BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 16 mei 1994

tot vaststelling van de bemonsteringsschema's en diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van bepaalde ziekten bij weekdieren

(Voor de EER relevante tekst)

(94/306/EG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 91/67/EEG van de Raad van 28 januari 1991 inzake veterinairrechtelijke voorschriften voor het in de handel brengen van aquacultuurdieren en aquacultuurprodukten [1], gewijzigd bij Richtlijn 93/54/EEG [2], en met name op artikel 15,

Overwegende dat met het oog op een uniforme toepassing van de in Richtlijn 91/67/EEG vastgestelde procedures bemonsteringsschema's en diagnostische methoden moeten worden vastgesteld die moeten worden toegepast om een kustgebied of kwekerij vrij van weekdierziekten te kunnen verklaren, en om bestanden te onderzoeken bij abnormale mortaliteit;

Overwegende dat het bij Besluit 81/651/EEG van de Commissie [3] ingestelde Wetenschappelijk Veterinair Comité is geraadpleegd;

Overwegende dat de in deze beschikking vastgestelde maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Veterinair Comité,

HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING GEGEVEN:

Artikel 1

De bemonsteringsschema's en diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van Bonamiosis (Bonamia ostreae) en Marteiliosis (Marteilia refringens) zijn vastgesteld in de bijlage.

Artikel 2

Deze beschikking is van toepassing met ingang van 1 juni 1994.

Artikel 3

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 16 mei 1994.

Voor de Commissie
René STEICHEN
Lid van de Commissie

---

[1] PB nr. L 46 van 19. 2. 1991, blz. 1.
[2] PB nr. L 175 van 19. 7. 1993, blz. 34.
[3] PB nr. L 233 van 19. 8. 1981, blz. 32.

BIJLAGE

I. BEMONSTERINGS- EN TESTMETHODEN VOOR DE CONTROLE OP BONAMIA OSTREAE EN MARTEILIA REFRINGENS BIJ OSTREA EDULIS

1. Bemonstering

1.1. *Bemonsteringspunten*

Voor elk in bijlage B, punt III, bij Richtlijn 91/67/EEG bedoeld gebied wordt een aantal bemonsteringspunten gekozen op zodanig wijze dat de kans op ontdekking van eventueel aanwezige Bonamia ostreae en/of Marteilia refringens maximaal is. Daartoe wordt ook rekening gehouden met factoren die van invloed zijn op de ontwikkeling van de ziekteverwekkers, bij voorbeeld de dichtheid van de bestanden, de waterstromen en de ontwikkelingscyclus van de weekdieren.

Per gebied moeten ten minste drie bemonsteringspunten worden gekozen. Het aantal punten moet worden verhoogd voor grotere zones met meerdere afzonderlijke percelen waar voor de ziekten vatbare soorten worden gekweekt.

Indien mogelijk moet ten minste één monster worden genomen op natuurlijke oesterbanken. Bij de bemonstering moeten weekdieren worden gekozen met afwijkingen (abnormale groei, openstaande kleppen).

1.2. *Bemonsteringsperiode en -frequentie*

Het tijdstip van de in bijlage B, punt III, B, 2, bij Richtlijn 91/67/EEG bedoelde controles wordt bepaald op basis van de periode waarin de ziekte zich manifesteert of kan worden vastgesteld ; de controles moeten na die periode plaatsvinden. Bij de bepaling van het tijdstip van de controles moet ook rekening worden gehouden met het overbrengen van de weekdieren, wat over het algemeen in het voor- en najaar plaatsvindt. Daarom moet de bemonstering worden verricht :

— eenmaal per jaar, na de zomerperiode, voor Marteilia refringens,

— tweemaal per jaar, in het voorjaar en in het najaar, voor Bonamia ostreae.

1.3. *Grootte van het monster*

In de controleperiode van twee jaar die voorafgaat aan het verwerven van de status van erkend gebied, moeten op elk bemonsteringspunt 150 dieren worden bemonsterd teneinde met een betrouwbaarheid van 95 % te garanderen dat het agens wordt ontdekt bij een besmettingsgraad van 2 %.

