

# *Vaccinatiemethodes voor zeebaars (Dicentrarchus labrax) tegen Vibriosis*

*Literatuurstudie naar de vergelijking van vaccinatiemethodes op arbeids- en materiaalkosten, mortaliteit en de immuniteitsduur.*

Arjo Oostra

5TBB TOEGEPASTE BIOLOGIE

# **Vaccinatiemethodes voor zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) tegen Vibriosis**

Literatuurstudie naar de vergelijking van vaccinatiemethodes op arbeids- en materiaalkosten, mortaliteit en de immuniteitsduur.

**Arjo Oostra**

Student Toegepaste biologie

Studentnummer: 3022331

Email: Arjo1@live.nl

**Erwin Roze**

Docent Aeres Hogeschool Almere

Email: e.roze@aeres.nl

**Almere, Januari 2020**



## Voorwoord

Als laatste onderdeel voor mijn opleiding Toegepaste Biologie aan de Aeres hogeschool Almere ligt hier de scriptie 'Vaccinatiemethodes voor zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) tegen Vibriosis'. De scriptie zal op basis van een literatuuronderzoek een omschrijving geven van de verschillende vaccinatiemethodes. Het betreft methodes die bij zeebaars worden toegepast om immuniteit te krijgen tegen de visziekte vibriosis. De methodes voor het toedienen van vaccins zullen worden vergeleken in arbeid, materiaal, immuniteitsduur en vissterfte. De vergelijking zal inzicht geven over het uiteindelijke vraagstuk welke methode nu het meest voordelig, optimaal en visvriendelijk is voor toepassing in een aquacultuur.

## Samenvatting

Een aquacultuur of viskwekerij is een bedrijf waar vissen, schaaldieren, waterplanten, algen en/ of weekdieren worden gekweekt en geoogst. De grootste visproductie bevindt zich in het middellandse zeegebied. Waaronder de productie van zeebaars (*Dicentrarchus labrax*). Wereldwijd proberen aquaculturen kweekvissen immuun te maken tegen visziekten (Jun & Woo, 2003). De meest bekende infectieuze visziekte is vibriosis. De ziekte wordt veroorzaakt door het bacteriële geslacht *Vibrio* waarvan de meest bekende bacterie *Vibrio anguillarum* is (Chistiakov, Hellemans, & Volckaert, 2007). De bacterie kan bij meer dan 50 verschillende zoet- en zoutwater vissoorten voorkomen waaronder zeebaars (Frans, et al., 2011). Sinds heden is bekend dat antibiotica op lange duur niet werkt en slecht is voor het milieu. Aquaculturen stappen over van antibiotica naar het toepassen van vaccinatie methodes (Gudding & Van Muiswinkel, 2013). In deze studie zijn doormiddel van een literatuuronderzoek de verschillende toedieningsmethodes van vaccins beschreven. Vanuit de basis toedieningsmethodes: inenten, immersie en orale vaccinatie zijn er negen verschillende methodes met elkaar vergeleken. De methodes zijn samen opgesteld in een vergelijkingstabel die de deelvragen beantwoord om vervolgens de hoofdvraag te beantwoorden: *‘welke vaccinatiemethode(s) kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeid, materiaal, immuniteitsduur en vismortaliteit?’*. Het doel van de studie is om aquaculturen een beter perspectief te geven over de mogelijke vaccinatiemethodes met de voor- en nadelen per methode. Aquaculturen zouden het advies mee kunnen nemen als leidraad voor een besluit welke methode te gaan toepassen. De studie heeft bevonden dat de beste methode om te gebruiken voor aquaculturen vaccinatie door injectie is. Maar omdat injectie pas mogelijk is voor zeebaars na een gewicht van 20 gram zijn directe immersie (lange of korte dip) of oraal vaccinaties geadviseerd voor zeebaars met een lichter gewicht. De directe immersie en orale methodes kunnen toegepast worden bij zeebaars kleiner dan 5 gram (larvale fase) waar het immuunsysteem nog in ontwikkeling is. Zeebaars zijn in deze levensfase kwetsbaar voor visziekten waar de meeste vissterfte voorkomen. Om de gehele levensfase resistentie te bieden tegen vibriosis tot aan de oogst wordt het volgende geadviseerd. Voor de larvale en juveniele levensfase kan een immersie proces of orale vaccinatie worden ingezet. Wanneer de zeebaars boven de 20-35 gram weegt wordt geadviseerd om doormiddel van injectie te revaccineren die resistentie biedt tot de oogst.

## Abstract

An aquaculture or fish farm is a company where fish, crustaceans, aquatic plants, algae and / or molluscs are grown and harvested. The biggest fish production in the Mediterranean region including the greatest production of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Internationally, aquacultures are trying to protect the produced fish against fish diseases (Jun & Woo, 2003). The most well-known infectious fish disease is vibriosis. The disease is caused by the bacterial genus *Vibrio*. The well-known species of this genus is the bacterium *Vibrio anguillarum* (Chistiakov, Hellemans, & Volckaert, 2007). The bacteria can occur in more than 50 different freshwater and saltwater fish species, including sea bass (Frans, et al., 2011). Currently it is known that antibiotics, on a long term, do not work effectively and are bad for the environment. In this trend, aquacultures are switching from antibiotics to applying vaccination methods (Gudding & Van Muiswinkel, 2013). This literature study describes the various administration methods of vaccines against vibriosis. Based on the basic administration methods: vaccination, immersion and oral vaccination, nine different methods were compared.

The methods are put together in a comparison table that answers the sub-questions. Afterwards, these sub-questions will answer the main question: "when taking into account the process, material, immunity duration and fish mortality, which vaccination method(s) will be the most effective administrated to sea bass against vibriosis?". The aim of the study is to give aquacultures a better perspective of the available vaccination methods by showing the advantages and disadvantages per method. Aquacultures could take the advice as a guideline for deciding which method to apply.

The study found that the best method to use for aquaculture is vaccination by injection. However, injection is only possible when the sea bass in question weigh 20 grams or above. For sea bass below this weight, direct immersion (long or short dip) or oral vaccination is recommended. The direct immersion and oral methods can be applied to sea bass weighing less than 5 grams (larval phase) when the immune system is still developing. In this phase of life. In this phase sea bass are vulnerable to fish diseases with the highest mortality rates.

To reach an immunity against vibriosis until harvest the study advises to use 2 separate methods.

For the larval and juvenile life phase, an immersion process or oral vaccination can be used. When the sea bass weigh more than 20-35 grams, it is recommended to revaccinate by injection that offers immunity until harvest.

## Inhoudsopgave

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Inleiding.....                                                                   | 6  |
| 1.1. Leeswijzer.....                                                                | 9  |
| 2. Methode .....                                                                    | 10 |
| 2.1. Geraadpleegde Databases .....                                                  | 10 |
| 2.2. Zoektermen.....                                                                | 11 |
| 2.3. Criteria bronselectie.....                                                     | 12 |
| 2.4. Bronnenmatrix .....                                                            | 12 |
| 2.5. Vergelijkingstabel vaccinatiemethodes .....                                    | 13 |
| 3. Literatuur omschrijving (Resultaten) .....                                       | 14 |
| 3.1. Theoretische kader .....                                                       | 14 |
| 3.1.1. Injectie.....                                                                | 14 |
| 3.1.1.1. handmatige injectie .....                                                  | 14 |
| 3.1.1.2. Automatische vaccinatie .....                                              | 17 |
| 3.1.2. Immersie .....                                                               | 20 |
| 3.1.2.1. Directe immersie (korte dip/langdurige bad) .....                          | 20 |
| 3.1.2.2. Ultrasound, Multipel punctie instrument, Hyper osmotische dip, Spray ..... | 22 |
| 3.1.3. Oraal.....                                                                   | 24 |
| 3.1.3.1. Orale methodes .....                                                       | 24 |
| 3.2. Vergelijkingstabel.....                                                        | 27 |
| 4. Discussie.....                                                                   | 31 |
| 4.1. Arbeid en mankracht .....                                                      | 31 |
| 4.2. Materiaal.....                                                                 | 31 |
| 4.3. Effectiviteit toedieningsmethode vaccin .....                                  | 32 |
| 4.4. Gemiddelde Vissterfte voor/na het proces .....                                 | 33 |
| 4.5. Aanpak resultaten.....                                                         | 34 |
| 5. Conclusie .....                                                                  | 35 |
| 5.1. Conclusie deelvragen .....                                                     | 35 |
| 5.2. Conclusie hoofdvraag + aanbeveling .....                                       | 36 |
| 6. Bronnenlijst.....                                                                | 37 |
| Bijlagen.....                                                                       | 44 |
| Bijlage I Checklist schriftelijk rapporteren 2018 .....                             | 44 |

## 1. Inleiding

Een aquacultuur of viskwekerij is een bedrijf waar vissen, schaaldieren, waterplanten, algen en/ of weekdieren worden gekweekt en geoogst. De grootste visproductie bevindt zich in het Middellandse zeegebied. Waaronder de productie van zeebaars (*Dicentrarchus labrax*). Wereldwijd proberen aquaculturen kweekvissen immuun te maken tegen visziekten (Jun & Woo, 2003). De meest bekende infectieuze visziekte is vibriosis. De ziekte wordt veroorzaakt door het bacteriële geslacht *Vibrio* waarvan de meest bekende bacterie *Vibrio anguillarum* is (Chistiakov, Hellemans, & Volckaert, 2007). Het is de meest voorkomende bacterie die bij aquaculturen grote vissterfte kan veroorzaken. De bacterie kan bij meer dan 50 verschillende zoet- en zoutwater vissoorten voorkomen waaronder zeebaars (Frans, et al., 2011).

De symptomen bij vissen na besmetting met vibriosis zijn, verlies van gewicht, opzetten van de buikholte en rode bloeditstoringen over het gehele lichaam. Daarnaast kunnen er bij de ogen infecties ontstaan die zwellingen veroorzaken wat exoftalmie (uitpoppen van de ogen) tot gevolg kan hebben (Angelidis, 2006). Voor vissen zijn deze symptomen een belemmering van de groei en gezondheid die in het ergste geval kunnen leiden tot sterfte. Vissen raken besmet met *V. anguillarum* bij beschadigingen aan de huid of bij het innemen van besmet visvoer of water (Vázquez & Munoz-Cueto, 2015). *V. anguillarum* kan vibriosis veroorzaken wanneer de weerstand van de vis verlaagd is door hoge stress en wanneer de watertemperatuur boven de 15 graden Celsius is. De bacterie heeft een optimale groei bij 25 tot 30 graden Celsius (Colquhoun & Lillehaug, Vaccination against vibriosis, 2014). Factoren die bij de vis stress kunnen veroorzaken zijn bijvoorbeeld een slechte waterkwaliteit, te veel voeren, hoge populatiedichtheden of snelle veranderingen in de watertemperatuur (Jun & Woo, 2003; Ashley, 2006).

Een preventieve aanpak voor aquaculturen die een uitbraak van vibriosis willen voorkomen, is het tegen gaan van de stressfactoren bij kweekvis (Sobhana, 2009). Voorbeelden hiervan zijn het verbeteren van waterkwaliteit en de beperking van de populatiedichtheid in zeekooien of vistanks. Naast dit soort preventieve maatregelen proberen aquaculturen kweekvis door middel van vaccinatie resistent te maken tegen visziekten zoals vibriosis (Frans, et al., 2011). Hierbij wordt een verzwakte of dode ziekteverwekker, bijvoorbeeld een virus of bacterie, toegediend in het lichaam waardoor er antistoffen gemaakt worden, dit verhoogt de resistentie op "natuurlijke wijze". Vaccinatie voor vissen werd in 1942 ontwikkeld, gebruikt en bewezen door Duff (Duff, 1942).

Duff bewees vaccinatie bij vis door regenboogforellen (*Oncorhynchus mykiss*) te injecteren met *Aeromonas salmonicidai* bacteriën of deze oraal via het voer toe te dienen. Zijn doel was om de regenboogforellen immuniteit te geven tegen de ziekte furunculose. Toch werd vaccinatie na het succes van Duff weinig tot niet gebruikt door andere aquaculturen die voor commerciële doeleinden vis kweekten (Gudding & Van Muiswinkel, 2013). Tijdens en na de Tweede Wereldoorlog was het lastig om vaccins te krijgen en werd chemische therapie als een beter alternatief gezien (Snieszko & Friddle, 1949; Gudding & Goodrich, 2014). Chemische therapie is het toepassen van antibiotica voor een langere tijd. Het was goedkoper en minder arbeidsintensief omdat de antibiotica gemengd kon worden met het visvoer om ook "preventief" de vis te beschermen. Wegens het succes van chemische therapie werd vaccinatie niet door aquaculturen gebruikt en was er geen belang voor ontwikkeling van vaccinaties tot aan het begin van de 70'er jaren (Gudding & Goodrich, 2014).

In de jaren '70 van de afgelopen eeuw werd in aquaculturen van zoutwatervissen voor het eerst gebruik gemaakt van zeekooien die op het wateroppervlak bleven drijven. Voordat deze in gebruik werden genomen vond de teelt van vis voornamelijk plaats aan de kustlijn. Met de komst van de zeekooien konden vissen aan de hand van aquaculturen ook op open zee geteeld worden. Het bood meer ruimte en verhoogde de visproductie (Gudding & Goodrich, 2014). Het nadeel van de zeekooien in de open zee was dat de kweekvis blootgesteld werd aan bacteriën zoals *V. anguillarum*. Wereldwijd ontstonden vibriosis uitbraken als gevolg met het kweken van vis in hoge dichtheden op de open zee (Embregts & Forlenza, 2016; Ashley, 2006).



Figuur 1 Zeekooien in de Adriatische zee uitkijkend naar het eiland Ugljan.

Als oplossing tegen de vibriosis uitbraken gebruikte de aquaculturen chemische therapie. Er werd een grote hoeveelheid aan antibiotica toegediend aan de kweekvis wat uiteindelijk een volgend probleem veroorzaakte. Het effect van antibiotica verdwijnt bijvoorbeeld bij overmatig gebruik. De bacteriën bouwen een resistentie op tegen de antibiotica waardoor de visziekte toch tot uiting komt (Lillehaug, 1998). De kweekvissen in de zeekooien werden hierdoor niet meer beschermd tegen vibriosis met als gevolg, een grote vissterfte en hoge economische verliezen sinds 1977 (Vázquez & Munoz-Cueto, Pathologies Due to Bacteria, 2015).

Daarnaast veroorzaakte het grote antibiotica gebruik verschillende problemen in het aquatische milieu (Plant & LaPatra, 2011; Evelyn, 1997). Het eerste probleem is de vervuiling van water dat ook gebruikt kan worden als drink-, irrigatie- en recreatiewater. Het tweede probleem zijn de bacteriën die resistentie op hebben gebouwd tegen antibiotica en zich verspreiden in de open zee. Deze verspreiding van de resistente bacteriën kan tot nieuwe vibriosis uitbraken leiden in andere dichtbij gelegen aquaculturen. Het laatste probleem is dat de residuen van antibiotica die terecht zijn gekomen in open zee bacteriën doden die van belang zijn voor het aquatische ecosysteem. Bijvoorbeeld bacteriën die als voedselbron dienen voor krill (*Euphausiacea*) die weer als voedselbron dient voor grote baleinwalvissen. Met het doden van deze bacteriën is een belangrijke voedselbron weg uit een ecosysteem. Dit heeft als gevolg uit balans te raken waardoor veel andere soorten kunnen doen lijden/sterven (Costanzo, Murby, & Bates, 2005).

De ontdekking van de negatieve bijwerkingen van antibiotica op het milieu had als gevolg dat regelgeving en handhaving veranderden en strenger werden. Het zoeken naar andere methodes voor het voorkomen van visziektes werd hierdoor essentieel (Beyls, 2015). Chemische therapie bleek geen goed alternatief meer te zijn waardoor er meer aandacht kwam voor vaccinatie. In 1976 werd in de Verenigde Staten voor het eerst een visvaccin geregistreerd voor commercieel gebruik (Gudding & Van Muiswinkel, 2013). Het vaccin werd vermengd in visvoer en gaf door orale toediening kweekvis resistentie tegen enteric redmouth disease (Adams, 2019). Het tweede geregistreerde vaccin volgde kort daarna in 1977. Dit vaccin werd ook oraal toegediend en bood een gecombineerde resistentie tegen *Vibrio anguillarum* en *Ordalii* vibriosis (Rombout J. , 2006).

