



Bakterie koster dambrugerne dyrt

Madsen, Lone; Dalsgaard, Inger

Published in:
Fisk og hav

Publication date:
2004

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Madsen, L., & Dalsgaard, I. (2004). Bakterie koster dambrugerne dyrt. *Fisk og hav*, 57, 28-38.
https://www.aqua.dtu.dk/om_dtu_aqua/publikationer/fisk_og_hav

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Bakterie koster dambrugene dyrt

LONE MADSEN
(lm@dfu.min.dk)

INGER DALSGAARD
(id@dfu.min.dk)

Danmarks
Fiskeriundersøgelser,
Afdeling for Havøkologi
og Akvakultur,
Fiskepatologisk
Laboratorium

Sygdom forårsaget af bakterien *Flavobacterium psychrophilum* er et stort problem på danske dambrug. Inden for de senere år har vi ved Fiskepatologisk Laboratorium deltaget i flere projekter for at indsamle mere viden om sygdommen. I det følgende beskrives sygdommen, årsagen til den, hvor bakterien kommer fra, overførsel af smitte, behandling samt forebyggelse – kort sagt alt hvad vi ved på nuværende tidspunkt.

Bakterien *Flavobacterium psychrophilum* er en af hovedårsagerne til sygdom og høj dødelighed blandt opdrættet regnbueørred-yngel og sættefisk såvel i Danmark som i andre lande. Dødeligheden forårsaget af sygdommen har været ret konstant siden sygdommen for første gang blev rapporteret i Europa i 1980'erne, og i Danmark kan sandsynligvis ingen ferskvandsdambrug i dag hævde at være fri for

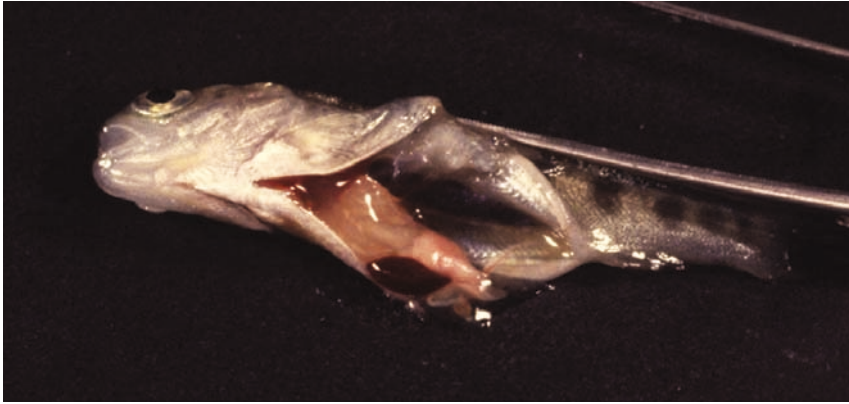
bakterien. Nylige undersøgelser (baseret på tal fra 1998) anslår dødeligheden som følge af sygdommen blandt yngel til at udgøre 34 % af startantal yngel (ca. 88 mill. stk. døde yngel), svarende til ca. 18 mill. kr. i direkte tab årligt for dambrugs-erhvervet. Forskning inden for området er essentiel for at få minimeret dødelighed og økonomiske tab på grund af sygdommen.

Figur 1
SYGE REGNBUE-
ØRREDER

Regnbueørreder (20 cm) med vintersår (koldtvandsygge). Uden på fiskene ses sår på siden samt ved øjnene.



FOTO: LONE MADSEN



Figur 2
SYMPTOMER HOS
YNGEL

Forstørret milt og nyre hos yngel (4,5 cm) af regnbueørred der er eksperimentelt inficeret med *Flavobacterium psychrophilum*.

Sygdommen

Flavobacterium psychrophilum kan føre til sygdom hos både yngel og sættefisk. I Danmark blev bakterien første gang påvist hos sættefisk i midten af 1980'erne. Sygdommen blev kaldt vintersår (koldt-vandssyge), da den optræder ved lave vandtemperaturer samt giver bylder og senere sårddannelser på overfladen af fisken (Figur 1). Endvidere kan ses udstående øjne, evt. med blødninger, lys gullig lever og formindsket forreste del af nyren. Høj dødelighed ses sjældent hos større fisk.