In de daaropvolgende jaren (behoud van de status van erkend gebied) kan het aantal eenheden in het monster tot 30 worden verminderd, teneinde met een betrouwbaarheid van 95 % te garanderen dat het agens wordt ontdekt bij een besmettingsgraad van 10 %.

2. Verzending van de monsters

Alle bemonsterde weekdieren moeten binnen 24 uur na bemonstering in het erkende laboratorium aankomen. Zij moeten verpakt zijn volgens de geldende normen om ze in goede staat te houden. Een etiket waarop plaats en datum van bemonstering alsmede de eventuele anamnese zijn vermeld, moet aan het monster zijn gehecht.

3. Macroscopisch onderzoek

De weekdieren moeten voorzichtig worden opengemaakt teneinde de weefsels, in het bijzonder de mantel, de kieuwen, het hart en de spijsverteringsklier niet te beschadigen. Afwijkingen en beschadigingen van het weefsel worden opgetekend.

4. Voorbewerking en onderzoek van monsters op Bonamiosis

4.1. *Immunofluorescentie*

4.1.1. Immunofluorescentie kan worden uitgevoerd op larven, op kleine en op volwassen oesters. Wanneer de monsters droog zijn, wordt van larven een papje gemaakt of wordt van hartweefsel op een glazen microscoopplaatje een afdrukpreparaat gemaakt. Na droging aan de lucht wordt dit gefixeerd door onderdompeling in aceton gedurende vijf tot tien minuten. Deze preparaten kunnen rechtstreeks gebruikt worden of bevoren worden bij $-20\,^{\circ}C$.

Bereid met toepassing van de door de leverancier aanbevolen verdunning een oplossing van monoklonale antilichamen in bufferoplossing (NaCl 8 g/l, KH_2 PO4 0,2 g/l, Na_2 HPO_4 $12H_2O$ 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, Azide Na 0,2 g/l, Tween pH 7,4).

Breng om de preparaten te bedekken 50 µl van de oplossing met een pipet in elk putje of op plaatjes over. Na incubatie gedurende 15 minuten bij 20 °C in een vochtige kamer, de plaatjes wassen met bovengenoemde bufferoplossing en vervolgens bedekken met een oplossing van geitantimuis- Ig G antilichamen (50 µl per putje), geconjugeerd met fluoresceïne-isothiocyanaat. Verdun deze oplossing van antilichamen volgens de gebruiksaanwijzing van de leverancier, en voeg aan de voor de verdunning gebruikte buffer Evans blue (1 %) toe.

Na incubatie gedurende 15 minuten bij 20 °C in een vochtige kamer, worden de preparaten in een glycerinebuffer geplaatst en onderzocht met een U/V-microscoop. Wanneer bolvormige, fluorescerende groene cellen worden waargenomen, is daardoor besmetting met Bonamia ostreae bevestigd.

Andere in specifieke laboratoria ontwikkelde tests met vergelijkbare resultaten mogen ook worden gebruikt.

4.2. *Bloeduitstrijkjes*

Voor larven en oesters worden de monsters eerst aan de lucht gedroogd en dan wordt van larven een papje gemaakt of wordt van hartweefsel een afdrukpreparaat gemaakt op een plaatje voor histologisch onderzoek. Na droging aan de lucht worden de plaatjes gefixeerd in methanol. De voorbewerkte larven en oesters worden gekleurd volgens een voor de gewenste kleur gebruikelijke standaardmethode. Na het kleuren worden de plaatjes afgespoeld met leidingwater, volledig gedroogd met koude of warme lucht en vastgezet met behulp van synthetische hars.

De parasiet (ter grootte van 2 micron) wordt geïdentificeerd aan de hand van zijn blauwe cytoplasma en rode kern. Hij kan voorkomen in en buiten de bloedcellen. Een observatietijd van vijf minuten per plaatje is voldoende.

