# KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 16. maj 1994

om prøveudtagningsplaner og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af visse sygdomme hos bløddyr

(Tekst af betydning for EØS)

(94/306/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 91/67/EØF af 28. januar 1991 om dyresundhedsmæssige betingelser for afsætning af akvakulturdyr og -produkter [1], ændret ved direktiv 93/54/EØF [2], særlig artikel 15, og

ud fra følgende betragtninger:

Det er med henblik på ensartet anvendelse af procedurerne i direktiv 91/67/EØF nødvendigt at fastlægge prøveudtagningsplaner og diagnosticeringsmetoder, der skal anvendes for at erklære en kystzone eller en farm fri for sygdomme, som rammer bløddyr, og for undersøgelse af bestande med abnorm dødelighed;

Den Videnskabelige Veterinærkomité, der blev nedsat ved Kommissionens afgørelse 81/651/EØF [3], er blevet hørt;

de i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Veterinærkomité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

*Artikel 1*

Prøveudtagnings- og diagnosticeringsmetoderne til påvisning og bekræftelse af bonamiose *(Bonamia ostraea)* og marteiliose *(Marteilia refringens)* er fastlagt i bilaget.

*Artikel 2*

Denne beslutning anvendes fra den 1. juni 1994.

*Artikel 3*

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 16. maj 1994.

*På Kommissionens vegne*

René STEICHEN

*Medlem af Kommissionen*

---

[1] EFT nr. L 46 af 19. 2. 1991, s. 1.
[2] EFT nr. L 175 af 19. 7. 1993, s. 34.
[3] EFT nr. L 233 af 19. 8. 1981, s. 32.

*BILAG*

## I. PRØVEUDTAGNINGS- OG TESTMETODER TIL OVERVÅGNING AF BONAMIA OSTRAEA OG MARTEILIA REFRINGENS I OSTREA EDULIS

### 1. Prøveudtagning

1.1. *Prøveudtagningssteder*

Der udvælges for hver af de zoner, der omhandles i bilag B, punkt III, til direktiv 91/67/EØF, et antal prøveudtagningssteder, der vil give størst mulighed for at opdage eventuel tildstedeværelse af Bonamia ostreae og/eller Marteilia refringens. Med henblik herpå benyttes parametre, som har indflydelse på udviklingen af sygdomssagen, f.eks. populationstæthed, vandstrømme og bløddyrets udviklingscyklus.

Der udvælges for en given zone mindst tre prøveudtagningssteder. Antallet af prøveudtagningssteder øges for omfattende zoner med flere, adskilte områder, hvor der opdrættes modtagelige arter.

Hvis det er muligt, udtages der mindst en prøve fra naturlige banker. Valget skal falde på bløddyr, der visser abnormiteter (unormal vækst, åbne skaller).

1.2. *Prøveudtagningstidspunkt og -hyppighed*

Hyppigheden af den kontrol, der omhandles i bilag B, punkt II A 2, til direktiv 91/67/EØF, afhænger af den periode, hvori sygdommen har manifesteret sig eller kan påvises, og kontrollen må finde sted derefter. Ved tilrettelæggelsen af kontrollen tages der også hensyn til omflytningen af bløddyrene, som normalt finder sted i foråret og efteråret. Følgelig bør der udtages prøver

— en gang om året efter sommerperioden for Marteilia refringens

— to gange om året (forår/efterår) for Bonamia ostreae.

1.3. *Prøvestørrelse*

I den indledende toårige kontrolperiode, som går forud for opnåelse af status som godkendt, er prøvestørrelsen for hvert prøveudtagningssted 150 for at sikre påvisning med en konfidens på 95 % for smittebærerne ved en almindelig sygdomsforekomst på 2 %.

I de efterfølgende år (bevarelse af status som godkendt) kan prøvestørrelsen nedsættes til 30 til at sikre påvisning med en konfidens på 95 % for smittebærerne ved en almindelig sygdomsforekomst på 10 %.

### 2. Indsendelse af prøver

Alle udtagne bløddyr skal ankomme til det godkendte laboratorium inden 24 timer efter prøveudtagningen. De skal indpakkes efter almindelige normer for at holde dem i god stand. En etiket med angivelse af prøveudtagningsstedet, prøveudtagningsdatoen og eventuelle bemærkninger påsættes prøven.

### 3. Makroskopisk undersøgelse

Bløddyrene skal åbnes forsigtigt, så vævene ikke beskadiges, navnlig ikke kappen, gællerne, hjertet og fordøjelseskirtlen. Abnormiteter og vævslæsioner noteres.

### 4. Tilberedning og undersøgelse af prøver for bonamiose

4.1. *Immunofluorescens*

4.1.1. Immunofluorescens kan foretages på larver, små østers og voksne østers. Efter tørring af prøven moses larverne, eller hjertevævet udstryges på et objektglas. Objektglasset lufttørres og fikseres ved neddypning i acetone 5 til 10 min. Sådanne tilberedninger kan bruges direkte eller nedfryses til −20 °C.

Der tilberedes en opløsning af monoklonale antistoffer i bufferopløsning (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) fortyndet i henhold til leverandørens anvisninger.

