

GÖTTINGER BEITRÄGE ZUR LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT
IN DEN TROPEN UND SUBTROPEN

Heft 128

Claudia Bechteler

Versuche zur Immunisierung von Garnelen (*Penaeus monodon*)
gegen Vibrioneninfektionen



Göttingen 1998

5 Zusammenfassung

Im Verlauf der letzten Jahre haben sich in Thailand, bedingt durch eine steigende Intensität der Haltungformen, die hygienischen Probleme in der Gamelenproduktion verschärft. Insbesondere die Faktorenerkrankung Vibriose verursacht große betriebs- und volkswirtschaftliche Verluste. Die prophylaktisch und therapeutisch eingesetzten Antibiotika und Sulfonamide wirken nur unzureichend und bergen große gesundheitliche und ökologische Risiken. Daher wird verstärkt nach einem Impfstoff gegen die Vibriose gesucht.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Firma B. B. Holding Co., Ltd., Bangkok/Thailand, angeregt und finanziell unterstützt. Ziel war die Entwicklung eines Vibrioseimpfstoffes für Riesengamelen (*P. monodon*). Aus der Literaturrecherche zum gegenwärtigen Kenntnisstand über die Infektionsabwehr von Krustazeen geht hervor, daß zunehmend von einer primitiven Immunität bei Gamelen ausgegangen wird. Das macht den Einsatz eines Vibrioseimpfstoffes aussichtsreich. Erste Laborversuche dazu waren erfolgversprechend. Viele Fragen sind aber noch offen. Insbesondere fehlen Nachweise über die Wirkung solcher Impfstoffe unter Praxisbedingungen.

Nach Hinweisen aus der Literatur zu erfolgreichen Fischimpfstoffen und den Erfahrungen des IBT muß ein wirksamer Vibrioseimpfstoff aus homologen, standortspezifischen Erregern bestehen, polyvalent sein und einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Um dies zu erreichen, wurden 20 Feldstämme aus dem Süden Thailands, wo der Impfstoff später eingesetzt werden soll, nach den üblichen Methoden bis zum Speziesniveau identifiziert und charakterisiert. Für die eigentliche Vakzineproduktion wurde das vom IBT entwickelte kontinuierliche Fermenterverfahren (Göttinger Bioreaktor) mit anschließender Kaskaden-Ultrafiltration durch Hohlfaserfilter eingesetzt. Auf diese Weise wurden aus drei besonders virulenten Stämmen der Spezies *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. alginolyticus* drei formalinaktivierte und hochkonzentrierte Impfstoffchargen hergestellt. Sie setzten sich allein aus den Bakterienzellen und/oder den entsprechenden Toxoiden zusammen und unterschieden sich im Formalingehalt und in der Ultraschallbehandlung.

Die Verträglichkeit und Wirksamkeit der Impfstoffchargen, gemessen an Überlebensrate, Gewichtsentwicklung und Gesundheitszustand geimpfter Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren, wurde unter Praxisbedingungen in verschiedenen Regionen Südthailands geprüft. Die Impfstoffe wurden den Gamelen der PL-Stadien 5 und 12 bis 14 in verschiedenen

