

MINISTERIE van MIDDENSTAND en LANDBOUW

Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling (DG 6)

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek (CLO) - Gent

Departement Zeevisserij - Oostende

Departementshoofd: Dr. ir. R. De Clerck

Werkgroep Biologie

Voorlopig Activiteitsverslag

1999 - 2001

Partim: Hoofdthema 1

Oostende, maart 2001

MINISTERIE van MIDDENSTAND en LANDBOUW

Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling (DG 6)

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek (CLO) - Gent

Departement Zeevisserij - Oostende

Departementshoofd: Dr. ir. R. De Clerck

Werkgroep Biologie

Voorlopig Activiteitsverslag

1999 - 2001

Partim: Hoofdthema 1

Oostende, maart 2001

Inhoudstafel

Project 1.1.	Studie van de visbestanden en de natuurlijke mortaliteit van commerciële vissoorten	2
Project 1.2	Histopathologisch onderzoek en registratie van levernodulen bij platvis.	32
Project 1.3	Hematologisch en immunologisch onderzoek bij zeevis.	
Project 1.3.1	Bloedonderzoek op kabeljauw en tong uit het Belgisch Continentaal Plat en de zuidwestelijke Noordzee.	39
Project 1.3.2	Fagocytose onderzoek bij tarbot en kabeljauw.	49
Project 1.4	Studie van de natuurlijke mortaliteit en de biologische conditie van schaal- en weekdieren.	
Project 1.4.1	Bacteriologisch, parasitair en toxisch fytoplankton onderzoek bij mosselen.	56
Project 1.4.2	Studie van het voorkomen van <i>Haematodinium</i> bij langoustine in de zuidelijke Noordzee.	67
	Publicaties, werk- en studiegroep rapporten, e.d.	70

Hoofdthema 1 – Pathologie van vis, schaal- en weekdieren

Project 1.1-Studie van de visbestanden en de natuurlijke mortaliteit van commerciële vissoorten

Projectverantwoordelijke : D. Declerck

Project 1.1.3 Registratie van ziekten en parasieten bij commerciële vissoorten in het Belgisch continentaal plat en de ZW Noordzee

a. Projectverantwoordelijke : D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond, materiaal en methoden

De studie van de natuurlijke mortaliteit van commerciële vissoorten beoogt door middel van registratie en determinatie van inwendige en uitwendige ziekten en parasieten, een bijdrage te leveren tot de stockramingen op het Belgisch Continentaal Plat en in de ZW-Noordzee

De registratie van ziekten en parasieten bij commerciële vissoorten uit het Belgisch Continentaal Plat, werd in het voor- en najaar 1999 uitgevoerd. De bemonstering gebeurde met behulp van de 0.29 'Broodwinner' en omvatten vier platvissoorten namelijk schol (*Pleuronectes platessa*), schar (*Limanda limanda*), bot (*Platichthys flesus*) en tong (*Solea solea*), en twee rondvissoorten, namelijk kabeljauw (*Gadus morhua*) en wijting (*Merlangus merlangus*). In de ZW-Noordzee werd het onderzoek op schol, schar en tong in augustus '99 met behulp van het onderzoekingschip de 'Belgica' uitgevoerd. De visgronden voor schol en schar in de ZW-Noordzee zijn te vinden in figuur 1.1.3.8. Het in- en uitwendig onderzoek bij plat- en rondvis werd uitgevoerd met een methode, die door de ICES WGPDMO werkgroep

werd uitgewerkt voor monitoring programma's (ICES, 1989) en de aanbevelingen van BEQUALM (1999). De registratie van de ziekten gebeurde in de periode waarin de bestandsopnamen in het Belgisch continentaal plat en de ZW-Noordzee werden uitgevoerd. Hierdoor kunnen de resultaten aan de populatie-parameters worden verbonden (EGIDIUS, 1983; BUCKE en STONES, 1988)

c. Stand van zaken

Belgisch Continentaal Plat : Voor- en najaar 1999

Schol, schar en bot

De resultaten worden weergegeven in de tabellen 1.1.3.1a tot 1.1.3.3a en in een overzichtstabel 1.1.3.4a. Wanneer de periode 1996-1998 als referentie voor het Belgisch continentaal plat wordt genomen, bleef het voorkomen van pigmentafwijkingen in 1999 zeer hoog voor bot (21,3%), schol (5,2%) en schar (4%). Voor schar werd vooral staartpigment opgetekend. De aanwezigheid van huidzweren bij schar (1,1%) en bot (0,5%) bleef onveranderd. De waargenomen huidzweren werden vooral veroorzaakt door beschadiging van de vis door het vistuig.

De virale aandoening *lymphocystis* daalde spectaculair bij bot (0,25%) en was voor het eerst sinds de waarnemingen van dezelfde orde van grootte als bij schar (0,2%) en schol (0,3%).

Zoals de jaren voorheen werd *epidermale papilloma* in de geobserveerde platvissen uit het Belgisch continentaal plat niet vastgesteld. Dit is in tegenstelling met de hoge percentages die in midden Noordzee en de noordelijke Noordzee worden opgetekend. Het voorkomen van skeletvervormingen steeg bij bot (1,5%) en bleef onveranderd bij schar (1,1%).

De protozoaire aandoening *Glugea stephani* steeg na drie jaar opnieuw bij schar (10,9%). Deze *Glugea* infectie vertoonde het hoogste voorkomen sinds de waarnemingen in 1985 zijn gestart (figuur 1.1.3.4). In tegenstelling met het hoge voorkomen bij schar bleef de *Glugea* infectie laag (< 0,2%) bij schol en bot.

Tenslotte werden levernodulen >2mm bij hogere percentages genoteerd dan in de periode daarvoor : in schar (0,8%), schol (0,3%) en bot (2,5%).

Wijting (*Merlangus merlangus*)

De resultaten zijn opgenomen in tabel 1.1.3.5a. Voor wat de lengteklasse 22-29cm betreft werd er bij het voorkomen van de kiemparasiet *Lerneaocera branchialis* 16% in de lente en 7,9% in de herfst vastgesteld. Voor dezelfde lengteklasse bedroeg de aanwezigheid van *Cryptocotyle lingua* in de lente 17,8% en 2,5% in de herfst. Andere gedetecteerde afwijkingen waren groenverkleuring van de lever (0,3%) en lordosis (0,6%).

Kabeljauw (*Gadus morhua*)

Van december 1999 tot eind januari 2000 waren we in staat de jonge kabeljauwpopulatie (0-2 jaar) uit het Belgisch continentaal plat te analyseren. *Pseudoterranova decipiens* werd gevonden in 2,8%; *Lerneaocera branchialis* in 18,3%; *Cryptocotyle lingua* in 2,8% en skeletdeformatie in 5,6% van de gevallen. Geen granulatie van de milt werd genoteerd. Dit was in tegenstelling met november 99, waarbij 8,4% van de kabeljauwpopulatie een miltaandoening vertoonde.

Tong (*Solea solea*)

Bloedanalyses op een tweehonderdtal tong exemplaren afkomstig van het Belgisch continentaal plat werden in de maand juni 2000 uitgevoerd. *Haemogregarina* infecties van de leucocyten en de erythrocyten werden bij 10,6% van de lengteklasse 12-20cm gevonden. Dit is een aanzienlijke daling in vergelijking met de maand maart 1999 waarbij 40% en in de maand juni 1999, 63,3% werd opgetekend. De besmetting lijkt over haar hoogtepunt heen te zijn (figuur 1.3.3.5). Er werd evenwel een nieuwe soort van *Haemogregarina* infecties bij de erythrocyten vastgesteld. Voor wat de tankexperimenten op tong betreft werd een grote sterfte binnen de eerste twee maanden vastgesteld. Ten aanzien van de *Haemogregarina* infectie kon nog geen verband worden gelegd.

Belgisch Continentaal Plat : Voor en najaar 2000

Schol, schar en bot

De resultaten worden weergegeven in de tabellen 1.1.3.1b tot 1.1.3.3b en in een overzichtstabel 1.1.3.4b. De evolutie van de voornaamste ziekten (1985-2000) wordt uitgezet in de figuren 1.1.3.1 voor schar, 1.1.3.2 voor schol en 1.1.3.3 voor bot. De evolutie van de pigmentafwijkingen, *Lymphocystis*, *Glugea stephani* en levertumoren bij schar, schol en bot zijn in figuur 1.1.3.4 opgenomen.

Wanneer de periode 1996-1999 als referentie voor het Belgisch continentaal plat wordt genomen steeg het voorkomen van pigmentafwijkingen bij bot (22%) en schol (6.7%) opnieuw. De aanwezigheid van huidzweren in schar (0,1%) en bot (1,2%) bleef laag. Ook werden zeer lage percentages voor de virale aandoening *Lymphocystis* bij schar (0,2%), schol (0,1%) en bot (0,4%) genoteerd. Zoals het jaar voordien werd *Epidermale papilloma* in het Belgisch continentaal plat niet genoteerd. Hyperpigmentatie verdween eveneens bij schar en schol. Het voorkomen van skeletafwijkingen daalde opnieuw in bot (1,2%) en schar (0,6%). Het voorkomen van levernodulen (tumoren) bij schar (0.1%), schol (0.1%) en bot (1,6%) werd eveneens bij een lager procentueel aantal genoteerd. Over het algemeen werd een daling van de pollutie gebonden aandoeningen vastgesteld.

Tenslotte steeg de protozoaire aandoening *Glugea stephani* opnieuw bij schar (11,8%) en bedroeg 15,6% in het voorjaar 2000. Deze *Glugea* infectie bereikte het hoogste procentueel voorkomen sinds de waarnemingen in 1985 gestart zijn.

Wijting (*Merlangus merlangus*)

De resultaten voor het bemonsteringsjaar 2000 zijn opgenomen in tabel 1.1.3.5b. Voor wat de lengteklasse 22-29cm betreft werd er bij het voorkomen van de kiemparasiet *Lerneaocera branchialis* 6,2% in de lente en 6% in de herfst vastgesteld. Deze lage voorkomens bevestigen de trend die op het einde van 1999 werd bekomen. Voor dezelfde lengteklasse bedroeg de aanwezigheid van *Cryptocotyle lingua* in de lente 9,5% en een zeer laag percentage namelijk 0,5% in de herfst. Beide organismen kregen onlangs meer aandacht bij de studie van de invloed van de pollutie op de aanwezigheid van parasieten bij vis. Groenverkleuring van de lever werd niet meer gedetecteerd. lordosis werd in 0,6% van de gevallen genoteerd.

Kabeljauw (*Gadus morhua*)

Van december 2000 tot eind januari 2001 hadden we de mogelijkheid de jonge kabeljauwpopulatie (0-2 jaar) uit het Belgisch continentaal plat te analyseren. *Pseudoterranova decipiens* werd gevonden in 3%; *Lerneaocera branchialis* in 18,3%; *Cryptocotyle lingua* in 2,8% en skeletdeformatie in 3,6% van de gevallen. Granulatie van de milt werd bij 10% van de gevallen genoteerd. In sommige gevallen werd de detectie van zuurvaste bacteriën vastgesteld, wat wijst op de aanwezigheid van *Mycobacterium marinum*. Er werd geen viraal onderzoek verricht. De uitwendige kenmerken van de ziekte geven geen aanleiding om tot een virale aandoening te besluiten.

Tong (Solea solea)

Meer dan 1000 bloeditstrijkjes werden op tong uitgevoerd tussen juni tot oktober 2000. De tong was afkomstig van het Belgisch continentaal plat (figuur 1.1.3.5). Er werden vier lengteklassen bestudeerd. Bij de lengteklasse <11cm werd de *Haemogregarina infectie* in de bloedcellen niet waargenomen. De onderzochte 21-25cm lengteklasse vertoonde in juni 36% en in september 76% besmette exemplaren. De besmetting van de 26-30cm klasse lag iets hoger. De *haemogregarina* besmetting was het hoogst in augustus (80-90%) gedurende de jaarlijkse opnamen in ZW Noordzee.

C2. ZW-Noordzee : aug 1999

Voor wat de ZW-Noordzee betreft werden de voornaamste visstations in figuur 1.1.3.8 uitgezet. De bekomen resultaten werden opgenomen in de tabellen 1.1.3.6a en 1.1.3.7a en in de figuren 1.1.3.6a en 1.1.3.7a. Hyperpigmentatie werd alleen bij schar (11,8%) in visgrond 2 vastgesteld (figuur 1.1.3.8) In dit gebied van de zuidwestelijke Noordzee werd er een lichte stijging van de bestudeerde ziekten, voornamelijk levertumoren (3,9%) opgetekend.

In 1999 werd de *Haemogregarina* infectie in tong bevestigd en bedroeg 95% bij de lengteklasse >26cm.

C2. ZW-Noordzee : aug 2000

De bekomen resultaten voor schar en schol werden opgenomen in de tabellen 1.1.3.6b en 1.1.3.7b en in de figuren 1.1.3.6a en 1.1.3.7b. Het procentueel voorkomen was ongeveer hetzelfde als vorig jaar. Hyperpigmentatie bij schar werd in bijna alle ICES visvakken (figuur 1.1.3.8) met uitzondering van het Belgisch continentaal plat vastgesteld. De meest geïnfecteerde ICES-visvakken waren 36FO, 36F1 en 36F2. In dit gebied stijgen de ziekten lichtjes, vooral het voorkomen van de levertumoren (varieert van 0%-14,3%), *epidermale papilloma* (varieert van 1%-6,3%), ulcers (varieert van 1,9%-6,1%) en *Glugea stephani* (varieert van 2,3%-7,5%). *Stephanostomum baccatum* werd slechts eenmaal bij schar gedetecteerd. De *Haemogregarina* infectie bij tong bedroeg 90% bij de lengteklasse >21cm.

Werkschema 1999-01				
	99-2	00-1	00-2	01-1
Bestandsopnamen juvenielen B. C. P.	XU		XU	
Bestandsopnamen adulten ZW-Noordzee	XU		XU	
Pathologisch onderzoek B. C. P.	XU	XU	XU	XU
Pathologisch onderzoek ZW-Noordzee	XU		XU	
Tankexperimenten op tong	XU			

d. Referenties

BUCKE D, STONES K (1988). Fish diseases monitoring on the 1987 North Sea Groundfish survey.

Dis Aquatic. Org., 3, 1-11.

EGIDIUS E (1983) : Registration of diseases during traditional biological surveys. ICES, Mar. Envir. Qual. Comm., CM 1983 / E : 8

ICES (1989) : Methodology of fish disease surveys. Coop. Res. Rep. Int. Council Exploration of the sea. ,166, 1-43.

ANON. (1999) : Biological Effects Assurance in Monitoring Programmes (BEQUALM). Report of the first workshop (21-23 October 1999) : External Fish Diseases and Liver Histo-Pathology

Aandoening	LENGTEKLASSEN									TOTAAL AANTAL BESMET			PROCENTUEEL AANTAL(%)		
	15-19cm			20-24cm			≥25cm								
	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal
Voorjaar 1999															
Glugea stephani	-	3	3	2	9	11	2	10	12	4	22	26	9,3	5,4	5,8
Skeletvervorming	-	-	-	-	1	1	-	2	2	-	3	3	-	0,7	0,6
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	0,5	0,4
Pigmentafwijking	-	1	1	-1	4	5	1	6	7	2	11	13	4,6	2,7	2,9
Levernodulen	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	0,2	0,2
Inkeping	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	2,3	-	0,2
Zweren	-	-	-	1	2	3	-	3	3	1	5	6	2,3	1,2	1,3
Verwondingen	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	2,3	-	0,2
Aantal onderzocht	7	14	21	26	177	203	10	210	220	43	401	444			
Najaar 1999															
Glugea stephani	1	7	8	6	21	27	4	32	36	11	60	71	13	16,9	16,2
Skeletvervorming	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	2	1,2	0,3	0,45
Verwondingen	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	0,5	0,45
Pigmentafwijking	1	-	1	5	5	10	1	6	7	7	11	18	8,3	3,1	4,1
Levernodulen	-	-	1	-	2	2	1	2	3	1	4	6	1,2	1,1	1,3
Zweren	-	-	-	2	-	2	-	1	1	2	1	3	2,4	0,3	0,7
Vinerosie	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	0,3	0,2
Aantal onderzocht	10	44	54	49	149	198	25	161	186	84	354	438			

0

Tabel 1.1.3.1a : Voorkomen van ziekten en parasieten bij schar in het Belgisch continentaal plat (voor-en najaar 1999)

Tabel 1.1.3.1b : Voorkomen van ziekten en parasieten bij schaar in het Belgisch continentaal plat (voor-en najaar 2000)

Aandoening	LENGTEKLASSEN			TOTAAL AANTAL BESMET			PROCENTUEEL AANTAL(%)					
	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal			
Aandoening	15-19cm			>=25cm								
	1	4	5	4	16	20	6	72	78	11,5	16,1	15,6
	-	-	-	-	8	8	2	12	14	3,8	2,7	2,8
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	0,2	0,2
Glugea stephani	1	4	5	1	52	53	4	16	20	6	72	78
Staatpigment	-	-	-	2	4	6	-	8	8	2	12	14
Huidtumoren	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
Zweren	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
Verwondingen	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
Aantal onderzocht	10	30	40	31	280	311	11	138	149	52	448	500
Najaar 2000												
Glugea stephani	6	10	16	5	6	9	-	-	-	11	16	27
Staatpigment	-	-	-	2	4	6	-	-	-	2	4	6
Skeletvervorming	1	5	6	-	-	-	-	-	-	1	5	6
Verwondingen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Levernodulen	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Aantal onderzocht	61	127	188	26	123	149	6	41	47	99	291	390

Aandoening	LENGTEKLASSEN									Totaal aantal			Procentueel aantal (%)		
	15-24cm			25-29cm			>30cm			Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal
	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal						
Voorjaar 1999															
Pigmentafwijking	6	9	15	7	4	11	-	5	5	13	18	31	6,7	7,3	6
Skeletvervorming	1	-	1	-	2	2	-	1	1	1	3	4	0,5	0,9	0,8
Glugea stephani	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	0,5	-	0,2
Levernodulen	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	2	2	-	0,6	0,4
Lidtekenvorming	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	0,5	-	0,2
Lymphocystis	1	-	1	-	1	1	-	-	-	1	1	2	0,5	0,3	0,4
Worm lever	-	-	-	-	-	-	-	2	2						
Aantal onderzocht	63	74	137	99	152	251	32	93	125	194	319	513			
Najaar 1999															
Pigmentafwijking	3	1	4	8	13	21	-	3	3	11	17	28	4,3	6,9	5,6
Skeletvervorming	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	0,4	-	0,2
Levernodulen	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	0,4	-	0,2
Aantal onderzocht	65	95	160	171	117	288	18	34	52	254	246	500			

Tabel 1.1.3.2a: Voorkomen van ziekten en parasieten bij schol in het Belgisch continentaal plat (voor-en najaar 1999)

Aandoening	LENGTEKLASSEN									Totaal aantal			Procentueel aantal (%)		
	15-24cm			25-29cm			>30cm			Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal
	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal						
Voorjaar 2000															
Pigmentafwijking	6	10	16	6	6	12	5	5	10	17	21	38	10	6,5	7,6
Skeletvervorming	1	-	1	-	-	-	-	1	1	1	1	2	0,6	0,3	0,4
Glugea stephani	6	-	6	3	-	3	-	-	-	6	-	6	3,4	-	1,2
Levernodulen	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	0,6	-	0,2
Verwondingen	1	1	2	-	-	-	-	-	-	1	1	2	0,6	0,3	0,4
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	0,3	0,2
Vinerosie	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	0,3	0,2
Aantal onderzocht	86	166	252	74	112	186	16	42	58	176	320	496			
Najaar 2000															
Pigmentafwijking	4	2	6	8	4	12	4	6	10	16	10	28	8,2	3,6	5,9
Skeletvervorming	-	4	4	-	-	-	-	2	2	-	6	6	-	2,1	1,2
Vinerosie	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	0,7	0,4
Stephanostomum	-	-	-	-	-	-	2	-	2	2	-	2	1	-	0,4
Aantal onderzocht	58	132	190	110	38	148	44	88	132	194	276	470			

Tabel 1.1.3.2b : Voorkomen van ziekten en parasieten bij schol in het Belgisch continentaal plat (voor-en najaar 2000)

	LENGTEKLASSEN (CM)									TOTAAL AANTAL			PROCENTUEEL AANTAL		
	20-24			25-29			>=30								
Aandoening	Mannelijk	Vrouwelijk	Tot	Mannelijk	Vrouwelijk	Tot	Mannelijk	Vrouwelijk	Tot	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal
Voorjaar 1999															
Pigmentafwijking	-	-	-	2	7	9	14	36	49	16	43	58	15,8	25,1	21,3
Vin- en staarterosie	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	0,6	0,4
Levernodulen	-	-	-	-	-	-	2	1	3	2	1	3	2	0,6	1,1
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1	-	0,4
Skeletvervorming	-	-	-	-	-	-	2	-	2	2	-	2	2	-	0,8
Wormen op lever	-	-	-	1	-	1	-	1	1	1	1	2	1	0,6	0,8
Zweren	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	2	2	-	1,2	0,8
Aantal onderzocht	3	1	4	35	28	63	63	142	205	101	171	272			
Najaar 1999															
Pigmentafwijking	-	-	-	2	-	2	12	28	40	14	28	42	20	21,5	21
Vin-en staarterosie	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	1,5	1
Levernodulen	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	10	10	-	7,7	5
Skeletvervorming	-	-	-	2	-	2	2	-	2	4	-	4	5,7	-	2
Leveraandoening	-	-	-	2	-	2	2	-	2	4	-	4	5,7	-	2
Aantal onderzocht	4	2	6	18	6	24	48	122	170	70	130	200			

Tabel 1.1.3.3a : Voorkomen van ziekten en parasieten bij bot in het Belgisch continentaal plat (voor- en najaar 1999)