Hos yngel optrådte bakterien som årsag til sygdom fra slutningen af 1980'erne. Her blev sygdommen kaldt yngeldødeligheds-syndromet (YDS), da man i første omgang troede at årsagen til sygdommen var et samspil af faktorer. I starten af 1990'erne kunne det dog konstateres at årsagen var *F. psychrophilum*. Hos ynglen medfører bakterien en blodforgiftning (bakterier i blodet), oftest resulterende i at ynglen dør. Der kan ses dødeligheder på op til 80 % i en yngelproduktion der får sygdommen.

Hos ynglen ses endvidere nogle af de samme symptomer som hos de større fisk, og derudover forstørret milt (Figur 2), rødlig tarm og gat samt blege gæller (tegn på blodmangel). Der er mistanke om at bakterien, måske i samspil med andre faktorer, også kan føre til misdannelser af hvirvelsøjlen. Hos ynglen kan sygdommen optræde allerede få uger efter startfodring, med maximale dødeligheder hos yngel op til 2 gram.

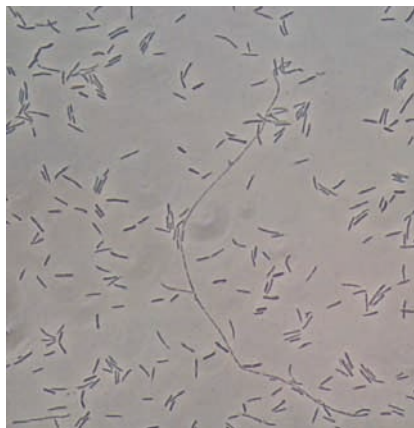
Psychrophilum betyder kuldeelskende, og som navnet antyder, så ses sygdomsudbrud ved lave vandtemperaturer – under 15°C. Sygdommen giver overvejende problemer hos laksefisk, herunder regnbueørred og coho-laks, men i få tilfælde er bakterien også blevet fundet hos andre fiskearter.

Bakterien

Flavobacterium psychrophilum er en Gram-negativ bakterie (Figur 3A), som foretrækker at vokse på specielle næringsfattige substrater, hvor den dan-

Figur 3
Flavobacterium psychrophilum

(A) *Flavobacterium psychrophilum* er en lang, slank, stav-formet bakterie. (B) Agarplade med gule kolonier af *Flavobacterium psychrophilum*.



(A)



(B)

FOTOS: LONE MADSEN

ner gule kolonier (Figur 3B). I selskab med andre gule vandbakterier kan *F. psychrophilum* være svært at identificere. Det er karakteristisk for bakterien at den ikke vokser på substrater tilsat blod, som ellers anvendes til isolering af andre fiskepatogene bakterier. *F. psychrophilum* er meget langsomt voksende, den nedbryder ikke kulhydrater, men er stærkt proteolytisk (dvs. den nedbryder proteiner). Det er en egenskab den bruger ved infektion, hvilket også fremgår af de forandringer der ses hos fisk ved sygdomsudbrud. Bakterien kan ikke vokse ved saltprocenter over 1, og af den grund er bakterien også kun et problem i ferskvand og ikke i det marine miljø. Den kunne muligvis blive et problem i brakvand.

Det er selvfølgelig vigtigt at kunne identificere en bakterie, så man får sat navn på årsagen til sygdom, men betydning af en yderligere karakterisering af bakterien, dvs. en kortlægning af dens egenskaber, skal ikke undervurderes. En karakterisering af bakterier kan bruges til at for-

klare smittespredning, herunder hvordan smitte spredes i en produktion af fisk og fra dambrug til dambrug.

Bakteriens proteolytiske egenskaber bruges ikke bare i forbindelse med identifikation af bakterien, men også ved en karakterisering af bakterien. *F. psychrophilum* nedbryder mange forskellige proteiner i fisken, men det har vist sig at elastin, som indgår i bindevæv, ikke nedbrydes af alle bakterier. Det ser ud til at de bakterier der ikke kan nedbryde elastin, heller ikke er sygdomsfremkaldende (= virulente).