Momenteel zijn er vierentwintig geregistreerde vaccins om commercieel te gebruiken voor zeventien vissoorten (Adams, 2019). Om een vaccin toe te passen moet rekening gehouden worden met welke vissoort het vaccin toegediend krijgt. Iedere vissoort heeft een andere reactie op het vaccin. Door gebruik te maken van een vaccinatiestrategie kunnen aquaculturen het juiste vaccin bij de juiste vis



inbrengen om zo onnodige vissterfte te voorkomen. De term ‘vaccinatiestrategie’ houdt in dat er duidelijk is tegen welke ziekte wordt gevaccineerd, bij welke vissoort en met welke toedieningsmethode (vaccinatieprocedure) (Lillehaug, 2014).

Voor het toedienen van vaccins worden er drie basismethodes gehanteerd: inenten, vaccinbad (immersie) en orale toediening. Bij inenten wordt het vaccin aangebracht met een injectienaald op een aangewezen plaats bij vissen. De meest gebruikte plaats is in de buikwand van de vis. Bij immersie wordt meestal pootvis (jonge vis met een gewicht van 1 tot 5 gram) in een vaccinbad gedoopt en komt het vaccin via de kieuwgang de bloedbaan binnen. Bij orale toediening wordt het vaccin vermengd met



*Figuur 2 Vaccinatie doormiddel van inenting bij zeebaars.*

visvoer en gevoerd aan de kweekvissen. Op deze manier zal het vaccin via de metabolische weg in de bloedbaan van de vis komen (Brudeseth, et al., 2013). Door de vele manieren om een vis te vaccineren is het helaas niet duidelijk welke methode het beste werkt voor een aquacultuur. Voor aquaculturen is het uiteraard van belang dat de methode zo weinig mogelijk kost en ook weinig vissterfte oplevert. Daarbij is het van belang dat de immuniteitsduur lang genoeg zal zijn tot de vissen worden geoogst voor consumptie.

In deze studie wordt door middel van een literatuurstudie een vergelijking gemaakt van de bestaande toedieningsmethodes van de vaccins tegen *vibriosis* in zeebaars. De hoofdvraag die hierbij gesteld wordt is *‘welke vaccinatiemethode(s) kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeid, materiaal, immuniteitsduur en vismortaliteit?’*. De toedieningsmethodes zullen worden vergeleken op basis van de benodigde arbeid om te vaccineren, de kosten van het materiaal dat nodig is voor het vaccineren, de effectiviteit van het vaccin (immuniteitsduur) en tot slot de mogelijke mortaliteit van de vis tijdens het vaccineren. Voor het beantwoorden van de hoofdvraag zijn er een viertal deelvragen opgesteld:

- 1) Welke vaccinatiemethodes bestaan er om zeebaars te vaccineren tegen vibriosis?
- 2) Wat is er per methode nodig aan mankracht, arbeid en materialen (kosten)?
- 3) Hoe lang blijft het vaccin effectief (immuniteitsduur) bij de zeebaars per methode?
- 4) Hoe hoog is de gemiddelde vissterfte (mortaliteit) tijdens en (kort)na het toedienen van het vaccin per methode?

## 1.1. Leeswijzer

In hoofdstuk 2 'methode' zal er omschreven worden hoe en waar de informatie voor de afstudeeropdracht is geraadpleegd. Daarnaast zal hoofdstuk 2 een uitleg geven hoe het resultaat is uitgewerkt. In hoofdstuk 3 'resultaten' wordt in het theoretische kader de verschillende methodes beschreven. Na het theoretische kader is een vergelijkingstabel opgezet die de methodes onder elkaar zet en per deelvraag beantwoord. Vervolgens worden in hoofdstuk 4 'discussie' de gevonden methodes, die in de vergelijkingstabel zijn opgesteld, vergeleken met elkaar. Per deelvraag zullen de deelvragen worden vergeleken. De discussie wordt afgesloten over de aanpak van de resultaten die zijn besloten tijdens het schrijven. Als afsluiting zal in hoofdstuk 5 'conclusie' elke deelvraag worden beantwoord. Vervolgens zullen dankzij de deelvragen een uiteindelijke uitspraak worden gegeven over de hoofdvraag *“welke vaccinatiemethode kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeids- en materiaalkosten, immuniteitsduur en vismortaliteit?”*. Uiteindelijk zal in de discussie een aanbeveling gegeven worden welke methode of methodes aquaculturen het beste kunnen gebruiken.

## 2. Methode

Voor het beantwoorden van de hoofdvraag ‘welke vaccinatiemethode kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeids- en materiaalkosten, immuniteitsduur en vissterfte?’ is voor dit afstudeerwerkstuk/onderzoek een literatuurstudie opgezet. In dit hoofdstuk is omschreven hoe en waar de literatuur is verzameld. Dit hoofdstuk zal vervolgens omschrijven aan welke criteria een bron moest voldoen om opgenomen te worden in de literatuurstudie.

De geraadpleegde databases zijn in paragraaf 2.1 opgesteld in tabel 1. In de tabel zijn de webpagina's met weblinks en boeken met het ISBN-nummer opgesplitst. Voor het vinden van artikelen moeten er specifieke zoektermen worden ingevuld in de zoekbalken van de databases. In paragraaf 2.2 zijn deze zoektermen opgesplitst in hoofdtermen en combinatietermen opgesteld in tabel 2. De bronnen die zijn gevonden zijn vervolgens gescreend op basis van de criteria vermeld in 2.3.1. De hier uit naar voren gekomen relevante bronnen zijn vermeld in een bronnenmatrix omschreven in 2.4. Als laatste wordt in paragraaf 2.5 de uitwerking van het resultaat besproken. Hierbij wordt omschreven hoe na het vinden van de literatuur de deelvragen zijn beantwoord en waar de literatuur voor is gebruikt.

### 2.1. Geraadpleegde Databases

Om wetenschappelijke bronnen te krijgen over de verschillende vaccinatiemethodes zijn de volgende databases gebruikt: google scholar, google, Science direct, Wiley, Springer link, Europe PMC en mediatheek aangeboden vanuit de Aeres hogeschool (zie tabel 1). Daarnaast is er ook gebruik gemaakt van boeken met informatie over het onderwerp, daarvan zijn het ISBN-nummer en de titel onder de databases vermeld en apart gezet.

Tabel 1 Databases en boeken die zijn geraadpleegd voor bronnen en informatie.

| Geraadpleegde databases                           | Weblink                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Google Scholar                                    | <a href="http://scholar.google.nl">http://scholar.google.nl</a>                                                                                                                                                 |
| Science direct                                    | <a href="http://www.sciencedirect.com">http://www.sciencedirect.com</a>                                                                                                                                         |
| Wiley                                             | <a href="http://www.wiley.com">http://www.wiley.com</a>                                                                                                                                                         |
| Springer link                                     | <a href="https://link.springer.com">https://link.springer.com</a>                                                                                                                                               |
| Europe PMC                                        | <a href="https://europepmc.org">https://europepmc.org</a>                                                                                                                                                       |
| Wikipedia*                                        | <a href="https://nl.wikipedia.org/wiki/Hoofdpagina">https://nl.wikipedia.org/wiki/Hoofdpagina</a>                                                                                                               |
| Google                                            | <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a>                                                                                                                                                     |
| Mediatheek intranet                               | <a href="https://aerport.aeres.nl/organisatie/CAH/organisatie/afdelingen/mediatheek/Paginas/afdeling.aspx">https://aerport.aeres.nl/organisatie/CAH/organisatie/afdelingen/mediatheek/Paginas/afdeling.aspx</a> |
| Geraadpleegde Boeken                              | ISBN-nummer                                                                                                                                                                                                     |
| The biology of the European Seabass               | 9781466599468                                                                                                                                                                                                   |
| Fish vaccination                                  | 9781118806937                                                                                                                                                                                                   |
| Cage aquaculture                                  | 9781405148023                                                                                                                                                                                                   |
| Fish Defenses: Pathogens, Parasites and predators | 9781439842850                                                                                                                                                                                                   |

\*= Wikipedia is gebruikt om inspiratie op te doen met het zoeken en een overzicht te krijgen van het onderwerp.

## 2.2. Zoektermen

In tabel 2 is een zoekprofiel opgesteld van de zoektermen. Per deelvraag zijn er zoektermen opgesteld die zijn opgesplitst in hoofdtermen en combinatietermen voor het zoeken in de geraadpleegde databases (zie tabel 1). Met het invullen van de zoekbalk in de databases is altijd een hoofdterm gebruikt. Daarbij zijn bij de hoofdtermen, combinatietermen toegevoegd om meer artikelen te vinden gericht op de specifieke deelvraag. Meerdere combinatietermen zijn er gebruikt bij het aanvullen van een hoofdterm. Termen zijn in het Engels in de zoekbalken gezet. De combinaties zijn in de zoekbalken doormiddel van 'and' of 'or' ingevuld. In tabel 2 is de term 'method x' vermeld. Deze term staat voor de gevonden methodes van deelvraag 1 en helpt met het beantwoorden van de andere deelvragen.

Om het lezen van de tabel te vergemakkelijken, worden de deelvragen hier nogmaals vermeld:

- 1) *Welke vaccinatiemethodes bestaan er om zeebaars te vaccineren tegen vibriosis?*
- 2) *Wat is er per methode nodig aan mankracht, arbeid en materialen (kosten)?*
- 3) *Hoe lang blijft het vaccin effectief (immuniteitsduur) bij de zeebaars per methode?*
- 4) *Hoe hoog is de gemiddelde vissterfte (mortaliteit) tijdens het toedienen van het vaccin per methode en wat is de belangrijkste oorzaak?*

Voorbeelden van combinaties gemaakt met de zoektermen zijn bijvoorbeeld:

- Vaccination method(s) vibriosis and seabass.
- Oral methodology Seabass, *V. anguillarum*.
- Protective efficiency, method x, Seabass vibriosis.

Zoals te zien is in de combinaties zijn termen zoals Seabass en vibriosis bijna altijd gebruikt.

Tabel 2 Zoekprofiel van zoektermen die per deelvraag zijn gebruikt met het zoeken naar bronnen.

| Deelvraag | Hoofdzoektermen:                                                                                                               | Combinatietermen:                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | <i>Vaccination method(s)</i><br><i>Injection</i><br><i>Immersion</i><br><i>Vaccine bath</i><br><i>Oral</i><br><i>Fish food</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• (Vaccination) Procedures</li> <li>• (Vaccination) Tactics</li> <li>• <i>Vibriosis</i></li> <li>• <i>Vibrio anguillarum</i></li> <li>• Seabass</li> <li>• Administration</li> <li>• Vaccine</li> <li>• Methodology</li> <li>• Administration</li> </ul> |
| 2         | <i>Labour intensity</i><br><i>Materials</i><br><i>Working method of</i><br><i>Methodology</i>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Method x</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                    |
| 3         | <i>Immunity duration</i><br><i>Method x (Term van gevonden methode)</i><br><i>Efficacy</i><br><i>Protective efficiency</i>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Method x</li> <li>• Vaccination</li> <li>• Seabass</li> <li>• Vibriosis/<i>V. anguillarum</i></li> </ul>                                                                                                                                               |
| 4         | <i>Mortality</i><br><i>Stress gradient</i>                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Method x</li> <li>• Seabass</li> <li>• Cause/reason</li> </ul>                                                                                                                                                                                         |

### 2.3. Criteria bronselectie

Om voor de literatuurstudie de juiste artikelen te kiezen en te lezen zijn er criteria opgesteld waaraan een artikel moest voldoen om mee genomen te worden in de bronnenmatrix in paragraaf 2.4.

Criteria voor elk artikel:

- Wetenschappelijke studie?  
Titel van de publicatie, publicatiedatum, peer-reviewed en citatie van de publicatie. Is het een wetenschappelijke studie of niet?
- Welke vissoort wordt er omschreven?  
Voor deze studie zal bij de toedieningsmethode gericht worden gezocht op zeebaars (*Dicentrarchus labrax*) en/of andere gerelateerde vissoorten. Artikelen over garnalen- of mosselsoorten worden uitgelaten.
- Welke visziekte en/of bacterie wordt in het artikel beschreven?  
Vibriosis, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio* subspecies zijn goedgekeurd en meegenomen. Andere visziektes en andere soorten bacteriën zijn bij voorbaat uitgesloten voor de studie.

Criteria als er specifiek werd gezocht per deelvraag:

- Criteria deelvraag 1: Gaat het over een vaccinatiemethode?  
Gedacht aan de drie basis toedieningswijzen: inenten, immersie, oraal.
- Criteria deelvraag 2: Gaat het over het vaccinatieproces?  
Hoeveel mankracht is er nodig? Op welke manier wordt de zeebaars gevaccineerd? Welke materialen zijn nodig voor het proces?
- Criteria deelvraag 3: Gaat het over de immuniteitsduur van een van de vaccinatiemethodes?
- Criteria deelvraag 4: Gaat het artikel over de vissterfte tijdens het vaccineren en/of de reden van vissterfte?

### 2.4. Bronnenmatrix

Om alle gevonden bronnen samen te vatten en overzichtelijk te houden is er een bronnenmatrix opgesteld (zie tabel 3). Bij het goedkeuren van de bron doormiddel van de criteria opgesteld in paragraaf 2.3. zijn de titel, onderwerp, toedieningsmethode (indien omschreven) en publicatiedatum genoteerd. Met behulp van deze matrix kon verlies en het moeilijk terugvinden van de bron worden voorkomen.

Tabel 3 Voorbeeld bronnenmatrix gebruikt met de literatuurstudie.

| Titel artikel | Onderwerp | Toedieningsmethode | Datum publicatie | Wetenschappelijke bron? Internetlink | Overige notaties |
|---------------|-----------|--------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|
| -             | -         | -                  | -                | -                                    | -                |

## 2.5. Vergelijkingstabel vaccinatiemethodes

Nadat alle bronnen zijn gevonden, door de criteria zijn gekomen en vervolgens vermeld in de bronnenmatrix zijn de resultaten genoteerd. Een voorbeeld tabel is opgesteld (zie tabel 4) die gebruikt is om per factor (arbeidskosten, nodige materiaal, effectiviteit vaccin, gemiddelde vissterfte tijdens vaccinatie) elke vaccinatiemethode te vergelijken. Elke methode is in de tabel per factor besproken, onder elkaar gezet om vervolgens voor de discussie een hulpsteun te bieden welke vaccinatiemethode het beste is op het gebied van arbeids- en materiaalkosten, immuniteitsduur en mortaliteit.

*Tabel 4 Alle gevonden vaccinatiemethodes vergeleken op basis van de factoren: arbeid, materiaal, effectiviteit vaccin en vissterfte tijdens vaccinatie.*

| Methodes\factoren | Nodige mankracht | Nodige materiaal | Effectiviteit toedieningsmethode vaccin | Gemiddelde vissterfte na vaccinatie |
|-------------------|------------------|------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| Methode x         |                  |                  |                                         |                                     |
| ...               |                  |                  |                                         |                                     |

### 3. Literatuur omschrijving (Resultaten)

In dit hoofdstuk zullen alle gevonden visvaccinatie methodieken in theoretische kader worden omschreven (ter beantwoording van deelvraag 1). Vervolgens zal doormiddel van een tabel de methodes onder elkaar gezet en worden vergeleken met de 4 factoren (deelvraag 2, 3 en 4). Met de tabel zal er in een oog opslag te zien zijn wat de verschillen zijn tussen de methodieken in arbeids-, materiaalkosten, immuniteitsduur en vissterfte.

#### 3.1. Theoretische kader

Voor het theoretische kader zijn de verschillende vaccinatie methodieken opgedeeld in drie subcategorieën: Injectie, Immersie (onderdompeling) en Oraal.