Konzentrationen, variierenden Einwirkungszeiten und unterschiedlichen Impfverfahren über das Wasser im Kurzzeitbad verabreicht. Die wichtigsten Ergebnisse der Laborversuche und des Feldversuchs lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Eine Behandlung mit Formalin erhöhte die Mortalität signifikant, zwischen einer Behandlung mit inaktivierten Bakterien und Toxoiden konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Als Konsequenz aus diesen ersten Ergebnissen wurden bei der Herstellung der zweiten und dritten Impfstoffcharge die Zell- und Toxoidfraktion im Verhältnis 1:1 gemischt und der Formalingehalt auf ein Minimum eingestellt.
- Steigende Impfstoffkonzentrationen verbesserten die Überlebensrate bis zu einem Maximum, darüber sank sie wieder ab; längere Einwirkungszeiten wirkten sich günstig auf die Überlebensrate aus. Das heißt, Impfstoffkonzentration und Einwirkungszeit können sich in gewissen Spannen gegenseitig ersetzen.
- Kurzfristig führten niedrigere Impfstoffkonzentrationen zu einer höheren Überlebensrate, langfristig erwiesen sich aber höhere Impfstoffkonzentrationen als überlegen. Die Verträglichkeit des Impfstoffes und sein Einfluß auf die kurzfristige Überlebensrate darf daher nicht überbewertet werden.
- Ein Vibrioschutz konnte bereits nach einem Tag sowie über einen Zeitraum von drei Monaten nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, daß der Impfschutz zunächst auf einer Chemostimulation, später auf aktiver Immunität beruht und durch natürliche Boosterungen über die gesamte Produktionsperiode aufrechterhalten wird. Dies bestätigt die Arbeitshypothese, daß Garnelen sowohl über eine Resistenz als auch Immunität verfügen.
- Ein Impfschutz konnte schon in einem frühen PL-Stadium (PL 5) induziert werden. In dieser Altersgruppe sind die Garnelen noch in der Brüterei, so daß sie bereits hier vor einer Vibrioneninfektion geschützt werden könnten, zumal die technischen und organisatorischen Voraussetzungen für eine Impfung auf den Gamelenfarmen häufig nicht gegeben sind.
- Der Kontakt mit dem Impfstoff im Antigenbad, insbesondere bei höheren Konzentrationen, und das mit der Impfung verbundene Handling haben sich als Streßfaktoren für die Garnelen herausgestellt. Ein Splitting der Impfstoffdosis konnte aufgrund des intensiveren Handlings den negativen Effekt höherer Impfstoffkonzentrationen nicht kompensieren.
- Die Verträglichkeit und Wirksamkeit des Impfstoffes hingen von der Qualität und dem Alter der Garnelen ab. Sie wurden außerdem von Transport, Verpackung und Wasser-

wechsel sowie den spezifischen Haltungs- und Hygienebedingungen, denen die Garnelen vor und nach der Impfung ausgesetzt waren, beeinflusst. So war unter anderem die Überlebensrate der Versuchstiere in der Brüterei höher als auf der Farm. Eine Impfung der Garnelen sollte deshalb vom Praxisbetrieb in die Brüterei verlagert werden.

Diese Erkenntnisse führen zu neuen Fragen. So ließe sich die Inaktivierung der Impfstoffkomponenten mit Formalin unter Umständen durch Hitze einwirkung ersetzen. An die Stelle des Kurzzeitbades könnte eine orale Immunisierung („bioencapsulation“) treten. Die optimale Kombination aus Impfstoffkonzentration und Einwirkungszeit muß noch bestimmt werden. Ungeklärt ist auch, inwieweit eine Impfung von PL 5 langfristig wirksam ist.

Als zentrales Ergebnis konnte im Feldversuch nachgewiesen werden, daß der getestete Impfstoff unter den sehr heterogenen Bedingungen von Praxisbetrieben einen Impfschutz gewährleistet. Bei nachgewiesenem Vibrioseausbruch wurden Überlebensrate und Gewichtsentwicklung der Garnelen deutlich verbessert. Entsprechend höher fiel der Ernteertrag aus. Das Ergebnis ließ sich statistisch absichern. Allerdings war es im Feldversuch nicht möglich, mit der ceteris-paribus-Bedingung zu arbeiten. Auch mußte der Impfstoff ohne Kenntnis der genauen Wirkungszusammenhänge zwischen Impfstoff und Reaktion des Abwehrsystems der Garnelen entwickelt werden. Danach bleibt offen, ob sich die Ergebnisse in weiteren Feldversuchen in der hier festgestellten Deutlichkeit verifizieren lassen.

Trotz dieser Einschränkungen kann man davon ausgehen, daß dieser Vibrioseimpfstoff die Wirtschaftlichkeit der Garnelenzucht im Süden Thailands verbessern bzw. sichern kann. Damit kann auch die ökologisch und für den Menschen bedenkliche Anwendung von Chemotherapeutika reduziert werden.

6 Summary

The hygienic problems in prawn production in Thailand have aggravated during the past few years due to intensified aquaculture systems. Especially the opportunistic disease *Vibriosis* has caused heavy economic losses. The prophylactically and therapeutically used antibiotics and sulfonamides work only insufficiently and contain severe health and ecological risks. Thus the search for a vaccine against *Vibriosis* of shrimp has intensified.