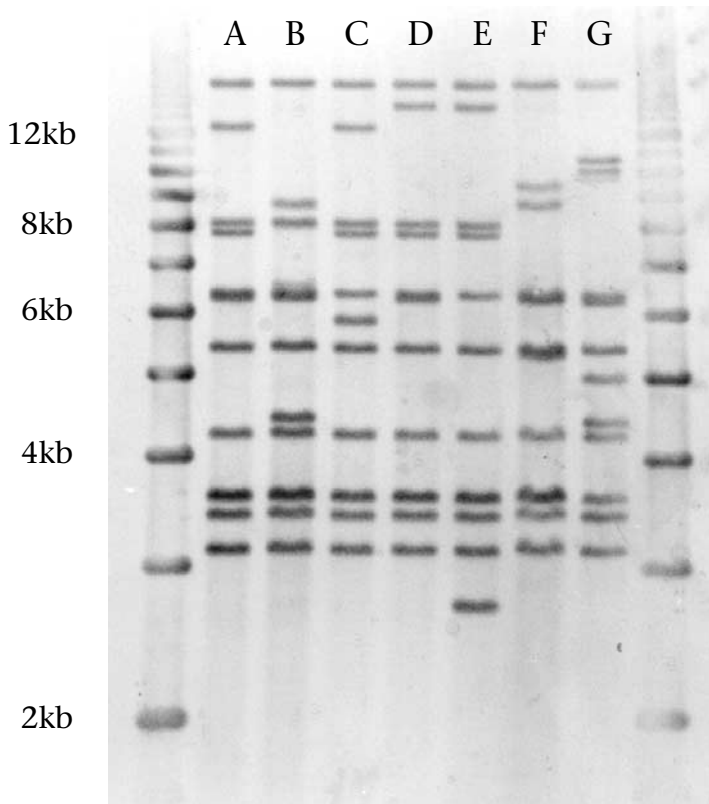
F. psychrophilum forekommer ikke kun i forbindelse med sygdomsudbrud, men findes også hos fisk uden symptomer på sygdom. Bakterierne kan inddeles i såkaldte serotyper, og undersøgelser viser at nogle serotyper ses i forbindelse med sygdomsudbrud, mens andre serotyper optræder i forbindelse med tilfældige fund af bakterien hos ikke-syge fisk. Metoden der anvendes til at karak-

terisere serotypen, er en antigen-antistof reaktion. På nuværende tidspunkt arbejder vi med tre serotyper, hvor de to er påvist i forbindelse med sygdom, mens den tredje endnu ikke er påvist i forbindelse med sygdom i Danmark. Formålet med at inddеле bakterier i serotyper har stor betydning for udvikling af vacciner.

Bakterier kan foruden serotypekarakterisering også underinddeles i ribotyper. Ribotype-karakterisering er en slags "fingeraftryksteknik", hvor man isolerer bakteriens DNA (arveanlæg) og skærer

dette med enzymer på bestemte steder. Man sammenligner de mønstre (typer) der fremkommer når man kører disse ituskårne DNA-stykker i et spændingsfelt, og på denne måde kan små forskelle mellem *F. psychrophilum*-bakterier konstateres (Figur 4). Vores undersøgelser viser at der findes en dominerende ribotype kaldet A blandt bakterier isoleret ved sygdomsudbrud, mens eksempelvis bakterier med ribotype B kun er blevet fundet hos fisk uden tegn på sygdom.

Bakterier kan yderligere karakteriseres ud



Figur 4

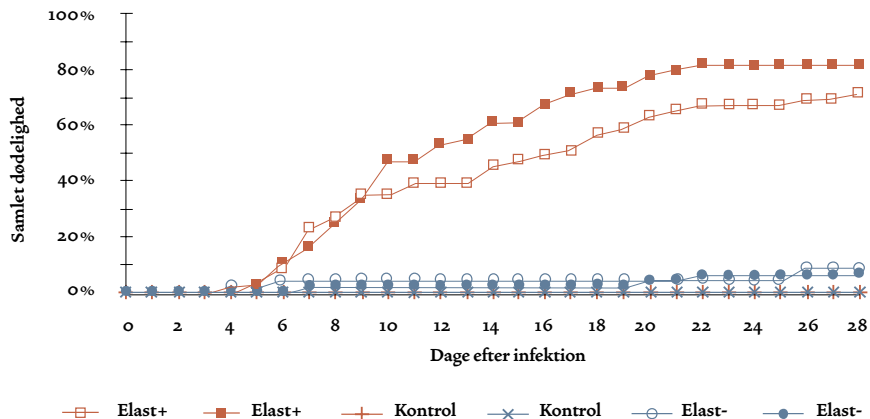
UNDER-INDELING I RIBOTYPER

Ribotypeprofiler hos *Flavobacterium psychrophilum*-isolater fra danske regnbueørreder. DNA-stumper fra bakterierne "trækkes" på en gel ved hjælp af et elektrisk spændingsfelt; de små stumper vandrer længst. De syv midterste søjler svarer hver til en ribotype.