	LENGTEKLASSEN									TOT. AANTAL			PROCENTUEEL AANTAL		
	20-24			25-29			>=30								
Aandoening	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal	Mannelijk	Vrouwelijk	Totaal
Voorjaar 2000															
Pigmentafwijking	2	2	-	4	8	12	12	44	46	18	54	72	20	34,6	29,5
Glugea stephani	-	-	-	2	-	2	-	2	2	2	2	4	2,2	1,3	1,6
Levernodulen	-	-	-	2	-	2	0	2	2	2	2	4	2,2	1,3	1,6
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1,1	-	0,4
Skeletvervorming	-	-	-	1	-	1	1	1	2	2	1	3	2,2	0,6	1,2
Verwondingen	-	-	-	-	2	2	2	2	4	2	4	6	2,2	2,6	2,4
Zweren	-	-	-	-	2	2	-	1	1	-	3	3	-	1,9	1,2
Inkeping	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	1,3	0,8
Lidtekenvorming	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	2	-	1,3	0,8
Aantal onderzocht	10	24	34	35	36	72	42	96	138	88	156	244			

Tabel 1.3.3.3b : Voorkomen van ziekten en parasieten bij bot in het Belgisch continentaal plat (voorjaar 2000)

Soort	Aantal onderzocht	Pigment- afwijking	Skeletver- vormingen	Vin erosie	Zweren	Wonden	Glugea stephani	Hyper- melanisatie	Lymphocystis	LNOD	Wormen op lever
SCHAR											
Voorjaar '99	444	2,9	1,3	0,2	1,5	0,2	6,3	0,2	0,5	0,2	0,4
Najaar '99	438	5,0	0,7	0,2	0,7	0,4	16	0,2	-	1,3	-
Totaal '99	882	3,5	1	0,2	1,1	0,3	10,9	0,2	0,2	0,8	0,2
SCHOL											
Voorjaar '99	581	4,6	0,9	-	0,2	-	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4
Najaar '99	500	6	-	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	-
Totaal '99	1081	5,2	0,5	-	0,1	-	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2
BOT											
Voorjaar '99	272	22	1,2	0,4	0,8	0,4	-	-	0,4	1,6	1,2
Najaar '99	200	20	2	0,4	-	-	-	-	-	5	-
Totaal '99	472	21,3	1,5	0,4	0,5	0,25	-	-	0,25	2,5	0,6

Tabel 1.1.3.4a : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij commerciële platvis in het Belgisch continentaal plat (voor- en najaar 1999)

Soort	Aantal onderzocht	Pigment- afwijking	Skeletver- vormingen	Vin erosie	Zweren	Wonden	Glugea stephani	Lymphocystis	Huidtumoren	LNOD
SCHAR										
Voorjaar '00	500	2,8	-	-	0,2	0,2	15,6	-	0,2	-
Najaar '00	390	1,5	1,5	-	-	0,25	6,9	-	-	0,25
Totaal '00	890	2,2	0,6	-	0,1	0,2	11,8	-	0,1	0,1
SCHOL										
Voorjaar '00	496	7,6	0,4	0,2	-	0,4	1,2	0,2	-	0,2
Najaar '00	470	5,9	1,2	0,4	-	-	-	-	-	-
Totaal '00	966	6,7	0,8	0,3	-	0,2	0,6	0,1	-	0,1
BOT										
Voorjaar '00	244	29,5	1,2	-	1,2	2,4	1,6	0,4	-	1,6

Tabel 1.1.3.4b : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij commerciële platvis in het Belgisch continentaal plat (voor- en najaar 2000).

LENGTEKLASSE	AANTAL EXEMPLAREN ONDERZOCHT			LERNAEOCERA BRANCHIALIS								CRYPTOCOTYLE LINGUA								
				Vrouwelijk			Mannelijk			Tot	%	Vrouwelijk			Mannelijk			Tot	%	
	Vrouwelijk	Mannelijk	Totaal	1*	2	3	1*	2	3			1**	2	3	1**	2	3			
Voorjaar 1999																				
<= 21cm	52	33	85	4	-	-	2	-	-	6	7	-	-	1	-	1	1	3	3,5	
22-29 cm	166	119	285	16	12	1	16	1	-	46	16	22	9	13	2	4	1	51	17,8	
>= 30cm	7	3	10	1	1	-	1	-	-	3	30	-	1	-	-	-	-	1	10	
Totaal aantal	225	155	380	21	13	1	19	1	-	55	14,4	22	10	14	2	5	2	55	14,4	
Najaar 1999																				
<= 21cm	21	46	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	3	
22-29cm	152	164	316	12	3	-	7	2	1	25	7,9	2	1	3	-	1	1	8	2,5	
>=30cm	16	1	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Totaal aantal	189	211	400	12	3	-	7	2	1	25	6,25	2	1	3	1	2	1	10	2,5	

* = Aantal parasieten op de kieuwen geteld

** = Graad van besmetting

Tabel 1.1.3.5a : Procentueel voorkomen van in- en uitwendige aandoeningen bij wijting in het Belgisch continentaal plat (voor- en najaar 1999)

LENGTEKLASSE	AANTAL EXEMPLAREN ONDERZOCHT			LERNAEOCERA BRANCHIALIS						CRYPTOCOTYLE LINGUA									
	Vrouwelijk	Mannelijk	Totaal	Vrouwelijk			Mannelijk			Tot	%	Vrouwelijk			Mannelijk			Tot	%
				1*	2	3	1*	2	3			1**	2	3	1**	2	3		
Voorjaar 2000																			
<= 21cm	98	60	158	1	-	-	1	-	-	2	1,2	-	4	2	2	-	4	12	1,6
22-29 cm	117	221	338	9	2	-	9	1	-	21	6,2	4	4	11	6	4	3	32	9,5
>= 30cm	2	2	4	-	1	-	-	-	-	1	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Totaal aantal	179	321	500	10	3	-	10	1	-	24	4,8	4	8	13	8	4	7	44	8,8
Najaar 2000																			
<= 21cm	25	48	63	-	-	-	2	-	-	2	3,1	-	-	1	-	-	-	1	0,2
22-29cm	155	152	317	10	2	-	6	1	-	19	6	-	1	1	-	-	-	2	0,5
>=30cm	15	5	20	1	-	-	1	-	-	2	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Totaal aantal	195	205	400	11	2	-	9	1	-	23	5,8	-	1	2	-	-	-	3	0,7

* = Aantal parasieten op de kieuwen geteld

** = Graad van besmetting

Tabel 1.1.3.5b : Procentueel voorkomen van in- en uitwendige aandoeningen bij wijting in het Belgisch continentaal plat (voor- en najaar 2000)

Voorjaar : Skeletvervorming : 0,2%

Visvak	36FO	36F1	36F2	35FO	35F1	35F2	34F1	34F2	32F2	31F2	31F2-3V*	31F2-3N*
Code station	18,19,20,111	16,17,112,114	11,116,113	22,72	25,81,61,115	8,9,26,73	107b,28,62	6,7,63,29	2,3,32	1,36,86	B.c.p	B.c.p
Aantal onderzocht	99	210	95	20	97	142	112	68	38	196	444	438
Lymphocystis	-	1,4	-	5	2	-	-	-	-	0,5	0,5	-
Epidermale papilloma	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LNOD	11,1	0,95	-	-	3	1,4	-	-	-	-	0,2	1,3
Glugea stephani	-	5,2	-	10	2	0,7	1,8	2,6	3	0,5	6,3	16
Epitheliocystis	17,1	8,1	4,2	-	-	-	0,9	-	-	-	0,2	0,2
Skeletafwijking	-	-	-	-	-	0,7	0,9	-	-	1	1,3	0,7
Zweren	1	0,5	-	-	-	-	1,8	-	-	-	1,5	0,7
Wormen lever	13,1	3,8	-	-	2	0,7	-	-	-	-	-	-
Pigmentafwijking	5	6,6	12,6	15	7,2	4,2	4,4	8,8	7,9	4	2,9	5
Vinerosie	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2

Tabel 1.1.3.6a : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schar in de zuidwestelijke Noordzee (Belgica campagne aug 1999)

* = B.c.p. (voor - en najaar 1999)

Visvak	36F0	36F1	36F2	35F1	35F2	34F1	34F2	31F2	31F2-3V*	31F2-3N*
Code station	18,19,20,111	16,17,112,114	11,116,113	25,81,61,115	8,9,26,73	107b,28,62	6,7,63,29	1,36,86,40a,39, 37,36,1	B.c.p	Bc.p
Aantal onderzocht	294	613	213	200	168	209	115	69	500	390
Lymphocystis	-	2,3	1,9	0,5	-	0,5	0,9	-	0,2	0,25
Epidermale papilloma	3,1	6,3	1	0,5	-	1	0,9	-	0,2	0,25
Epi	3,1	9,9	6,1	0,5	1,2		0,9	-	-	-
Stephanostomum	-	0,16	-	-	-		-	-	-	-
LNOD	-	14,3	0,5	1	0,6		0,9	-	-	-
Glugea stephani	2,7	2,3	7,5	1	3,6	1	5,2	2,9	15,6	6,9
Verwondingen	-	-	-	-	-		-		0,2	0,25
Skeletvorming	0,7	0,65	-	1,5	1,8		0,9	2,9	-	1,5
Zweren	3,4	1,9	6,1	1	1,8		1,7		0,2	-
Wormen lever	21	5,3	4,7	2	-		1,7		-	-
Staartpigment	6,1	3,3	5,6	7	13,6	2,4	13,9	2,9	2,8	1,5
Vinosie	3,4	-	-	-	-		-		-	-

Tabel 1.1.3.6b : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schaar in de diverse visvakken van de ZW Noordzee (Belgica campagne aug 2000)

* = B.c.p. (voorjaar en najaar 2000)

Visvak	36F0	36F1	36F2	35F1	35F2	34F2	33F2	32F1	32F2	31F2	31F2-3V*	31F2-3N*
Code station	19,20	114,112,16,17	11,113,116	24,25,81,115	8,9,26	6,7,28	4,5,30	85,93,82b	3,2	1,36,86		
Aantal exemplaren	102	100	110	107	101	76	48	101	55	153	581	500
Pigmentafwijking	-	6	14,5	3,4	10,9	7,9	8,3	1	14,5	5,2	4,6	6
Skeletafwijking	-	-	-	-	1	-	2,1	-	-	3	0,9	-
Wormen lever	1	1	0,9	0,9	3	1,3	2,1	-	1,8	-	0,4	-
Vin- en staarterosie	1	-	0,9	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,2
Glugea stephani	-	-	-	0,9	-	-	2,1	-	-	-	0,2	0,2
LNOD	-	1	0,9	-	1	-	2,1	-	-	-	0,4	0,2
Zweren	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lidtekenvorming	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-

Tabel 1.1.3.7a: Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schol in de diverse visvakken (Belgica campagne aug 1999)

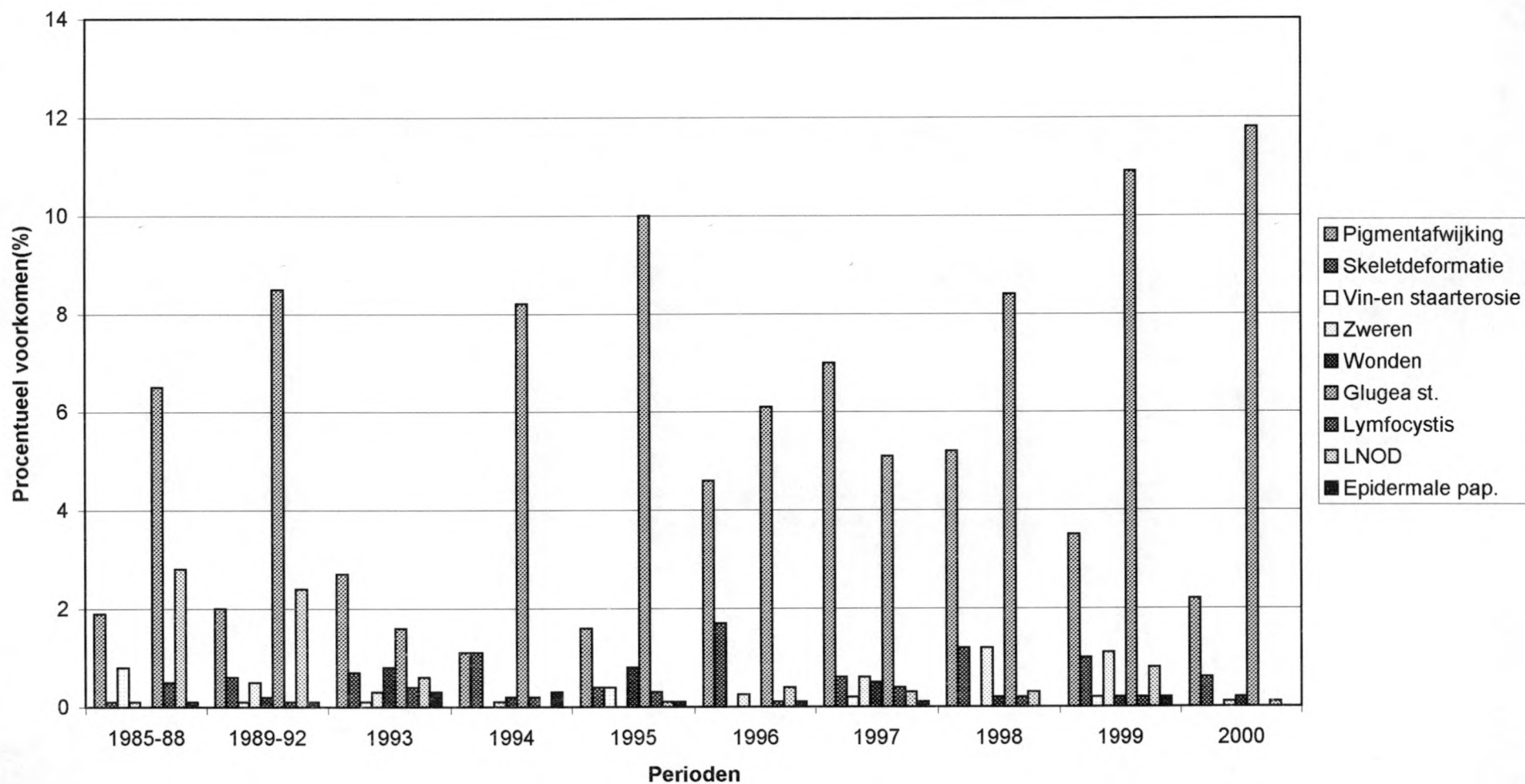
* = B.c.p. (voorjaar en najaar 1999)

Visvak	36F0	36F1	36F2	35F1	35F2	34F2	33F2	31F2	32F1	31F2-3V*	31F2-3N*
Code station	19,20,11,18	114,112,16,17	113,116,11	24,25,115	8,9,26,73	7,28	3,4,5	40a,86,39,37,36,1	91a,85,96		
Aantal exemplaren	70	132	114	60	75	40	91	125	52	496	470
Pigmentafwijking	-	3	13,1	6,6	14,6	2,5	-	0,8	-	7,6	5,9
Skeletvorming	1,4	-	1,7	-	-	2,5	-	0,8	-	0,4	1,2
Glugea stephani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-
Levernodulen	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Genezende wonde	-	-	0,9	-	1,3	-	-	-	-	0,4	-
Lymphocystis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,4
Vinerosie	-	-	-	1,6	-	-	-	0,8	1,9	0,2	-
Stephanostomum	-	-	0,9	-	-	-	-	0,8	-	-	0,4
Wormen lever	2,8	5,3	6,1	-	2,6	-	1,1	-	-	-	-
Epitheliocystis	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-

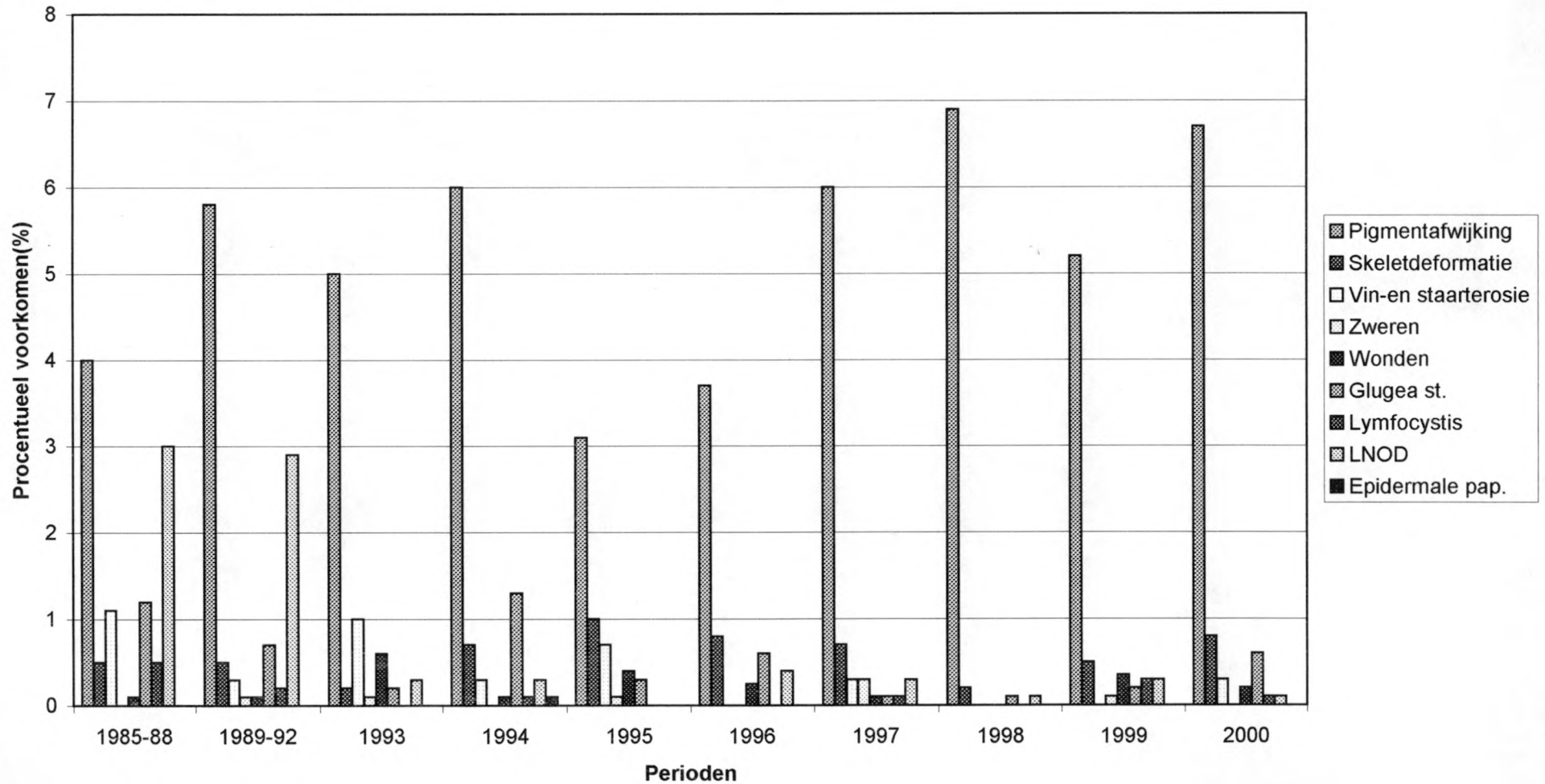
Tabel 1.1.3.7b : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schol in de diverse visvakken (Belgica campagne aug 2000)

* = B.c.p. (voorjaar en najaar 2000)

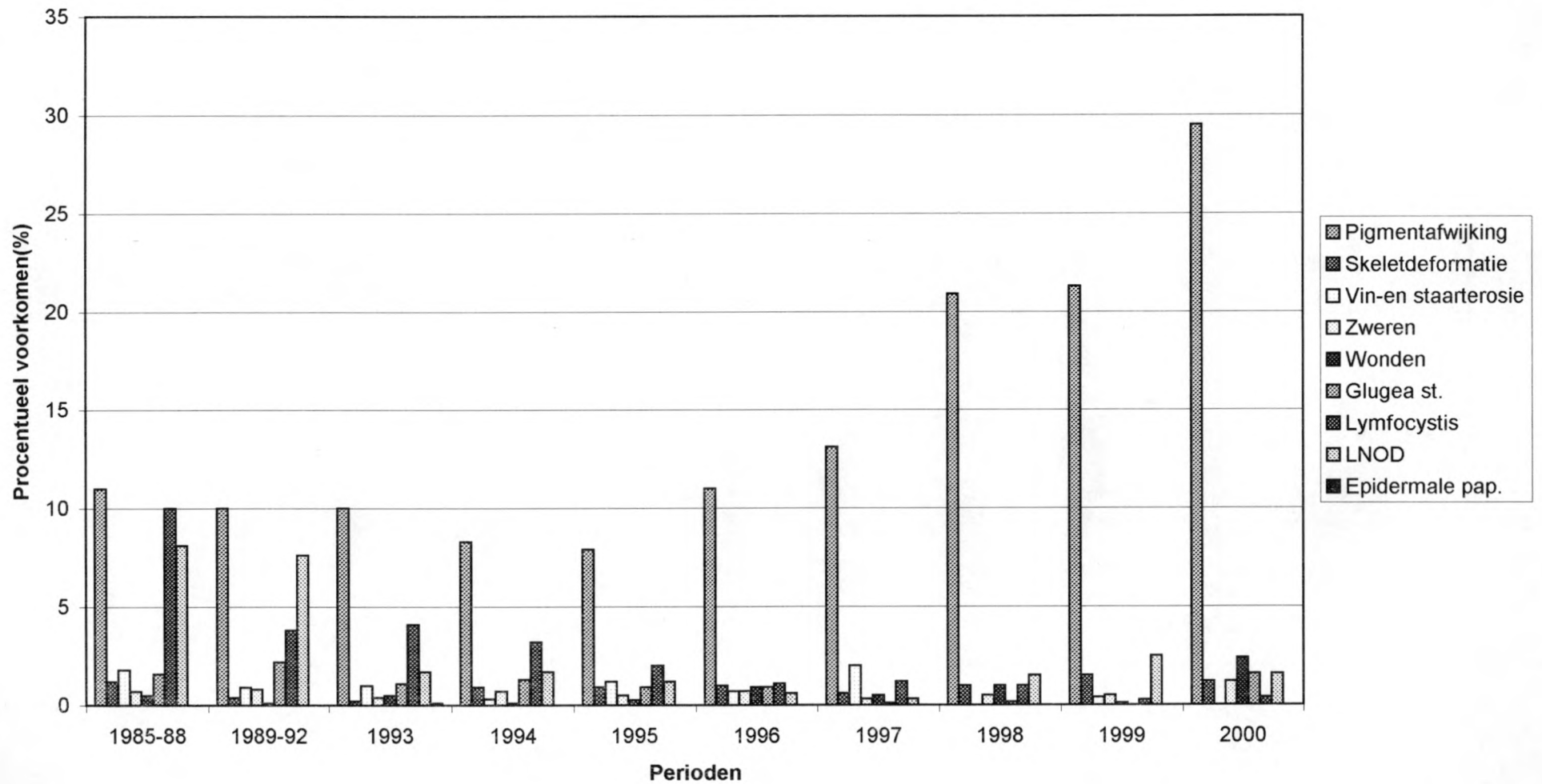
Figuur 1.1.3.1 : Evolutie van het voorkomen van in- en uitwendige aandoeningen bij schar afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1985-2000)

