ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 16. Mai 1994

über die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Weichtierkrankheiten

(Text von Bedeutung für den EWR)

(94/306/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 91/67/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur [1], geändert durch die Richtlinie 93/54/EWG [2], insbesondere auf Artikel 15,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Im Hinblick auf die einheitliche Anwendung der in der Richtlinie 91/67/EWG festgelegten Verfahren müssen die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren bestimmt werden, die anzuwenden sind, wenn ein Küstengebiet oder ein Zuchtbetrieb als frei von Weichtierkrankheiten erklärt werden soll oder um Bestände mit ungewöhnlicher Mortalität zu untersuchen.

Der mit der Entscheidung 81/651/EWG [3] eingesetzte Wissenschaftliche Veterinärausschuß wurde gehört.

Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinärausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Probenahme- und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis von Bonamiose (Bonamia ostreae) und Marteiliose (Marteilia refringens) sind im Anhang festgelegt.

Artikel 2

Diese Entscheidung gilt ab dem 1. Juni 1994.

Artikel 3

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 16. Mai 1994

Für die Kommission

René STEICHEN

Mitglied der Kommission

---

[1] ABl. Nr. L 46 vom 19. 2. 1991, S. 1.
[2] ABl. Nr. L 175 vom 19. 7. 1993, S. 34.
[3] ABl. Nr. L 233 vom 19. 8. 1981, S. 32.

ANHANG

I. PROBENAHME- UND TESTVERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BONAMIA OSTREAE UND MARTEILIA REFRINGENS IN AUSTERN (OSTREA EDULIS)

1. Probenahme

1.1. *Probenahmestellen*

Für jedes der in Anhang B Ziffer III der Richtlinie 91/67/EWG genannten Gebiete werden mehrere Probenahmestellen ausgewählt, um den einen oder anderen der vorhandenen Erreger Bonamia ostreae und Marteilia refringens oder beide mit größtmöglicher Sicherheit ermitteln zu können. Dabei sind alle die Erregerentwicklung fördernden Parameter wie Besatzdichte, Wasserströmung und Entwicklungszyklus der Weichtiere zu berücksichtigen. Für jedes Gebiet sind mindestens drei, bei großen Gebieten mit mehreren separaten Austern-Zuchtanlagen noch weitere Probenahmestellen festzulegen.

Es sollte möglichst eine Probe aus natürlich vorkommenden Austernbänken entnommen werden. Dabei sind Weichtiere auszuwählen, die eindeutig Anomalien (anomaler Wuchs, offene Schalen) aufweisen.

1.2. *Zeit und Häufigkeit der Probenahmen*

Die Kontrollabstände gemäß Anhang B Ziffer III Buchstabe B Nummer 2 der Richtlinie 91/67/EWG richten sich nach dem Zeitraum, in dem sich die Krankheit manifestiert bzw. nachweisbar ist. Dabei ist auch den Umsetzungen von Weichtieren Rechnung zu tragen, die in der Regel im Frühjahr und im Herbst stattfinden. Demnach erfolgt die Probenahme

— einmal jährlich (nach dem Sommer) für Marteilia refringens,

— zweimal jährlich (Frühjahr und Herbst) für Bonamia ostreae.

1.3. *Probenumfang*

Während der ersten zweijährigen Kontrollperiode, die jeder Zulassung vorausgehen muß, werden an jeder Probenahmestelle 150 Proben entnommen, um den Erreger bei einer Prävalenz von 2 % mit einer Nachweissicherheit von 95 % ermitteln zu können.

In den folgenden Jahren (Erhaltung des Zulassungsstatus) kann der Probenumfang auf 30 Tiere reduziert werden, um den Erreger bei einer Prävalenz von 10 % mit einer Nachweissicherheit von 95 % ermitteln zu können.

2. Einsendung der Proben

Alle Weichtierproben müssen binnen 24 Stunden nach ihrer Entnahme bei dem zugelassenen Untersuchungslabor eingehen. Sie sind normgerecht zu verpacken, um sie in gutem Zustand zu halten. Jede Probe ist zu etikettieren, wobei die Probenahmestelle, das Entnahmedatum und gegebenenfalls andere wichtige Daten anzugeben sind.

3. Makroskopische Untersuchung

Die Weichtiere sind vorsichtig zu öffnen, damit das Gewebe, insbesondere Mantel, Kiemen, Herz und Eingeweidesack, nicht verletzt wird. Gewebeanomalien und -läsionen sind zu vermerken.

4. Aufbereitung von Probematerial und Untersuchung auf Bonamia ostreae

4.1. *Immunfluoreszenz*

4.1.1. Nach dem Immunfluoreszenz-Verfahren können Larven sowie junge und ausgewachsene Austern untersucht werden. Proben entwässern, Larven zerdrücken oder Herzgewebe auf einen gläsernen Objektträger tupfen. Lufttrocknen lassen und durch Immersion in Azeton (5 bis 10 Minuten) fixieren. So aufbereitet kann das Material direkt oder gefroren (− 20 °C) verwendet werden.

Eine Lösung aus monoklonalen Antikörpern und Pufferlösung (NaCl 8 g/l, KH_2 PO_4 0,2 g/l, Na_2 HPO_4 $12H_2O$ 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, Natriumazid 0,2 g/l, Tween pH 7,4) zubereiten und nach Herstellerempfehlung verdünnen.