4.3. *Histologie*

Voor het histologisch onderzoek wordt een coupe gemaakt uit hart, spijsverteringsklier en kieuwen ; de coupe wordt in een fixeervloeistof, bij voorbeeld Davidson, Bouin of Carson, geplaatst. Bij gebruik van Carson kunnen de monsters eventueel nog voor elektronenmicroscopie worden gebruikt. De verhouding tussen de monsterdeeltjes en de fixeervloeistof bedraagt 1 : 10.

Door diverse niet-specifieke kleuringen, bij voorbeeld Haematoxyline-Eosine of het driekleurenprocédé van Masson, kan Bonamia ostreae zichtbaar worden gemaakt. Dit zijn slechts enkele voorbeelden, er zijn nog andere methodes om te kleuren. Het verdient aanbeveling twee coupes per oester te onderzoeken.

De parasiet (ter grootte van 2 micron) wordt in vrije toestand aangetroffen in het bindweefsel of in de bloedcellen.

5. **Voorbewerking en onderzoek van monsters op Marteiliosis**

5.1. *Cytologisch onderzoek*

Voor het maken van de preparaten wordt een coupe gemaakt van de spijsverteringsklier ; het overtollige water wordt verwijderd door het monster op vloeipapier te leggen ; vervolgens wordt op het plaatje een afdrukpreparaat gemaakt van de coupe die door het spijsverteringskanaal loopt. Nadat de plaatjes aan de lucht zijn gedroogd, worden ze gefixeerd in methanol (twee tot drie minuten).

De voorbewerkte monsters worden gekleurd volgens een voor de gewenste kleur gebruikelijke standaardmethode. Na het kleuren worden de monsters afgespoeld met leidingwater, volledig gedroogd met koude of warme lucht en vastgezet met behulp van synthetische hars.

De parasiet, die in het vroege ontwikkelingsstadium 5 à 8 micron meet, kan gedurende de sporulatie tot 40 micron uitgroeien. Het cytoplasma van de cellen krijgt een meer of minder hevig blauwe kleur terwijl de kern felrood is. De secundaire cellen of sporoblasten zijn omgeven door een heldere halo. Een observatietijd van vijf minuten per plaatje is voldoende.

5.2. *Histologisch onderzoek*

Om de histologische coupes te maken, wordt de spijsverteringsklier met een kleine schaar doorgeknipt, waarna het monster in een fixeervloeistof, bij voorbeeld Davidson, Bouin of Carson, wordt geplaatst. Bij gebruik van Carson kunnen de monsters eventueel nog voor elektronenmicroscopie worden gebruikt. De verhouding tussen de weefseldeeltjes en de fixeervloeistof bedraagt ten hoogste 1 : 10. Verder worden de monsters behandeld volgens de klassieke histologische methoden. Door diverse kleuringen, bij voorbeeld Haematoxyline-Eosine of het driekleurenprocédé van Masson, kan Marteilia refringens zichtbaar worden gemaakt. Deze opsomming is niet volledig ; andere kleurprocédés zijn mogelijk. Het verdient aanbeveling twee coupes per oester te onderzoeken.

Marteilia in het beginstadium wordt aangetroffen in het epitheel van de maag ; de verder gevorderde stadia kunnen worden aangetroffen in het epitheel van de divertikels van het spijsverteringsstelsel. Ook kunnen sporangia vrij voorkomen in het lumen van de ingewanden.

II. ONDERZOEK VAN BESTANDEN VAN OSTREA EDULIS BIJ ABNORMALE MORTALITEIT

Bij abnormale mortaliteit in bestanden van Ostrea edulis, moet een urgentieprocedure op gang worden gebracht om de etiologie van het verschijnsel te bepalen.

In dat geval moet het monster bestaan uit 100 oesters. Het monster moet behandeld worden volgens de in deel I voor het histologisch onderzoek vastgestelde procedure. Deze techniek moet worden toegepast voordat onderzoek van enig ander type wordt uitgevoerd.

Om de monsters te fixeren wordt bij voorkeur Carson-fixeervloeistof gebruikt omdat het monster in dat geval nog gebruikt kan worden voor elektronenmicroscopie.