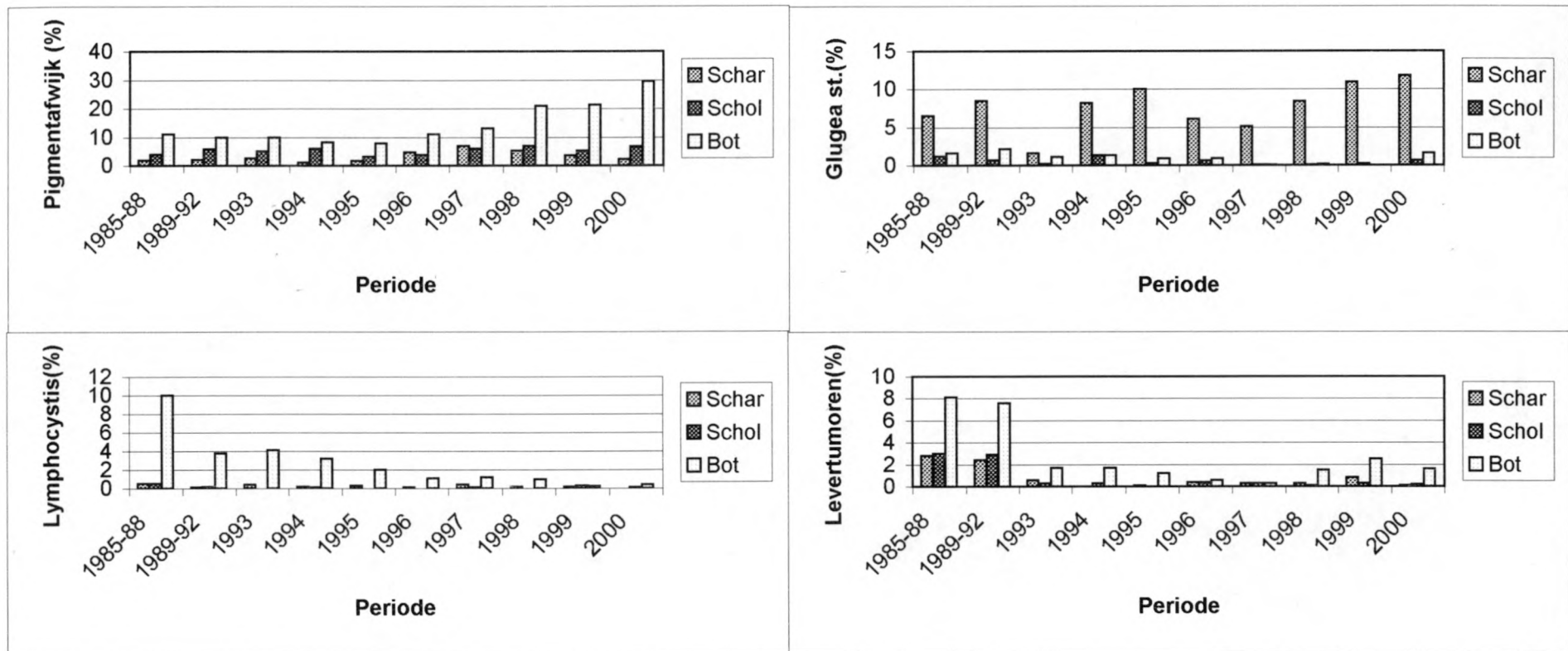


Figuur 1.1.3.2 : Evolutie van de in- en uitwendige aandoeningen bij schol afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1985-2000)



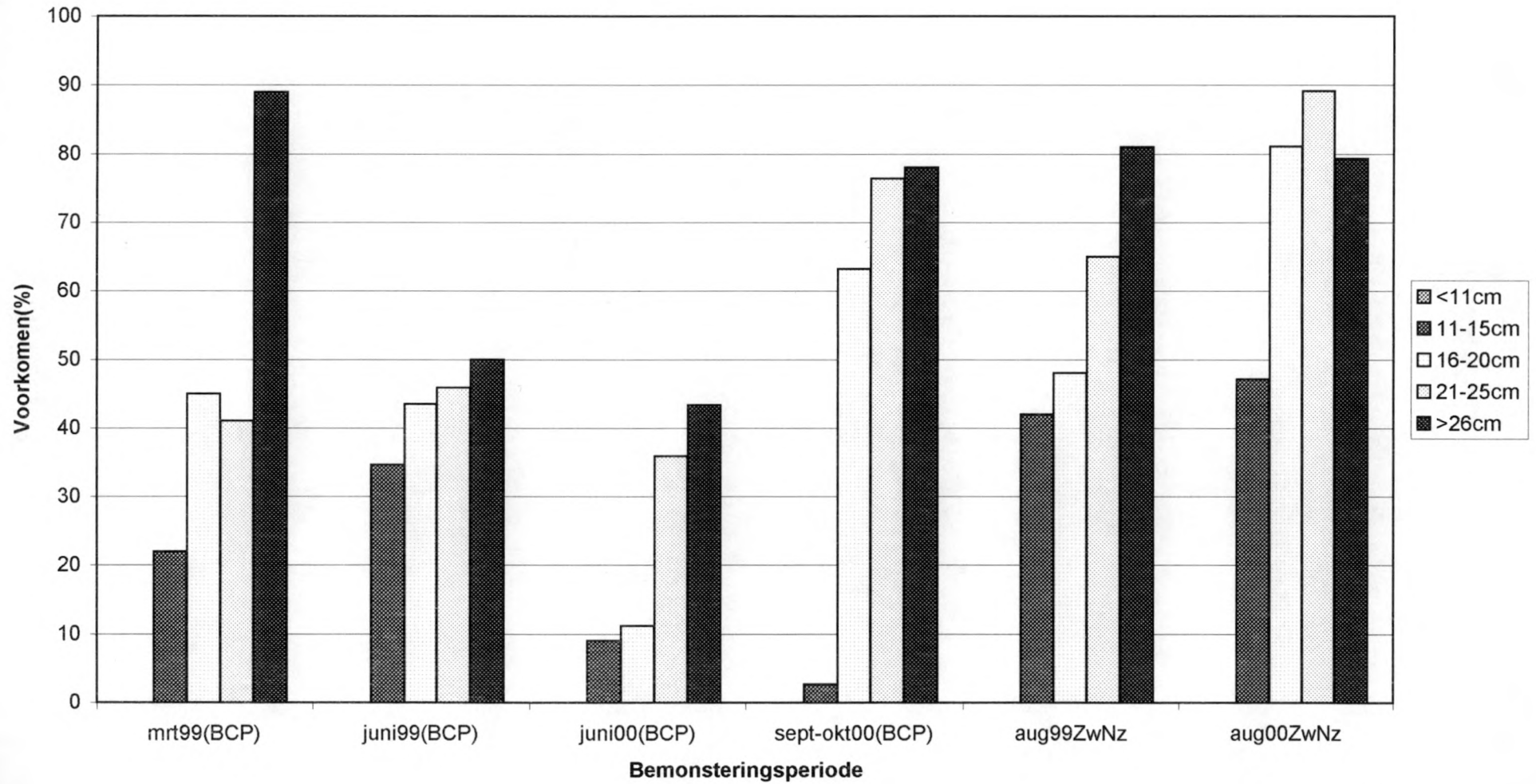
Figuur 1.1.3.3 : Evolutie van het voorkomen van de in- en uitwendige aandoeningen bij bot afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1985-2000)





Figuur 1.1.3.4 : Evolutie van voorkomen van in- en uitwendige aandoeningen bij platvis uit het Belgisch continentaal plat (1985-2000)

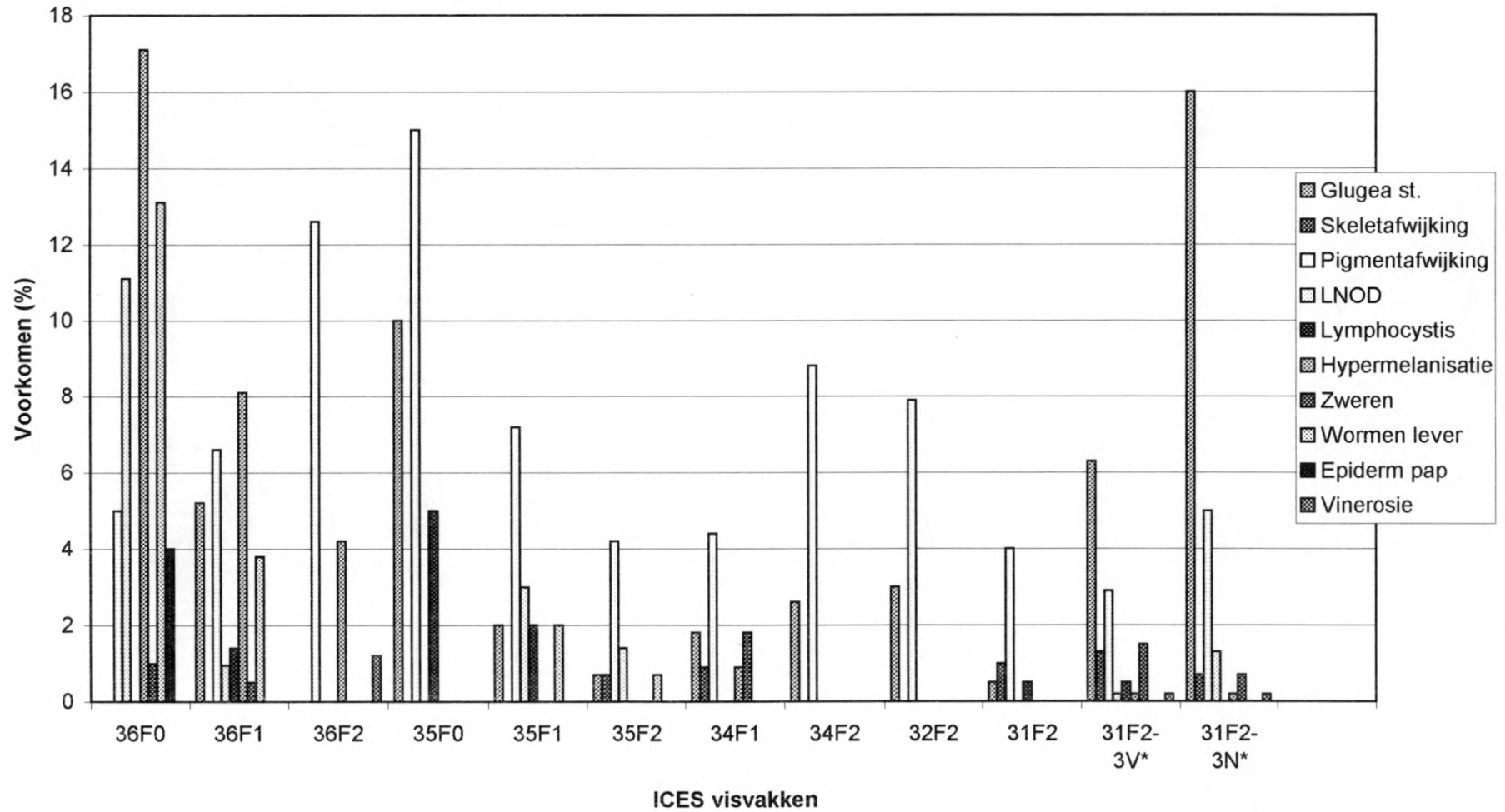
Figuur 1.3.1.7 : Voorkomen van *Haemogregarina simondi* in de bloedcellen van tong (*Solea solea*) in functie van de grootte en het seizoen in het B.C.P. en de Zw-Noordzee



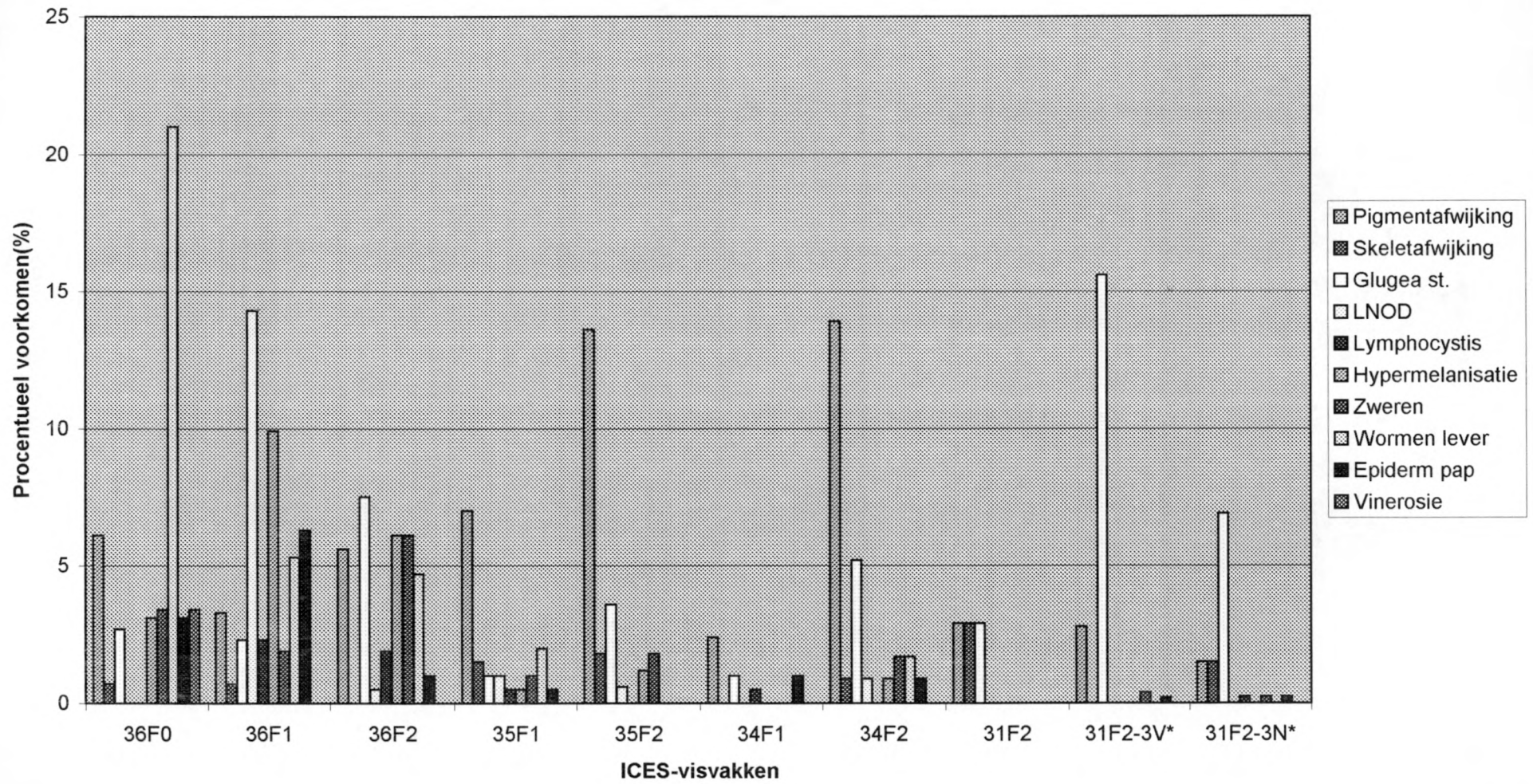
Bcp = Belgisch continentaal plat.

ZwNz = Zuidwestelijke Noordzee

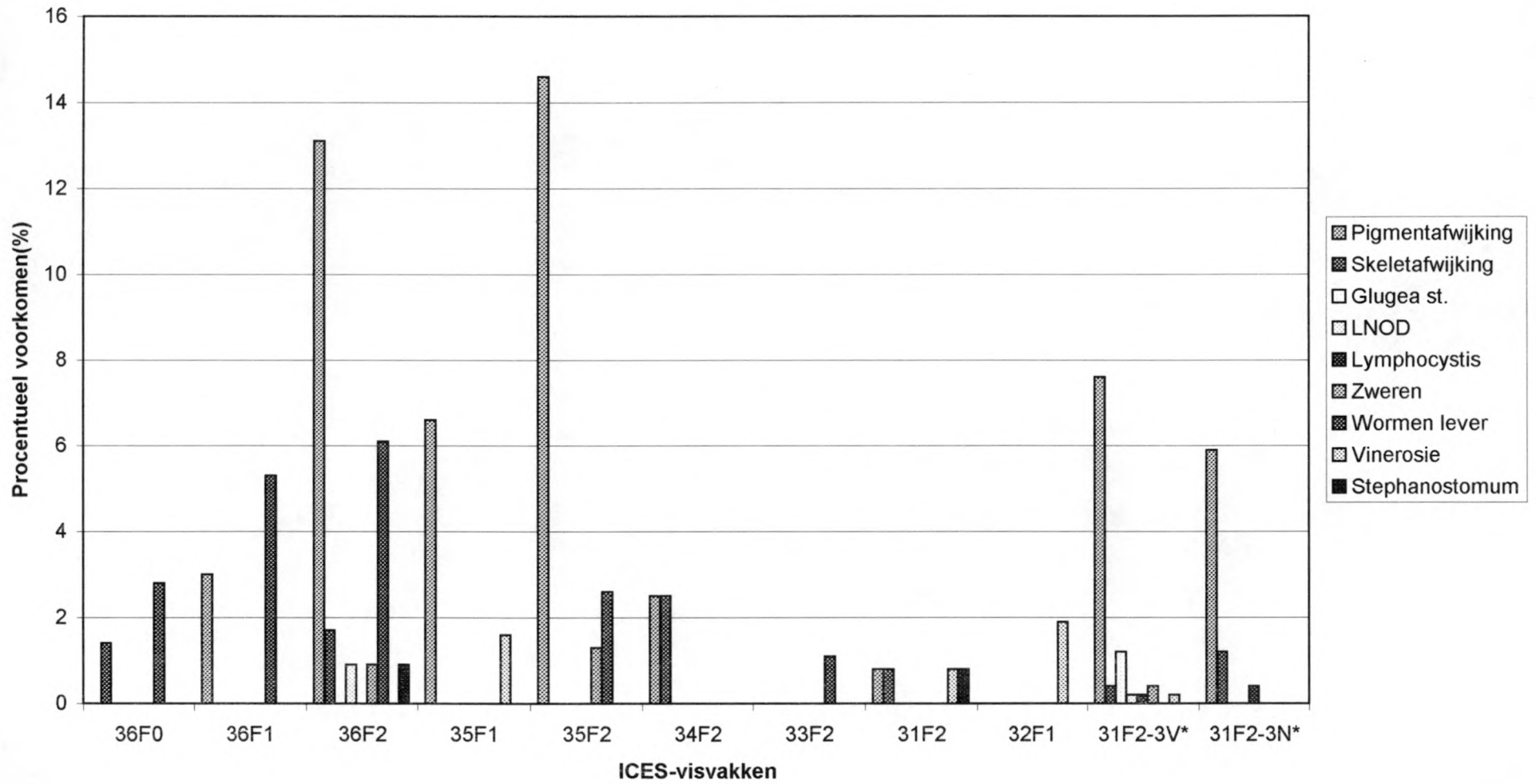
Figuur 1.1.3.6 a: Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schar in relatie met de ICES-visvakken in de ZW-Noordzee (Belgica campagne aug 1999)