Figur 5

INFEKTIONSFORSØG

Forsøg med infektion med elastin-positive og elastin-negative *Flavobacterium psychrophilum*-isolater. *F. psychrophilum* nedbryder mange forskellige proteiner i fisken, men bakterien er kun sygdomsfremkaldende hvis den kan nedbryde elastin, som er et protein der indgår i bindevæv.



fra deres plasmid-indhold. Plasmider er cirkulære DNA-sekvenser der kan forekomme hos bakterier uden for kromosomet. De kan ofte grupperes efter hvilke egenskaber de giver bakterien, f. eks. resistens-plasmider og virulens-plasmider.

De fleste danske *F. psychrophilum*-bakterier har et plasmid på 3,3 kb (=kilobaser, et mål for DNA-mængden). Eksperimentelle infektionsundersøgelser som vi har foretaget, viser at et plasmid på denne størrelse findes hos både virulente og mindre virulente bakterier. Til gengæld har bakterier uden dette plasmid vist sig ikke at være sygdomsfremkaldende, både i felten samt ved eksperimentelle undersøgelser. Plasmidets betydning for udvikling af sygdom er dog endnu ikke fuldt belyst.

Hvordan finder man så ud af hvor sygdomsfremkaldende en bakterie er? Dette kan undersøges ved hjælp af infektionsmodeller. Ofte bruges intraperitoneal

infektion, dvs. at bakterien sprøjtes ind i bughulen på fisken. Vi har anvendt denne metode ved undersøgelser af forskellige *F. psychrophilum*-bakterier, da metoden kan reproducere fra gang til gang (Figur 5). Badinfektionsmetoder hvor fiskene bades i en bakteriekultur er også afprøvet, og det har vist sig at de også er reproducerbare som den intraperitoneale, selvom dødeligheden ved bad er lavere. Resultaterne ved brug af disse infektionsmodeller er afhængige af forskellige faktorer, såsom hvilken bakterie der anvendes, antallet og størrelsen af fisk i forsøgskarrene, samt fiskenes oprindelse.

Hvor kommer bakterien fra?

Hvor *Flavobacterium psychrophilum* oprindelig stammer fra vides ikke. Bakterien blev første gang isoleret i USA fra coho-laks i 1940'erne. I Danmark er den først blevet påvist i forbindelse med sygdom i 1980'erne. Ved karakterisering ses markante forskelle mellem den amerikanske typestamme (fra 1947) og danske



Figur 6
BAKTERIENS NATURLIGE HABITAT?

(A) Elektrofiskeri: Man leder en elektrisk strøm gennem vandet, hvilket kortvarigt lammer fiskene. Derved føres de passivt med vandstrømmen og kan opfanges med net. (B) Vi fandt *Flavobacterium psychrophilum* bl.a. hos bækørred (*Salmo trutta fario*).



bakterier, bl.a. er de danske isolaters ribotyper meget forskellige fra typestammens. Bakteriens naturlige habitat (opholdssted) mellem sygdomsudbrud er stadig et af de store spørgsmål som vi mangler svar på. Feltundersøgelser på og ved dambrug har givet os nogle fingerpeg. I forbindelse med elektrofiskeri (Figur 6A) opstrøms og nedstrøms for et dambrug hvor bakterien er årsag til sygdomsproblemer, fandt vi bakterien hos hundestejle, skrubbe og bækørred (Figur 6B).

Bakterien blev kun fundet hos fisk nedstrøms for dambruget, og fiskene havde ingen sygdomssymptomer. Bakterien

kunne overvejende isoleres fra gæller hos fiskene, og vores karakterisering af bakterierne (serotyper og ribotyper) viste at der var stor variation, sammenlignet med bakterier isoleret ved sygdomsudbrud på dambrug. Resultatet viser at vildfisk ikke kan udelukkes som reservoir for bakterien. Det kan til gengæld heller ikke udelukkes at bakterien i nævnte tilfælde stammede fra dambruget. I Tyskland er *F. psychrophilum* også fundet hos vildfisk som ål, samt karper.

Vi har også fundet *F. psychrophilum* i vandprøver taget på dambrug med sygdomsproblemer, både fra kummer og

Figur 7
BAKTERIEN I RASKE FISK

Fisk kan huse bakterien uden selv at vise sygdomstegn. Udtagning af prøver fra moderfisk, herunder fra ægsækken (som pincetten har fat i på billedet).