##### 3.1.1. Injectie

Vaccinatie doormiddel van injectie is de meest bekende vorm van het toedienen van vaccin. Doormiddel van een injectienaald, die wordt ingebracht in de buikwand van de zeebaars, wordt het type vaccin ingebracht in de vis (Dhar & Allnutt, 2011). De precieze plaats bevindt zich boven de buikvin en de anale doorgang (zie figuur 2) waar de minste schade kan worden aangebracht bij infectie aan de wond van de injectie. Het proces kan handmatig of machinaal worden uitgevoerd (Dhar & Manna, 2014).



Figuur 3: Ronder zeekooi met een geplaatst bad met zeewater en vermengd anestheticum (onderin foto).

##### 3.1.1.1. handmatige injectie

Het vaccinatie proces begint met het in narcose brengen van de zeebaars. Als vissen verdoofd zijn voorkomt het dat de vis onverwachte bewegingen maakt en er fouten of schade wordt gemaakt aan de buikwand van de vis tijdens de injectie (Vázquez & Munoz-Cueto, 2012). Eerst wordt de zeebaars uit de zeekooien gehaald en apart gezet in een met zeil aangebracht bad (zie figuur 3). In dit bad wordt anestheticum vermengd met het zeewater. Tricaine methaansulfonaat (figuur 4) wordt voor vissen gebruikt als anestheticum (Popovic, et al., 2012). Om zuurstoftekort bij de zeebaars te voorkomen wordt

“Tricaine methane-sulphonate (MS-222),  $C_9H_{11}O_2N + CH_3SO_3H$ , also known as ethylm-amino benzoate, tricaine mesilate, m-aminobenzoic acidethyl ester methanesulfonate and metacaine, has been one of the most widely used anaesthetic agents for poikilotherms world-wide since its introduction in 1967.” - (Popovic, et al., 2012)

zuurstof aan het bad toegevoegd. Wanneer de vissen verdoofd zijn kan het volgende proces in gang worden gezet. De zeebaars worden vervolgens op een werktafel aangebracht (zie figuur 5). De werktafel die ontworpen is voor visvaccinatie door injectie is een U-vormige bak gevuld met water waar de vis in wordt geplaatst. Om te voorkomen dat het injecteren te lang duurt wordt het water in de werktafel vermengd met het verdovingsmiddel om de vis onder narcose te houden. Een werktafel heeft (meestal) twee goten waar stromend water doorheen stroomt (Lillehaug, 2014). Na plaatsing van injectie wordt de zeebaars in de goot geplaatst die de zeebaars transporteert naar een andere zeekooi.

Figuur 4: Uitleg over de meerdere naamsgebruiken van Tricaine methaansulfonaat.



In de volgende zeekooi zullen de geïnjecteerde zeebaars uit de narcose komen. Voor het injecteren van de zeebaars worden injectiepistolen gebruikt (zie figuur 6). Voor zeebaarzen met een gewicht van 20-125 gram worden 3-5mm injectienaalden gekoppeld aan de injectiepistolen (Lillehaug, 2014). Bij juist gebruik zal het de buikwand van de vis doorboren maar de organen niet bereiken en beschadigen (zie figuur 2). Na verloop van gebruik wordt de naald bot en moet vervangen worden. Het



*Figuur 5: Werktafel gebruikt voor visvaccinatie door injectie.*

kan gebeuren dat met een botte naald de buikwand niet kan worden doorboord en juist meer schade maakt dan nodig is. Het vaccin wordt in een fles bewaard die geconnecteerd staat aan het pistool doormiddel van een buisje. Op basis van luchtdruk wordt met het drukken van de trekker het vaccin in de vis gespoten waarmee de vaccinatie voltooid is (Dhar & Manna, 2014).

Voor het proces zijn er minimaal 4 tot 5 mensen nodig die injecteren met 1 persoon als operator. De operator zorgt ervoor de er niet te veel vissen worden verdoofd en dat het proces draaiende blijft. Het voorkomt dat de zeebaars te lang onder narcose is, te weinig zuurstof binnen krijgt en sterft (Brudeseth, et al., 2013). De mensen voor het injecteren zijn uitgerust met een injectiepistool en plastic handschoenen. Voor de veiligheid en ter voorkoming van het “per-ongeluk” injecteren van zichzelf kunnen mensen beschermende handschoenen dragen. Bij het injecteren van zichzelf met een volle dosis vaccin moet de persoon naar het ziekenhuis om daar vervolgens het vaccin te laten verwijderen. Het vaccin dat wordt gebruikt voor injectie is gemaakt op olie-basis, dit kan het lichaam niet snel verwerken. Het is mogelijk dat dit gaat irriteren en infecteren (Lillehaug, 2014).



*Figuur 6: Twee soorten injectiepistolen waarbij (linker) met de muis van de hand wordt ingedrukt en de (rechter) met de vingers. De rechter injectiepistool bevat ook een teller om de aantal vissen te tellen per schot.*

De zeebaars die in de volgende zeekooi terechtkomen om uit narcose te raken worden onder toezicht gehouden. Het is van belang dat de zeebaars niet te lang in narcose blijft. Als dat gebeurt zakken de vissen naar de bodem, stapelen en zullen door zuurstoftekort sterven. Enkele dagen na het proces wordt elke dag de zeekooi gecontroleerd op vissterfte.



#### 3.1.1.1.1. Voordelen van handmatige injectie:

- Injectie is de methode die de langste immuniteit (langer dan 1 jaar) biedt. Deze methode kan met een eenmalig proces de vis immuniteit bieden tot aan de oogst (Afonso, Gomes, Silva, Marques, & Henrique, 2005; Plant & LaPatra, 2011).
- Vaccinatie doormiddel van injectie geeft de vis de hoogste immuniteitsrespons tegen vibriosis (Afonso, Gomes, Silva, Marques, & Henrique, 2005).
- Injectie is een directe inbreng van antigenen voor snelle opname en immuniteitsrespons bij zeebaars (Dhar & Allnutt, 2011). Binnen 6-7 dagen een immuniteitsrespons op te merken bewezen door Afonso et al. (2005).
- Injectie biedt de mogelijkheid om multivalent vaccin toe te dienen die immuniteit geven tegen meerdere ziektes (Plant & LaPatra, 2011). Het is mogelijk om 5 verschillende antigenen van visziektes te combineren in een vaccin.

#### 3.1.1.1.2. Nadelen van handmatige injectie:

- Het vaccinatieproces heeft een hoge arbeidsintensiteit waarbij veel arbeidskracht en gespecialiseerde materialen nodig zijn (Evensen, 2009). Daardoor stijgen de kosten van het vaccineren doormiddel van injectie (Dhar & Allnutt, 2011; Adelman, et al., 2008).
- Vaccineren door injectie is niet geschikt voor vissen lichter dan 20 gram door het arbeidsintensief proces, tijdelijke stop met voeren, doorboren van de buikwand en vergrootte kans op infectie in de injectiewond. Het is ook niet geschikt in jongere levensfase van de vis door een onderontwikkeld immuunsysteem dat geen tot zwakke immuniteitsrespons geeft op het ingebrachte antigen(en) (Terech-Majewska, 2016).
- Kans op werkkrachten die zichzelf injecteren. Wanneer dit gebeurt moet de werkkraft naar het ziekenhuis om het vaccin te laten verwijderen. Vervolgens zijn deze werkkraften niet in staat om te werken voor 2-3 dagen (Lillehaug, 2014).
- Grote kans op schade van de vis in de buikwand door een fout van de werkkraft. Hoge vissterfte tijdens het proces (Poppe & Koppang, 2014).

### 3.1.1.2. Automatische vaccinatie

Het is een volgende stap op automatisatie van injectie waarbij minder mankracht nodig is en het proces sneller doet verlopen. Met automatische injectie wordt beweerd 10,000 vissen per uur te kunnen vaccineren (Lillehaug, 2014; Plant & LaPatra, 2011). Een getrainde persoon voor handmatige injectie kan volgens Brudeseth et al. (2013) 3500 vissen per uur vaccineren.

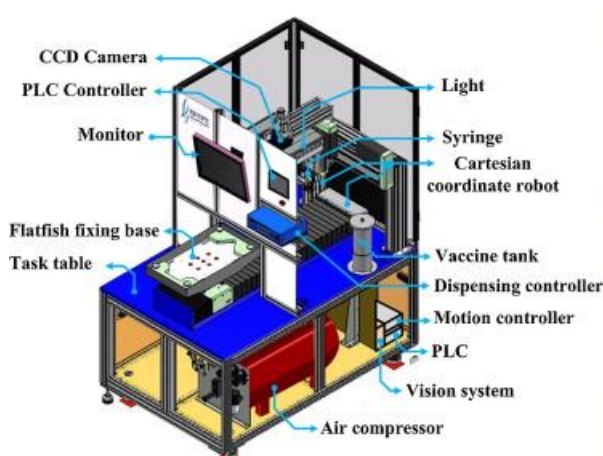
Automatische injectie wordt vooral gebruikt bij de platvis (*Pleuronectiformes*) kwekerijen. Met behulp van een camera en meetsysteem worden platvissen gemeten op lengte en hoogte. Bij andere vissoorten zoals bij zeebaars moet ook de breedte gemeten moet worden.

Het nadeel van automatische injectie is dat dit systeem alleen grotere vissen kan injecteren (>35gr) dan bij handmatige injectie, immersie en orale methodes. Het automatisch injecteren kan dan te ruw gaan of te veel stress geven waardoor vissterfte plaats vindt. Door een onderontwikkeld immuunsysteem zijn jongere vissen meer vatbaar voor visziektes dan bij vis van 35 gram of zwaarder. Afwachten om alleen automatisch te vaccineren wordt afgeraden (Evensen & Leong, 2013).

Twee verschillende machines zijn ontworpen en in twee studies van Lee et al. (2013(a); 2013(b)) getest en omschreven. De machines gebruiken 'vision units' die de maten bij platvissen meet en automatisch instellingen kan bepalen voor de injectie.

#### Vision-based automatic vaccine injection system

De eerste methode wordt een platvis (of zeebaars) onder een camera geplaatst met behulp van een fixatie plaat. De vis wordt vooraf verdoofd zodat onnodige bewegingen wordt voorkomen. De camera die met behulp van een 'charge coupled device'(CCD) de maat van de platvis afleest geeft die door aan de 'programmable logic controller'(PLC). De PLC kiest een aantal opgeslagen afmetingen uit die vervolgens doorgestuurd worden naar de vision units. Elke opgeslagen afmeting geeft een punt aan waar de injectie plaats gaat vinden. De vision unit bepaalt de meest corresponderende afmeting die doorgestuurd wordt aan de injectiemachine om de vis op de aangegeven punt te injecteren. Een ingewikkeld proces voor een simpele handeling (zie figuur 7). De platvis wordt daarna weer van de plaat gehaald en teruggeplaatst in de tank met gevaccineerde platvissen. Bij deze methode moeten werknemers handmatig alleen de vis verdoven, plaatsen en weghalen (Lee, et al., 2013(a)).



Figuur 7: Vision-based automatic vaccine injection system.

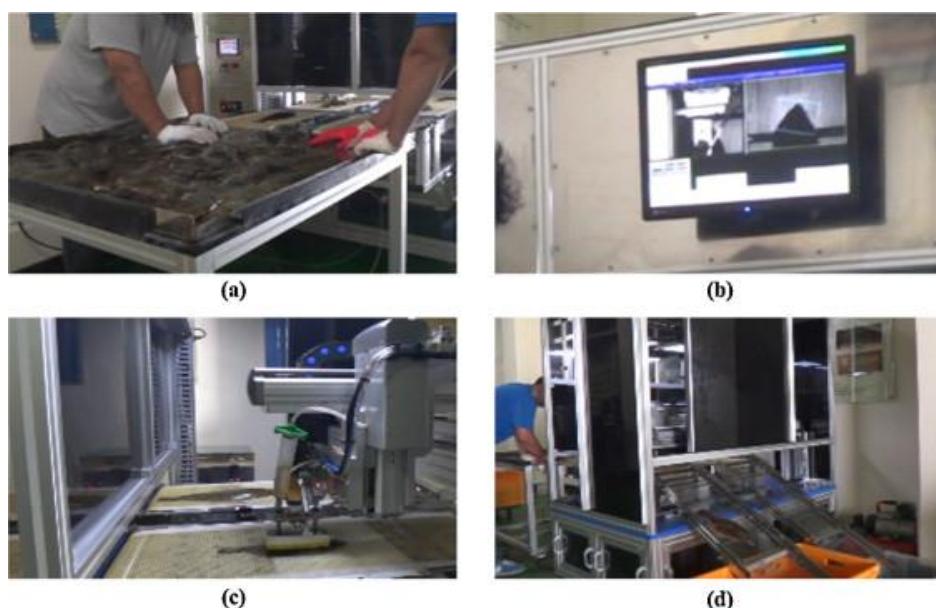
## AVIS

Het volgende systeem van Lee et al. bevat dezelfde meet programma's en apparatuur zoals is uitgelegd bij de 'vision-based automatic vaccine injection system'. De 'Automatic vaccine injection system' (AVIS) bevat vier delen waar de vis doorheen gaat: invoer, meting, injecteren en controle (zie figuur 8). Bij invoer worden de vissen op twee lopende banden geplaatst die de vissen meeneemt naar de meting. De meting, zoals eerder uitgelegd, wordt gedaan door de CCD, de PLC met de uiteindelijke keuze van de vision units om de gemeten vis op de juist plaats te injecteren. De vis wordt geïnjecteerd door een mechanische robot arm die de juiste hoeveelheid toedient. De robot plaatst de naald op de juiste diepte in de vis en met behulp van een koker die om de naald zit die de naald uit de vis haalt. De koker voorkomt dat de huid van de vis blijft hangen aan de naald. Het voorkomt ook veel schade aan de huid waardoor de mogelijke vissterfte met dit systeem een verbetering is vergeleken met de andere systemen.

Met een verdeelklep wordt het exacte hoeveelheid vaccin toegediend in de vis (meestal 0,1ml).

Het controle gedeelte van het systeem wordt over het gehele proces bijgehouden door de robot zelf. Doormiddel van een automatisch controle toestel met een PLC en monitor kan de AVIS het gehele proces bij houden. Elke onderdeel wordt door camera's gecontroleerd. Het systeem regelt hiermee het proces, het vervangen van de injectienaald, verandering met de plaatsing van de naald in de vis en het aanpassen van de hoeveelheid vaccin op het gewicht van de vis.

Ook bij dit systeem is de vis het gehele proces verdoofd om onnodige beweging te voorkomen. Op het einde wordt de vis door de lopende band uit het systeem gehaald om plaats te maken voor de volgende (Lee, Yang, Bae, & Kang, 2013(b)).



Figuur 8: Het proces van de AVIS (bron foto: (Lee, Yang, Bae, & Kang, 2013(b))).

Na de studies van Lee et al. die de systemen voor platvissen heeft ontwikkeld kwamen vervolgens in 2015 de ontwikkeling van een systeem voor andere vissoorten (zie figuur 9). Liang et al. (2015) kwamen met een methode om graskarpers (*Ctenopharyngodon idella*) te draaien en de juiste positie aan te nemen voor injectie. Doormiddel van een helling glijden de vissen in een vernauwde doorgang waardoor de vissen door de randen van de helling gefixeerd werd. Met behulp van de zwaartekracht werden de vissen door het mechaniek altijd op de juiste kant gefixeerd. Als stelling kwam de studie met: "Omdat het zwaartepunt van de vislarven dichtbij de buik ligt, en de rugvin gladder is dan de buik, is de wrijving op de rugvin minder dan die van de buik, waardoor de vissen altijd met de rugvin omhoog komt te staan. Dit doet vissen automatisch omdraaien met behulp van de zwaartekracht." (Liang, Li, Ruan, & Zhu, 2015).

Door deze mechaniek kunnen andere soorten naast platvissen ook door de AVIS worden gevaccineerd (Dongdong, Jianping, & Songming, 2018).