The submitted paper was suggested and financially supported by B. B. Holding Co., Ltd., Bangkok/Thailand. The goal was the development of a vaccine against *Vibriosis* of giant tiger prawns (*P. monodon*). A literature survey on the present knowledge of the mechanisms of immune response in crustacea suggests that there is a primitive active immunity in prawns. This makes the application of a vaccine against *Vibriosis* promising. Although first lab trials have been encouraging, many questions are still unsolved, particularly there is no evidence of the practicality of such vaccines.

According to the literature and experiences of the IBT, a successful fish vaccine should consist of homologous, site-specific pathogens, be polyvalent, and demonstrate a high degree of purity. In order to achieve this twenty vibrio species from the south of Thailand, where the vaccine would eventually be used, were, according to the usual methods, identified and characterized to species level. An IBT-developed continuous fermentation process („Göttinger Bioreaktor“) with additional cascade ultrafiltration through hollow-fibre-filters was used to produce the actual vaccine. This resulted in three formaline-inactivated and highly concentrated vaccine charges from three especially virulent species of vibrio: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. alginolyticus*. They consisted only of the bacteria cells and/or the corresponding toxoids and differed in formaline content and ultrasonic treatment.

The bio-availability and effectiveness of the three charges of the vaccine, measured as survival rate, development of body weight and health status of the immunized prawns as compared to non-immunized (control) animals, were tested under practical conditions in several regions in the south of Thailand. The vaccine-charges were applied to the prawns (PL 5 and 12 to 14) in various concentrations, incubation times and vaccination-procedures via the water using short-time bathing. The most important results of the lab and field trials can be summarized as follows:

- The treatment with formaline increased the mortality of the prawns significantly. There was no difference between treatment with inactivated bacteria and toxoids. As a consequence of these results, for the second and third vaccine-charges, the cell- and toxoid fraction were mixed at a ratio 1:1 and the content of formaline was reduced to a minimum.
- Increased vaccine concentration increased survival rate to a maximum, beyond this survival rate decreased. Longer incubation time had a positive effect on the survival rate. It is suggested that vaccine concentration and incubation time can replace each other to some extent.
- Over the short term, lower vaccine concentrations led to higher survival rates, whereas for longer periods higher vaccine concentrations were superior. The bio-availability of the vaccine and its influence on the short-term survival rate should therefore not be overestimated.
- A protection against *Vibriosis* was evident already after one day and continued over a period of three months. This indicates that a vaccine-protection is initially mediated by chemostimulation and later by an active immunity and is maintained through natural boosterings during the entire production period. This confirms the hypothesis that prawns possess a passive as well as an active immunity.
- An immune protection could be induced in a very early PL-stage (PL 5). At this age, the prawns are still in the hatchery, so that they could be protected against *Vibriosis* infection while still there, which is especially important due to technical and organisational limitations for vaccination on farms.
- The contact with the vaccine in the antigen-bath, especially at higher concentrations, and the handling connected with the vaccination, were found to stress the prawns. The splitting of the vaccine dose could not compensate for the negative effects of higher vaccine concentrations due to the intensified handling.
- The bio-availability and effectiveness of the vaccine depended on the quality and age of the prawns. They were also influenced by transporting, packing, water-exchanging and the specific conditions of husbandry and hygiene the prawns were exposed to before and after vaccination. Thus among other things, the survival rate of the test animals was higher in the hatchery than on the farm. The vaccination of prawns therefore should be transferred from the farm to the hatchery.

These findings lead to new possibilities of improving the vaccination process. E.g., the inactivation of the vaccine components with formaline could probably be replaced by heat-

stabilisation. Instead of short-time bathing, oral immunization („bioencapsulation“) could be tried. The optimum combination of vaccine concentration and incubation time remains to be evaluated. It needs also to be clarified to what extent a vaccination of PL 5 remains effective.

The field trial did prove that the tested vaccine provides an immune protection under the very heterogenous conditions of farms. After a proven outbreak of *Vibriosis*, the survival rate and development of body weight were clearly increased with a noteworthy and statistically significant improvement in the final harvest. It should be noted however, that it was not possible to work with the *ceteris-paribus* condition in the field trial and that the relationship between the actual effectivity of the vaccine and the development of the prawn immune system remains unknown. Thus, it is still unclear whether these results in further field trials can again be so clearly demonstrated.

Despite these limitations, it seems likely that this vaccine against *Vibriosis* can improve or even guarantee the economic viability of prawn production in the south of Thailand. With the help of the vaccine, the potentially harmful, both ecological and human, application of chemical agents can also be reduced.