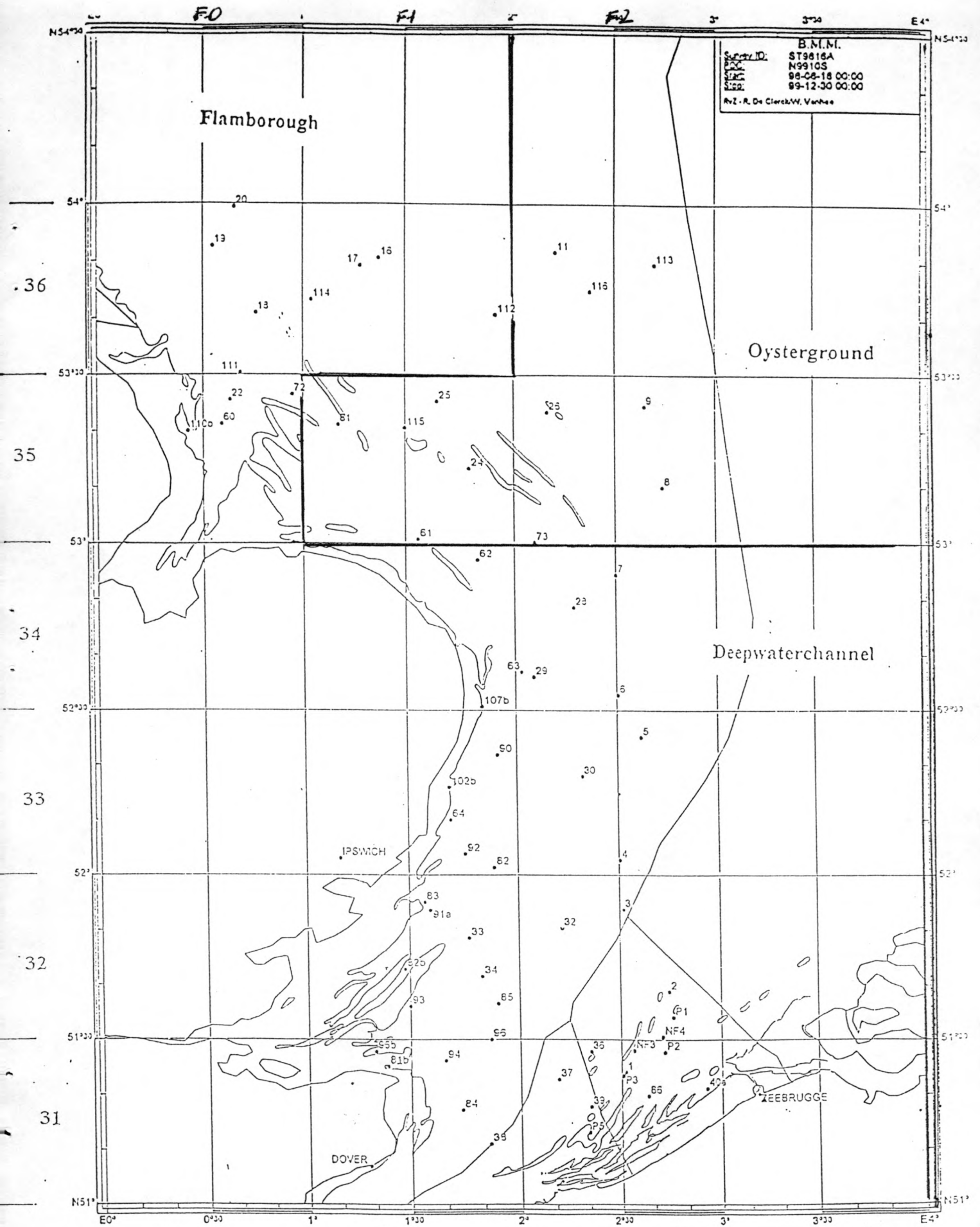


Figuur 1.1.3.6 b : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schar in relatie met de ICES visvakken in de ZW-Noordzee (Belgica campagne aug 2000)



Figuur 1.1.3.7.b : Procentueel voorkomen van ziekten en parasieten bij schol in relatie met de ICES-visvakken in de ZW-Noordzee (Belgica campagne aug 2000)





Figuur : 1.1.3.8 – Visgronden voor schol en schar:

Project 1.2. - Histopathologisch onderzoek en registratie van levernodulen bij platvis

a. Projectverantwoordelijke : D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond materiaal en methoden

Histologische en histochemische biomerkttekens van letsels, het slecht functioneren en het ontstaan van tumoren als gevolg van chronische blootstelling aan levertoxinen en levercarcinogenen worden tegenwoordig voorgesteld als de beste indicatoren om de verzwakking van vis door antropogene activiteiten aan te wijzen. Zoals bij andere dieren is de lever van vis betrokken bij de omzetting van het voedsel en de biotransformatie van lichaamsvreemde stoffen. Vooral platvis die het meest kwetsbaar is, leeft in nauw contact met het sediment dat levertoxinen en carcinogene componenten accumuleert. Levercellen reageren zeer gevoelig op veranderingen in het natuurlijk milieu van vis. Hoge concentraties aan schadelijke stoffen en contaminanten veroorzaken op lange termijn een zodanige 'stress' dat vis vatbaar wordt voor ziekten.

Leverletsels die in wilde vis gevonden worden zijn te vergelijken met neoplasia en aanverwante letsels (niet-neoplastische weefsels) die door experimentele blootstelling van vis en zoogdieren aan chemische carcinogenen en andere toxische verbindingen geïnduceerd worden. In deze zin treden deze letsels bij het blootstellen aan contaminanten misschien op als een van de meest directe en geïntegreerde 'bio-markers'. Het voorkomen van toxisch fytoplankton heeft eveneens direct of indirect een invloed op de gezondheid van vis. Van sommige toxines is het bekend dat zij aan de basis liggen van het ontstaan van levertumoren

Ter gelegenheid van de ICES-Meeting omtrent het gebruik van leverpathologie bij de monitoring van platvis (Weymouth, 1996) produceerde de werkgroep een nieuw classificatieschema van leveraandoeningen bij platvis die als 'bio-markers' voor monitoringprogramma's in aanmerking kunnen komen. De belangrijkheid van het letsel als 'bio-marker' wordt eveneens aangegeven.

Gedurende de vergadering van de WGPDMO in Gdynia (ICES, 1998) werd informatie gegeven omtrent een voorstel voor de ontwikkeling van een trainings en intercalibratie programma voor de diagnose van histopatologische leverbeschadigingen die deel uitmaakt van

een schema inzake kwaliteitsverzekering (Quality assurance scheme). Dit schema werd sedert 1 november 1998 in een programma van de Europese Commissie geïncorporeerd onder de titel "Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes" (BEQUALM). Gedurende het eerste jaar werd vooral aandacht besteed worden aan de oprichting en uitvoering van een intercalibratie-programma voor de diagnose van leverpathologie. Er werd een verzameling aangelegd van bewerkte histologische weefsels, foto's van relevante leverbeschadigingen en bijbehorende documentatie. Tenslotte werd door de workshop protocols, praktische oefeningen en diagnostische criteria tot stand gebracht om de graad van overeenkomst (interpretatie van de pathologie) binnen de deelnemersgroep te bepalen. De eerste workshop nam in oktober 1999 plaats en nam 3 dagen in beslag (BEQUALM 1999). De tweede workshop zal gedurende het derde jaar van het project tot stand komen.

Deze studie heeft tot doel een bijdrage te leveren voor de detectie van zichtbare levernodulen, die kunnen veroorzaakt worden door bacteriën, parasieten, contaminanten en toxisch fytoplankton (Verdrag van Parijs).

c. Stand van zaken

De BEQUALM histopathologische werkvergadering had plaats in de CEFAS Visserij laboratoria te Weymouth, UK en nam drie dagen in beslag.

Vooreerst werden de nationale rapporten omtrent de activiteiten rond de monitoring van visziekten in de diverse landen besproken. De protocollen voor fixatie, histologische behandeling en kleuring (Haematoxylin en Eosin) werden voor leverweefsel vastgelegd.

De ervaring bij de groep was dat de diagnose voor lever histopathologie geen gemakkelijke taak is. Tot nu toe werd de diagnose gestoeld op 35 verschillende categorieën van letsels (ICES 1997). Sinds deze eerste vergadering waren slechts enkele laboratoria in staat dit systeem te gebruiken.

Als een onderdeel van de discussie werden sets van gekleurde doorsneden van schar en bot, als referentie materiaal aan elke deelnemer overgemaakt.

Met behulp van dit materiaal grepen praktische zittingen rond de microscopen plaats. Verder werden ook doorsneden onderzocht die door de deelnemers werden meegebracht. Deze doorsneden omvatten zeldzaam voorkomende tumoren bij schar en bot en andere typen van leverletsels (tumoren van de pancreas, cholangioma, carcinoma en proliferatie van de galwegen).

De ICES werkgroep WGPDMO stelde reeds in 1998 een aantal nieuwe categorieën van visziekten voor, die naast de reeds bestaande visziekten in het FDE (Fish disease Data Entry Program) dienen opgenomen te worden.

De nieuwe ziektecategorieën werden geselecteerd op basis van hun mogelijkheid de blootstelling aan contaminanten te kunnen aanwijzen.

De voornaamste categorieën, die voor monitoring doeleinden werden geselecteerd waren :

- Vroege niet-neoplastische letsels (sponslever, levercellen en nucleair cellulair polymorfisme, vacuolisatie van de levercellen en epitheliale galcellen) veroorzaakt door intoxicatie.
- Focussen van celbederf.
- Goedaardige tumoren
- Kwaadaardige tumoren
- Niet-specifieke leverletsels

Zowel voor de niet-neoplastische als voor de niet-specifieke leverletsels werd bij de deelnemers geen consensus bereikt. De beslissing zal worden uitgesteld tot na de bekendmaking van de resultaten van de ringtest.

Uiteindelijk zal voor de BEQUALM ringtest een set met referentie weefsel, afkomstig van het coördinerend lab, bij de deelnemers rondgaan. De slides zullen blind gelezen worden en gaan van het ene laboratorium naar het andere laboratorium tot de uiteindelijke terugkeer naar het moederlaboratorium in Weymouth. De resultaten zullen verzameld en samengevat worden in Excel. De ringtest is voorzien voor 2001.

De volgende vergadering omtrent de ontwikkeling van een training en intercalibratie programma van de Europese Commissie (BEQUALM) is voorzien voor november 2001.

Er zal voornamelijk aandacht besteed worden aan:

- De evaluatie van de nog uit te voeren ringtest.
- De vooruitgang bij het ineensteken van de aangekondigde CD-ROM en eventuele veranderingen zullen worden besproken.
- Het histopathologisch materiaal dat gedurende de nationale programma's wordt verzameld zal worden onderzocht.
- Aanbevelingen omtrent de toepassing van het schema omtrent kwaliteitsverzekering zullen worden geformuleerd.

Voor wat de resultaten van het Belgisch onderzoek in de zuidwestelijke Noordzee betreft, werd gedurende de periode 1990-2000 de evolutie van het voorkomen van levertumoren bij schar, schol en bot in de tabellen 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 opgenomen (DECLERCK 1999). Het procentueel voorkomen bij de drie verschillende schar en scholpulaties Flamborough (area 2); Oysterground (area 3); Deepwaterchannel (area 4) is eveneens in de tabellen vermeld.

Gedurende de eerste drie onderzoekingsjaren (1990-1993) werden tussen het voorkomen van levertumoren bij schar en schol geen significante verschillen gevonden. Sindsdien werd een

dalende trend voor beide vissoorten vastgesteld. In 1999 werd echter een significante stijging bij schar uit de Flamborough zone 2 vastgesteld. Deze stijging werd in augustus 2000 ter gelegenheid van de onderzoeken in de Zuidwestelijke Noordzee bevestigd.

In het Belgisch continentaal plat was het voorkomen van levernodulen zeer frequent bij platvis tussen de jaren 1980-1990, doch daalde nadien aanzienlijk. Alleen bij bot, afkomstig van het estuarium van de Westerschelde, bleef het procentueel voorkomen van levertumoren tot in 1992 hoog (8,5%), doch daalde nadien tot 0,8% in 1996. De laatste twee jaar (1998-1999) steeg het voorkomen opnieuw tot 1,5%.

Uiteindelijk geeft tabel 1.2.4 het voorkomen weer van visueel bepaalde tumoren bij platvis, afkomstig van de zuidwestelijke Noordzee, in de periode 1997-1999. In 74% van de gevallen werden histologische veranderingen vastgesteld. Hiervoor werd de fixatie van het leverweefsel zo vlug mogelijk in gebufferde formol gebracht. De weefsels werden ontwaterd, geklaard, en ingebed in paraffine wax. Voor de kleuring werd de haematoxiline\ eosine methode aangewend (Weymouth 1996,1999). De diagnose werd uitgevoerd volgens de criteria van BOORMAN (1997), KOHLER (1996) EN MURCHELANO (1990).

Werkschema 1999-01				
	99-2	00-1	00-2	01-1
Deelname werkvergaderingen te Weymouth (UK)	U			X
Levernodulen rond- en platvis Belgisch Continentaal Plat	U	U	U	U
Levernodulen rond- en platvis ZW-Noordzee	U		U	
Leveronderzoek schol Belgisch Continentaal Plat	U		U	

U = reeds uitgevoerd

d. Referenties

ANON. (1999). Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes (BEQUALM). Report of the workshop (Weymouth 21-23 October 1999) : External Fish Diseases and Liver Histopathology.

BOORMAN, A et al. (1997) : Diagnostic Criteria for Degenerative, Inflammatory, Proliferative Nonneoplastic Liver Lesions in Medaka (*Oryzias latipes*) : Consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group.

DECLERCK D (1996) : Registration of liver nodules in flatfish and identification of problems areas in the south-western North Sea. ICES ad hoc meeting on the use of liver Pathology of flatfish for monitoring Biological effects of Contaminants, 10p (Weymouth, 1996).

ICES (1998) : Report of the Working Group on Pathology and diseases of Marine Fish Stocks. ICES, Mariculture Committee, 1998/F:6

KOHLER-GUNTHER A, VETHAAK D, MEYERS M, OKIHIRO M, BOGOVSKI S , GRINWIS G AND FEIST S (ICES 1996 p2-73). Diagnostic criteria for liver histopathology. Report of the special Meeting on the Use of Liver Pathology of Flatfish for monitoring Biological effects of Contaminants.

MURCHELANO RA and MACCLEAN SA (1990). Histopathological Atlas of the Registry of Marine Pathology, Oxford, MD., 45-49.

Populatie	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Flamborough (Area 2)	2,4	1,9	2,7	0,8	0,6	0,6	2,5	2,1	0	3,9	9,7
Oysterground (Area 3)	1,9	3,7	1,9	1	1,1	0,1	0,4	1,4	0,3	1,5	0,7
Diepwaterchannel (Area 4)	3,6	1,7	3,1	0	0	0	0	0,2	0,3	0,1	0,6

Tabel 1.2.1: Evolutie van het voorkomen (%) van levertumoren bij schar afkomstig van de zuidwestelijke Noordzee (1990-2000)

Populatie	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Flamborough (Area 2)	1,8	2,3	4,4	1,7	0,8	0,35	0	0	1,2	0,6	0,5
Oysterground (Area 3)	1,8	3,8	3,6	1,2	0	1,7	1,3	0	0	0,5	0,6
Diepwaterchannel (Area 4)	3,1	3,1	2,5	0	0	0,5	0	0,2	0,2	0,3	0,2

Tabel 1.2.2 : Evolutie van het voorkomen (%) van levertumoren bij schol in de zuidwestelijke Noordzee (1990-2000)

	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Western Scheldt estuary (B.c.s)	4,2	8,1	8,5	1,7	1,7	1,2	0,8	0,3	1,5	1,5	0

Tabel 1.2.3 : Evolutie van het voorkomen (%) van levertumoren bij bot in het Belgisch continentaal plat (1990-2000)

Jaar	Aantal onderzocht	LNOD visueel gedetecteerd als tumor	Gedecteerd met histopathologische veranderingen
1997			
Flounder	910	3	3
Plaice	2074	4	3
Dab	2769	28	18
1998			
Flounder	608	9	7
Plaice	1653	3	2
Dab	1919	5	4
1999			
Flounder	272	4	3
Plaice	1122	6	5
Dab	1558	19	15

Table 1.2.4 : Gedetecteerde levertumoren bij platvis afkomstig van de zuidwestelijke Noordzee (1997-1999)

Project 1.3. - Hematologisch en immunologisch onderzoek bij zeevis

Project 1.3.1-Bloedonderzoek op kabeljauw en tong uit het Belgisch Continentaal Plat en de zuidwestelijke Noordzee

a. Projectverantwoordelijke : D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond, materiaal en methoden

Hematologisch en immunologisch onderzoek spelen een belangrijke rol in de diagnose van ziekten bij vissen. In dit domein is er bij zeevis nog weinig bekend. Ook bij in het wild levende vispopulaties zoals vis uit de Noordzee, is er in verband met hematologisch onderzoek weinig beschikbaar. In het licht van de op gang zijnde aquacultuur van tarbot en tong is het volgen van de bloedformule noodzakelijk. Het verschaft ons onder meer belangrijke gegevens omtrent het voedselregime doch het bloedonderzoek stelt ons vooral in staat besmettingen van bacteriologisch en protozoaire aard vroegtijdig op te sporen. De samenstelling van de bloedformule is afhankelijk van een aantal factoren zoals stamsoort, geslacht, leeftijd en seksuele maturiteit, seizoen, temperatuur, paaiperiode, sociale stress, transport, aanwezigheid van vrije koolstofdioxide en deficiëntie aan zuurstof. Het bloedbeeld van een vis kan ook door ziekte (BLAXHALL, 1972; HOFFMAN en medewerker, 1984; KIRMSE, 1980; STEINHAGEN en medewerkers, 1990) wijzigen. Naast de fysiologische stress en de stress door ziekten kan er bij de vis stress geïnduceerd worden door het milieu (ZELIKOFF, 1994; WEEKS and WARINNER, 1986; PULSFORD et al, 1995; HOLDWAY et al, 1994) waarin de vis leeft. Ook de voeding speelt een belangrijke rol (BLAZER, 1991).

De morfologie, de functie en de oorsprong van de rode bloedcellen worden ondermeer door PEETERS en medewerker (1985) beschreven en door de 'Atlas of fish histology' (1982) in beeld gebracht. De morfologie, de functie en de oorsprong van de lymfocyten, de plasmacellen,

de monocyten, de macrofagen, de granulocyten, (neutrofiële, basofiele, en eosinofiele) en de trombocyten worden door ELLIS (1977) omschreven.

Het bloedonderzoek op kabeljauw en tong, afkomstig van het Belgisch Continentaal Plat werd voortgezet. Op regelmatige tijdstippen werden tong en kabeljauw bemonsterd en na de nodige voorbereidingen van de bloedstalen op het schoolschip "De broodwinner" naar het laboratorium gebracht. Als hematologische parameters werden erythrocyten en leucocyten bepaald. Bij de leucocyten werd een onderscheid gemaakt tussen de monocyten, lymfocyten en granulocyten. Ook het procentueel voorkomen van de trombocyten werd eveneens opgenomen. Verder werden ook het hematocrietgetal en het hemoglobine gehalte bepaald. De gebruikte hematologische methoden werden omschreven door COTMAN EN DECLERCK (1993). Het bloedonderzoek naar het voorkomen van *Heamogregarina simondi* in het Belgisch Continentaal Plat en de zuidwestelijke Noordzee werd uitgevoerd met behulp van de 'Broodwinner' en het oceanografisch schip 'De Belgica'. Er werden tongen in diverse visvakken bemonsterd (figuur 1.1.3.8).

c. Vorderingsverslag

De resultaten van het hematologische onderzoek bij tong zijn opgenomen in de tabellen 1.3.1.1 en 1.3.1.2 en voor kabeljauw in de tabel 1.3.1.3. Naast de vangstdatum werd het geslacht en de temperatuur van het zeewater geregistreerd.

Voor wat de bloedformule betreft werden geen duidelijke verschillen tussen het bloed van gezonde mannelijk en vrouwelijke tongen en kabeljauwen gevonden. Er werd eveneens geen significant verschil gevonden tussen de vrouwelijke en mannelijke tongen en kabeljauwen voor wat de conditiefactor betreft. Bij de tellingen worden zowel de monocyten, lymfocyten, granulocyten en trombocyten procentueel uitgedrukt. De uitstrijkjes werden gekleurd met Hemacolor van Merck.

Gedurende de bemonsteringsperiode bedroeg het gemiddeld aantal erythrocyten voor tong en kabeljauw respectievelijk $1866697/\mu\text{l} \pm 379236$ en $1624756/\mu\text{l} \pm 414126$. Het erythrocyten gemiddelde bij kabeljauw lag lager dan bij schor, schol, bot en tong. Het gemiddeld aantal leucocyten bedroeg bij tong en kabeljauw respectievelijk 20221 ± 9843 en 30033 ± 9804 . Het leucocyten aantal lag hoger bij kabeljauw dan bij alle andere reeds onderzochte vissoorten.

Het gemiddeld hematocriet getal en de hemoglobine concentratie voor tong bedroeg respectievelijk $21,6 \pm 4$ en $4,6 \pm 1,2 \text{ g/l}$. Het hemoglobine gehalte bij kabeljauw verschilde niet aanzienlijk met tong, doch het hematocriet getal lag gemiddeld hoger bij kabeljauw.

De evolutie van de bloedparameters van tong werd grafisch in de figuren 1.3.1.1 tot 1.3.1.6 uitgezet.

Het aflezen van het hematocriet getal van tong werd bemoeilijkt door een onduidelijke scheidingszone. Dit verschijnsel komt soms voor bij zieke exemplaren van andere vissoorten. Voor wat de studie van de bloedparasieten bij platvis betreft, werden van juni tot oktober 2000 uitstrijkjes op tong (1200 exemplaren) gemaakt die afkomstig was van het Belgisch Continentaal Plat. De *haemogregarina* infectie van de erythrocyten bereikte, bij de 21-25cm groep en de 26-30cm groep (figuur 1.3.1.7) in juni 36% en 43% en in september 76% en 78%. Er werd geen infectie bij de kleinste groep (<11cm) vastgesteld. Zoals het jaar voorheen werd de hoogste infectiegraad (80-90%) in augustus 2000 gedurende de boomkorrevisserij in de zuidwestelijke Noordzee opgetekend. Schol en schar waren niet met *Haemogregarina* spp besmet.

Werkschema 1999-2001				
	99-2	00-1	00-2	01-1
Bloedformule tong	U	U	U	U
Bloedformule kabeljauw		U		U
Parasitair onderzoek tong	U	U	U	U
Parasitair onderzoek kabeljauw		U		U

U = uitgevoerd

d. Referenties

BLAXHALL PC (1972). The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature.