*Figuur 9: AVIS ontworpen om vissen zoals graskarpers juist te positioneren voor injectie (Bron foto: (Skala)).*

#### 3.1.1.2.1. Voordelen van automatische vaccinatie:

- Het vaccinatieproces is minder arbeidsintensief, minder handelingen zijn nodig om de vis te laten vaccineren waarbij minder werkrachten nodig zijn.
- Minder werkracht en materialen nodig, minder kosten.
- Met automatisch vaccineren zijn er minder handelingen nodig om de zeebaars te vaccineren en komt fouten met injectie bijna tot nooit voor. Dit resulteert in lagere stressgehaltenes en minder vissterfte (Cameron, 2007; Lee, et al., 2013(a)).
- Meer vissen gevaccineerd per uur dan vergeleken met een getrainde werkracht (Lillehaug, 2014; Brudeseth, et al., 2013).

#### 3.1.1.2.2. Nadelen van automatische vaccinatie:

- Het is pas mogelijk om vissen automatisch te laten vaccineren als de vissen zwaarder zijn dan 35 gram (Evensen & Leong, 2013).
- Hoge aanschaf kosten van het systeem en de machine (Lee, et al., 2013(a)).
- Bij de 'vision-based automatic vaccine injection system' kunnen alleen vissen van dezelfde grootte worden gevaccineerd. Dit zorgt met het scheiden van vissen voor een extra handeling waardoor het stressgehalte verhoogt. Wanneer de groep van hetzelfde gewicht gevaccineerd is, kan de andere groep vissen door het systeem. Bij een ander formaat vis moet het systeem handmatig worden gewijzigd. Dit verlengt het proces waarbij de AVIS die verschillende maten gelijktijdig kan vaccineren (Lee, et al., 2013(a); Lee, Yang, Bae, & Kang, 2013(b)).

### 3.1.2. Immersie

Vaccinatie doormiddel van immersie is de meest simpele vorm van vaccineren. Met deze methode worden de zeebaarzen ondergedompeld in een mengsel van (zee)water met vaccin. Het vaccin wordt dan doormiddel van de huid, kieuwwegen en de laterale lijn (zie figuur 10) opgenomen in de zeebaars. Het verschil met injectie is dat het vaccin bij injectie inwendig worden aangebracht. De antigenen van het aangebrachte vaccin wordt dan opgenomen in de nieren en de milt, organen die voor de vis van belang zijn voor de filtratie en het immuunsysteem (Kibenge, Godoy, Fast, Workenhe, & Kibenge, 2012). Bij immersie komen de antigenen op de huid en kieuwen van de vis. Dit zijn belangrijke doorgangen die ook gebruikt worden door pathogenen bij het binnendringen van de vis (Huisling, et al., 2003).

De laterale lijn loopt vanaf het oog van de vis tot het begin van de staartvin als een lijn over de schubben van de vis. "The lateral line is a sensory system that allows fishes to detect weak water motions and pressure gradients" - (Bleckmann & Zelick, 2009)

*Figuur 10: Uitleg wat een laterale lijn inhoudt van de vis.*

De methode kan op twee manieren worden uitgevoerd: directe immersie met een korte dip of een langere periode in een bad met hogere concentratie. Voor het verhogen van de vaccin opname in de vis is het mogelijk om extra methodes toe te passen. Hierbij worden materialen gebruikt tijdens of voor het dippen. Deze materialen/methodes kunnen zijn: een voorafgaande hyper osmotische dip of het gebruik van ultrasound, multipel punctie instrument of spray.

#### 3.1.2.1. Directe immersie (korte dip/langdurige bad)

Voor een korte dip wordt een bak klaar gezet waar de immersie in wordt aangebracht. Hierin wordt de verhouding van 1 deel vaccin op 9 of 10 delen water toegepast (Paolini, et al., 2005). Handmatig zullen de zeebaarzen doormiddel van een schepnet worden opgeschept en voor circa 30 seconden in de klaargezette bak worden gehouden. Vooraf wordt het water uit het net gelekt dat meegaat uit de tank om verdunning van het vaccin te voorkomen (Dos Santos, et al., 2001). Onder de bak wordt een weegschaal geplaatst om het gewicht te noteren en om de juiste aanbeveling aan te houden van de hoeveelheid zeebaars (zie figuur 11). De aanbeveling in een vaccin bad voor de hoeveelheid vis is 450gr/liter. Het maximum gewicht aan vis dat door één vaccin bad kan is 100 kg per liter (Brudeseth, et al., 2013). Na 30 seconden wordt het net wederom goed uitgelekt zodat er zo min mogelijk vaccin in de vis tank terechtkomt. Na het uitlekken worden de zeebaarzen in een tweede tank geplaatst waar uiteindelijk alle zeebaars vanuit de eerste tank heen gaat (Lillehaug, 2014).

Voor een langdurig bad blijft de zeebaars in dezelfde tank. Het waterniveau van de tank wordt verlaagd en inkomend water wordt stopgezet. Met deze methode zal vaccin worden aangebracht in een verhouding van 1:1000 (Brudeseth, et al., 2013). Er wordt zuurstof toegevoegd aan de tank en de zeebaars zullen één uur in dit bad gehouden worden (Paolini, et al., 2005). Na één uur wordt het waterniveau weer verhoogd en het vaccin verdund. Dezelfde hoeveelheid aan vis wordt gevaccineerd, vis ondergaat minder stress en er is minder arbeid nodig. Het grote nadeel van deze methode is de hoeveelheid vaccin dat nodig is om de verhouding te krijgen van 1:1000. Beide methodes vereisen het minimale van 2 werknemers die opscheppen, noteren en de juiste verhouding in de bak aanbrengt (Dhar & Manna, 2014).



*Figuur 11: Immersie bak met zeebaars die een dip ondergaan. Weegschaal meet de hoeveelheid in grammen af. De weegschaal geeft 450 gram zeebaars aan.*

#### 3.1.2.1.1. Voordelen van directe immersie

- Directe immersie kan worden ingezet bij zeebaars kleiner dan 5 gram. Voordeel hiermee is dat de vissen immuniteit krijgen in de fase waar vissen het meest kwetsbaar zijn voor visziektes, in de larvale en juveniele stadium (<5 gr) (Angelidis, 2006; Evensen & Leong, 2013).
- Bij vaccineren doormiddel van immersie zijn er minder handelingen nodig en komt de vis maar een korte tijd uit het water. Bij een langdurig bad komt de vis helemaal niet uit het water. Lage stressgehalte en bij goeie hantering van het proces minder vissterfte.
- Verminderde kosten door verminderde arbeid, en nodige werkkrachten (minimaal 2) (Dhar & Allnutt, 2011).
- *V. anguillarum* dringt de vis binnen doormiddel van de huid en kieuwen/bek. Doormiddel van immersie komt het vaccin direct op de huid en kieuwen en bied bescherming aan het exterieur van de vis (Dadar, et al., 2016; Bogwald & Dalmo, 2019).

#### 3.1.2.1.2. Nadelen van direct immersie

- Hoge hoeveelheid vaccin nodig voor beide vormen van vaccinaties (Lillehaug, 2014).
- Lagere immuniteit en kortere immuniteitsduur (circa 3-12 maanden). Niet lang genoeg om de hele productiecycclus te kunnen doorstaan op eenmalige vaccinatie door immersie (Dhar & Allnutt, 2011; Bogwald & Dalmo, 2019).
- Grotere vis vaccineren door immersie is mogelijk. Het kost alleen meer tijd en er is meer vaccin nodig waardoor kosten oplopen en de immuniteitsrespons van de vissen verminderen (Dadar, et al., 2016; Dhar & Allnutt, 2011).
- Het is mogelijk dat door te veel vis op te scheppen met een schepnet een deel van de vis sterft door verdrukking (Lillehaug, 2014).



### 3.1.2.2. Ultrasound, Multipel punctie instrument, Hyper osmotische dip, Spray

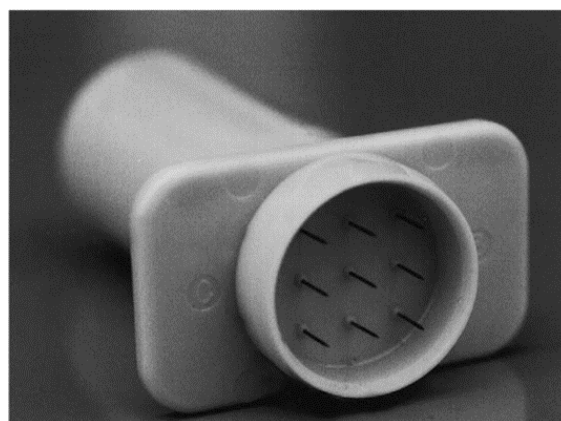
Het nadeel van vaccinatie met immersie is dat het niet dezelfde hoeveelheid resistentie en duur heeft zoals met injectie. Om de resistentie te vergroten zijn er methodes bedacht die de opname van het vaccin verhogen. 'Door de opname van vaccin te verbeteren zal de graad van immunisatie verhogen' (Dickerson, 2009).

#### Ultrasound

Met ultrasound worden er geluidsgolven tijdens de dip of bad uitgezonden met een frequentie van circa 20 kilohertz. Het effect van lage frequentie golven op de huid van de vis zodat de permeabele opname verhoogt. Het verandert de structuur van de huid die antigenen van de immersie makkelijker door de huid laat komen (Jiang, et al., 2016). Bij het toepassen van hogere frequenties kan het nadeel optreden dat de kieuwen beschadigen (Labarca, et al., 2015). In het rapport van Navot et al. (2011) wordt beweerd dat het de opname verhoogd en de geteste vissen meer antilichamen aanmaakt. Het zal een betere resistentie geven dan doormiddel van alleen immersie.

#### Multipel punctie instrument

Met het multipel punctie instrument zal, voordat de vissen worden gedipt in de immersie, de huid van de zeebaars worden doorboord. Als eerste worden de vissen verdoofd om vervolgens van beide zijanten met het instrument met 9 naalden (zie figuur 12) doorboord worden. Alleen het huidoppervlak wordt doorboort. Dit zal de huidopname van het vaccin vergroten tijdens de immersie en zal meer immuniteit geven dan met immersie zonder het multipel punctie instrument. Het artikel van Nakanishi et al (2002) ontwierp het product en beweerden dat het dezelfde resistentie zou bieden die vissen ook zouden krijgen doormiddel van injectie.



*Figuur 12: Het multiple punctie instrument (bron foto: (Nakanishi, Kiryu, & Ototake, 2002)).*

Na de studie bleek dat na gebruik van het instrument de vissterfte daalt naar 35% tot 40%. Waarbij de vissen van de controle groep die niet door dit instrument zijn behandeld voor immersie 80% vissterfte had (Nakanishi, Kiryu, & Ototake, 2002). Na 2002 zijn er geen studies gevonden die de beweringen testen.

#### Hyper osmotische dip

Deze methode wordt aangebracht door de zeebaars voor de immersie in een bad te dippen met een aangebrachte hyper osmotische vloeistof zoals ureum of zwavelchloride. De hyper osmotische dip zorgt ervoor dat de cellen die een bescherming laag zijn voor het epitheel van de vissenhuid van vorm veranderen. Deze vormverandering zorgt voor huidpassages waardoor het vaccin gemakkelijker kan worden opgenomen (Huisling, et al., 2003). Als de vis na het proces terug in de tank wordt geplaatst met zout of zoet water, herstellen de omgevormde cellen zich snel beweert Huisling et al. in hun studie. Over deze methode zijn er tegenstrijdigheden in rapporten waarbij studies melden dat het wel of niet de immuniteit verhoogd. In het rapport van Plan en LaPatra (2011) omschrijft de tegenstrijdig heden tussen twee rapporten van Tatner en Horne (1983) en Anderson et al. (1979) over het niet bereiken van een betere resistentie tegen de ingeënte visziekte. Maar dat de rapporten van Fender en Amend (1978) en Thune en Plumb (1984) wel een verhoging in resistentie zien met het gebruik van een hyper osmotische dip. Nieuwere studies die dit testen zijn er met deze studie niet gevonden.



## Spray

Ontworpen voor het vaccineren van *Vibrio* vaccins waarbij de vissen op de lopende band worden besproeid met vaccin. De methode kan alleen wanneer de vissen groter zijn dan 20 gram. Vele bronnen geven aan dat deze methode geen voordeel heeft. Zo geeft Plant en La Patra (2011) aan dat het meer stress oplevert omdat de vis uit het water worden gevist, op de lopende band komen en vervolgens besproeid worden. Ook in het artikelen van Rombout & Kiron (2014) en Gudding & Goodrich (2014) geven aan dat spray vaccinatie niet veel wordt gebruikt door commerciële aquaculturen. Het is daarbij ook niet makkelijk om alle vissen aan evenveel vaccin te laten blootstellen. Toch is in de studie van Austin & Austin (2016) verklaard dat met een (5-7 seconden) lage druk spray de vissen een mortaliteit hadden van 3% waar niet gevaccineerde vis een mortaliteit had van 80%.

### 3.1.2.2.1. Voordelen van de extra handeling bij directe immersie

- De extra handelingen verhogen de opname van vaccin doormiddel van immersie.

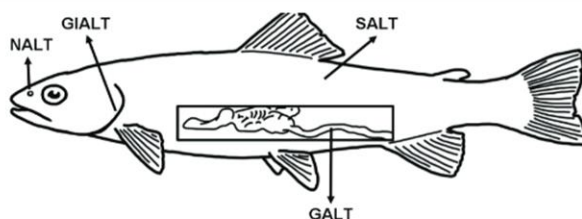
### 3.1.2.2.2. Nadelen van de extra handeling bij directe immersie

- Veel tegenspraak in of de extra handelingen wel of niet werken (Plant & LaPatra, 2011).
- De extra handeling die nodig is vóór de immersie dip/bad maakt het minder praktisch en doet het stressgehalte bij de zeebaars verhogen (Adams, 2019).
- Alle extra manieren om opnames te verhogen worden nauwelijks tot niet in de commerciële aquaculturen gebruikt en vele studies over deze extra handelingen zijn verouderd en niet actueel (Lillehaug, 2014; Munang'andu, Mutoloki, & Evensen, 2015(a); Jiang, et al., 2016).

### 3.1.3. Oraal

Waarbij immersie en injectie de vaccinatie methodes zijn die de meeste resistentie bieden voor vissen, zou oraal vaccins toedienen het beste alternatief zijn. Het principe is al aanwezig en wordt dagelijks uitgevoerd, kweekvis voeren. Door vaccin te mengen met het visvoer zijn geen extra handelingen nodig om immuniteit te realiseren. De vissen hoeven niet uit het water worden gehaald of gehanteerd. Het grote nadeel met orale vaccinatie is de onzekerheid dat iedere vis een evenveel aantal vaccin binnen heeft gekregen (Plant & LaPatra, 2011).

Vissen hebben, voor de opname van bacteriën in het spijsverteringskanaal, een darm geassocieerd lymfoïde weefsel (gut-associated lymphoid tissue, GALT). De GALT (zie figuur 13) is verbonden aan het spijsverteringskanaal (darmen) waar het de immuun cellen aanmaakt (Rombout, Abelli, Picchietti, Scapigliati, & Kiron, 2011). Vissen missen zoals bij zoogdieren een lymfestelstel. Hiermee is de voornaamste opname van antigenen via het spijsverteringskanaal. Toch, met de voornaamste opname via de GALT, geeft orale vaccins een lage immuniteit en een korte immuniteitsduur. Om immuniteit te behouden en de immuniteitsduur te verlengen is het belangrijk dat orale vaccins herhaaldelijk worden gevoerd aan vis in de juiste verhouding en hoeveelheid.



Figuur 13: Weergave van de 4 verschillende lymfoïde weefsels van een vis. GALT: Gut-associated lymphoid tissue; SALT: skin-associated lymphoid tissue; GIALT: gill-associated lymphoid tissue; NALT: nasopharynx-associated lymphoid tissue (Bron foto: (Sallinas, 2015)).

De uitdaging voor de productie van orale vaccins is het bereiken van de GALT. Voordat de antigenen worden opgenomen door de darmen moeten de antigenen door de zure omstandigheden van de maag. Om resulterende effecten te geven voor de vis moet het vaccin, gebonden aan het visvoer, de omstandigheden kunnen doorstaan zonder afgebroken te worden door de maag (Munang'andu, Mutoloki, & Evensen, 2015(a)).