50 µl af opløsningen pipetteres i hvert hul eller på objektglas, så udstyringerne dækkes. Efter inkubering i fugtkammer i 15 min., ved 20 °C vaskes objektglassene med ovennævnte bufferopløsning og dækkes herefter med en opløsning af gedeantistoffer mod mus og G antistof (50 µl pr. hul) konjugeret med fluorescerende istothiocyanat. Antistofopløsningen fortyndes i henhold til leverandørens anvisninger, og der tilsættes Evans-blåt (1 %) til den buffer, som er anvendt til fortynding.

Efter inkubering i fugtkammer i 15 min. ved 20 °C anbringes tilberedningerne i en glycerinbuffer og undersøges ved U/V-mikroskopi.

Tilstedeværelse af kuglerunde celler, der er fluorescerende grønne, bekræfter infektion med Bonamia ostreae.

Andre prøver, som forskellige laboratorier har udviklet, og som giver sammenlignelige resultater, kan også benyttes.

4.2. *Udstrygningspræparater af blod*

For larver og østers : efter lufttørring af prøverne moses larverne, eller hjertevævet udstryges på et histologisk objektglas. Objektglassene lufttørres og fikseres derefter i metanol.

De tilberedte larver og østers farves efter de standardmetoder, der normalt benyttes i forbindelse med den pågældende farve. Efter farvningen skylles glassene med ledningsvand og henstår til fuldstændig tørring i kold eller varm luft, hvorefter de monteres ved hjælp af kunstharpiks.

Parasitten (størrelse : 2 mikrometer) identificeres ved det blå cytoplasma og den røde kerne. Den kan iagttages i hæmatocytterne eller uden for disse. En observationstid på 5 min. pr. objektglas er tilstrækkelig.

4.3. *Histologi*

Til den histologiske undersøgelse tages en sektion (»bøf«) af østersen ved snit gennem hjerte, fordøjelseskirtel og gæller, og prøven anbringes i fikservæske som Davidson's, Bouin's eller Carson's ; sidstnævnte gør det muligt at genbruge prøverne senere til elektromikroskopi, hvis påkrævet. Forholdet på 1 : 10 mellem prøvens volumen og fiskervæskens volumen skal overholdes.

Flere uspecifikke farvemetoder som f.eks. Hæmatoxylin-Eosin eller Masson's trikromasi gør det muligt at visualisere Bonamia ostreae. Disse eksempler er ikke udtømmende, og der kan benyttes andre farvningsmetoder. Det anbefales at undersøge to sektioner pr. østers.

Parasitten (størrelse : 2 mikrometer) visualiseres tydeligt i bindevævet eller i hæmatocytterne.

5. **Tilberedning og undersøgelse af prøver for marteiliose**

5.1. *Cytologisk undersøgelse*

Til udstrygninger tages en sektion ved snit gennem fordøjelseskirtlen og gællerne. Det overskydende vand fjernes ved, at prøven anbringes på trækpapir, hvorefter den sektion, der passerer gennem fordøjelseskanalen, udstryges på objektglasset. Efter lufttøring fikseres objektglassene i metanol (2-3 min.).

De tilberedte prøver farves efter de standardmetoder, der normalt benyttes i forbindelse med den pågældende farve. Efter farvningen skylles objektglassene med ledningsvand og henstår til fuldstændig tørring i kold eller varm luft, hvorefter de monteres ved hjælp af kunstharpiks.

Parasitten, der er 5 til 8 mikrometer stor i de første udviklingsstadier, kan komme op på 40 mikrometer under sporedannelsen. Cellernes cytoplasma bliver mere eller mindre strækt blåt, og kernen bliver kraftigt rød. De sekundære celler eller sporoblasterne er omkranset af en opklaring. En observationstid på 5 min. pr. objektglas er tilstrækkelig.

5.2. *Histologisk undersøgelse*

Til den histologiske undersøgelse tages en sektion ved snit gennem fordøjelseskirtlen ved brug af en lille saks, og prøven anbringes i fikservæske som f.eks. Davidson's, Bouin's eller Carson's ; i sidstnævnte tilfælde kan prøverne genbruges senere til elektronmikroskopi, hvis påkrævet. Forholdet mellem vævets volumen og fikservæskens volumen må ikke være over 1 : 10.

Prøverne håndteres derpå efter klassiske, histologiske metoder. Flere farvemetoder gør det muligt at iagttage Marteilia refringens som f.eks. Hæmatoxylin-Eosin eller Masson's trikromasi. Disse eksempler er ikke udtømmende, og der kan benyttes andre farvningsmetoder. Det anbefales at undersøge to sektioner pr. østers.

De tidlige stadier af Marteilia er til stede i mavens epitel, mens de senere udviklingsstadier kan findes i tarmdivertiklens epitel. Frie sporehuse kan også iagttages i tarmens lumen.

## II. UNDERSØGELSE AF BESTANDE AF OSTREA EDULIS MED ABNORM DØDELIGHED

Hvis der forekommer abnorm dødelighed i bestande af Ostrea edulis, skal der straks foretages undersøgelse for at bestemme ætiologien.

Den prøve, der tages, skal bestå af 100 østersindivider. Prøven håndteres efter den metode, der er fastlagt for histologisk undersøgelse i afsnit I. Denne metode skal bruges i første række, inden der benyttes nogen anden form for undersøgelse.

Prøverne fikseres — helst i Carson's fikservæske, som gør det muligt at genbruge prøven til elektronmikroskopi.