Journal.Fish Biology. 4, 593-604

COTMAN D (1993). Hematologisch en immunologisch onderzoek bij vissen. Eindverhandeling o.l.v. D. Declerck (onuitgegeven. Brugge, H.T.I).

ELLIS AE (1977). The leucocytes of fish : A review.

Journal. Fish Biololy. 11, 453-491.

HOFFMANN R, and LOMMEL R (1984) Haematological studies in proliferatives kidney diseases of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.

Journal of Fish Diseases 7, 323-326.

HOLDWAY DA, BRENNAN SE and AHOKAS JT (1994). Use of Hepatic MFO and Blood Enzyme Biomarkers in Sand Flathead (*Platycephalus bassensis*).
Marine Pollution Bulletin. 11, 101-114.

KIRMSE P (1980). Observations on the pathogenicity of *Haemogregarina sachi* in farmed turbot *Scotphthalmus maximus* (L.).
Journal of fish Diseases. 3, 101-114.

PEETERS G and SCHWARZER R (1985). Changes in hemopietic tissue of rainbow trout under influence of stress.
Diseases of aquatic organisms. 1, 1-10.

STEINHAGEN D and JENDRYSEK S (1994). Phagocytosis by carp granulocytes, in vivo and in vitro observations.
Fish and Shellfish Immunology. 4, 521-525.

WEEKS AD and WARINNER JE (1986). Functional evaluation of macrophages in fish from polluted estuary.
Veterinary Immunology and Immunopathology. 12, 313-320

ZELIKOFF JT (1994). Fish immunotoxicology.
Second edition, 71-95. Edited by JH Deann JH et al, New York, Raven Press.

Tabel 1.3.1.1 : Bloedonderzoek op tong afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1998)

Tong Datum	Lengte	Gewicht	Geslacht	Cond. Fact	Haematocriet	R.B.C./ μ l	W.B.C./ μ l	Monocyt(%)	Lymphocyt(%)	Granulocyt(%)	Trombocyt(%)	Haemo-globine g/dl	Haemo-gregarina
Temp. zeew.													
4/02/98 5°C	39	660	vr	1,11	28(+2)	2272000	25312	3	40	8	49	7,37	+
17/03/98 8°C	30	310	vr	1,15	22(+2)	1504000	20468	7	68	4	21	5,86	+
	25	135	vr	0,86	28(+3)	2752000	6675	7	40	6	47	8,02	+
	34	440	vr	1,15	20	1616000	18281	6	51	6	37	5,71	+
	29	270	vr	1,1	24	2000000	24375	20	60	14	6	6,24	+
	27	185	m	0,9	30(+2)	2160000	9375	13	44	7	36	7,67	+
22/04/98 10°C	38	510	vr	0,93	13(+2)	1248000	37187	11	48	20	21	3,3	-
	36	510	vr	1,1	22(+7)	2304000	10312	1	82	4	13	5,7	+(min)
	25	130	m	0,83	21(+2)	2256000	26250	15	60	9	16	5,6	+(min)
	26	150	m	0,85	22(+3)	1840000	35781	9	64	4	23	5,8	+
27/05/98 15,5°C	29	240	vr	0,98	15(+6)	1360000	35156	6	85	7	2	4,23	+
	29	240	vr	0,98	18(+5)	1824000	29375	8	70	4	18	5,22	+
	31	250	vr	0,84	22(+3)	1696000	21718	4	69	4	23	4,69	+
	30	230	vr	0,85	23(+3)	2032000	19843	16	61	8	15	5,14	+
	38	455	vr	0,82	23	1632000	13281	14	63	6	17	2,9	+
	32	270	vr	0,82	18(+4)	1920000	50312	13	57	6	24	3,17	-
	29	165	m	0,67	19(+2)	1808000	46093	4	46	7	43	3,85	+
11/6/98 16°C	28	210	vr	0,95	18(+2)	1552000	12031	5	66	3	26	4,5	+
	39	490	vr	0,81	19(+1)	1216000	8594	7	72	1	20	4,38	+
	30	220	m	0,81	23(+1)	2288000	13593	8	50	8	34	4,95	+
	30	220	m	0,81	17(+4)	1712000	32812	3	75	4	18	4,61	+
	35	415	vr	0,96	20(+2)	1856000	26718	9	69	3	19	4,27	+
	31	300	vr	1	24	2400000	12500	4	78	3	15	5,21	+
	32	320	vr	0,97	19(+2)	1600000	13750	1	82	4	13	4,5	+
	31	291	m	0,97	20(+2)	2656000	17187	5	69	3	23	5,25	+
16/09/98 17°C	30	300	vr	1,11	30	2048000	14375	8	60	7	25	3,89	+
	33	359	vr	1	24	1920000	14375	7	61	7	25	3,25	+
	37	573	vr	1,13	30	2032000	18125	16	50	11	23	3,13	+
	32	318	vr	0,97	27	1936000	10156	5	64	3	28	4,19	-
18/11/98 11°C	27	230	vr	1,17	18(+2)	1552000	19687	7	56	3	34	3,44	+
	28	178	m	0,8	22(3)	1872000	18281	9	56	5	30	4,27	+
	32	380	vr	1,16	18(+2)	1792000	25468	17	45	5	33	3,75	++
	29	263	vr	1,08	18(+1)	1744000	7656	1	65	2	32	2,57	+
	26	185	vr	1,05	19(+1)	1552000	13906	5	59	3	33	2,61	+
	29	253	vr	1,04	24(+3)	1856000	16093	5	57	5	33	5,4	+
	27	213	m	1,08	26(+3)	2208000	22813	9	55	10	26	4,27	+
	33	340	vr	0,95	22(+2)	2160000	26406	3	50	3	44	4,31	+
11/12/98 9°C	41	830	vr	1,2	24(+3)	1632000	17812	15	32	10	43	4,95	+
	31	310	vr	1,04	20(+3)	2224000	13437	10	58	10	22	3,7	+
	31	300	vr	1,01	21(+5)	2400000	17656	10	65	1	24	5,52	+
	27	190	vr	0,96	15(+3)	1392000	15156	10	64	9	17	3,17	+
	30	300	vr	1,11	18(+2)	960000	9375	4	47	5	44	3,85	-
	32	390	vr	1,19	24(+6)	1504000	21562	12	65	8	15	4,01	+

Tabel 1.3.1.2 : Bloedonderzoek op tong afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1999-2000)

Tong Datum	Lengte	Gewicht	Geslacht	Cond. Fact	Haematocriet	R.B.C./ μ l	W.B.C./ μ l	Monocyt(%)	Lymphocyt(%)	Granulocyt(%)	Trombocyt(%)	Haemoglobine g/dl	Haemogregarina
Temp. zeew.													
6/5/99	32	295	vr	0,9002686	16+2	1360000	76875	2	65	7	26	6,05	+
11°C	28	160	vr	0,73	25+2	2016000	30625	7	55	9	29	5,74	+
	27	185	vr	0,94	15+2	1040000	34687	7	74	13	6	5,74	+
	32	265	vr	0,8	19+1	1696000	54062	7	84	7	2	7,41	+
26/5/99													
12°C	31	250	vr	0,84	19+1	1360000	28125	14	58	9	19	4,42	+
	28	180	vr	0,82	25+3	2032000	33906	6	60	8	26	6,99	+
	28	170	vr	0,77	12+6	1280000	66562	5	67	6	22	3,93	+
	29	210	vr	0,86	25+3	2112000	33125	8	59	8	25	6,9	+
	26	130	m	0,73	17+3	1488000	39531	3	54	13	30	4,8	+
	31	270	vr	0,9	20+2	1184000	51875	12	49	13	26	4,65	+
	28	185	vr	0,84	16+3	1776000	29062	6	74	5	15	4,8	+
	27	160	vr	0,81	17+1	1344000	18437	21	54	21	4	4,23	-
1/6/99													
13°C	27	160	vr	0,81	23+3	2192000	18750	10	50	5	35	5,93	+
	30	227	vr	0,84	22	1648000	19062	3	58	18	21	4,76	+
	22	110	m	1,03	23+6	2032000	70312	5	64	12	19	5,55	+
	25	142	m	0,9	19+1	1264000	40625	5	61	10	24	4,19	+
	28	190	m	0,86	19+2	1296000	16900	5	52	5	38	4,91	+
	25	123	m	0,78	23+5	2016000	37187	6	61	7	26	6,16	+
	29	180	vr	0,73	26+2	1760000	31093	10	52	5	33	6,16	+
9/6/99													
14°C	30	240	vr	0,88	14+4W	1024000	55312	4	76	4	16	4,08	+
	28	175	vr	0,97	22+2R	2304000	29062	5	59	2	34	6,06	+
	27	185	m	0,93	20+2R	1712000	22500	3	52	5	40	5,78	+
	26	165	m	0,93	25+1W	2112000	23437	10	69	8	13	6,43	+
	31	275	vr	0,92	26+5R	3104000	68750	9	45	14	32	7,75	+
	28	150	m	0,68	13+6RR	976000	26562	10	51	3	36	4,04	+
14/6/99													
14°C	32	280	vr	0,85	15+2w	1632000	17187	8	74	7	11	4,27	+
	25	150	m	0,96	22+6R	1504000	35937	6	69	12	13	5,14	+
	28	190	m	0,86	18+1w	1248000	16406	2	53	8	37	4,99	+
	26	150	m	0,85	20+W	1280000	34375	9	59	12	14	4,31	+
	29	190	m	0,78	22+2W	1888000	24375	4	67	10	19	5,25	+
	30	230	m	0,85	16+2W	1248000	23125	3	82	4	11	4,51	+
16/6/99													
14,5°C	33	345	vr	0,96	18+3R	2016000	42187	1	62	17	20	5,44	+
	26	150	m	0,85	23+2W	2160000	30625	9	74	7	10	5,93	+
	26	120	m	0,68	18+2R	1520000	29375	6	66	7	21	4,7	+
	32	280	vr	0,85	24+5R	1680000	70937	1	71	8	20	6,08	+
	26	160	m	0,91	17+1R	1648000	34375	5	79	9	7	4,61	+
	28	190	vr	0,86	20+3R	1440000	39375	2	72	1	26	4,19	+
	29	220	vr	0,9	23+2W	2144000	31562	4	50	5	41	5,86	+
	27	150	m	0,76	23+2R	1552000	35781	10	70	11	9	4,72	+
25/6/99													
15°C	26	145	m	0,82	23+4R	1968000	40937	6	52	4	38	5,82	+
	30	215	m	0,79	15+1W	1424000	26875	4	44	4	48	3,02	+
	28	205	vr	0,93	15+2R	1424000	31093	9	61	11	19	5,03	+
	31	255	vr	0,85	16+2R	1504000	34687	8	76	8	8	4,31	+

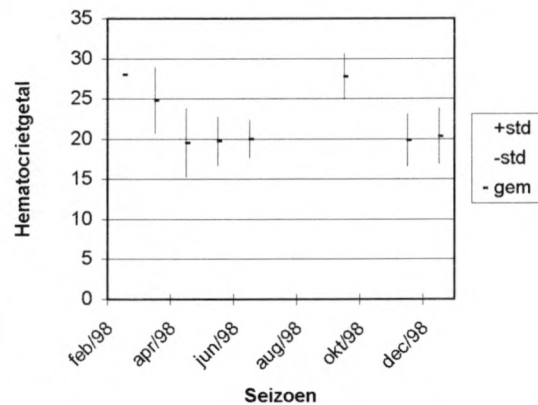
	25	120	m	0,77	20+2W	1360000	21718	3	65	5	27	4,46	+
	25	150	m	0,96	19+2W	2048000	45625	1	67	4	28	5,48	+
	29	190	vr	0,78	20+2W	1552000	35937	8	54	16	22	5,37	+
	27	160	m	0,81	23+3R	2096000	30937	11	58	6	25	6,54	+
14/06/00	29	170	vr	0,69	20+3	2368000	9375	5	80	6	9	6,01	+
14°C	26	190	m	1,08	20+2	2112000	3750	4	55	9	32	6,8	++
	28	215	vr	0,97	22+3	1728000	11250	4	62	5	29	6,73	++
	26	165	m	0,93	18+3	2464000	9687	10	70	10	10	6,99	+
	31	230	vr	0,77	18+4	1280000	12812	3	75	5	17	6,99	+
	25	100	m	0,64	22+3	2976000	10000	16	69	6	9	7,52	-
	27	190	vr	0,96	22+3	2528000	14687	3	72	10	15	7,41	+
	26	170	m	0,96	18+3	2400000	9687	4	73	12	11	7,26	+
21/06/00	27	195	m	0,99	32	2400000	6875	2	75	6	17	8,11	+
14°C	27	185	vr	0,93	18+2	1504000	8437	3	75	8	14	5,02	-
	25	145	m	0,92	15+2	1824000	10937	1	73	6	20	5,32	+
	27	195	m	0,99	18+3	1824000	17187	4	51	6	39	7,07	+
	29	305	vr	1,25	21+3	1760000	23125	10	71	10	9	6,47	+
	26	180	m	1,02	20+2	1696000	36250	9	62	9	20	4,24	+
	27	210	vr	1,05	21+4	2016000	29062	6	76	13	5	4,16	-
	30	260	vr	0,96	22+1	1312000	8750	2	61	1	36	7,07	+
27/06/00	29	213	vr	0,87	18+3	1856000	18750	1	75	2	22	6,11	+
15°C	38	520	vr	0,94	22+4	2304000	16875	5	78	4	13	7,18	++
	24	120	m	0,86	17+4	1536000	25625	8	71	10	11	4,91	++
	26	163	vr	0,92	17+2	1504000	20625	5	65	12	18	4,95	+
	27	205	vr	1,04	23+2	2592000	7812	7	48	12	33	7,22	+
	29	207	vr	0,84	24+2	2240000	34687	14	42	10	34	7,74	-
	25	142	m	0,9	20+1	1728000	9687	2	65	6	27	6,03	+
	24	130	m	0,94	15+2	1376000	19687	6	60	15	19	4,94	+

Tabel 1.3.1.3 : Bloedonderzoek op kabeljauw afkomstig van het Belgisch continentaal plat (1998 - 2000)

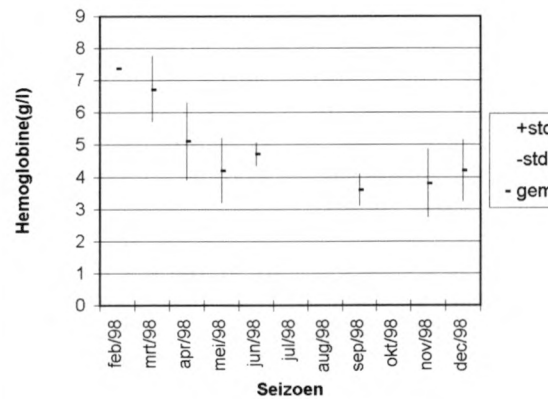
Kabeljauw datum	Lengte	Gewicht	Geslacht	Cond. fac	Hematocriet	R.B.C. \µl	W.B.C. \µl	lymphocyt(%)	onocyt(%)	ranulocyt(%)	Trombocyt(%)	Haemoglob g/dl	Ziekte
Temp. zeew.													
1\12\98	28	252	m	1,14	21+2	1360000	19687	52	15	4	29	2,83	
8°C	28	268	m	1,22	23+2	1376000	23750	55	13	5	27	3,41	
9\12\98	54	1890	vr	1,2	24	1808000	14687	43	16	13	28	3,2	Lerneocera b.
8°C	62	2790	vr	1,17	22+4	1088000	12968	53	12	9	26	3,55	"
	60	2560	m	1,18	25+2	2112000	15937	45	15	9	31	4	Miltaanfoening
	54	1820	vr	1,15	24+3	1568000	23437	43	14	7	36	5,29	Lerneocera b.
	58	2170	vr	1,11	15	896000	11718	74	5	11	10	8,24	Miltaanfoening
	64	2830	m	1,08	19+3	1072000	25000	56	18	17	9	3,48	Miltaanfoening
11\12\98	27	200	vr	1,02	15	992000	24375	48	19	5	28	4,42	Lern 2+Miltaanf.
8°C	54	1400	vr	0,89	27+2	1344000	17968	33	12	6	49	5,86	
	49	1510	m	1,28	25+3	1504000	25312	51	20	4	25	5,75	
	40	610	m	0,95	25+2	2144000	17968	40	22	5	33	5,7	
	27	250	m	1,27	21	1264000	33750	49	11	14	26	4,72	Miltaanfoening 3
	49	1510	vr	1,28	27+3	1440000	25937	54	14	9	23	5,06	
	37	600	m	1,28	28+2	2128000	27500	35	21	15	29	8,01	
	34	390	m	0,99	21	1344000	24062	59	10	15	16	6,05	
16\12\98	50	1330	vr	1,06	24+2	1424000	27500	46	23	10	21	6,01	
8°C	29	280	vr	1,14	26+4	1856000	45937	35	24	18	23	6,92	
	27	270	m	1,37	25+2	2336000	29843	47	29	7	17	5,82	Lerneoc. b 1
	40	670	m	1,04	32+2	3008000	29675	49	22	6	23	6,39	
	34	420	m	1,07	28+3	1440000	29843	56	15	12	17	4,34	Miltaanfoening
	30	400	vr	1,48	22+10	1440000	47968	50	14	8	28	6,08	
	40	640	vr	1	23+4	1296000	23906	56	10	7	27	5,59	Lerneoc. 3
17\12\98	27	205	vr	1,04	23+4	1872000	38437	53	24	12	11	5,7	
10°C	28	263	m	1,2	22+3	1504000	32031	65	12	15	8	5,03	
	36	480	vr	1,03	27+4	1824000	46875	63	16	6	15	5,78	
	31	330	m	1,1	26+2	1744000	44687	72	15	6	7	6,73	
	42	780	m	1,05	26	1456000	32812	70	12	10	8	5,14	
	29	330	m	1,35	25+2	1728000	47500	53	23	10	14	6,12	
	29	305	m	1,25	18	1408000	23125	57	14	9	20	6,35	
	27	230	m	1,17	14	1024000	17031	74	15	5	6	4,31	
18\12\98	51	1400	m	1,05	25+5	1680000	23125	55	29	2	14	5,78	
6°C	49	1460	m	1,24	27+6	1504000	48437	53	24	8	15	5,44	
	29	320	m	1,31	18+2	960000	42812	55	12	13	20	5,9	

	46	1170	vr	1,2	28+4	2432000	35312	59	13	12	16	7,18	
	32	370	m	1,09	18+2	1312000	36875	51	30	6	13	5,12	
	48	1460	vr	1,32	25+4	1792000	32812	43	27	9	21	5,82	Skeletvorming
	28	290	m	1,32	19+2	928000	48437	55	11	6	28	4,91	
	40	650	vr	1,01	30+6	1920000	40312	60	8	11	21	5,55	
22/01/99	31	405	vr	1,36	28+3	2432000	26718	52	13	9	26	3,97	Lern1:grote RBC
8,2°C	32	415	m	1,26	29+2	1664000	27656	60	16	6	18	3,55	
	21	110	m	1,18	30+3	1920000	28125	61	1	11	12	4,46	
	29	285	vr	1,16	27+4	1504000	40312	61	17	11	11	3,55	
	30	320	m	1,18	33+2	2128000	20781	53	22	14	11	4,57	
	28	295	m	1,34	27+2	1472000	36039	54	16	18	12	4,16	
	27	255	m	1,29	26+2	1264000	32656	54	20	9	17	3,47	
	34	480	vr	1,22	21	1120000	11562	84	6	6	4	4,04	
29/01/99	30	315	m	1,16	27+1	1872000	33750	53	22	9	16	3,85	
8,4°C	30	340	vr	1,26	20+3	1440000	27656	44	21	17	18	3,78	
	27	240	m	1,21	27+2	1712000	38593	48	16	14	22	4	
	31	400	m	1,34	32+1	2256000	32656	31	17	16	36	3,82	
	32	385	vr	1,17	27+2	1584000	33125	41	22	8	29	4,61	
	31	430	m	1,44	23+2	1776000	28281	57	22	13	8	3,63	
	34	465	m	1,18	22	1488000	17031	72	16	7	5	4,35	
	34	515	m	1,31	27+1	1200000	46406	44	26	8	22	3,75	
9/02/99	32	380	vr	1,16	30+2	1968000	38437	67	8	8	17	5,29	Lern 1
7,6°C	31	405	m	1,35	23+1	1312000	31093	53	19	20	8	4,2	
	32	450	vr	1,37	27+1	1408000	53750	37	33	24	6	4,76	
	32	345	vr	1,05	15	1072000	17656	80	10	2	8	5	
	33	435	vr	1,21	30+2	1184000	35468	42	17	14	27	5,44	
	30	275	vr	1,01	23+1	1568000	26875	67	9	12	12	5,14	Lern 1
	29	285	vr	1,17	26+1	1200000	9531	79	8	6	7	3,89	
	33	395	m	1,1	17	1472000	33906	58	17	8	17	4,57	Speudoterranova
17/03/99	35	450	m	1,05	34+3	2352000	44375	57	20	10	13	5,8	
7°C	35	450	vr	1,05	20+1	992000	35312	59	16	11	14	4,76	
	36	590	m	1,26	34+2	2240000	52187	51	21	9	19	6,2	
	33	40	vr	1,11	30+4	1968000	65000	58	11	13	18	5,48	Lern 1
	32	370	vr	1,13	25+3	1568000	29218	42	32	16	10	4,96	
	37	605	vr	1,19	28+2	1424000	45312	36	37	9	18	5,59	
	34	465	m	1,18	25+2	1456000	42656	50	30	10	10	5,25	
	37	620	m	1,22	28+1	1856000	56093	36	33	14	17	5,4	
31/03/99	38	680	m	1,24	26+2	1408000	67187	42	34	10	14	5,21	
8°C	52	1630	m	1,6	23+4	1344000	52250	31	25	14	30	4,65	Lordosis
	36	605	m	1,3	28+2	1648000	58125	49	28	10	13	5,06	
	35	535	vr	1,2	18+1	1008000	26875	45	7	29	19	4,5	
	35	555	vr	1,3	30+4	1808000	68125	42	35	14	9	6,46	Lern 2
	35	565	m	1,3	22+1	1328000	31562	69	5	21	5	5,52	

