen niet vernietigd. Deze cellen worden van de bodem losgemaakt en nogmaals 7-10 dagen in een verse fles met de cellijn getest om te kijken of er alsnog celvernietiging en dus virus aangetoond kan worden. Op het ID-DLO worden standaard 2 vissencellijnen gebruikt: de FHM-cellijn (afkomstig van een karpers) en de RTG2-cellijn (afkomstig van een forel). Voor virusisolatie uit meerval wordt gebruik gemaakt van de BB-cellijn (afkomstig van een meervalsoort). In principe worden vissen getest op virussen, die behoren bij de desbetreffende vissoort. Op aanvraag kan op an-

dere virussen getest worden.

### **Virustypering**

Nadat virus geïsoleerd is dient het virus getypeerd te worden. Dit gebeurt door middel van immunofluorescentie (IFT), immunoperoxidase (IPMA) of door de virusneutralisatie-test (VNT). Daarbij speelt steeds hetzelfde principe: het virus wordt aan specifieke antisera blootgesteld. Bij IFT en IPMA wordt het virus nadat het net een cellijn heeft geïnfecteerd zichtbaar gemaakt door een kleurtje aan dat antiserum te doen (bijvoorbeeld rood, of fluorescerend groen). Bij de VNT wordt het virus door het analoge antiserum gebonden, waardoor het niet meer de cellijn kan vernietigen, terwijl het virus niet met de andere antisera reageert en daarbij wel de cellijn kapot maakt.

### **Tijdsduur van visdiagnostisch onderzoek bij het ID-DLO**

#### *Parasieten:*

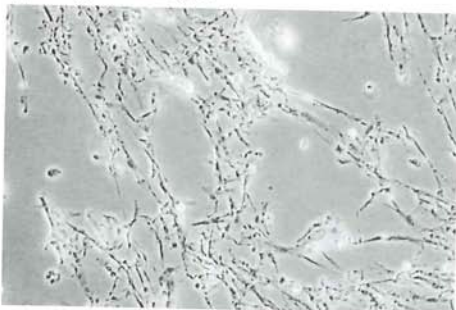
1 dag (behalve voor Myxosoma-onderzoek: ca. 14 dagen)

#### *Bacteriën en schimmels:*

antibiogram (bacteriën): 2-7 dagen, afhankelijk van reinkweek van de bacterie  
isolatie en typering van schimmels en bacteriën: doorgaans 5-30 dagen

#### *Virussen:*

isolatie: 15-30 dagen  
typering: 2-14 dagen



◆ Een met Infectious Pancreatic Necrosis-virus besmette RTG-2 cellijn 5 dagen na besmetting: de cellen worden door het virus vernietigd (foto ID-DLO Lelystad).

Zoals te zien is, duren sommige onderzoeken lang. Zeker, als het virus pas in een laat stadium van het testen zichtbaar wordt door middel van vernietiging van de cellijn is het antwoord aan de kweker pas laat bekend. Dit is een vervelend iets, maar er is weinig aan te doen. Vissen zijn koudbloedige dieren en veel ziekteverwekkende bacteriën moeten bij 22°C worden geïsoleerd waarbij ze traag groeien. Voor sommige visziekten zijn er sneltesten in ontwikkeling internationaal, zoals Polymerase Chain Reaction testen (PCR). Nadeel van deze testen is, dat ze vaak zo gevoelig zijn, dat er vals positieven ontstaan: een vis wordt een bepaalde ziekte toegerekend, die hij niet heeft. Daarom zijn deze testen tot nu toe nog niet internationaal erkend voor keuring van vis bijvoorbeeld. Om zo'n test op te zetten, te valideren en in stand te houden is veel laboratoriumpersoneel nodig en veel vismateriaal uit de praktijk, waarbij de kosten gigantisch oplopen.

#### **Referenties**

- \* Amos, K.H. (1985). Procedures for the detection

and identification of certain fish pathogens. 3rd ed. Fish Health Section, American Fisheries Society, Corvallis, Oregon, 114 p.

- \* Bruno, D.W., Alderman, D.J., and H.-J. Schlotfeldt (1997). What should I do? A practical guide for the marine fish farmer. Eur. Assoc. of Fish Pathol., Marine Lab, Aberdeen, Scotland, 64 p.
- \* Noga, E.J. (1995). Fish disease: diagnosis and treatment. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, 367 p.
- \* Schlotfeldt, H.-J. (1985). Grundlagen der Fisch-pathologie. Verlag Paul Parey, Berlin, 425 p.
- \* Schlotfeldt, H.-J. and Alderman, D.J. (1995). What should I do? A practical guide to the fresh water fish farmer. Eur. Assoc. of Fish Pathol., Suppl. Bull. EAFP 15(4), 60 p.
- \* Sniezko, S.F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases in fishes. J. Fish Biol. 6: 197-208.

#### ***Kerstvakantie visziektenlab***

Het visziektenlaboratorium van het ID-DLO zal gesloten zijn van 23 december 1997 tot 5 januari 1998.