50 µl der Lösung in jedes Näpfchen oder auf die Objektträger pipettieren, um die Abstriche abzudecken. Nach Inkubieren in einer Feuchtkammer (15 Minuten bei 20 °C) Objektträger mit obengenannter Pufferlösung waschen und mit einer Verdünnung aus Ziegen-Antimaus-IgG-Antikörper (50 µl je Näpfchen), konjugiert mit Fluoreszin-Isothiozyanat, überschichten. Antikörperlösung nach Herstellerempfehlung verdünnen und Evansblau (1 %) zur Verdünnungspufferlösung geben.

15 Minuten bei 20 °C in feuchter Kammer inkubieren, in eine Glyzerinpufferlösung geben und UV-mikroskopisch untersuchen. Der Bonamiose-Erreger zeigt sich als intensiv grüne, runde Fluoreszenz.

In anderen Laboratorien entwickelte Tests mit vergleichbaren Ergebnissen können auch verwendet werden.

4.2. *Blutausstriche*

Larven- und Austernmaterial lufttrocknen lassen. Larven zu einer breiigen Masse verarbeiten oder Herzgewebe zur histologischen Untersuchung auf einen Objektträger tupfen. Lufttrocknen lassen und in Methanol fixieren.

Die aufbereiteten Larven und Austern nach dem Standardverfahren für das gegebene Färbemittel anfärben. Mit Leitungswasser abspülen, unter Kalt- oder Warmluftzufuhr vollständig trocknen lassen und mit Kunstharzfilm fixieren.

Der 2 µm große Parasit wird nachgewiesen durch einen roten Zellkern im blauen Zytoplasma. Er zeigt sich in den oder neben den Hämozyten. Für die Diagnose reicht eine Beobachtungszeit von 5 Minuten pro Objektträger aus.

4.3. *Histologische Untersuchung*

Für die histologische Untersuchung ein Schnittpräparat („steak") aus Herz, Eingeweidesack und Kiemen herstellen und in eine Fixierlösung (z. B. Davidson, Bouin oder Carson) geben. Letztere eignet sich für eine eventuell erforderliche elektronenmikroskopische Untersuchung. Das Probe-/Fixierbadvolumen-Verhältnis von 1 : 10 einhalten !

Mit diversen unspezifischen Färbemitteln (z. B. Hämatoxylin-Eosin) oder durch den 3-Farben-Prozeß nach Masson kann Bonamia ostreae sichtbar gemacht werden. Diese Beispiele sind nicht erschöpfend, andere Färbemethoden sind zulässig. Es wird empfohlen, je Auster zwei Schnittpräparate zu untersuchen.

Der 2 µm große Parasit wird im Bindegewebe oder in den Hämozyten frei sichtbar.

5. Aufbereitung von Proben und Untersuchung auf Marteilia refringens

5.1. *Zytologische Untersuchung*

Zur Aufbereitung der Abstriche : Schnittpräparat aus Eingeweidesack und Kiemen herstellen und überschüssiges Wasser mit Filterpapier entfernen. Schnitt durch den Verdauungstrakt auf den Objektträger tupfen. Lufttrocknen lassen und für 2 bis 3 Minuten in Methanol fixieren.

Die aufbereiteten Proben nach dem Standardverfahren für das gegebene Färbemittel anfärben. Mit Leitungswasser abspülen, unter Kalt- oder Warmluftzufuhr vollständig trocknen lassen und mit Kunstharzfilm fixieren.

Der in den frühen Entwicklungsphasen 5 bis 8 µm große Parasit kann im Lauf der Sporulation bis zu 40 µm groß werden. Das Zellzytoplasma zeigt eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung, der Zellkern ist intensiv rot. Die Sekundärzellen oder Sporoblasten sind von einem hellen Lichthof umgeben. Für die Diagnose reicht eine Beobachtungszeit von 5 Minuten pro Objektträger aus.

5.2. *Histologische Untersuchung*

Zur histologischen Untersuchung ein Schnittpräparat („steak") aus Eingeweidesackgewebe herstellen (kleine Schere verwenden). Die Probe in eine Fixierlösung (z. B. Davidson, Bouin oder Carson) geben, wobei letztere für eine eventuell erforderliche elektronenmikroskopische Untersuchung geeignet ist. Das Probe-/Fixierbadvolumen-Verhältnis darf auf keinen Fall größer sein als 1 : 10.

Danach die Proben nach konventionellen histologischen Verfahren untersuchen. Mit diversen unspezifischen Färbemitteln (z. B. Hämatoxylin-Eosin) oder durch den 3-Farben-Prozeß nach Masson kann Marteilia refringens sichtbar gemacht werden. Diese Beispiele sind nicht erschöpfend, andere Färbemethoden sind zulässig. Es wird empfohlen, je Auster zwei Schnittpräparate zu untersuchen.

In den frühen Entwicklungsphasen sind Marteiliose-Erreger im Epithelgewebe des Magens, in späteren Entwicklungsphasen im Epithelgewebe der Verdauungsdivertikel präsent. Freie Sporangien können auch im Darmlumen beobachtet werden.

II. UNTERSUCHUNG VON O. EDULIS-BESTÄNDEN MIT ERHÖHTER MORTALITÄT

Bei anormaler Mortalität in O. Edulis-Beständen sind umgehend Untersuchungen zur Feststellung der Krankheitsursache durchzuführen. In diesem Fall muß die Probe 100 Austern umfassen. Das Probematerial ist nach dem in Abschnitt I beschriebenen histologischen Analyseverfahren zu untersuchen. Diese Technik ist vorrangig, also vor anderen Untersuchungsverfahren anzuwenden.

Die Proben sind vorzugsweise mit Carson-Lösung zu fixieren, damit sie auch für eine elektronenmikroskopische Untersuchung wiederverwendet werden können.