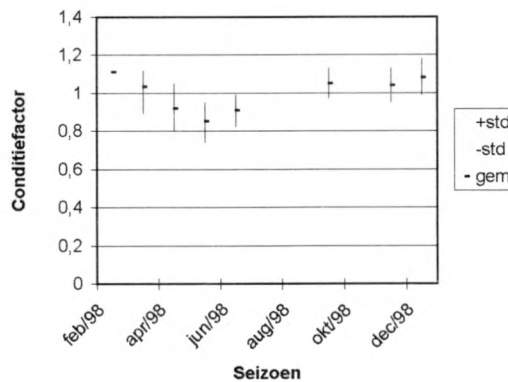
Figuur 1.3.1.1 : Evolutie van het hematocrietgetal bij tong in functie van het seizoen



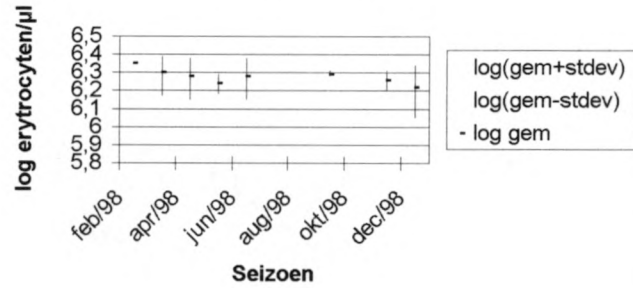
Figuur 1.3.1.2 : Evolutie van het hemoglobine (g/l) bij tong in functie van het seizoen



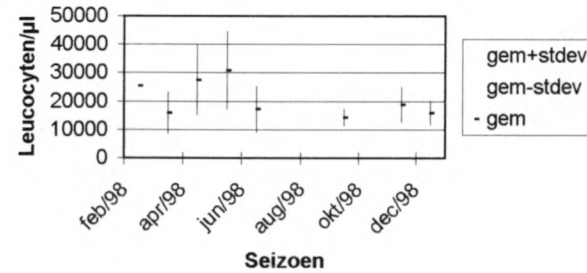
Figuur 1.3.1.3 : Evolutie van de conditiefactor bij tong in functie van het seizoen



Figuur 1.3.1.4 : Evolutie van het gemiddeld aantal erythrocyten per μl bij tong in functie van het seizoen



Figuur 1.3.1.5 : Evolutie van het gemiddeld aantal leucocyten per μl bij tong in functie van het seizoen



Figuur 1.3.1.6 : Gemiddeld procentueel aantal monocytten, lymfocyten, granulocyten en trombocyten bij tong in functie van het seizoen

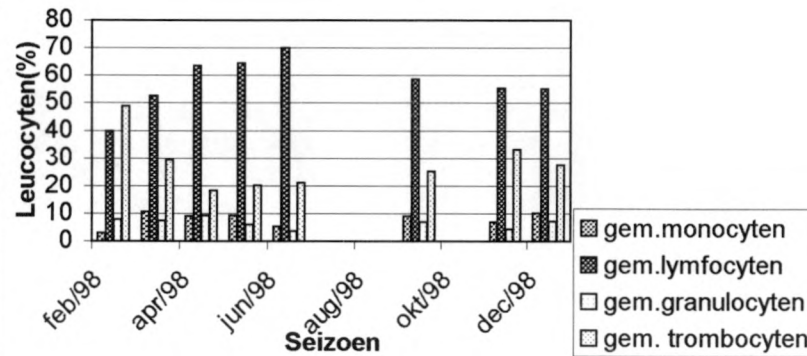
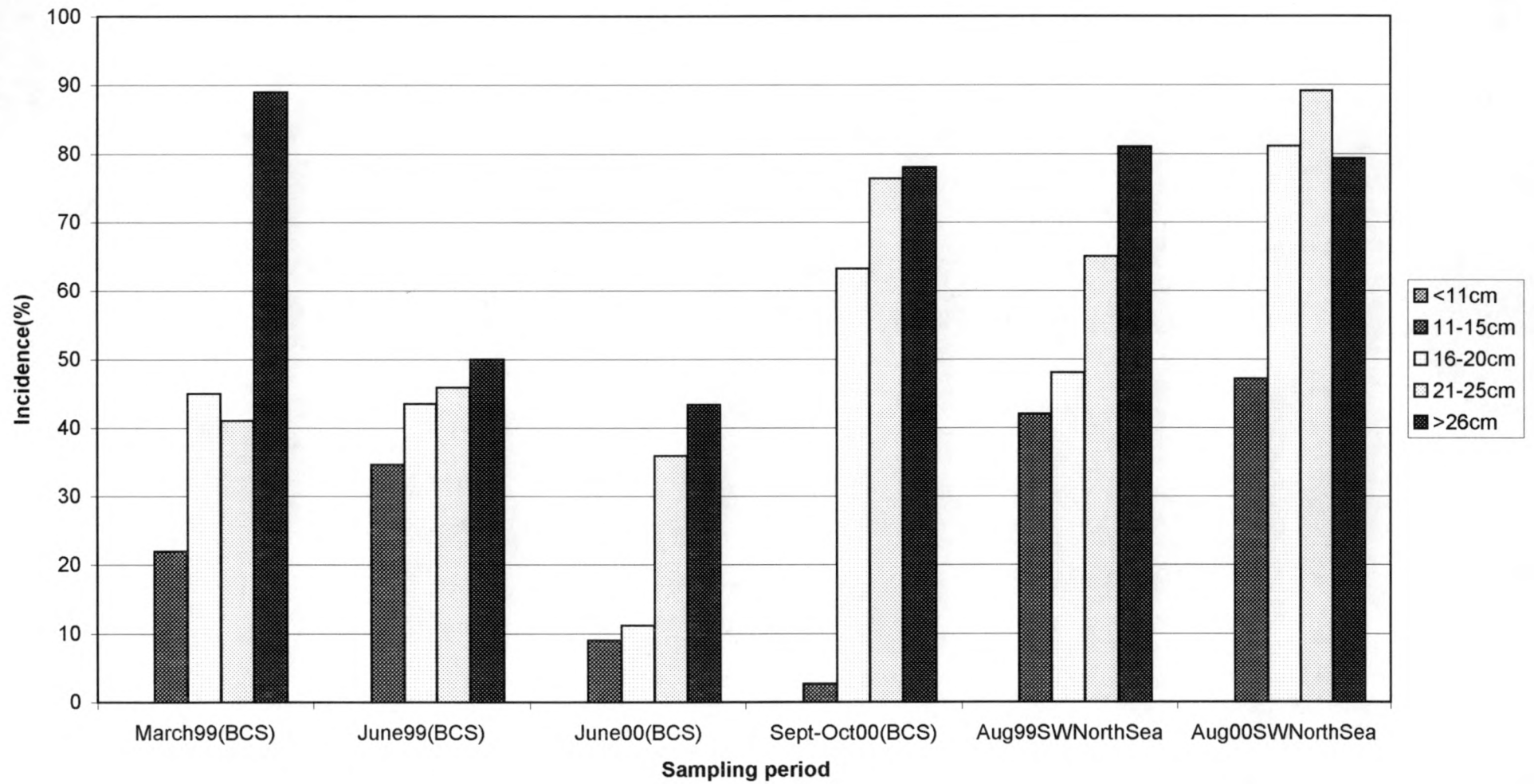


Figure 2 : Incidence of *Haemogregarina simondi* in the bloodcells of sole (*Solea solea*) in function of the size and the saison in the B.c.s and the SW North Sea



Bcs = Belgian continental shelf

Project 1.3.2 – Fagocytose onderzoek bij tarbot en kabeljauw

a. Projectverantwoordelijke : D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond, materiaal en methoden

Fagocytose is een van de technieken die gebruikt kan worden als indicator voor stressbepaling bij vis (MATHEWS, 1990). Fagocytose, de verslinding van cellen en partikels, biedt vele mogelijkheden in het planten- en dierenrijk, namelijk de opname van partikels van enkele micrometers groot zoals bacteriën of in experimentele situaties zelfs dunne plastieken pareltjes (GREENBERG, 1993)

Fagocyterende cellen hebben een belangrijke functie bij het tot stand komen van de immunorespons. Tot de fagocyterende cellen behoren zowel de granulocyten, waarvan de neutrofielen in dit kader de belangrijkste zijn als de monocytën/macrofagen. GREENBERG en SILVERSTEIN (1993) noemen de granulocyten polymorf nucleaire leucocyten en de monocytën en macrofagen mononucleaire leucocyten. Monocytën behoren tot het mononucleair - fagocytensysteem. De monocytën zijn de macrofagen van het bloed. Als monocytën het bloed verlaten naar de weefsels worden ze macrofagen genoemd. Monocytën migreren naar weefselplaatsen van infecties of ontstekingen, waar ze differentiëren in macrofagen die gebroken cellen, dode microorganismen en andere partikels vernietigen (DARNELL et al., 1990).

De verschillende fasen waarbij de fagocytose plaatsgrijpt werden door ROITT en medewerkers (1990) en den OTTOLANDER (1989) beschreven.

Voor de analyses worden voor vis de macrofagen en granulocyten uit de kopnier (pronephros) geïsoleerd. MATHEWS en medewerkers (1990) gaan ervan uit dat de lichtmicroscopische meting van de fagocytose een nauwkeurige en betrouwbare techniek is.

PLASMAN en VRAY (1994) hebben een methode beschreven om de fagocytose activiteit na te gaan door gebruik te maken van fluorescerende partikels zoals bacteriën, gisten of parels. In een ander experiment hebben PLASMAN en VRAY (1993) peritoneale cellen van muizen gescheiden op 12 fracties van Percoll-gradiënten met een eigen densiteit. SANTAREM en FIGUERAS (1994) hebben de effecten bestudeerd van intraperitoneale injecties van *Pasteurella piscicida* o antigen bij tarbot (*Scophthalmus maximus L.*) LERNOUT en

OLLEVIER(1992) hebben de invloed van de voedingslipiden op de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) onderzocht.

c. Stand van zaken

De methode beschreven in het activiteitsverslag (1997-1999) voor bot (*Platichthys flesus*) werd als uitgangspunt gebruikt voor de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot. De proefdieren (tarbot < 30cm) waren afkomstig uit het Belgisch Continentaal Plat en aangevoerd door het schoolschip "Broodwinner". De kieuw wordt doorgeknipt. Enerzijds wordt voor het onderzoek van de bloedformule 0,5ml bloed in een buisje voorzien van EDTA opgevangen. Daar de tarbotten te klein waren kon onvoldoende bloedserum verkregen worden. Na het volledig uitbloeden van de vis wordt de kopnier met steriel dissectiemateriaal weggenomen en in een plastic potje, voorzien van AIMV-medium, gebracht.

Voor de bereiding van 0,5 liter AIMV-medium worden 248ml AIMV + 248ml Leibovitz L15 + 2ml heparine (5000 I.E/ml) en 10ml penicilline\streptomycine (10000 IE/g) aangewend. Het AIMV-medium wordt gesteriliseerd met behulp van een membraanfilter (0,22 μ) en bewaard bij 4°C.

De kopnier wordt in een homogenisator (V.E.I. catalogus art nr 7351502) gebracht en geplet zonder de bloedcellen te breken en daarna gefiltreerd door een steriele filter van 40 μ .

De scheiding van de cellen wordt uitgevoerd met behulp van het Sigma product histopaque-1077. De gewassen kopnieroplossing (15ml) wordt op 15ml histopaque 1077 aangebracht en gedurende 30 minuten bij 700g (2000T/min) afgecentrifugeerd. Om een betere scheiding van de lagen te bekomen wordt de temperatuur gedurende het centrifugeren op 12°C gebracht. Hierna wordt de bovenlaag afgezogen en daarna de witte bloedcellenlaag afgezonderd. De witte bloedcellenlaag wordt 2x gewassen met 5ml AIMV-medium en op 200g gedurende 10 minuten afgecentrifugeerd. Daarna worden de neergeslagen bloedcellen in 5 ml AIMV-medium bewaard.

De overleving van de geïsoleerde (polymorf nucleaire en mononucleaire leucocyten) cellen wordt met trypaanblauwoplossing getest. Het percentage cellen die fagocyteren en de fagocytoseindex worden in functie van de tijd bepaald. De fagocytosetest wordt met behulp van gistcellen uitgevoerd. Er wordt een verhouding bloedcellen \ gistcellen van 1 tot 10 nagestreefd.

Twee soorten proefnemingen werden uitgevoerd : namelijk de bepaling van het best geschikte medium om de fagocytosetest bij tarbot uit te voeren en het onderzoek van de optimale incubatietemperatuur.

Voor wat de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij tarbot betreft, werd zowel het AIMV-medium met (test A) of zonder (test D) kabeljauwserum; het PBS-medium (B) als het RPMI-medium (C) uitgetest. De incubatie temperatuur waarbij de fagocytose werd uitgevoerd bedroeg 4°C.

Daar de tarbotexemplaren te klein waren werd beroep gedaan op kabeljauwserum. Dit serum bleek goed geschikt bij de bepaling van de fagocytosecapaciteit bij bot.

Proefopstelling fagocytosetest bij tarbot :

A- 1000µl WBC + 500µl kabeljauwserum + 70µl gistcellen + 500µl AIMV-medium

B- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1000µl PBS-medium

C- 500µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl RPMI-medium

D- 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium

Bij de proefopstelling A, waarbij AIMV-medium en kabeljauwserum werd gebezigd werd geen fagocytose waargenomen. Het kabeljauwserum bleek giftig te zijn voor de uitvoering van de fagocytose door tarbotfagocyten. Bij de proefopstelling B en C werd eveneens geen fagocytose waargenomen. Alleen bij proefopstelling D werd voldoende fagocytose waargenomen in aanwezigheid van het AIMV-medium.

Ten slotte werd de invloed van de temperatuur op de fagocytosecapaciteit en fagocytoseindex bij tarbot werd bestudeerd. Er werden vier verschillende incubatietemperaturen namelijk : 4°C, 12°C, 22°C en 30°C ingesteld. De proefneming werd zes maal herhaald en gaven steeds dezelfde resultaten. Het incubatiemedium omvatte 1000µl WBC + 70µl gistcellen + 1500µl AIMV-medium.

In vergelijking met de twee andere ingestelde incubatietemperaturen (22°C en 30°C) kwam de incubatie bij 4°C en 12°C trager op gang. Het fagocyteren bij 30°C kwam gedurende het eerste uur goed op gang maar viel achteraf stil. De beste incubatietemperatuur bleek 4°C te bedragen. Bij deze temperatuur bereikte de fagocytose reeds een maximum na 3 uur incubatie (figuren

1.3.2.1 en 1.3.2.2). Het hoogst aantal gefagocyteerde gistcellen per tarbotfagocyt bedroeg 7 à 8. Het onderzoek werd voorlopig beëindigd.

De invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot werd bestudeerd. De afzonderlijke fagocyten werden bij 12°C opgeslagen. Na 1d, 2d, 3d, 6d, 8d en 10 dagen bewaren werd het fagocytoseproces bij 4°C uitgevoerd. De resultaten werden in de figuren 1.3.2.3 en 1.3.2.4 opgenomen. Bij de fagocyten die slechts 1 dag oud waren kwam het fagocytoseproces slechts moeilijk op gang. De oudere fagocyten fagocyteerden bijna onmiddellijk en bereikten reeds een maximum na 3 uur incubatie. De polymorf nucleaire leucocyten en monoccyten verloren hun fagocytosecapaciteit na 10 dagen bewaren bij 12°C.

De bepaling van de fagocytosecapaciteit vond haar toepassing bij de kweek van tarbot waarbij verschillende voedselregimes werden gebruikt. Een eerste lot tarbot juvenielen kregen het voedsel Provimi, een tweede lot : provimi + visolie + vit C en een derde lot : provimi + visolie + vit C + vit E. Er werden 9 verschillende tarbotten onderzocht; drie van elk lot. Vooraleer de proefnemingen te starten werden alle tarbotten gedurende 6 weken op hetzelfde regime van visafval gevoederd. Op het bloed van elke vis werd de bepaling van de fagocytosecapaciteit drie maal herhaald. De gemiddelde resultaten van de bepalingen van de fagocytosecapaciteit en de fagocytoseindex zijn in de figuren 1.3.2.5 en 1.3.2.6 opgenomen. Het beste resultaat werd bekomen bij de toevoeging van vitamine C aan het basisvoedsel provimi. De toevoeging van vitamine E deed het effect van de toevoeging van vitamine C teniet. Uit de bepalingen van de fagocytosecapaciteit kwam verder tot uiting dat de invloed van het basisregime op de conditie van de tarbot een zekere tijd blijft doorwerken na de stopzetting van de toevoeging van de diverse provimi regimes.

Voor wat het onderzoek van de fagocytosebepaling bij kabeljauw betreft werd er geringe fagocytose bij gebruik van het RPMI en het PBS-medium vastgesteld. Het AIMV-medium in aanwezigheid van kabeljauwserum gaf de beste resultaten.

De incubatietemperatuur bedroeg 2°C boven van het zeewater. Het maximum aan fagocytose werd reeds na een uur bereikt. De opname van gistcellen door de fagocyten was maximum 5 eenheden. De proefnemingen op kabeljauw werden in januari 2001 verder gezet. Hierbij werd de invloed van het kabeljauwserum op de fagocytose bestudeerd. De invloed van de incubatietemperatuur werd eveneens onderzocht.

Voor wat de scheiding tussen de rode bloedcellen en de leucocyten betreft werd beroep gedaan op een mengsel van PBS en Histopaque 1077. De beste verhouding bleek 1deel PBS tot 3 delen Histopaque. Hierdoor worden de rode bloedcellen beter afgezonderd en krijgt men sedimentatie van de rode bloedcellen, waardoor de witte bloedcellenlaag zuiverder wordt.

Voor het bekomen van een goede fagocytosecapaciteit bleek de toevoeging van kabeljauwserum gedurende het bewaren van de fagocyten noodzakelijk. Bij de incubatie zelf is geen extra toevoeging van kabeljauwserum nodig. Het toevoegen van extra kabeljauwserum bleek remmend te werken. De optimum temperatuur bij de bepaling bleek 11°C. De fagocytosecapaciteit werd reeds bij bot, schar, schol, tong, tarbot, kabeljauw en mosselen bepaald. Er zal een overzicht van de optimale bepalingmethoden bij de voornaamste commerciële vissoorten worden gepubliceerd gepubliceerd.

Werkschema 1999-01				
	99-2	00-1	00-2	01-1
Bloedformule tong	U	U	U	U
Bloedformule van kabeljauw		U		U
Fagocytosecapaciteit kabeljauw en tarbot		U		U
Parasitair bloedonderzoek kabeljauw		U		U
Parasitair bloedonderzoek tong	U	U	U	U

U = reeds uitgevoerd

d. Referenties

DARNELL et al., 1990. Molecular cell biology. Second edition. New York. Freeman and company. pp. 555 - 560.

den OTTOLANDER G.J.H., 1989. Interne geneeskunde. Negende herziene druk. Utrecht. Bohn, Scheltema en Holkema. 8 - 10 en pp. 46 - 49.

GREENSBERGS S. and SILVERSTEIN, 1993. Phagocytosis. Fundamental immunology. Third edition edited by William E. Paul. New york. Raven Press. Lid. chapter 27, pp. 941 - 949.

LERNOUT M., 1992. Invloed van voedingslipiden op de gewichtstoename en de fagocytosecapaciteit bij de Afrikaanse Meerval (*Clarias gaiepinus* Burchell 1822). Eindverhandeling (onuitgegeven) o.l.v. prof F.Ollevier. Leuven, K.U.L.

MATHEWS ELAINE S., et al., 1990. Assays of immune function in fish macrophages. Techniques used as indicators of environmental stress. Techniques in Fish Immunology. Fish Immunology Technical Communications 1. Edition by Stolen J.S et al.

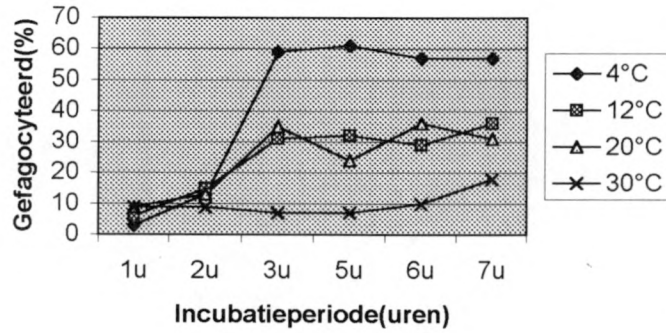
PLASMAN N. and B. VRAY, 1993. Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients. Res. Immunol. 144, 151 - 163.

PLASMAN N. and B. VRAY, 1994. Quantification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorimetry. Journal of Immunology Methods. 174, 195 - 202.

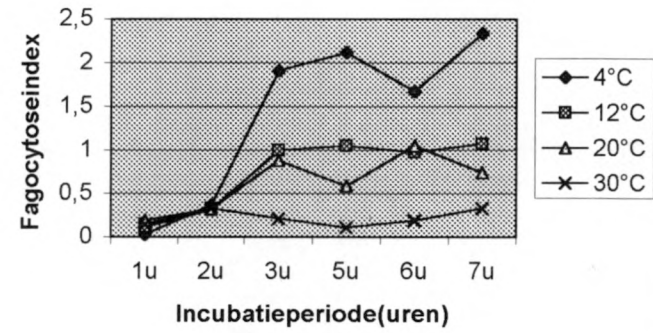
ROITT I. et al., 1989. Immunology. Second edition. London. New York. Churchill livingstone. Gower Medical Publishing. pp. 1.1 -1.5, and pp. 15.2 - 15.9.