In een artikel van Mutoloki, Munang'andu & Evensen (2015(b)) werd verteld dat in 2014 van de 17 commerciële vaccins, 2 soorten vaccins oraal werden toegediend. Momenteel is het aantal gestegen naar 24 commerciële vaccins en zijn er 5 verschillende orale vaccinatie methodes (Adams, 2019). Ontwikkeling van orale vaccinatie gaat traag met nog te weinig kennis over het immuunsysteem van vissen en het beter overbrengen van het antigen naar de GALT. De vijf methodes die gebruikt worden om vaccin door het spijsverteringskanaal te krijgen naar de GALT is doormiddel van microalgen, Plantextract, bio-inkapseling, bio films en Nano- en micropartikels.

#### 3.1.3.1. Orale methodes

##### Microalgen

Natuurlijke producten die makkelijk en goedkoop te verkrijgen en makkelijk genetische manipuleerbaar zijn. Microalgen, vaak de algensoort *Chlamydomonas reinhardtii*, zijn eencellige algen. Het is een belangrijk voedselproduct gebruikt vanaf het begin van de levensfase bij zoet- en ook zoutwater vislarven. De algen worden genetische gemanipuleerd om proteïne of antigenen mee te dragen en de groei en bescherming van vislarven te bevorderen (Siriponadulsil, Dabrowski, & Sayre, 2007). Microalgen zijn goeie dragers voor vaccin die de ph doorstaan van de maag (Dadar, et al., 2016).

## Plantextract

Vermeld door Plant & LaPatra (2011) is het mogelijk om planten te modificeren en te geven als visvoer. De gemodificeerde planten bevatten eiwitten die volgens het artikel immuunrespons geven. Zo zouden specifieke planten extracten gebruikt worden voor in voer die als vaccin dienen. Nog vrij weinig resultaat is gebleken in onderzoeken. In het artikel van Olsen et al. (Olsen, Ringo, Jensen, Romero, & Lauzon, 2014) zijn meerder artikelen omschreven over het effect van verschillende planten extracten op vissoorten. Zo verteld de studie over groene thee extracten, gebruikt om het antioxidanten systeem van regenboogforellen te verhogen. Maar ook over *Achyranthes aspera* (plantensoort) van de familie *Amaranthaceae* die vislarven betere bescherming zou bieden tegen weefsel schade en oxidatie stress (tekort aan antioxidanten). Als een van de studies waar Olsen et al. die meer in aanmerking komt met deze studie vertelt over het gebruik van gember (*Zingiber officinale Roscoe*) op Aziatische zeebaars tegen *Vibrio. Harveyi*. Gember verhoogde de groei, verbetert het bloed gehalte en gaf een non-specifieke immuniteit (zie figuur 14) voor de vis tegen *V. harveyi* (Olsen, Ringo, Jensen, Romero, & Lauzon, 2014).

Het gebruik van plantextracten in de aquacultuur wereld is een onderwerp nog in ontwikkeling waarvan nog veel informatie ontbreekt. Voor gebruik zijn plantenextract nog te duur, geven nog geen gewenste immuniteit en zijn er variërende effecten tussen de verschillende kweekvissoorten voor hetzelfde plantenextract (Ringo & Song, 2015; Ringo, et al., 2016). Wel is het voordeel in productie dat het kweken van planten snel en in grote hoeveelheden (Clarke, Waheed, Lössl, Martinussen, & Daniell, 2013).

“The non-specific defence mechanisms, which include phagocytosis and the production of oxidative radicals, are quickly activated by the immunostimulants and are rapidly prepared to protect the fish against pathogens” - (Siwicki, Anderson, & Rumsey, 1994)

Figuur 14: Betekenis van non-specifieke immuniteit.

## Bio-inkapseling

De methode van het bio-inkapseling is waar levend voer wordt gebruikt om als vaccin op orale manier te worden toegediend. Filtervoeders zoals garnalen en kreeftjes (*Artemiidae sp.*) worden gevoerd aan pootvis in de eerste levensfasen van de kweekvissen. Met bio-inkapseling worden filtervoeders opgeslagen in een tank met zeewater samen met een vaccin suspensie (immersie maar voor filtervoeder) (Chen, et al., 2011). Filtervoeders zijn non-selectief en nemen de antigenen van het vaccin op. Als gevolg worden filtervoeders een drager van de antigenen (bio-microcapsules) die vervolgens worden gevoerd aan de pootvissen (Lin, Lin, Chen, & Yang, 2007). Filtervoeders is alleen rendabel als oraal vaccin wordt gegeven aan pootvissen en niet bij grote vissen (Dhar & Allnutt, 2011).

## Bio films

Met het gebruik van bio films (zie figuur 15) worden antigenen vermengd met glycocalyx. Het glycocalyx van een bio film is een polymeer die bacteriën omkapseld en de antigenen beschermen tegen het maagzuur (Rombout & Kiron, 2014). Door de plakwerking van bio film die bacteriën bij elkaar houden om een kolonie te vormen is het ook makkelijk te vermengen met het visvoer. Het is een goedkoop middel en makkelijk te produceren (Pandy, Bharti, & Kumar, 2014).

“A biofilm is an assemblage of microbial cells which is irreversibly associated with a surface and enclosed in a matrix of primarily polysaccharide material” (Pandy, Bharti, & Kumar, 2014).

Figuur 15: Betekenis van een biofilm.

## Nano- en micropartikels

Deze methode biedt de mogelijkheid om antigenen te combineren met Nano- en micropartikels. De antigenen worden op deze wijze beschermt tegen de zure omstandigheden van de maag. In het artikel van Kibenge et al. (2012) is het gebruik van Nano- en micropartikels met immunologie een zekere verbetering in de orale vaccinatie methode. 'Immunobioengineering in de context van aquaculturen' zoals het artikel van Kibenge verwijst naar een artikel van Nielsen et al. (2011).

De partikels (of 'deeltjes') kunnen natuurlijk of synthetisch zijn. Voorbeelden van partikels die veel gebruikt worden zijn chitosan, poly lactide co-glycolide en alginaat. Chitosan is een polysacharide gemaakt in crustaceeën en wordt veel gebruikt in de medicatie wegens het voordeel dat chitosan 'mucoadhesive' is (zie figuur 16). Poly lactide co glycolide (PLG) is een Hydrofobe polyester. PLG's zijn niet giftig en zijn biologisch afbreekbaar. Het is een goedkope en makkelijk te produceren product. PLG's worden steeds meer gebruikt voor in orale vaccinatie (Tian, et al., 2008). Alginaat is een polysacharide uit bruin alg of zeewier die veel wordt gebruikt om verbindingen te leggen tussen componenten in medicatie (Plant & LaPatra, 2011).

"The term mucoadhesion is defined as the state in which a biological surface covered by a mucus layer and a synthetic surface are held together for an extended period of time to form bonds by means of interfacial forces" (Sandri, et al., 2012).

*Figuur 16: Betekenis van mucoadhesive - slijmvlies hechtend.*

### **3.1.3.1.1. Voordelen van orale vaccinatie**

- Met het oraal vaccineren ondergaat de kweekvis geen stress, schade of letsel doordat hantering of roering in de zeekooien tijdens het vaccinatie proces niet nodig is (Dhar & Manna, 2014).
- De toediening van het voer is gemakkelijk en vereist niet meer mankracht voor het voeren. Minder mankracht, een goedkope methode in arbeidskosten (Lillehaug, 2014; Rombout & Kiron, 2014).
- De middelen zijn gemakkelijk en goedkoop te produceren (plantextract niet meegerekend) (Dhar & Manna, 2014).
- Orale vaccinatie kan vanaf het begin tot het einde in de levensfase van de vis gelijk toegediend worden (Kibenge, Godoy, Fast, Workenhe, & Kibenge, 2012).

### **3.1.3.1.2. Nadelen van orale vaccinatie**

- Zelfs bij het elke dag voeren van het vaccin bereikt orale vaccinatie niet de gewenste immuniteit en bescherming tegen visziektes (Grisez & Tan, 2005; Plant & LaPatra, 2011; Lillehaug, 2014).
- Orale vaccinatie is een niet efficiënte methode. Het is niet duidelijk of alle kweekvissen de nodige hoeveelheid aan voer heeft binnen gekregen om tot immuniteit te komen (Plant & LaPatra, 2011; Kibenge, Godoy, Fast, Workenhe, & Kibenge, 2012).
- Orale vaccinatie heeft een trage vooruitgang in de ontwikkeling van nieuwe en verbeterde producten die immuniteit kunnen realiseren bij de vis. De methode loopt in ontwikkeling tegenover injectie en immersie achter. Het weerhoudt commerciële aquaculturen om orale vaccinatie volledig toe te passen (Embregts & Forlenza, 2016; Ahmed, et al., 2019).
- Productie en ontwikkeling is bepalend door het spijsverteringskanaal. Het antigen moet de zure omstandigheden overleven en de GALT bereiken om immuniteit te realiseren in de vis (Rombout, Abelli, Picchiatti, Scapigliati, & Kiron, 2011).

### 3.2. Vergelijkingstabel

| Methodes\factoren   | Nodige mankracht                                                                                                                                                                              | Nodige materiaal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Effectiviteit toedieningsmethode vaccin                                                                                                                                                      | Gemiddelde vissterfte na vaccinatie                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Handmatige injectie | Minimaal 1 aanwezige projectleider om het team te leiden en om anesthetica aan te brengen voor verdoving van de vis. Minimaal 4 mensen voor het injecteren van de zeebaars (Lillehaug, 2014). | Voor het handmatig injecteren van zeebaars is veel materiaal nodig en maakt het een dure toedieningsmethode (Colquhoun & Lillehaug, 2014; Lillehaug, 2014): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Injectiepistolen</li> <li>- Injectienaalden</li> <li>- Vaccin</li> <li>- Kledij voor de werkkrachten</li> <li>- Drijvende werkplaats om bij de zeekooien te kunnen werken</li> <li>- Werktafels met stromend water</li> <li>- Voor stromend water elektriciteit nodig, aggregaat. Aggregaat heeft benzine/diesel nodig.</li> <li>- Boten nodig om werkkrachten te vervoeren en om de werkplaats te verplaatsen.</li> </ul> | Immuniteitsduur is langer dan 1 jaar. De methode is multi-viralent waarbij 1 tot 5 verschillende soorten antigenen van visziekten kunnen worden vermengd in één vaccin (Grisez & Tan, 2005). | Vissterfte na het proces is 1.4% van de gevaccineerde zeebaars door vibriosis (Austin & Austin, 2016). De vissterfte tijdens het proces liggen hoger door fout handelen, injectie plaatsing gevolgd door infectie, verouderd materiaal en te veel of te weinig anesthetica (Poppe & Koppang, 2014). |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Machinale injectie | Voor het gebruik van de machines, het verdoven en aanbrengen met weghalen van zeebaars zijn er minimaal 2 personen nodig. Daarbij moet rekening worden gehouden met een externe monteur die klaar staat voor een defecte machine (Lillehaug, 2014). | De hoge aankoop prijs en onderhoud van de machine maakt de methode duur. Als materiaalkosten naast de aanschaf zijn het de onderhoudskosten met de materialen die moeten worden vervangen of aangevuld (Lillehaug, 2014; Dadar, et al., 2016): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Machine</li> <li>- Injectienaalden</li> <li>- Vaccin flessen</li> <li>- Onderhoudskosten</li> </ul> | (zie Handmatige injectie)                                                                                                          | Vissterfte na het proces is 1.4% vissterfte door vibriosis (Austin & Austin, 2016). Door machinale vaccinatie is vissterfte door fouten met injecteren minimaal en niet in cijfers terug te vinden (Dadar, et al., 2016). |
| Korte dip immersie | Minimaal 2 werknemers zijn er nodig voor korte dip immersie. Één nodig voor het noteren en wegen, de ander voor het opscheppen van de zeebaars (Dhar & Manna, 2014).                                                                                | Voor materiaalkosten is de korte dip een goedkope methode. Niet veel materiaal is nodig op de aankoop van vaccin na. Veel vaccin gaat verloren en wordt niet opgenomen door de vissen (Brudeseth, et al., 2013). <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 bakken voor immersie</li> <li>- Schepnet</li> <li>- Vaccin op water basis</li> <li>- Weegschaal</li> </ul>                      | Immunitetsduur tot 12 maanden. Het immuunrespons bij zeebaars neemt af na 8 maanden (Dhar & Allnutt, 2011; Bogwald & Dalmo, 2019). | Vissterfte voor directe immersie is 2.1% en is bij non gevaccineerde zeebaars door directe immersie 33% (Austin & Austin, 2016).                                                                                          |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                 |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lang bad immersie           | De gehele methode kan uitgevoerd en gecontroleerd worden door 2 personen (Dhar & Manna, 2014).                                                                                                                                                  | Voor de lange bad immersie zijn de kosten verbonden met de hoeveelheid aan vaccin dat nodig is voor een proces. Bij het vaccineren van grotere vis is een grotere hoeveelheid aan vaccin nodig (Brudeseth, et al., 2013). | (zie korte dip immersie)                                                                                                                                                                                           | Vissterfte van 60% na een lange bad immersie. Een laag immuunrespons met veel vissterfte (Colquhoun & Lillehaug, 2014).                         |
| Hyper osmotische bad        | 2 werknemers. De extra handeling voor deze methode vereist niet meer werknemers die nodig zijn voor de directe immersie methode (Lillehaug, 2014).                                                                                              | Kosten van korte dip immersie met daarbij de extra kosten voor de hyper osmotische vloeistof dat nodig is (Plant & LaPatra, 2011).                                                                                        | Hyper osmotische bad, multiple punctie instrument, ultrasound en spray zijn methodes die de opname van het vaccin verhogen. Het doet de immuniteitsduur niet verlengen. (zie korte dip immersie) (Lillehaug, 2014) | Vissterfte van 33% met gevaccineerde zeebaars, 62% met niet gevaccineerde zeebaars (Huisin, et al., 2003)                                       |
| Multiple punctie instrument | Minimaal 4 werknemers nodig voor de uitvoering met het multiple punctie instrument. 2 personen voor de dip of bad, minimaal 2 personen nodig om de vissen te doorboren met het multiple punctie instrument (Nakanishi, Kiryu, & Ototake, 2002). | Elke medewerker heeft een Multiple punctie instrument nodig om elke vis ermee te doorboren. Verdere kosten zijn hetzelfde als de immersie met korte dip (Nakanishi, Kiryu, & Ototake, 2002).                              |                                                                                                                                                                                                                    | Vissterfte percentage van 40% met 80% mortaliteit bij de niet gevaccineerde zeebaars (Nakanishi, Kiryu, & Ototake, 2002; Plant & LaPatra, 2011) |



|            |                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ultrasound | 2 werknemers nodig voor de methode. Niet meer dan bij directe immersie (Navot, Sinyakov, & Avtalion, 2011). | Ultrasounds wordt toegepast bij een immersie met lange dip. De aanschafkosten zijn duurder door de ultrasound instrument dat nodig is voor de methode (Bart, et al., 2001; Zhou, Wang, Zhang, & Su, 2002).                                                                         |                                                                                                                                  | Vissterfte na ultrasound direct immersie is 50% in de studies van Plant et al. En Zhou, wang, Zhang & Su (2011; 2002).                                                                                                                                                                                                        |
| Spray      | Minimaal 2 werknemers nodig voor de uitvoering met spray vaccinatie (Plant & LaPatra, 2011).                | Materiaalkosten als sproeisputten en een lopende band. De kosten liggen vooral bij de hoeveelheid vaccin. Veel vaccin gaat verloren in de neveldamp of wordt niet opgenomen door de huid van de zeebaars (Rombout & Kiron, 2014).                                                  |                                                                                                                                  | Een vissterfte van 3% na het toedienen van vaccin door spray als directe immersie. (Austin B. , 2012)                                                                                                                                                                                                                         |
| Oraal      | Niet meer personen nodig. Standaard werkrachten die de vissen voeren (Plant & LaPatra, 2011).               | Aanschafkosten van het voer zullen niet hoger komen te liggen bij orale vaccinatie. Dit maakt orale vaccinatie de goedkoopste methode van de 3 basismethoden (Chen, et al., 2011; Pandey, Bharti, & Kumar, 2014; Plant & LaPatra, 2011; Siriponadulsil, Dabrowski, & Sayre, 2007). | Immunitetsduur van 120 dagen bij vissen met een gewicht van 4 gram. 60 dagen bij een gewicht van 2 gram (Plant & LaPatra, 2011). | Mortaliteit zakt van 66% naar 12.5% bij blootstelling van <i>V. anguillarum</i> en 54.1% naar 25% met blootstelling onder een verhoogd stressgehalte (Torrecillas, et al., 2012).<br><br>Bij de studie van Austin & Austin (2016) lag de vissterfte voor gevaccineerde zeebaars op 11.3% en niet gevaccineerde zeebaars 40.9% |

## 4. Discussie

In het volgende hoofdstuk worden de verschillen besproken van de methodes aan de hand van de deelvragen. Het doel om met de vergelijking van de methodes een conclusie te geven in wat sinds heden doormiddel van de bevonden resultaten de beste methode(s) is of zijn. Deze methode(s), gekozen doormiddel van de deelvragen die zijn gesteld in de inleiding.