FOTO: LONE MADSEN

damme med fisk (hvor bakterien også fandtes) samt fra klækkebakker med æg og udløb fra dambrug. Fra finske undersøgelser ved man at bakterien under laboratorieforhold kan overleve i sterilt ferskvand ved 15°C i op til 300 dage, så det kan ikke umiddelbart afvises at bakterien kan overleve frit i vand uden at skulle sidde på/i fisk eller andet.

Vores og andre forskeres undersøgelser har vist at en fisk kan være carrier (smittebærer) af bakterien, dvs. huse bakterien uden selv at vise sygdomstegn. Dette fænomen har vi bl.a. set hos moderfisk. Bakterien er fundet uden på fisken (i slim og gæller) samt i sår, men også inde i fisken (Figur 7), herunder i hjerne, øje, bughule, hjerte, tarm, nyre, milt, lever og i sæd, ægvæske samt på overfladen af æg. Ved nærmere karakterisering af bakterierne, har de vist sig at tilhøre både virulente og ikke-virulente serotyper og ribotyper, uafhængig af om bakterierne stammede fra fiskens ydre eller indre.

Amerikanske og japanske undersøgelser har vist at bakterien kan forekomme inde i æg. Trods omfattende undersøgelser har vi ikke kunnet bekræfte dette, selvom vi både har undersøgt æg før og efter befrugtning, samt i laboratorieskalafor søg har tilsat bakterien før befrugtning for at se, om bakterien kunne komme ind i ægget sammen med sædcellen i forbindelse med befrugtningen.

Carrier-fisk-fænomenet er også set i forbindelse med undersøgelser af fisk i yngel/sættefisk-størrelsen, hvor bakterien blev fundet sporadisk hos få fisk (ofte i hjernen) uden sygdomstegn. Denne potentielle smittemulighed kan så måske

udløses ved stress-tilstande (dårlig vandkvalitet, høj fisketæthed, intensive fodringsstrategier, anden sygdom).

Overførsel af smitte

Hvordan sygdommen spredes er endnu ubesvaret. Faktum er at syge fisk udskiller mange bakterier. Sygdommen på et dambrug spredes ofte fra kumme til kumme, dam til dam, hvilket tyder på at smitten er sket med vand eller overført ved person- eller redskabskontakt. Under laboratorieforhold har bakterien svært ved at smitte mellem fisk uden at fiskens overflade (slimlag og overhud) er ødelagt.

Som allerede omtalt kan *F. psychrophilum* findes i ægvæske samt sæd hos moderfisk, og dermed er der mulighed for at bakterien kan findes på æg. Ved salg af inficerede æg kan bakterien overføres til andre dambrug.

Hvordan bakterien kommer ind i fisken er ikke kendt. Hverken gæller eller hud kan udelukkes, specielt i forbindelse med læsioner eller andre faktorer der spiller ind over for disse fysiske barrierer hos fisken, eksempelvis nedsat immunstatus. Mave-tarmkanal kan også være en mulig vej ind i fisken.

Behandling

Flavobacterium psychrophilum-infektioner behandles med antibiotika. Der findes to godkendte antibiotika til behandling af fisk i Danmark. For infektioner med *F. psychrophilum* er der set stigende resistens over for oxolinsyre, og resistensen over for trimethoprim/sulfadiazin er næsten 100 %, så de godkendte antibiotika kan ikke bruges. Tidligere har man anvendt oxytetracyklin, men her er der også set

stigende resistens. For tiden anvendes florfenicol til behandling, dog kræves der at dyrlægen har en speciel tilladelse for at anvende dette antibiotikum til behandling, og det må kun anvendes mod denne sygdom.

Som behandling er alternativt brugt forhøjelse af vandtemperatur til 18-22°C i nogle dage, dvs. man udnytter at bakterien ikke vokser godt ved høje temperaturer. Allerede ved 22°C vil bakterien vokse betydeligt dårligere end ved optimumtemperaturen 15°C. Forsøg med vandtemperaturforhøjelse som behandling har dog vist sig at have negative bivirkninger, nemlig muligheden for at introducere parasitinfektioner eller andre bakterie-infektioner som favoriseres af den højere temperatur. Endvidere vil denne form for behandling kun være mulig i recirkuleringsanlæg, hvor anlægget ikke er større end at vandet kan varmes op.