SANTAREM M. and A. FIGUERAS, 1994. Kinetics of phagocytic activity, plaque - forming cells and specific agglutinins of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunised with O antigen of *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida*. Fish and Shellfish Immunology. 4, 527 - 537.

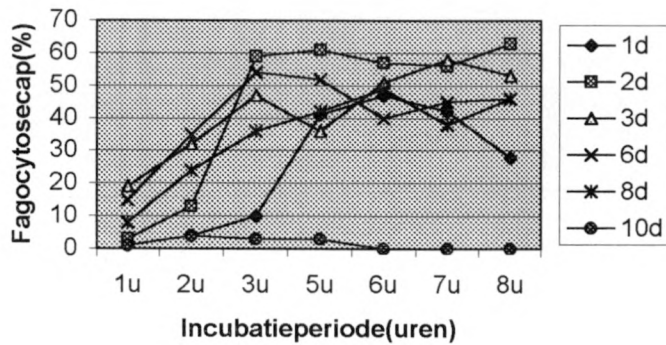
Figuur 1.3.2.1 : Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytosecapaciteit bij tarbot



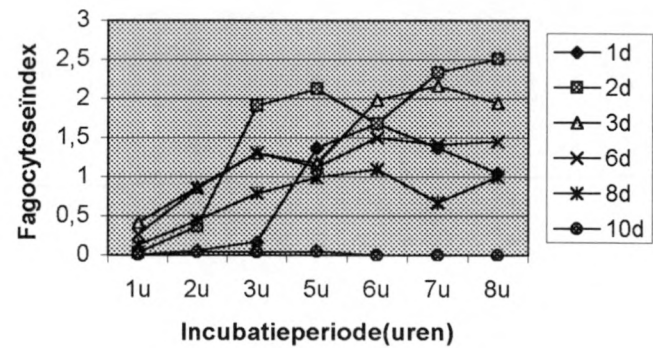
Figuur 1.3.2.2 : Invloed van de incubatietemperatuur op de fagocytoseindex bij tarbot.



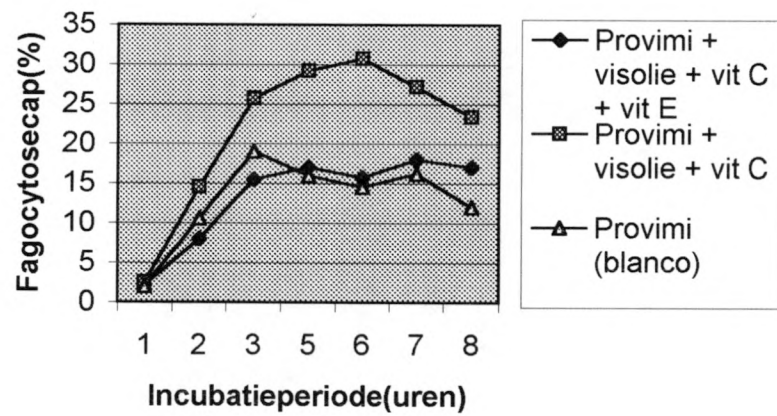
Figuur 1.3.2.3 : Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytosecapaciteit bij tarbot



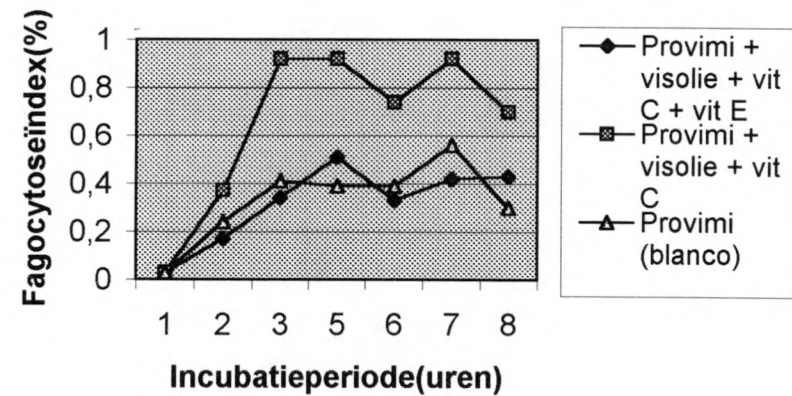
Figuur 1.3.2.4 : Invloed van de ouderdom van de fagocyten op de fagocytoseindex bij tarbot



Figuur 1.3.2.5 : Invloed van het voedselregime op de fagocytosecapaciteit van tarbot.



Figuur 1.3.2.6 : Invloed van het voedselregime op de fagocytoseindex van tarbot



Project 1.4- Studie van de natuurlijke mortaliteit en de biologische conditie van schaal- en weekdieren

Project 1.4.1 Bacteriologisch, parasitair en toxisch fytoplankton onderzoek bij mosselen

a. Projectverantwoordelijke : D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond, materiaal en methoden

De studies betreffende de pathologie van schaal- en weekdieren moeten indicaties geven omtrent het ziekte voorkomen, het verloop van het ziektebeeld, de verantwoordelijke pathogenen, de impact van milieu omstandigheden en de geografische verspreiding van de aandoeningen. Het hieraan gekoppelde biologische conditie onderzoek wordt beïnvloed door een aantal endogene en exogene factoren, waaronder voedselaanbod, paaiperiode, abiotische milieucondities en de aanwezigheid van ziekten en parasieten, die allen in min of meerdere mate seizoensafhankelijk zijn.

Biotoxines geproduceerd door dinoflagellaten hebben de laatste jaren grote sterfte veroorzaakt onder zowel wilde als gekweekte vispopulaties. De expansie van de aquacultuur en haar economische betekenis langs de kustzones heeft er toe geleid meer aandacht aan de bloei van toxische algen te schenken. Van de 5000 gekende microalgen spp zijn er ongeveer 1% toxisch (SLEIDINGER ET AL 1998). Sommige microalgen zoals *Gymnodinium breve* produceren ten minste 8 toxinen, waaronder het dodelijke neurotoxine. De kieuwen schijnen de voornaamste plaats te zijn voor de opname van toxinen die afwisselend cytolytisch (celdestructie), neurolytisch (decompositie van het zenuwstelsel) of hemolytisch (scheiding kleurstof en rode bloedcellen) zijn. Variatie van de aantasting van de lever, kieuwen en de darmen hangt onder meer af van het type van toxine en de duur van de blootstelling aan het toxine. Vissterfte werd vastgesteld bij celconcentraties van *Gyrodinium aureolum* van $10^7/L$ (DAHL AND TANGEN ,1993) en *Gymnodinium breve* van $2 \times 10^5/L$ (STEIDINGER ET AL.,1998). De concentratie van het toxine, de vissoort en het milieu (ph en beschikbare zuurstof) hebben een invloed op de mortaliteit. In de aanwezigheid van algentoxines vertonen vele adulte vissoorten een aangepast gedrag.

De vissterfte van juveniele en volwassen vissen, te wijten aan toxische dinoflagellaten is goed herkenbaar, doch het verlies aan larven is minder evalueerbaar, vooral als het effect van bloeien bij toxische algen op de populatie moet worden onderzocht. Experimentele studies hebben aangetoond dat slechts een tiental cellen van *Alexandrium tamarence* reeds dodelijk waren voor de larven van zeebaars (WHITE ET AL 1989). Larven die zich voeden met toxische dinoflagellaten vertonen neurotische effecten, gewijzigd zwemgedrag, evenwichtverlies en paralyse. Copepoden en ander zooplankton, die zich voeden met toxische dinoflagellaten en de toxines tolereren, kunnen als toxinevector dienen voor vislarven en adulte plankton etende vissen, zoals haring. Bij mortaliteitsexperimenten met haringlarven, die zich voeden met copepoden die toxische dinoflagellaten hadden opgenomen, werden verliezen van 30% larven per dag opgetekend (WHITE, 1980). Het okadoic zuur, beter gekend voor zijn rol als DSP vergiftiger bij mensen, werd aangewezen als een tumor initiator bij zoodieren (FUJIKI and SUGANAMA, 1993). Recent werd het okadoic zuur in verband gebracht met het bevorderen van fibropapillomas (fibroom dat onder meer in de urineblaas voorkomt) in zeeschildpadden (LANDBERG and SHUMBERG, 1998)

Het is evident dat deze organismen direct of indirect een invloed hebben op de gezondheid van vis (van sommige toxines is bekend dat zij aan de basis kunnen liggen van het ontstaan van levertumoren) en op de consumeerbaarheid van visserijproducten (in casu schelpdieren). Mocht het tot uitbating van de schelpdieren bestanden in de Belgische kustwateren komen dan zal er een systeem nodig zijn van sanitaire monitoring (Richtlijnen van de Raad ; 79\923\EEG en 91\492\EEG) waarbij onder meer het toxisch fytoplankton, de aanwezigheid van coliformen en Salmonella en een aantal fysisch-chemische parameters van het schelpdierwater en de schelpdieren moeten bepaald worden. Het onderzoek op toxisch fytoplankton (producenten van DSP, PSP, NSP en ASP) zal voornamelijk gericht worden op de genera *Dinophysis*, *Procentrum*, *Alexandrium* en *Pseudonitzschia* die allen in de Belgische kustwateren kunnen voorkomen.

De onderzochte mosselen werden bemonsterd in november 1999 en waren afkomstig van de kustlijn (Knokke-het-Zoute tot Sint-Idesbald) en uit volle zee (figuur 4.1). Langs de kustlijn werden 9 plaatsen bemonsterd namelijk : Sint-Idesbald (oosthelling); Nieuwpoort (Veurnestraat); Westende (Sint-Laureins); Middelkerke (Keizer Karel domein); Oostende (rechts van de vaargeul – eerste golfbreker); Bredene (Bludseyde); Blankenberge (200m voorbij het staketsel) en Knokke-het-Zoute (Linkse kant van de golfbreker ter hoogte van ‘Surfparadise’). De onderzochte plaatsen komen overeen met de plaatsen die in november 1988 werden bemonsterd. De mosselmonsters werden gebruikt voor bacteriologisch en parasitologisch onderzoek, de bepalingen van de chemische samenstelling (asgehalte, vetgehalte, droge stof, eiwitgehalte), hematologische (fagocytosecapaciteit) bepalingen en rendementsbepalingen. Op dezelfde plaatsen werd er eveneens zeewater en zand bemonsterd. De bemonstering gebeurde ter hoogte van het midden van de

golfbreker. Anderzijds werden er eveneens mosselen bemonsterd van de hangcultuur die op de figuur 4.1 als plaats C wordt aangeduid. De mosselen van de hangcultuur waren in december 1999 circa negen maanden oud.

Het bacteriologisch onderzoek omvatte de bepaling van het aantal totaal bacteriën bij 20°C (Plate count agar), de fecale *E. coli* bij 44°C (Violet red bile agar) en de fecale Streptococci bij 44°C (Slanetz and Bartley agar). De bepaling van de fagocytosecapaciteit bij mosselen werd uitgevoerd door middel van het protocol dat door DECLERCK (1998) werd uitgewerkt.

c. Stand van zaken

Schelpmisvormingen komen zowel binnen als buiten de schelp voor. Binnenin de schelp zijn er soms parels waar te nemen. De meeste parels hebben kernen van niet identificeerbaar, korrelachtig materiaal. *Odostomia scalaris* behoort tot de gastropoden en is in staat beschadigingen aan de schelp van de mossel te veroorzaken. De slakken die zich vastgemaakt hebben op de buitenkant van de schelp dringen met hun lange slurf langs de ventrale zijde binnen in de mossel. Ze blijven verschillende dagen in deze houding om zich te voeden. Hierdoor vervormt de schelp (COLE EN HANCOCK, 1955). Het grootste aantal vervormingen bij de mosselen (29%) kwam voor ter hoogte van fort Napoleon. Dit is tegenstelling met de schelpen van de hangcultuur, waar geen enkel spoor van vervorming waar te nemen is. De schelpen van de hangcultuur hebben een zuivere en min of meer licht doorschijnende broze schelp. De kleur is grijs en enigszins afwijkend van de grijze mossel. Een meer donkere kleur en steviger schelp wordt verwacht gedurende de consumptieperiode augustus - december 2000. De mosselen zullen dan 18 maanden oud zijn.

Voor wat het parasitair onderzoek betreft werd *Mytilicola intestinalis* in de mosselen langs de Belgische kust niet aangetroffen. Het toxisch fytoplankton onderzoek werd in september en november 1999 op diverse plaatsen langs de kustlijn uitgevoerd. Het voorkomen in de maand september van *Alexandrium tamarense* (220/L) in het zeewater langs de kustlijn maakt analyses noodzakelijk gedurende de warme maanden. *Alexandrium tamarense* is reeds toxisch vanaf 100/liter en veroorzaakt paralytic shellfish poison.

De vitaliteitstest bij de erythrocyten gaf betere resultaten (97%) bij de hangcultuur dan de testen op de mosselen die afkomstig waren van de golfbrekers langs de kustlijn (92% à 93%).

De evolutie van de fagocytosecapaciteit en de fagocytose index bij mosselen afkomstig van drie verschillende locaties is in de tabel 1.4.1 en de figuren 1.4.10 en 1.4.11 opgenomen. Opvallend is de duidelijk hogere fagocytosecapaciteit en -index bij de mosselen afkomstig van de hangcultuur. Deze waarneming wijst op een betere biologische conditie van de hangcultuur mosselen.

Voor wat de chemische analyses in november 1999 betreft, werd het laagste eiwitgehalte in Sint-Idesbald (15,3%) en ter hoogte van Fort Napoleon te Oostende (14,62%) opgetekend.

Het bacteriologisch onderzoek op de mosselen, zeewater, en sediment (figuren 1.4.1 tot 1.4.9) wijst op een algemene verbetering van de kwaliteit van het zeemilieu in vergelijking met 10 jaar terug. Een sterke vermindering van fecale coliformen in het mosselvlees (0/100g) en in het sediment (35/100g) is waargenomen voor november 1999 t.o.v respectievelijk 77760/100g en 19050/100g voor oktober 1987.

De mosselen in november 1999 waren voor directe consumptie geschikt en beantwoorden aan de EEG richtlijn 91/492.

De verhouding fecale coliformen op fecale streptococcon (meestal <1) wijst op een vermindering van bacteriële input van menselijke oorsprong en dus een verbetering van de kwaliteit van het zeewater en milieu. De gunstige resultaten komen voort van een momentopname langs de Belgische kust. Verdere proefnemingen in de omgeving van de hangcultuur gedurende de maanden juli tot september moeten bevestiging brengen.

De biologische kwaliteit van de mossel langs de Belgische kustlijn is in het algemeen zeer sterk verbeterd, wat bemoedigend is voor de kwaliteit van mosselen afkomstig van de hangcultuur in het Belgisch Continentaal Plat. Alles wijst er op dat de aquacultuur van mosselen in het Belgisch Continentaal Plat in de toekomst tot de mogelijkheden behoort.

Voor wat het onderzoek van het toxisch fytoplankton betreft werd de concentratie in november 2000 in het Belgisch Continentaal Plat in diverse monitoring stations gemeten. Het voorkomen van een vijftal soorten plankton werd gevonden namelijk : *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum lima*, *Dinophysis* en *Gyrodinium*.

Uiteindelijk werden langs de Belgische kustlijn gedurende het voorbije jaar op regelmatige tijdstippen monsters zeewater op toxisch fytoplankton onderzocht. Er werden geen problemen voor de volksgezondheid vastgesteld.

Werkschema 1999-2001				
	99-2	00-1	00-2	01-1
Parasitair onderzoek op mosselen uit het B.c.p	U	U	U	U
Bacteriologisch onderzoek op mosselen uit B.c.p.	U	U	U	U
Hematologisch onderzoek op mosselen	U	U	U	U
Onderzoek van toxisch fytoplankton in B.c.p.	U	U	U	U

d. Referenties

COLE, H.A. and HANGCOCK D. A. (1955). On some larval trematode parasites of the mussel (*Mytilus edulis*) and the cockle (*Cardium edule*). *Parasitology*, 27, 276-280.

DAHL, E. and K. TANGEN. 1993. 25 years experience with *Gyrodinium aureolum* in Norwegian waters. IN : Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. T. Smayda and Y. Shimizu (eds.), pp. 15-21. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam.

DECLERCK, D. (1998) Onderzoek van de fagocytosecapaciteit van mosselen (*Mytilus edulis*) in de nabijheid van de Belgische kusthavens (CLO). Publicatie nr 249-D/198/0889/1.

FUJIKI, H. and M. SUGANUMA. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv. Cancer Res.* 61 : 143-194.

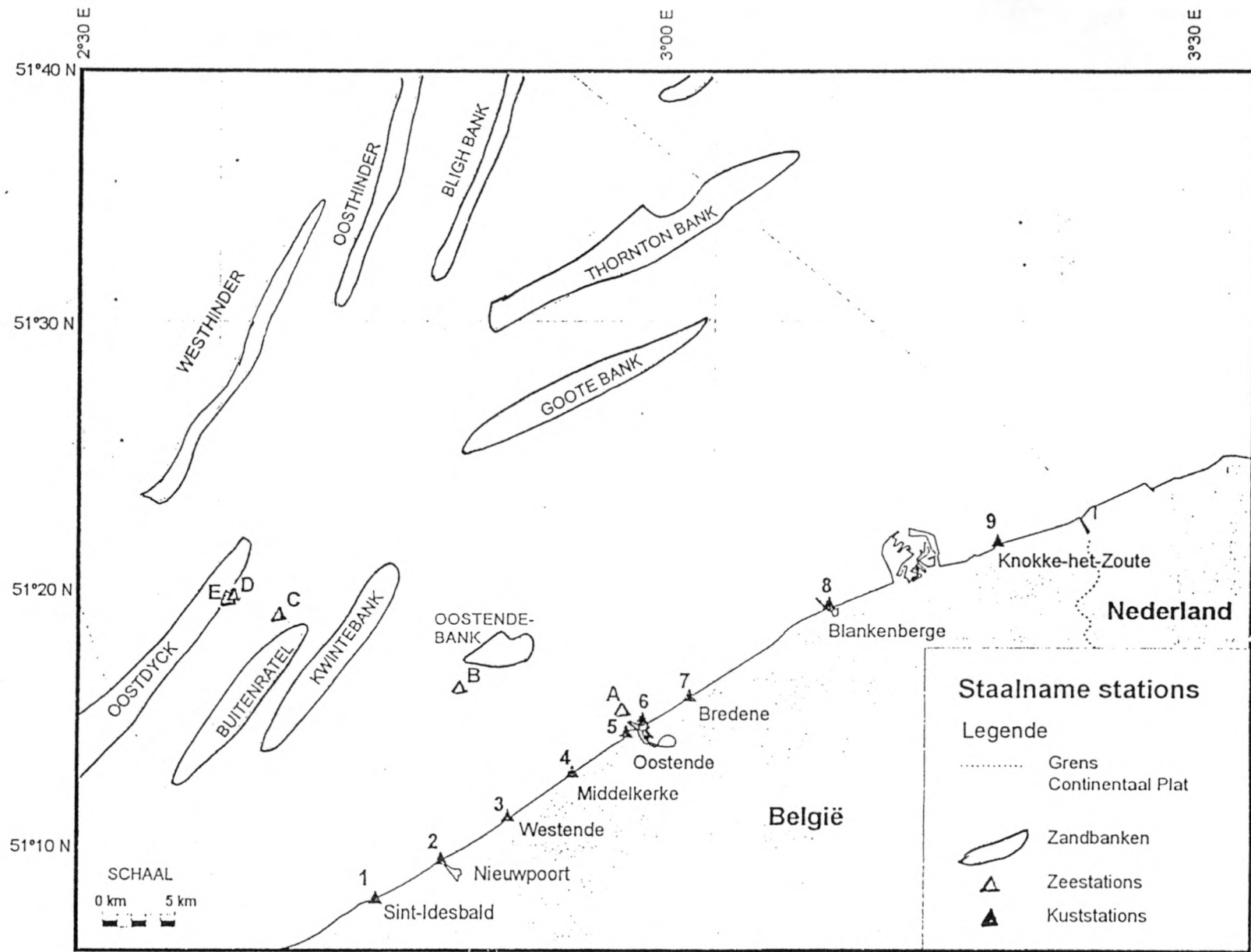
GOSSELIN, S., L. FORTIER AND J.A. GAGNE. 1989. Vulnerability of marine fish larvae to the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57:1-10.

LANDSBERG, J.H. and S.E. SHUMWAY. 1998. Harmful algal blooms and their effects on marine and estuarine animals. *Abstr. Proc. 3rd Int. Aquat. Anim. Hlt Sympos.*, pp.58-63. Baltimore.

STEIDINGER, K.A., G.A. VARGO, P.A. TESTER AND C.R. TOMAS. 1998. Bloom dynamics and physiology of *Gymnodinium breve* with emphasis on the Gulf of Mexico. IN: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. D.M. Anderson, A.D. Cembetta and G.M. Hallegraeff (eds.), pp. 133-153. Springer-Verlag, Berlin.

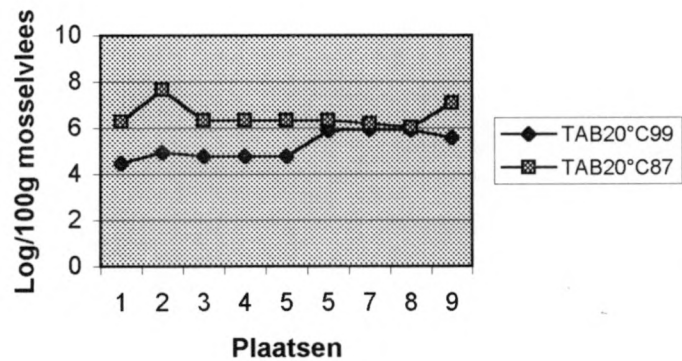
WARLEN, S.M., P.A. TESTER and D.R. COLBY. 1999. Recruitment of larval fishes into a North Carolina estuary during a bloom of the red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Bull. Mar. Sci.* 62 (in press)

WHITE, A.W. 1980. Recurrence of kills of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton. *Can.J. Fish. Aquat. Sci.* 37:2262-2265.