In de vergelijkingstabel is deelvraag 2 'wat is er per methode nodig aan mankracht, arbeid en materialen (kosten)?' gesplitst in twee rijen waar de 'nodige mankracht' en het 'nodige materiaal' wordt omschreven. Het proces (arbeid) van iedere methode is in het theoretische kader voorafgaand van de vergelijkingstabel omschreven. Deelvragen 'hoe lang blijft het vaccin effectief (immuniteitsduur) bij zeebaars per methode en 'hoe hoog is de gemiddelde vissterfte (mortaliteit) tijdens en (kort) na het toedienen van het vaccin per methode? Zijn in de vergelijkingstabel niet gesplitst en omschreven.

### 4.1. Arbeid en mankracht

Voor de handmatige injectie bestaat het werkteam uit een teamleider en werkkrachten die samen getraind zijn in het injecteren van vissen. In de vergelijkingstabel (zie hoofdstuk 3.2.) wordt er gesproken over een minimum van 4 werkkrachten. Dit minimum is niet voldoende voor grotere aquaculturen om binnen een jaar of seizoen alle vissen te vaccineren (denk bij een grote aquacultuur aan meerdere kwekerijen, 20 zeekeoien per locatie met gemiddeld 500.000 zeebaars per zeekeoi (Menezes, Hishamunda, Lovshin, & Martone, 2017)). Handmatige injectie is een langdurig proces en met de noodzakelijke werkkracht zijn daar hoge loonkosten aan verbonden. Het loonkosten probleem is aangepakt door de opkomst van mechanica waar automatische injectie mogelijk werd gemaakt. Het proces vraagt (per machine) minimaal 2 werknemers die de zeebaars verdoven, aanbrengen en weghalen op de fixatieplaat. Het vraagt minder mankracht die getraind moeten worden voor het hanteren van de machine. Indien nodig bij een defecte machine kan er een monteur worden ingeschakeld.

Beide directe immersie methodes (lange en korte dip) zijn methodes die minimaal 2 werknemers nodig heeft voor het opzetten, aanbrengen en het dippen van zeebaars in een vaccin mengsel. Bij de korte dip wordt het gewicht genoteerd van de zeebaars die zijn opgeschept met een schepnet (zie figuur 11). De handelingen van hyper osmotische dip, ultrasound en spray vragen niet extra werkkrachten om uitgevoerd te worden. Voor het multiple punctie instrument moet elke zeebaars individueel worden behandeld om hiervoor de opname te verhogen. De nodige mankracht kan hiervoor hetzelfde zijn als bij handmatige injectie, hoe meer getrainde werknemers er zijn hoe sneller het proces uitgevoerd kan worden.

Orale vaccinatie heeft in theorie geen extra mankracht nodig. Het toedienen van "vaccin vermengd voer" is al een bestaande routinematige handeling bij elke aquacultuur. Hiervoor zijn geen extra werkkrachten nodig en hoeven de bestaande werknemers (voerders) geen extra training voor het proces.

### 4.2. Materiaal

In de resultaten wordt er niet gesproken over de standaard materialen die aquaculturen gebruiken zoals tanks, filtersystemen en de waterkwaliteit. Er wordt alleen een vergelijking gegeven over de materialen die nodig zijn voor de toedieningsmethodes. Tijdens het zoeken naar kosten zijn geen exacte prijzen weergegeven maar een omschrijving waarom het duur of goedkoop was. Voor een exact kostenplaatje was er te weinig tijd en voor vervolg zou die als vervolgstudie kunnen worden aanbevolen.

Zowel in arbeid als in materiaalkosten is handmatige injectie de duurste. Grote kostenposten zoals het vaccin, anesthetica, benzine/diesel en injectiepistolen zijn dure terugkerende kosten die moeten worden aangevuld of vervangen. De werkplaats en werktafels zijn vaak gemaakt door aquaculturen zelf. Voor de veiligheid van de werknemers is het van belang de juiste kledij aan te schaffen die warmte en bescherming biedt. Het proces wordt op de open zee uitgevoerd waarbij temperatuur kan verschillen en door golfdeining mensen sneller zichzelf injecteren met vaccin.

Bij automatische injectie worden de materiaalkosten voor werknemers verlaagd. De injectienaalden, vaccin en anesthetica is een blijvende factor die ook bij deze methode worden aangevuld of vervangen. De grootste kostenpost is de machine zelf waar prijzen rond de 40.000 – 50.000 euro liggen voor alleen het injectiesysteem (Skala). Hierbij kan het gehele proces automatisch worden verricht waarbij niet meer dan 2 werknemers nodig zijn.

Directe immersie heeft als kosten voornamelijk de hoeveelheid vaccin dat nodig is om zeebaars resistentie te geven tegen vibriosis. Andere materialen die nodig zijn voor de immersie zijn meestal al aanwezig in een aquacultuur zoals een weegschaal, bakken en schepnetten. De lange dip immersie heeft naast vaccin geen materiaal nodig maar is wel duurder dan korte immersie door de hoeveelheid noodzakelijke vaccin. Bij het vaccineren door immersie van grotere vissen worden beide methodes duurder en geeft een vermindering in immuniteitsduur en respons waardoor injectie een goedkoper alternatief wordt (Dhar & Manna, 2014).

Hyper osmotische dip, multiple punctie instrument, spray en ultrasound zijn een toevoeging aan directe immersie die extra materiaalkosten geven. Hyper osmotische dip heeft een terugkerende kostenpost waarbij de hyper osmotische substantie moet worden vervangen na elk proces. Het multiple punctie instrument heeft hetzelfde principe als de injectienaalden voor injectie. Bij het bot worden van de naalden moeten deze worden vervangen. Het aantal instrumenten dat nodig is voor het proces is afhankelijk van het aantal werkrachten dat ingezet wordt tijdens het vaccinatieproces. De spraymethode is een immersie methode omdat de spray wordt aangebracht op de huid. Voor sprayvaccinatie zijn sproeiers nodig voor het aanbrengen van het vaccin en maakt de methode duur in aanschafkosten. De duurste van de vier methodes (multiple punctie instrument, hyper osmotische dip, spray en ultrasound) is ultrasound door de aanschafkosten van het ultrasound instrument dat nodig is.

Oraal is ook in materiaal het goedkoopste bevonden. Het mengen van vaccin met visvoer kan op meerdere manieren worden verricht en is geen duur proces. Het kan als normaal visvoer worden aangeschaft en op dezelfde manier worden opgeslagen als niet vermengd visvoer.

#### 4.3. Effectiviteit toedieningsmethode vaccin

Hoewel de handmatige en automatische injectie als duurste methode is bevonden, geeft de methode de langste immuniteitsduur en immuniteitsrespons aan zeebaars. Handmatige injectie en automatische injectie behaalt een immuniteitsrespons langer dan 1 jaar. Via injectie is de mogelijkheid om 5 verschillende antigenen van visziektes te combineren in een vaccin. Dit geeft verlaging in kosten en maakt zeebaars met een vaccinatieproces resistent tegen meerdere visziektes.

Vaccinatie door directe immersie behaalt een immuniteitsduur tot 12 maanden, maar vertoont een afnemend immuunrespons bij zeebaars na 8 maanden.

Het voordeel van directe immersie is dat de methodes kan worden toegepast bij zeebaars lichter dan 5 gram. Bij handmatige injectie moeten zeebaars minimaal 20 gram zijn en bij automatische injectie zelfs 35 gram. Het geeft de zeebaars in de jongere levensfase de resistentie tot de zeebaars de minimum eisen behalen om mogelijk doormiddel van injectie te worden gerevaccineerd.

Het nadeel van de extra toevoegingen van directe immersie is dat de immuniteitsduur niet wordt verlengd. In studies van Lillough et al. en plant et al. (2014; 2011) wordt beschreven dat de methodes alleen nog zijn gebruikt op experimentele basis. Hyper osmotische dip, multiple punctie instrument, ultrasound en spray worden commercieel niet gebruikt. Voor deze studie zijn de methodes wel meegenomen in de resultaten om te zien of in de literatuur 'jongere' studies zou worden gevonden.

Tijdens de literatuurstudie zijn er geen studies gevonden jonger dan 2006 die omschrijven over de immuniteitsduur en respons van hyper osmotische dip, multiple punctie instrument, spray of ultrasound. Er zijn wel reviews bevonden jonger dan 2010 die de methodes omschrijven maar ook in die studies zijn geen referenties gebruikt jonger dan 2006. In de review van plant et al. is er bij de hyper osmotische dip veel tegenspraak van verschillende studies die in 1987 tot 1992 zijn geschreven. Voor in deze studie is hyper osmotische dip bevonden als een verouderde methode en zal niet worden meegenomen als aanbeveling.

Orale methode is de goedkoopste in arbeid en materiaal en geeft de minste stress aan zeebaars. Als toedieningsmethode geeft orale vaccinatie van alle methodes de kortste immuniteitsduur en een lage immuniteitsrespons. Waarbij injectie en immersie zekerheid geven dat iedere zeebaars dezelfde hoeveelheid vaccin heeft binnen gekregen is dat bij orale methodes onduidelijk. Tijdens het voeren zal niet alle vissen dezelfde hoeveelheid voer binnen krijgen dat nodig is om resistent te worden. Het hangt af van het hoeveelheid dat wordt gevoerd en het gewicht van de zeebaars. Voor vissen met een gewicht van 4 gram kan de immuniteitsduur 120 dagen zijn. Voor vissen met een gewicht van 2 gram is dit 60 dagen. De methode kan worden toegepast wanneer de zeebaars uit het ei komen om tijdens de larvale fase resistentie te geven tegen visziektes.

#### 4.4. Gemiddelde Vissterfte voor/na het proces

De literatuur die mortaliteit omschreven noteerden alles in percentages, er zijn nooit exacte aantallen gevonden tijdens het schrijven van de resultaten.

Met het zoeken naar resultaten zijn geen cijfers gevonden over de vissterfte tijdens en door het proces. Er zijn in deze studie alleen percentages genoteerd over vissterfte na het vaccinatieproces.

Vissterfte tijdens het proces van handmatige injectie ontstaat vooral door menselijke fouten. Dit kan door verdrukking, te diep geïnjecteerd, verkeerd- of niet op de juist locatie geïnjecteerd van de zeebaars. De vis sterft dan aan schade aan de buikwand gevolgd door infectie. Een getrainde werkracht kan fouten minimaliseren maar niet totaal voorkomen.

De gemiddelde vissterfte worden vergeleken in de hoeveelheid zeebaars dat na vaccinatiemethodes door vibriosis sterft. Hierbij heeft handmatige en automatische injectie maar 1,4% vissterfte door injectie. Vissterfte door fouten bij de automatische injectie is lager omdat het systeem op de exacte locatie injecteert en de juiste diepte.

Met directe immersie is de vissterfte 2.1% waarbij het verschil is dat de bestudeerde zeebaars die niet gevaccineerd waren een vissterfte hadden van 33%.

Vissterfte na een hyper osmotisch bad had in het artikel Huising et al. (2003) een vissterfte van 33% en 62% bij de niet gevaccineerde zeebaars.

Nakanashi et al. (2002) is de enige gevonden studie over het multiple punctie instrument die het ontwierpen, toepasten en omschreven. In de studie werd bevonden dat door het multiple punctie instrument een vissterfte gaf van 40% en dat de controle groep 80% vissterfte had.

Ultrasound gaf een vissterfte percentage van 50% en bij spray vaccinatie was er 3% vissterfte na de behandeling. Van de extra toevoegingen aan immersie lijkt spray als methode het beste te zijn. Voor deze studie worden de extra toevoegingen niet geadviseerd om te gebruiken. Het is een extra handeling en geeft de zeebaars een verhoging in het stressgehalte. Als verschil met alleen de lange of korte dip behandeling geven deze methodes geen verbetering in de immuniteitsduur of respons. Met de verouderde literatuur dat is gevonden is het gebruikt van alleen de directe immersie beter bevonden.

Bij orale vaccinatie zijn vele nieuwe studies gevonden die de ontwikkeling bijhouden van nieuwe manieren om antigenen door het spijsverteringskanaal te helpen. Zo zakt de vissterfte bij vissen na orale vaccinatie van 66% naar 12.5% met alleen blootstelling van vibriosis. Bij de studie van Torrecillas et al. (2012) werd een extra groep getest die met verhoogde stressgehalte na orale vaccinatie aan vibriosis werden blootgesteld. Hierbij zakte de vissterfte van 54,1% naar 25%. Het artikel concludeerde

dat stress mede verantwoordelijk is voor de vissterfte. Maar van alle methodes geeft orale vaccinatie het laagste stressgehalte. Later werd, in het artikel van Austin & Austin (2016), omschreven dat de vissterfte voor oraal gevaccineerde zeebaars 11.3% was en van de niet oraal gevaccineerde zeebaars 40,9%. Het behaalt de immuniteitsduur en -respons niet van vaccinatie door injectie maar is naast directe immersie een alternatief om in de larvale- en juveniele fase van de zeebaars resistentie te bieden, waar injectie later pas toegepast kan worden.

#### 4.5. Aanpak resultaten

Tijdens het zoeken van literatuur zijn er artikelen gebruikt waar methodes werden omschreven met andere vissoorten. In deze artikelen werd wel aangegeven dat de methodes ook gebruikt werden bij zeebaars aquaculturen. Voor visziektes zijn er artikelen gebruikt die over andere soorten visziektes schreven waarbij de methodes beter verwoord en omschreven werden dan bij enkele artikelen over vibriosis.

Voor de resultaten van de methode automatische injectie zijn de gebruikte literatuur gericht op de platvis en graskarper maar werd in de artikelen aangegeven ook gebruikt te kunnen worden voor ombervis (*Argyrosomus regius*), zeebaars en tilapia (Dongdong, Jianping, & Songming, 2018; Lee, et al., 2013(a); Lee, Yang, Bae, & Kang, 2013(b)). Het artikel van Cameron (2007) omschreef de verlaging van het stressgehalte met automatische injectie voor coho zalm (*Oncorhynchus kisutch*), dit zou, in het artikel, ook zo zijn voor andere vissoorten zoals zeebaars.

Voor het resultaat van ultrasounds is het artikel gebruikt van Bart et al (2001) die ultrasound toe heeft gepast bij regenboogforel. In dit artikel zijn de materialen meegenomen die werden gebruikt voor de studie. Het artikel van Jian et al. (2016) omschrijft wat het effect van ultrasounds doet met een graskarpers huidlaag, deze informatie is gebruikt voor uitleg over dit effect wat het kan doen bij een vis en is niet specifiek omschreven in de resultaten voor zeebaars. Het artikel van Labarca (2015) over het effect van hogere frequentie gebruik op regenboogforel is gebruikt om de conclusie dat het de kieuwen van de forellen beschadigt.

De studie van Lin, Lin, Chen & Yang (2007) is meegenomen om de uitleg wat bio-inkapseling inhoudt als product, niet gespecificeerd om de vis die er werd gebruikt. Het artikel van Siwicki, Anderson & Rumsey (1994) is een oud artikel maar is gebruikt wegens de uitleg over het non-specifieke verdedigingsmechanisme. Het artikel omschreef de regenboogforel en het effect van de non-specifieke immuniteit en bescherming tegen furunculose. Voor de studie is alleen de uitleg gebruikt over de term 'non-specifieke verdedigingsmechanisme'.