En anden form for alternativ behandling er salt. Bakterien er som skrevet følsom over for salt og kan ikke vokse ved saltprocenter over 1. Dette kan man udnytte ved at salte op i et anlæg.

Forebyggende foranstaltninger – løsningen på sygdomsproblemet?

Som ved andre sygdomsproblemer er forebyggende tiltag vigtige. Vaccination vil være en oplagt mulighed, men de eksperimentelle undersøgelser der har været foretaget, har vist varierende resultater. På nuværende tidspunkt eksisterer der ingen kommercielle vacciner. Det springende punkt er også at fiskene oftest er meget små når de får sygdommen, og deres immunforsvar er ikke fuldt udviklet på dette stadium. Hvis man havde en vaccine, kunne man deri-

mod vaccinere større fisk for på den måde at holde smittepresset nede og dermed hindre en spredning af bakterien.

Foderforsøg med yngel har vist, at immunstimulerende midler i foder (i dette tilfælde glukose) måske kan øge modstandsdygtigheden hos fisken overfor sygdommen.

På nuværende tidspunkt er optimering af management og miljø nøgleordene ved forebyggelse af sygdommen, herunder ikke for høj fisketæthed, optimal ernæring, vandkvalitet samt hygiejne.

Undersøgelser har vist at det er muligt at producere yngel fra øjenægstadiet op til 4 gram uden at der optræder YDS-udbrud blandt fiskene. Disse undersøgelser blev foretaget på et dambrug med recirkuleringsanlæg, med separat enhed til yngel, med borevand og UV-behandling af vand.

Øjenæggene blev desinficeret inden de blev lagt ind i anlægget. Ynglen blev fulgt bakteriologisk ved regelmæssige prøvetagninger, og vi fandt ikke *Flavobacterium psychrophilum* før fiskene var blevet sorteret. Det tyder på at fiskene ikke har haft bakterien i sig, men at bakterien er kommet ind i recirkuleringsanlægget på anden måde.

Inden sorteringen af fiskene startede, var der blevet udtaget et antal fisk som blev overført til laboratorie-akvarier bragt på en anden lokalitet. Stressforsøg på disse fisk kunne heller ikke fremprovokere en opblomstring af bakterien. Dette tyder også på at bakterien ikke har været til stede.

Desinfektion (iodofor-behandling) af æg er meget vigtig, da vi som nævnt ofte ser *F. psychrophilum* som en del af bakteriefloraen på æg. For ovenstående beskrivelse af YDS-fri yngelopræt er det selvfølgelig alfa og omega at øjenæg ikke har bakterien med, når de lægges ind i et *F. psychrophilum*-frit anlæg.

Hvis man ved ovennævnte metode kan producere YDS-fri yngel, kunne man forestille sig at man herefter vaccinerede denne 4-grams yngel. På den måde vil man kunne sætte ind over for sygdommen på alle stadier og få bragt både dødelighed og økonomiske tab pga. sygdommen betragteligt ned.

Tak til Kirsten Kaas, Rikke M. Henkel, Farah S. Bahrani og Conny Møller for hjælp ved felt- og laboratorieundersøgelser samt tak til deltagerne i Fase I, II og III af projektet "Forebyggelse af YDS (yngeldødelighedssyndrom) og begrænsning af medicinforbrug i æg- og yngelopræt i danske dambrug".

LITTERATUR

Dalsgaard, I. & V. Hørlyck, 1990. Koldtvandsyge eller vintersår hos ørreder. *Ferskvandsfiskeribladet* 88: 4, 118-120

Jensen, P.A., N.H. Henriksen, K. Michelsen, L. Madsen & I. Dalsgaard, 2003. Forebyggelse af YDS (yngeldødelighedssyndrom) og begrænsning af medicinforbrug i æg- og yngelopræt i danske dambrug. Projektfase II og III: Slutrapporter. DFU-rapport 124-03

Lorenzen, E. 1991. Fortsatte undersøgelser over "yngeldødelighedssyndromet". *Ferskvandsfiskeribladet* 89: 4, 70-72

Madsen, L. 2000. *Flavobacterium psychrophilum* pheno- and genotypic characterisation, experimental infection methods, and role in spinal deformities. Ph.d.-afhandling. Fiskepatologisk Laboratorium, Danmarks Fiskeriundersøgelser & Afdeling for Fiskesygdomme, Institut for Veterinær Mikrobiologi, Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole, Frederiksberg, Danmark