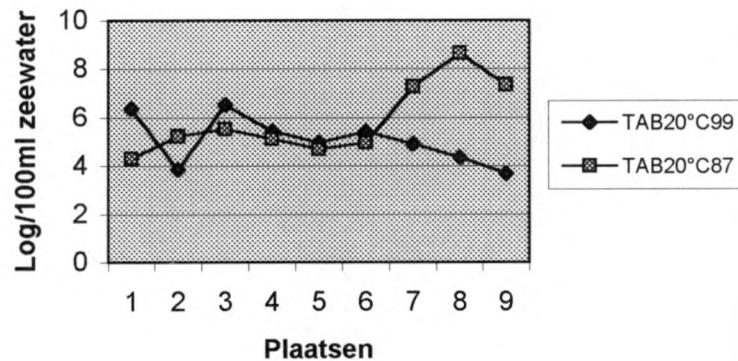


Figuur 1.4: Overzicht van de bemonsteringspunten langs de kustlijn en in het Belgisch Continentaal Plat.

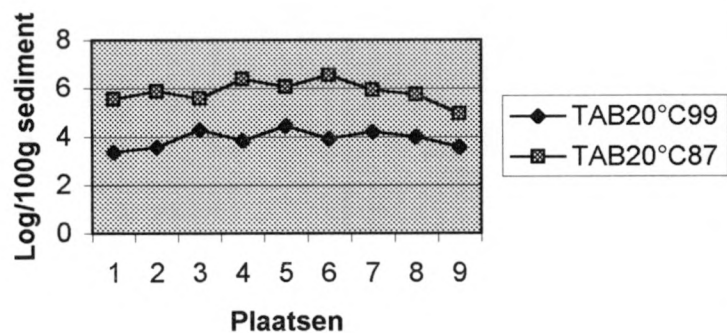
Figuur 1.4.1 : Vergelijkend onderzoek van het TAB per 100g mosselvlees afkomstig van de golfbrekers langs de Belgische kust (1987, 1999)



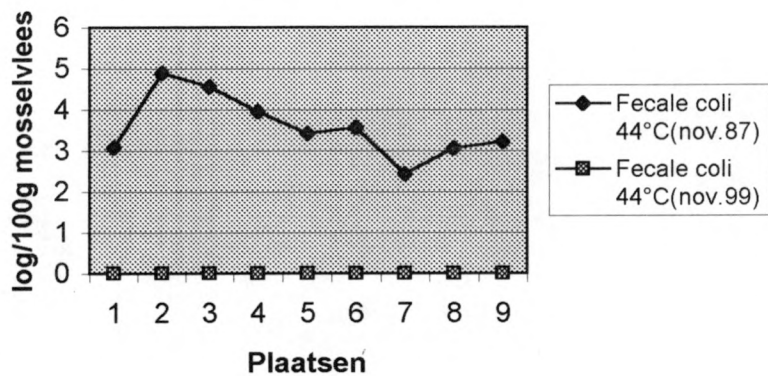
Figuur 1.4.2 : Vergelijkend onderzoek van het TAB/100ml zeewater in diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987, 1999)



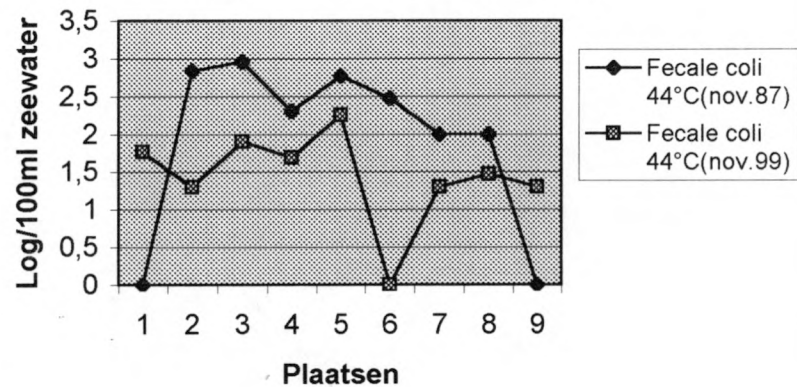
Figuur 1.4.3: Vergelijkend onderzoek van TAB/100g sediment in diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987, 1999)



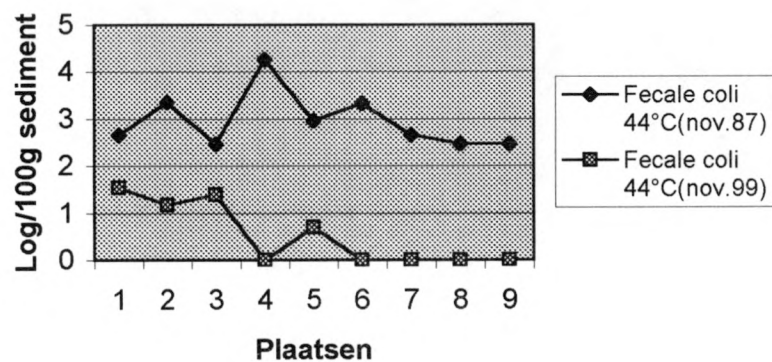
Figuur 1.4.4 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal fecale coli/100g mosselvlees afkomstig van de golfbrekers langs de Belgische kust (1987,1999)



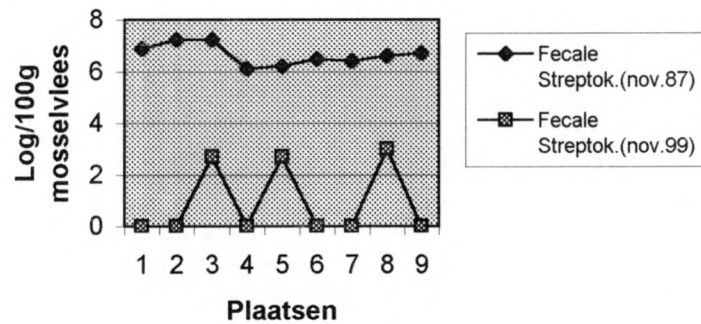
Figuur 1.4.5 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal fecale coli/100ml zeewater bij diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987,1999)



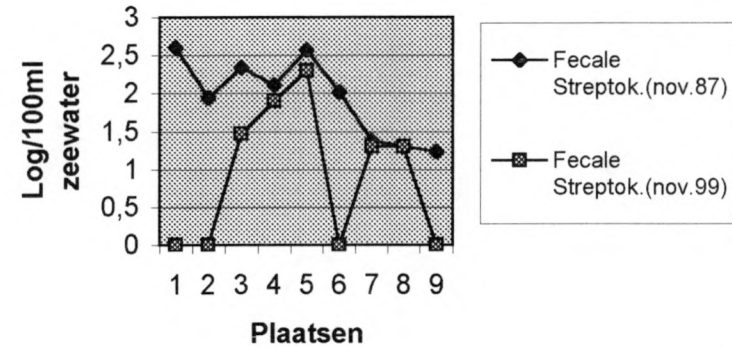
Figuur 1.4.6 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal fecale coli /100g sediment bij diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987,1999)



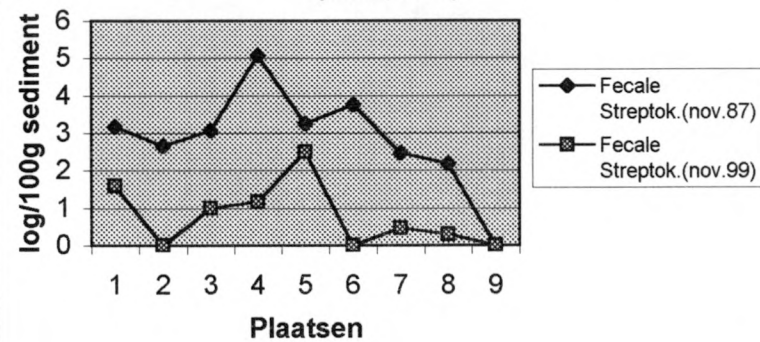
Figuur 1.4.7 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal fecale streptok./100g mosselvlees afkomstig van de golfbrekers langs de Belgische kust (1987,1999)



Figuur 1.4.8 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal fecale streptok./100ml zeewater bij diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987,1999)



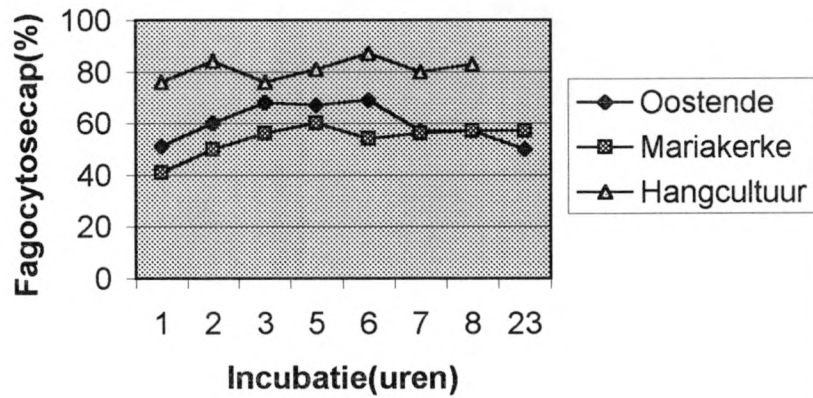
Figuur 1.4.9 : Vergelijkend onderzoek van het totaal aantal streptok./100g sediment bij diverse plaatsen langs de Belgische kust (1987,1999)



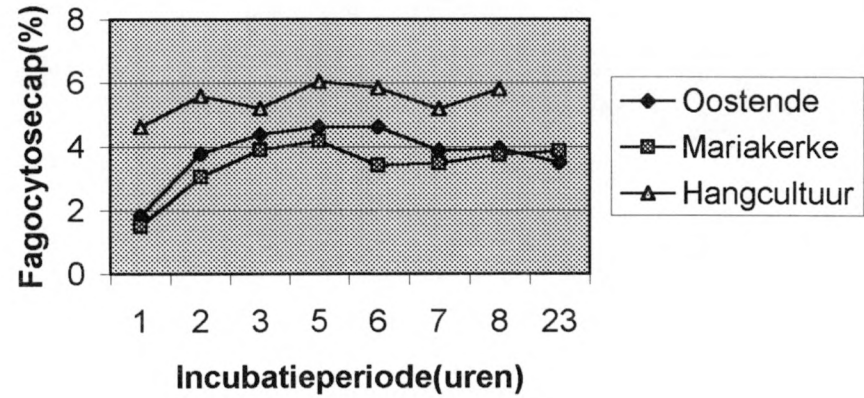
Tabel 1.4.1 : Evolutie van de fagocytosecapaciteit en fagocytoseindex bij mosselen afkomstig van drie verschillende locaties

Incubatie(uren)	Fagocytosecapaciteit				Fagocytoseindex		
	Oostende	Mariakerke	Hangcultuur		Oostende	Mariakerke	Hangcultuur
1	51	41	76	1	1,84	1,49	4,62
2	60	50	84	2	3,76	3,05	5,58
3	68	56	76	3	4,38	3,89	5,2
5	67	60	81	5	4,61	4,18	6,04
6	69	54	87	6	4,61	3,4	5,85
7	57	56	80	7	3,86	3,46	5,17
8	57	57	83	8	3,93	3,73	5,8
23	50	57		23	3,48	3,85	

Figuur 1.4.10 : Evolutie van de fagocytosecapaciteit bij mosselen afkomstig van drie verschillende locaties



Figuur 1.4.11 : Evolutie van de fagocytoseindex bij mosselen afkomstig van drie verschillende locaties



11-13 sept 00						
Station	Temperat	Prorocentrum micans\L	Prorocentrum minimum\L	Prorocentrum lima\L	Dinophysis\L	Gyrodinium\L
800	17,9	731	25	-	-	-
435	19,5	638	88	-	-	-
545	18,5	1080	54	54	-	-
421	17,9	759	-	-	-	-
315	18,1	1625	69	23	23	-
Z02	18	864	-	-	-	-
105	18,1	840	48	24	48	24
Zg03	18	864	-	-	23	23
215	18,1	437	-	-	25	-
115	17,8	1275	23	-	-	23
130	18,1	675	-	-	-	-
230	18,4	100	-	-	-	-
710	18,1	50	-	-	25	-
330	18,3	850	-	-	75	-
zg01	18,3	875	-	-	-	-

Tabel 1.4.2 : Concentratie van toxisch fytoplankton in diverse monitoring stations van het BCP (11-13 sept 2000)

Project 1.4.2. - Studie van het voorkomen van *Haematodinium* bij langoestine (*Nephrops norvegicus*) in de zuidelijke Noordzee

a. Projectverantwoordelijken: F. Redant en D. Declerck

b. Wetenschappelijke achtergrond

Sinds de eerste waarnemingen voor de Schotse Westkust (FIELD *et al.*, 1992) in het begin van de jaren '90, is er toenemende bezorgdheid over de mogelijke gevolgen van infectie door de parasitaire dinoflagellaat *Haematodinium* op de langoestinstocks in de Europese wateren (ICES, 1998). Uitbraken van deze ziekte hebben immers een epidemisch karakter en kunnen tot massale sterfte onder de langoestines leiden. In die mate dat zowel de populatie als de visserij er aanzienlijke en langdurige schade van (kunnen) ondervinden. Tot nu toe werd de ziekte enkel met zekerheid vastgesteld in de Schotse kustwateren en in het Kattegat (ICES, 2000), maar er zijn indicaties dat ze ook in andere delen van de Noordzee (waaronder het Botney Gut - Silver Pit gebied) voorkomt.

Gezien de potentiële omvang van het probleem en gezien zijn potentiële implicaties voor de langoestinevisserij, is er dringend nood aan bijkomende gegevens, teneinde de graad van infectie door *Haematodinium* in zoveel mogelijk *Nephrops*-populaties na te gaan (ICES, 1998). Op termijn moet deze kennis toelaten een zgn. 'risk assessment' uit te voeren naar de kansen op epidemische uitbraken, en naar de mogelijke gevolgen daarvan op de stocks en hun exploitatiemogelijkheden.

c. Stand van zaken

De gestructureerde aanpak van het *Haematodinium*-onderzoek was één van de agendapunten op de laatste vergadering van de ICES *Nephrops Study Group* (SGNEPH) (Reykjavik, mei 2000 - ICES, 2000). Op deze vergadering werd een overzicht gegeven van de meest recente onderzoeksresultaten die in Schotland en Zweden geboekt werden, en van de minimumvereisten waaraan toekomstige onderzoeken moeten voldoen om vergelijkingen tussen diverse *Nephrops*-stocks onderling mogelijk te maken. Deze gegevens werpen een totaal nieuw licht op de materie, en noodzaakten ons meteen ook om de oorspronkelijke planning van het onderzoek (zoals opgenomen in het Onderzoeksprogramma 1999-2001 van de 'Werkgroep Biologie') te herzien.

Zeer in het kort kunnen deze bevindingen (en hun implicaties voor het toekomstige *Haematodinium*-onderzoek) als volgt samengevat worden:

- In tegenstelling tot wat vroeger gemeend werd, verschillen de periodes met piekprevalenties van *Haematodinium* van gebied tot gebied. Voor de Schotse Westkust is dit in maart-april (STENTIFORD, niet-gepubliceerde gegevens, gerapporteerd aan de ICES *Nephrops Study Group* - ICES, 2000), maar voor de Zweedse kust in de late zomer en vroege herfst (ULMESTRAND, *ibidem*). De gevolgen hiervan voor de organisatie van toekomstige onderzoeken naar het voorkomen van *Haematodinium* liggen voor de hand: wil men een nauwkeurig beeld krijgen van de mogelijke graad van *Haematodinium*-infectie, dan is een doorlopend monitoringprogramma vereist, met een looptijd van minstens 12 en bij voorkeur 24 maanden. Bij een éénmalige studie (zoals oorspronkelijk voorzien in het Onderzoeksprogramma van de 'Werkgroep Biologie') bestaat het risico dat de prevalentiepiek 'gemist' wordt, en dat de infectiegraad zwaar onderschat wordt.
- De diverse methoden die tot nu toe gebruikt werden om de ziekte te registreren ('body colour method', 'pleopod method' en analyse van bloedmonsters) geven geen eenduidige resultaten, o.m. omdat de uitkomsten te zeer beïnvloed worden door de onderlegdheid van de waarnemer (resultaten van een Schots-Zweeds intercalibratie-onderzoek, gerapporteerd in ICES, 2000). Momenteel wordt aan de Universiteit van Glasgow een nieuwe diagnostische methode ontwikkeld voor de opsporing van *Haematodinium*, gebaseerd op de zgn. 'western blotting assay' (een immuno-respons-methode gericht op de detectie van parasiet-specifieke proteïnen in het bloed en de weefsels van *Nephrops* - STENTIFORD in ICES, 2000). Deze methode moet het mogelijk maken om snel en (relatief) goedkoop grote aantallen *Nephrops* op de aanwezigheid van *Haematodinium* te controleren – een absolute vereiste voor het type monitoringprogramma's waarvan hierboven sprake.

Rekening houdend met:

- de noodzaak om aanvullende gegevens te verzamelen over de incidentie van *Haematodinium* in zoveel mogelijk Europese *Nephrops*-stocks;
- de technische en logistieke eisen die aan een dergelijk pan-Europees onderzoek gesteld worden (aantal te onderzoeken stocks, minimale duur van de monitoringprogramma's teneinde zekerheid te hebben over het seizoenaal verloop van de ziekte, enz.); en
- de wenselijkheid om deze onderzoeken uit te voeren met een gestandaardiseerde en reproduceerbare diagnostische methode;

zijn de leden van SGNEPH overeen gekomen om bij de Europese Commissie (EC) een voorstel in te dienen tot financiering van een internationaal coöperatief onderzoeksprogramma naar de verspreiding van *Haematodinium* in de Europese *Nephrops*-stocks (ICES, 2000). Dr. Douglas Neil (University of Glasgow, UK) heeft ermee ingestemd om een ontwerp van onderzoeksproject uit te

werken en om de coördinatie van dit project op zich te nemen. Wellicht zal dit projectvoorstel in de loop van 2001 bij de EC ingediend worden.

Gezien het belang van dit onderzoek (ook voor de *Nephrops*-stock in het Botney Gut - Silver Pit gebied) en gezien de wenselijkheid om het eigen onderzoeksprogramma af te stemmen op de aanbevelingen van SGNEPH, werd met DG 6 overeengekomen om de geplande onderzoeken in het Botney Gut - Silver Pit gebied tijdelijk op te schorten en deel te nemen aan bovengenoemd pan-Europees project. De inbreng van extra (Europese) financiële middelen is trouwens een absolute vereiste, willen we in staat zijn om (a) de onderzoeken uit te breiden van een éénmalige studie tot een monitoringprogramma van 12 of 24 maanden, en (b) de onderzoeken uit te voeren met gebruikmaking van de 'western blotting assay'.

d. Referenties

FIELD, R.H., CHAPMAN, C.J., TAYLOR, A.C., NEIL, D.M. en VICKERMAN, K. (1992): Infection of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, by a *Haematodinium*-like species of dinoflagellate on the west coast of Scotland.

Diseases of Aquatic Organisms, **13**, 1-15.

ICES (1998): Report of the Study Group on Life Histories and Assessment of *Nephrops*.

ICES, Living Resources Committee, CM 1998/G:9.

ICES (2000): Report of the Study Group on Life Histories of *Nephrops*.

ICES, Living Marine Resources Committee, CM 2000/G:06.

PUBLICATIES

DECLERCK, D. (1999) : The occurrence of liver tumours in flatfish in the south-western North Sea. BEQUALM liver histopathological workshop (21-23 October 1999 Weymouth, U.K.

VYNCKE, W. en DECLERCK, D. (1999). Aspecten van de kwaliteitsbepaling van gerookte vis. Mededelingen van het departement Zeevisserij (CLO.) Publicatie nr. 254-D/1999/0889/5

DECLERCK, D. (2000). Onderzoek van de fagocytosecapaciteit bij tarbot (*Psetta maxima*). Mededelingen van het departement Zeevisserij (CLO.) Publicatie nr. 255-D/2000/0889/1

DECLERCK, D. (2000) : National report for Belgium. Diseases in wild populations of marine organisms (1999). Progress report submitted to the working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms, March 2000, Bremen Germany.

DECLERCK, D. (2001) : National report for Belgium. Diseases in wild populations of marine organisms (2000). Progress report submitted to the working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms, March 2001, Santiago Spanje.

WERK- EN STUDIEGROEP RAPPORTEN

BEQUALM (1999) : Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes. Report of the first workshop (21-23 October 1999) : External Fish Diseases and Liver Histopathology.

ICES (2000) : Report of the Working Group on Pathology and diseases of Marine Fish Stocks. ICES, Mariculture Committee, 2000/F

ICES (2001) : Report of the Working Group on Pathology and diseases of Marine Fish Stocks. ICES, Mariculture Committee, 2001/F

Proefschriften uitgevoerd onder leiding van D. Declerck

KINDT, S. (2000) : Oriënterend onderzoek naar de mogelijkheid van aquacultuur van de mossel in het Belgisch Continentaal Plat.

Eindwerk KHBO, Brugge (onder leiding van D. Declerck)

BEDDELEEM, S. (2001) : Onderzoek van de fagocytosecapaciteit van tong en kabeljauw.

Eindwerk KHBO, Brugge (onder leiding van D. Declerck)