De reviews/artikelen en de studies van Dhar & Alnutt (2011) Dhar & Manna (2014) Lillehaug (2014) en Plant & LaPatra (2011) zijn in deze studie veel gebruikt. De studies hadden meerdere overeenkomende onderwerpen die op deze studie aansloten.

In de resultaten van orale methodes zijn de orale middelen in de vergelijkingstabel samen gezet in een kolom. De verschillende methodes hebben als doel om het antigen door het spijsverteringskanaal te leiden zonder beschadigd of verteerd te worden. Van de producten is bewezen dat het antigen zonder beschadigingen naar de GALT wordt gebracht. Tussen de producten is er geen verschil in arbeid, materiaal, immuniteitsduur, -respons of mortaliteit.

Met het zoeken naar artikelen over studies van orale vaccinaties zijn vele nieuwe artikelen gevonden. Van al deze nieuwe ontwikkelingen over orale vaccinaties is geen review gevonden die deze nieuwe methodes samenvat.

## 5. Conclusie

De studie is een literatuurstudie naar de verschillende toedieningsmethodes van vaccin bij de kweekvissoort zeebaars. Er is een uitleg gegeven hoe elk proces van elke methode toegepast wordt, wat er nodig is aan werkkraft en materiaal, wat het effect van de methode op de zeebaars is en wat de uiteindelijke vissterfte door de visziekte vibriosis is na het proces.

Voor het beantwoorden van de hoofdvraag *‘welke vaccinatiemethode(s) kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeid, materiaal, immuniteitsduur en vismortaliteit?’* zijn deelvragen opgesteld en geconcludeerd.

### 5.1. Conclusie deelvragen

Voor deelvraag één ‘Welke vaccinatiemethodes bestaan er om zeebaars te vaccineren tegen vibriosis?’ zijn alle methodieken opgesteld en omschreven in het theoretische kader. Daarin is te lezen over de drie basis methodes: injectie, immersie en oraal. Voor zeebaars is het mogelijk om handmatig of automatisch te injecteren. Voor immersie is het mogelijk doormiddel van een korte dip in een vaccin mengsel met (zee)water of door het mengsel aan te brengen in de vis tank en zeebaars te laten baden voor langere tijd (circa 1 uur).

Om de vaccin opname tijdens de immersie dip te verhogen van de zeebaars zijn er toevoegingen mogelijk die voorafgaand kan worden uitgevoerd. Zo kan de zeebaars eerst in een hyper osmotisch bad worden aangebracht of tijdens de dip/bad geluidsgolven uit te zenden om de structuur van de huid aan te passen. Door het multiple punctie instrument worden openingen aangebracht zodat het vaccin door de gaatjes kan worden opgenomen. Als laatste toevoeging wordt het immersie bad vervangen door de spray methode die het vaccin mengsel op de huid van de zeebaars sproeit.

Bij orale vaccinatie zijn de materialen waaraan de antigenen worden verbonden omschreven. Daarbij worden microalgen genetische gemanipuleerd om proteïne en antigenen te binden en aan visvoeding toegevoegd. Plantenextracten is nog een product in ontwikkeling en is nog niet zeker of het immuniteitsrespons werkt op zeebaars. De plantenextracten worden gebruikt om de antioxidanten te verhogen. Met bio-inkapseling worden levende filtervoeders gebruikt om de antigenen op te nemen en als levend vaccin toegediend te worden. Bio films is de methode om glycocalyx te gebruiken om antigenen te binden. Door de natuurlijke wijze hoe bacteriën een kolonie vormen is het mogelijk om antigenen te vermengen met het visvoer.

Het gebruik van Nano- en micropartikels geeft de mogelijkheid om antigenen door chitosan, poly lactide co-glycolide en alginaat te mengen met visvoer. De orale methodes zijn ontworpen om de antigenen bescherming te bieden tegen de zure omstandigheden van de maag om door de GALT te bereiken.

Per methode is vervolgens in een vergelijkingstabel (zie hoofdstuk 3.2.) de nodige mankracht en materialen omschreven voor deelvraag twee ‘wat is er per methode nodig aan mankracht, arbeid en materialen (kosten)?’. Tijdens de studie zijn er geen duidelijke kostenplaatjes gemaakt, maar door een beeld te geven over de nodige materialen en mankracht kan worden aangegeven welke methode duur is en waarom.

Handmatige injectie heeft aan mankracht de meeste nodig voor een langere periode waarbij veel materiaal aan te pas komt. Automatische injectie doet de kosten voor mankracht verlagen maar heeft machines nodig waarvoor er hoge aanschafkosten gemaakt worden. Bij immersie wordt er niet meer dan 2 werkkraften gerekend per proces. Alleen bij het multiple punctie instrument zijn meer werkkraften nodig voor het gebruik van het instrument op de zeebaars. Als goedkoopste methode is de orale vaccinatie waarbij geen extra werkkraften ingezet hoeven te worden voor het proces en is visvoer al een standaard aanwezig product bij een aquacultuur. De prijs zal dan verschillen in het type visvoer en orale vaccin product dat wordt toegepast.



Vervolgens wordt in de vergelijkingstabel de effectiviteit en de vissterfte omschreven per methode. Voor de deelvragen 'hoe lang blijft het vaccin effectief (immuniteitsduur) bij de zeebaars per methode?' en 'hoe hoog is de gemiddelde vissterfte (mortaliteit) tijdens en (kort)na het toedienen van het vaccin per methode?'. Injectie geeft de langste immuniteitsduur van langer dan 1 jaar, langer dan nodig is tot de oogst van de vis. Immersie behaalt 12 maanden immuniteit maar neemt af na 8 maanden waardoor de immuniteitsrespons verlaagt. Oraal beschermt de zeebaars bij een gewicht van 4 gram voor 120 dagen en 2 gram voor 60 dagen.

Deze studie is bevonden dat injectie het beste is voor de immuniteitsduur en -respons. De vissterfte met Injectie had de laagste vissterfte door vibriosis van 1,4%, directe immersie 2.1% en oraal 11.3%-12.5%.

## 5.2. Conclusie hoofdvraag + aanbeveling

Als antwoord op de hoofdvraag *'welke vaccinatiemethode(s) kunnen aquaculturen het beste gebruiken wanneer er rekening gehouden wordt met arbeid, materiaal, immuniteitsduur en vismortaliteit?'* kunnen aquaculturen het beste twee methodes gebruiken. Een methode voor de larvale-juvenile stadium van de zeebaars (>20 gram) en als opvolger een van de twee injectie methodes. Injectie is de beste methode gebaseerd op immuniteitsduur en vismortaliteit.

Bij zeebaars die zwaarder zijn dan 20 gram behaalt immersie en oraal niet dezelfde immuniteitsduur en respons als bij injectie. Oraal is de beste methode op basis van kosten voor materiaal en arbeid en geeft een lager stressgehalte dan bij injectie en immersie. Immersie en oraal zijn beter wanneer de zeebaars in de larvale stadia is, het is dan niet mogelijk om de vis te injecteren. Daarom is de aanbeveling om vanaf geboorte de vissen of door orale vaccinatie of door één immersie proces (lange of korte dip zonder toevoegingen) immuniteit te geven tegen vibriosis. Na oraal of immersie zou, wanneer de zeebaars boven het gewicht van 20-35 gram is gekomen, gekozen kunnen worden om handmatige of automatische injectie toe te passen. Zo kunnen de zeebaars tot de oogst immuniteit blijven behouden tegen vibriosis. De keuze aan automatisch of handmatige injectie ligt aan de beschikking om direct hoge aanschafkosten te maken met automatische injectie of geleidelijke kosten in langere periodes met handmatige injectie.

Als vervolgstudies wordt geadviseerd voor een literatuurstudie naar de algehele kosten, mortaliteit tijdens het vaccinatieproces en de orale methodes. Tijdens de literatuurstudie zijn geen exacte kosten gevonden hoeveel elke toedieningsmethode gemiddeld kost per proces. Een studie hierover zou een helder beeld geven aan aquaculturen die duidelijk wil weten welke methode het goedkoopste zal zijn. Met de gevonden literatuur over mortaliteit spreken studies altijd over de vissterfte/mortaliteit na het vaccinatieproces. Geen studies zijn tijdens het zoeken gevonden die schrijven over de mogelijke gemiddelde vissterfte tijdens het vaccinatieproces. Met het resultaat van het geadviseerde vervolg studie zou een beter antwoord kunnen worden gegeven over de deelvraag 'Hoe hoog is de gemiddelde vissterfte (mortaliteit) tijdens en (kort)na het toedienen van het vaccin per methode?'. Het zou een ander antwoord bij de handmatige injectie geven waar veel vissterfte kan voorkomen door menselijke fouten tijdens het proces.

Voor de orale methodes zijn veel nieuwe artikelen gevonden waar nog geen overzichtelijke review is gegeven. Het zou een samenvattend antwoord geven hoe de ontwikkeling van de orale vaccinatie is sinds 2020. De vervolg studie zou voor aquaculturen een bron kunnen zijn die orale vaccinatie willen toepassen maar door het succes van injectie niet zeker zijn.



## 6. Bronnenlijst

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish immunology*, 90, 210-214. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464819303043>
- Adelmann, M., Köllner, B., Bergmann, S. M., Fischer, U., Lange, B., Weitschies, W., . . . Fichtner, D. (2008). Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine*, 6(26), 837-844. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X07013722>
- Afonso, A., Gomes, S., Silva, J. d., Marques, F., & Henrique, M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 1(19), 1-16. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464804001238>
- Ahmed, F., Soliman, F. M., Adly, A. M., Soliman, H. A., El-Matbouli, M., & Saleh, M. (2019). Recent progress in biomedical applications of chitosan and its nanocomposites in aquaculture: A review. *Research in veterinary science*, 1, 68-82. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528819301638>
- Anderson, D. P., Roberson, B. S., & Dixon, O. W. (1979). Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia ruckeri* O-antigen preparation. *Journal fish. Res. Board Can*(36), 636-639. Opgehaald van <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f79-092>
- Angelidis, P. (2006). Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 1-2(90), 46-49. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0396.2005.00572.x>
- Ashley, P. J. (2006). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3-4), 199-235. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168159106002954>
- Austin, B. (2012). Developments in vaccination against fish bacterial disease. *Infectious disease in aquaculture*, 1(1), 218-243. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978085709016450009X>
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). Vibrios. In B. Austin, & D. A. Austin, *Bacterial Fish Pathogens: disease of farmed and wild fish* (pp. 499-601). Springer. Opgehaald van [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-32674-0\\_10#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-32674-0_10#citeas)
- Bart, A. N., Kindschi, G. A., Ahmed, H., Clark, J., Young, J., & Zohar, Y. (2001). Enhanced transport of calcein into rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae using cavitation level ultrasound. *Aquaculture*, 1-2(196), 189-197. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848600005792>
- Beyls, D. (2015). *Vaccinatietechnieken bij vissen*. Diergeneeskunde. Gent: Universiteit Gent. Opgehaald van [https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/216/068/RUG01-002216068\\_2015\\_0001\\_AC.pdf](https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/216/068/RUG01-002216068_2015_0001_AC.pdf)

- Bleckmann, H., & Zelick, R. (2009). Lateral line system of fish. *INtegrative zoology*(4), 13-25.  
Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1749-4877.2008.00131.x>
- Bogwald, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*(7), article 627. Opgehaald van <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/12/627>
- Brudeseth, B. E., Wiulsirod, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Lokling, K.-E., Bordevik, M., . . . Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1759-1768. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464813005974>
- Cameron, S. S. (2007). Physiological stress responses to automated and hand vaccine injection procedures in yearling coho salmon. *North American journal of aquaculture*, 2(69), 180-184. Opgehaald van <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/A06-004.1>
- Chen, Y.-M., Shih, C.-H., Liu, H.-C., Wu, C.-L., Lin, C.-C., Wang, H.-C., . . . Lin, J. H.-Y. (2011). An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture*, 1-2(321), 26-33. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848611006831>
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., & Volckaert, F. A. (2007). Review on the immunology of european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(1-2), 1-16. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242707000669>
- Clarke, J. L., Waheed, M. T., Lössl, A. G., Martinussen, I., & Daniell, H. (2013). How can plant genetic engineering contribute to cost-effective fish vaccine development for promoting sustainable aquaculture? *Plant molecular biology*, 1-2(83), 33-40. Opgehaald van <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-013-0081-9>
- Colquhoun, D. J., & Lillehaug, A. (2014). Vaccination against vibriosis. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish vaccination* (pp. 172-181). John Wiley & Sons, Ltd.
- Colquhoun, D. J., & Lillehaug, A. (2014). Vaccination against vibriosis. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish vaccination* (pp. 172-184). Oslo: John Wiley and sons.
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1-4), 218-223. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X04003881>
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., . . . Joshi, S. K. (2016). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 3(25), 184-217. Opgehaald van <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23308249.2016.1261277>
- Dhar, A. K., & Allnutt, T. F. (2011). Challenges and Opportunities in Developing Oral Vaccines against Viral Diseases of Fish. *Marine Science. Research & development*, 51(2), 1-6. Opgehaald van [https://www.researchgate.net/profile/F\\_C\\_Thomas\\_Allnutt/publication/236325198\\_Challenges\\_and\\_opportunities\\_in\\_developing\\_oral\\_vaccines\\_against\\_viral\\_diseases\\_of\\_fish/links/54875ac80cf2ef34478ec838.pdf](https://www.researchgate.net/profile/F_C_Thomas_Allnutt/publication/236325198_Challenges_and_opportunities_in_developing_oral_vaccines_against_viral_diseases_of_fish/links/54875ac80cf2ef34478ec838.pdf)

- Dhar, A. K., & Manna, S. K. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *VirusDisease*, 1(25), 1-17.  
Opgehaald van <https://link.springer.com/article/10.1007/s13337-013-0186-4>
- Dickerson, H. W. (2009). The biology of teleost mucosal immunity. In G. Zaccane, C. Perrière, A. Mathis, & B. G. Kapoor, *Fish Defenses: Pathogens, Parasites and predators* (pp. 1-42). Georgia, USA: Science Publishers Jersey.
- Dongdong, L., Jianping, L., & Songming, Z. (2018). A Model to Determine Injection Position in Grass Carp Based on Machine Vision. *ASABE Meeting Presentation* (pp. 1-6). Detroit, Michigan: ASABE. Opgehaald van <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=49195>
- Dos Santos, N. M., Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A. C., Van Muiswinkel, W. B., Ellis, A. E., & Rombout, J. H. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicidabacterin*: an ontogenetic study. *Fish & Shellfish Immunology*, 1(11), 65-74.  
Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105046480090295X>
- Duff, D. C. (1942). The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal of immunology*, 44, 87-94.
- Embregts, C. W., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 118-137. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X16300982>
- Evelyn, T. (1997). A historical review of fish vaccinology. *Developments in biological standardization*, 90, 3-12. Opgehaald van <https://europepmc.org/article/med/9270829>
- Evensen, O. (2009). Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. *Op Méditerran Series*, 1(86), 86-177. Opgehaald van [https://www.researchgate.net/profile/Oystein\\_Evensen/publication/242541465\\_Development\\_in\\_fish\\_vaccinology\\_with\\_focus\\_on\\_delivery\\_methodologies\\_adjuvants\\_and\\_formulations/links/02e7e52812a4d12aa8000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Oystein_Evensen/publication/242541465_Development_in_fish_vaccinology_with_focus_on_delivery_methodologies_adjuvants_and_formulations/links/02e7e52812a4d12aa8000000.pdf)
- Evensen, O., & Leong, J. C. (2013). DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish & Immunology*, 6(35), 1751-1758. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464813008188>
- Fender, D. C., & Amend, D. F. (1978). Hyperosmotic infiltration factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal fish. res. board can*(35), 871-874.  
Opgehaald van <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f78-139#.XheX5vx7nIU>
- Frans, L., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Redlers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors. *Journal of Fish Diseases*, 34(9), 643-661.  
Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Grisez, L., & Tan, Z. (2005). Vaccine development for asian aquaculture. *Diseases in Asian Aquaculture*(5), 483-494. Opgehaald van [https://www.researchgate.net/profile/Vinay\\_T\\_N/post/Several\\_vaccines\\_have\\_been\\_developed\\_for\\_fish\\_diseases\\_but\\_still\\_we\\_dont\\_have\\_a\\_single\\_commercial\\_vaccine\\_in\\_Indian\\_aquaculture/attachment/59d6234ac49f478072e995ac/AS:272107181674496@1441886815360/download](https://www.researchgate.net/profile/Vinay_T_N/post/Several_vaccines_have_been_developed_for_fish_diseases_but_still_we_dont_have_a_single_commercial_vaccine_in_Indian_aquaculture/attachment/59d6234ac49f478072e995ac/AS:272107181674496@1441886815360/download)

- Gudding, R., & Goodrich, T. (2014). The history of fish vaccination. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish Vaccination* (pp. 1-12). John Wiley & Sons. Ltd.
- Gudding, R., & Van Muiswinkel, W. B. (2013). A history of fish vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1683-1688. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464813007766>
- Huising, M. O., Guichelaar, T., Hoek, C., Verburg-van Kemenade, B. L., Flik, G., Savelkoul, H. F., & Rombout, J. H. (2003). Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, 27-30(21), 4178-4193. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03004973>
- Jiang, Y., Wang, H., Deng, M., Wang, Z., Zhang, J., Wang, H., & Zhang, H. (2016). Effect of ultrasonication on the fibril-formation and gel properties of collagen from grass carp skin. *Materials science and engineering*(59), 1038-1046. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493115305361>
- Jun, L., & Woo, N. Y. (2003). Pathogenicity of Vibrios in Fish: an Overview. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2(2), 117-128. Opgehaald van <https://link.springer.com/article/10.1007/s11802-003-0039-7>
- Kibenge, F. S., Godoy, M. G., Fast, M., Workenhe, S., & Kibenge, M. J. (2012). Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral Research*, 3(97), 257-281. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354212001441>
- Labarca, C. C., Makhutu, M., Lumsdon, A. E., Thompson, K. D., Jung, R., Kloas, W., & Knopf, K. (2015). Cobo Labarca, C., Makhutu, M., Lumsdon, A. E., Thompson, The adjuvant effect of low frequency ultrasound when applied with an inactivated *Aeromonas salmonicida* vaccine to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*, 33(11), 1369-1374. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15000468>
- Lee, D.-G., Cha, B.-J., Park, S.-W., Kwon, M.-G., Xu, G.-C., & Kim, H.-J. (2013(a)). Development of a vision-based automatic vaccine injection system for flatfish. *Aquacultural Engineering*(54), 78-84. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860912000982>
- Lee, D.-G., Yang, Y.-S., Bae, B.-S., & Kang, J.-G. (2013(b)). Conveyor belt automatic vaccine injection system (AVIS) for flatfish based on computer vision analysis of fish shape. *Aquacultural Engineering*(57), 54-62. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486091300071X>
- Liang, R., Li, J., Ruan, Y., & Zhu, S. (2015). The design and parameter optimization of automatic positioning mechanism for automatic injection system of fry vaccine. *ASABE Meeting Presentation* (pp. 1-8). New Orleans, Louisiana: ASABE. Opgehaald van <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=45901>
- Lillehaug, A. (1998). A cost-effectiveness study of three different methods of vaccination against vibriosis in Salmonids. *Aquaculture*, 83(3-4), 227-236. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848689900355>
- Lillehaug, A. (2014). Vaccination Strategies and Procedures. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish Vaccination* (1 ed., pp. 140-152). Norway: John Wiley & Sons, Ltd.

- Lin, C.-C., Lin, J. H.-Y., Chen, M.-S., & Yang, H.-L. (2007). An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 1-4(268), 265-273. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848607003742>
- Menezes, A., Hishamunda, N., Lovshin, L., & Martone, E. (2017). *Doing aquaculture as a business for small- and medium-scale farmers*. Rome: Food and agriculture organization of united nations. Opgehaald van <http://www.fao.org/3/a-i7461e.pdf>
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, O. (2015(a)). An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. *Frontiers in Immunology*(6), 542. Opgehaald van <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4617105/>
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, O. (2015(b)). Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake and immune induction. *Frontiers in Immunology*(6), 519. Opgehaald van file:///C:/Users/HAMSTE~1/AppData/Local/Temp/fimmu-06-00519.pdf
- Nakanishi, T., Kiryu, I., & Ototake, M. (2002). Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, 31-32(20), 3764-3769. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X02002918>
- Navot, N., Sinyakov, M. S., & Avtalion, R. R. (2011). Application of ultrasound in vaccination against goldfish ulcer disease: A pilot study. *Vaccine*, 7(29), 1382-1389. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10018426>
- Nielsen, F. K., & A.I., B. M. (2011). Mapping uncertainties in the upstream: the case of PLGA nanoparticles in salmon vaccines. *Nanoethics*, 1(5), 57-71. Opgehaald van <https://link.springer.com/article/10.1007/s11569-011-0111-5>
- Olsen, R. E., Ringo, E., Jensen, I., Romero, J., & Lauzon, H. L. (2014). Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(24), 1005-1032. Opgehaald van <https://link.springer.com/article/10.1007/s11160-014-9361-y>
- Pandy, P. K., Bharti, V., & Kumar, K. (2014). Biofilm in aquaculture production. *African Journal of microbiology research*, 8(13), 1434-1443. Opgehaald van [https://www.researchgate.net/profile/Pramod\\_Pandey10/publication/261136328\\_Biofilm\\_in\\_aquaculture\\_production/links/0f3175345403d8a4e2000000/Biofilm-in-aquaculture-production.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Pramod_Pandey10/publication/261136328_Biofilm_in_aquaculture_production/links/0f3175345403d8a4e2000000/Biofilm-in-aquaculture-production.pdf)
- Paolini, A., Ridolfi, V., Zezza, D., Cocchietto, M., Musa, M., Pavone, A., . . . Giorgetti, G. (2005). Vaccination trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against pasteurellosis using oral, intraperitoneal and immersion methods. *Veterinaria Italiana*, 2(41), 137-144. Opgehaald van [http://www.izs.it/vet\\_italiana/2005/41\\_2/137.pdf](http://www.izs.it/vet_italiana/2005/41_2/137.pdf)
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & comparative immunology*, 35(12), 1256-1262. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X1100067X>
- Popovic, N. T., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Baisic, J., Jadan, M., Berakovic, A. P., & Klobucar, R. S. (2012). Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of*

- Applied Ichthyology*, 4(28), 553-564. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x>
- Poppe, T. T., & Koppang, E. O. (2014). Side-Effects of Vaccination. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish Vaccination* (pp. 153-161). Norwegen: John Wiley & Sons, Ltd.
- Ringo, E., & Song, S. K. (2015). Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and Beta-glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*, 1(22), 4-24. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/anu.12349>
- Ringo, E., Zhou, Z., Vecino, J. L., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, A., . . . Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatix animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 1(22), 219-282. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/anu.12346>
- Rombout, J. (2006). Infectiebestrijding bij kweekvis. *Cahiers bio-wetenschappen en maatschappij*(2), 57-60. Opgehaald van <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/351521>
- Rombout, J. H., & Kiron, V. (2014). Mucosal vaccination of fish. In R. Gudding, A. Lillehaug, & O. Evensen, *Fish vaccination* (pp. 56-68). Noorwegen: John Wiley & Sons, Ltd. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118806913#page=74>
- Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(31), 616-626. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464810002883>
- Sallinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 3(4), 525-539. Opgehaald van [https://www.researchgate.net/publication/281083387\\_The\\_Mucosal\\_Immune\\_System\\_of\\_Teleost\\_Fish](https://www.researchgate.net/publication/281083387_The_Mucosal_Immune_System_of_Teleost_Fish)
- Sandri, G., Rossi, S., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Mori, M., & Caramella, C. (2012). The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery. *Journal of drug delivery science and technology*, 4(22), 275-284. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224712500468>
- Siriponadulsil, S., Dabrowski, K., & Sayre, R. (2007). Microalgal Vaccines. In R. León, A. Galván, & E. Fernández, *Transgenic microalgae as green cell factories* (pp. 122-128). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Opgehaald van [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-75532-8\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-75532-8_11)
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., & Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and immunopathology*, 1-2(41), 125-139. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165242794900620>
- Skala. (sd). Vaksinerings. *Vaksinerings*. Skala. Opgehaald van <https://www.skalamaskon.no/aquakultur/vaksinerings>
- Snieszko, S. F., & Friddle, S. B. (1949). Prophylaxis of furunculosis in brook trout (*salvelinus fontinalis*) by oral immunization and sulfamerazine. *Progress Fish Cult*, 11, 168-8. Opgehaald van <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640%281949%2911%5B161%3APOFIBT%5D2.0.CO%3B2?journalCode=uzpf20>

- Sobhana, K. S. (2009). Diseases of seabass in cage culture and control measures. In I. Joseph, S. Joseph, B. Ignatius, T. V. Shaji, K. M. Venugopalan, C. N. Chandrasekharan, . . . M. D. Suresh, *Course manual: National training on cage culture of seabass* (pp. 87-93). Kerala, India: Central marine fisheries research institute.
- Tatner, M. F., & Horne, M. T. (1983). Factors influencing the uptake of 14c-labelled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Fish biology*(22), 588-591. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1983.tb04218.x>
- Terech-Majewska, E. (2016). Improving disease prevention and treatment in controlled fish culture. *Arch. Pol. Fish*(24), 115-165. Opgehaald van <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/aopf.2016.24.issue-3/aopf-2016-0013/aopf-2016-0013.pdf>
- Thune, R. L., & Plumb, J. A. (1984). Evaluation of hyperosmotic infiltration for the administration of antigen to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*(36), 1-8. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848684900498>
- Tian, J., Sun, X., Chen, X., Yu, J., Qu, L., & Wang, L. (2008). The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International immunopharmacology*, 900-908. Opgehaald van <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576908000726>
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Dhanasiri, A. K., Sweetman, J., & Izquierdo, M. (2012). Effects on mortality and stress response in European seabass, *Dicentrarchus labrax*(L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *Journal of fish diseases*, 8(35), 591-602. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.2012.01384.x>
- Vázquez, F. J., & Muñoz-Cueto, J. A. (2012). Stress, traumatic lesions and secondary infections. In F. J. Vázquez, & J. A. Muñoz-Cueto, *Biology of European Sea Bass* (p. 336). Spain: CRC Press.
- Vázquez, F. J., & Muñoz-Cueto, J. A. (2015). Pathologies Due to Bacteria. In *Biology of European sea bass* (pp. 289-295). Spain: CRC Press.
- Zhou, Y.-C., Wang, J., Zhang, B., & Su, Y. Q. (2002). Ultrasonic immunization of sea bream, *Pagrus major*, with a mixed vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*, 6(25), 325-331. Opgehaald van <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2761.2002.00383.x>



### Checklist Schriftelijk Rapporteren 2018

Naam:

Klas:

*De beoordelingscriteria die met een \* zijn aangegeven, zijn 'killing points'. Wanneer de beoordelaar daarvan meer dan vijf heeft aangekruist, dien je het rapport/verslag op alle onvoldoende onderdelen te verbeteren. In het afstudeerwerkstuk zijn geen 'killing points' toegestaan.*

#### 1. Het taalgebruik

- ☐ Bevat niet meer dan drie grammaticale, spel- en typefouten per duizend woorden; het rapport/verslag is dan afgekeurd\*
- ☐ Heeft een actieve schrijfstijl\*
- ☐ Is zakelijk, formeel en objectief \*
- ☐ Is coherent (verwijs- en verbindingswoorden)\*
- ☐ Heeft een adequate interpunctie\*
- ☐ Bevat niet de persoonlijke voornaamwoorden 'ik/mij/me, jij/je/jou, jullie, u, wij/we/ons' \*
- ☐ Is doelgroepgericht\*
- ☐ Heeft een uniforme stijl\*

#### 2. De ordening

- ☐ Het verslag/rapport heeft een logisch opbouw
- ☐ Elk hoofdstuk heeft een logische alineastructuur
- ☐ Elk hoofdstuk kent een introductie (m.u.v. H.1)

#### 3. Het rapport/verslag

- ☐ Is vrij van plagiaat\*
- ☐ De pagina's zijn genummerd\*
- ☐ Heeft een uniforme opmaak

#### 4. De omslag

- ☐ Bevat de titel
- ☐ Vermeldt de auteur(s)

#### 5. De titelpagina/het titelblad

- ☐ Heeft een specifieke titel\*
- ☐ Vermeldt de auteur(s)\*
- ☐ Vermeldt de plaats en de datum\*
- ☐ Vermeldt de opdrachtgever(s)\*

#### 6. Het voorwoord:

- ☐ Bevat de persoonlijke aanleiding tot het schrijven van het rapport/verslag
- ☐ Bevat persoonlijke dankjes (persoonlijke voornaamwoorden toegestaan)

#### 7. De inhoudsopgave:

- ☐ Vermeldt alle genummerde onderdelen van het rapport/verslag\*
- ☐ Vermeldt de samenvatting en de bijlage(n)
- ☐ Is overzichtelijk/gestructureerd
- ☐ Heeft een correcte paginaverwijzing

#### 8. De samenvatting:

- ☐ Is een verkorte versie van het gehele rapport/verslag
- ☐ Bevat de conclusies
- ☐ Bevat suggesties voor verder onderzoek

- ☐ Bevat geen persoonlijke mening
- ☐ Staat direct na de inhoudsopgave

#### 9. De inleiding

- ☐ Is hoofdstuk 1\*
- ☐ Beschrijft het kader/de context en de aanleiding\*
- ☐ Geeft inhoudelijke relevante achtergrondinformatie\*
- ☐ Bevat de probleemstelling/de onderzoeksvraag\*
- ☐ Vermeldt het doel\*
- ☐ Bevat een leeswijzer voor het rapport/verslag\*

#### 10. Materiaal en methode

- ☐ Beschrijft de gevolgde onderzoeksmethode
- ☐ Motiveert de keuze voor de gevolgde onderzoeksmethode
- ☐ Past bij de probleemstelling/de onderzoeksvraag\*
- ☐ Beschrijft de variabelen/eenheden
- ☐ Beschrijft de methode van data-analyse

#### 11. De (opmaak van de) kern

- ☐ De hoofdstukken en de (sub)paragrafen met maximaal drie niveaus zijn genummerd\*
- ☐ De hoofdstukken en (sub)paragrafen hebben een passende titel
- ☐ Een hoofdstuk beslaat ten minste één pagina
- ☐ Een nieuw hoofdstuk begint op een nieuwe pagina
- ☐ De zinnen lopen door (geen 'enter' binnen een alinea gebruiken)
- ☐ De figuren zijn (door)genummerd en hebben een passende titel (onder de figuur)\*
- ☐ De tabellen zijn (door)genummerd en hebben een passende titel (boven de tabel)\*
- ☐ Tabellen en figuren zijn zelfstandig te begrijpen
- ☐ In de tekst zijn er verwijzingen naar figuren en/of tabellen\*
- ☐ De tekst bevat verwijzingen naar de desbetreffende bijlage(n)
- ☐ De tekst is ook zonder verwijzingen te begrijpen

#### 12. De discussie

- ☐ Vermeldt de interpretatie(s) van de resultaten
- ☐ Bevat een vergelijking met relevante literatuur
- ☐ Geeft de valide argumentatie weer
- ☐ Evalueert de gevolgde onderzoeksmethode
- ☐ Bevat een kritische reflectie op de eigen bevindingen

#### 13. De conclusies en aanbevelingen

- ☐ Bevatten antwoord(en) op de onderzoeksvraag
- ☐ Zijn gebaseerd op relevante feiten
- ☐ Bevatten geen nieuwe informatie\*

#### 14. De bronvermelding

- ☐ Verwijzingen in de tekst zijn conform de APA-normen\*
- ☐ De bronnenlijst is conform de APA-normen\*

#### 15. De bijlagen

- ☐ Zijn genummerd
- ☐ Zijn voorzien van een passende titel
- ☐ Bevatten geen eigen analyse
- ☐ Zijn overzichtelijk weergegeven