ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 16ης Μαΐου 1994

για τη θέσπιση των σχεδίων δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων όσον αφορά την ανίχνευση και επιβεβαίωση της παρουσίας ορισμένων ασθενειών των μαλακίων

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(94/306/ΕΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 91/67/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 28ης Ιανουαρίου 1991 σχετικά με τους όρους υγειονομικού ελέγχου που διέπουν τη διάθεση στην αγορά ζώων και προϊόντων της υδατοκαλλιέργειας [1], και ιδίως το άρθρο 15, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 93/54/ΕΟΚ [2],

Εκτιμώντας:

ότι, για να εξασφαλισθεί η ενιαία εφαρμογή των διαδικασιών που θεσπίζονται στην οδηγία 91/67/ΕΟΚ, πρέπει να καθοριστούν τα σχέδια δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι που θα τεθούν σε εφαρμογή για να δηλωθεί μια παράκτιος περιοχή ή μια εκτροφή ως απαλλαγμένη από τις ασθένειες που πλήττουν τα μαλάκια, και για να εξετασθούν τα αποθέματα όπου παρατηρείται αφύσικη θνησιμότητα·

ότι ζητήθηκε η γνώμη της επιστημονικής κτηνιατρικής επιτροπής που έχει συσταθεί με την απόφαση 81/651/ΕΟΚ της Επιτροπής [3]·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μόνιμης Κτηνιατρικής Επιτροπής,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Οι δειγματοληπτικές και διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και επιβεβαίωση της βοναμιώσεως *(Bonamia Ostreae)* και μαρτειλιώσεως *(Matreilia refringens)* ορίζονται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση εφαρμόζεται από την 1η Ιουνίου 1994.

Άρθρο 3

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 16 Μαΐου 1994.

Για την Επιτροπή

René STEICHEN

Μέλος της Επιτροπής

---

(1) ΕΕ αριθ. L 46 της 19. 2. 1991, σ. 1.
(2) ΕΕ αριθ. L 175 της 19. 7. 1993, σ. 34.
(3) ΕΕ αριθ. L 233 της 19. 8. 1981, σ. 32.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ BONAMIA OSTREAE ΚΑΙ MARTEILIA REFRIGENS ΣΤΟ OSTREA EDULIS

1. **Δειγματοληψία**

1.1. *Σημεία δειγματοληψίας*

Για καθεμία από τις ζώνες στις οποίες αναφέρεται στο παράρτημα Β σημείο ΙΙΙ της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ, θα επιλέγεται ένας αριθμός σημείων δειγματοληψίας ώστε να υπάρχουν όσο το δυνατό περισσότερες πιθανότητες ανίχνευσης της παρουσίας της Bonamia ostreae, και της Marteila refringens σε περίπτωση που είναι παρούσα η μία από αυτές τις νόσους, ή αμφότερες· για το σκοπό αυτό, λαμβάνονται υπόψη παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών όπως είναι η πυκνότητα του ζωικού κεφαλαίου, η ροή των υδάτων και ο κύκλος αναπτύξεως των μαλακίων.

Για μια δεδομένη ζώνη πρέπει να επιλεγούν τουλάχιστον τρία σημεία δειγματοληψίας. Ο αριθμός των σημείων αυξάνεται εφόσον πρόκειται για ευρύτερες ζώνες που περιλαμβάνουν πολλές περιοχές στις οποίες καλλιεργούνται τα εν λόγω είδη.

Στο βαθμό του δυνατού πρέπει να λαμβάνεται, τουλάχιστον ένα δείγμα από φυσικές κοίτες. Επιλέγονται τα μαλάκια που παρουσιάζουν ανωμαλίες (υπερφυσικό μέγεθος, ανοικτό κέλυφος).

1.2. *Περίοδος και συχνότητα δειγματοληψίας*

Η συχνότητα του ελέγχου που αναφέρεται στο παράρτημα Β σημείο ΙΙΙ Β2 της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ, βασίζεται στο χρονικό διάστημα κατά το οποίο η νόσος είναι έκδηλη, ή είναι δυνατόν να ανιχνευθεί και, επομένως, οι έλεγχοι πρέπει να διενεργούνται μετά την πάροδο του εν λόγω χρονικού διαστήματος. Για τον καθορισμό της συχνότητας των ελέγχων, λαμβάνεται επίσης υπόψη τη μεταφορά μαλακίων, η οποία πραγματοποιείται συνήθως την άνοιξη και το φθινόπωρο. Ως εκ τούτου, η δειγματοληψία πρέπει να διενεργείται:

— μία φορά το χρόνο, μετά το καλοκαίρι, για τη Marteila refringens,

— δύο φορές το χρόνο (άνοιξη/φθινόπωρο) για τη Bonamia ostreae.

1.3. *Μέγεθος του δείγματος*

Κατά την αρχική διετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της επίτευξης του εγκριθέντος καθεστώτος, το μέγεθος του δείγματος για κάθε σημείο δειγματοληψίας είναι περίπου 150, προκειμένου να διασφαλιστεί η ανίχνευση, με βαθμό εμπιστοσύνης 95 %, φορέων παθογόνων οργανισμών που εμφανίζουν συχνότητα 2 %.

Τα επόμενα έτη (διατήρηση του εγκεκριμένου καθεστώτος) το μέγεθος του δείγματος μπορεί να μειωθεί σε 30 προκειμένου να διασφαλιστεί η ανίχνευση με βαθμό εμπιστοσύνης 95 % των φορέων παθογόνων που εμφανίζουν συχνότητα 10 %.

2. **Αποστολή δειγμάτων**

Όλα τα δείγματα μαλακίων πρέπει να βρίσκονται στο εγκεκριμένο εργαστήριο εντός 24 ωρών από τη λήψη τους. Πρέπει να είναι συσκευασμένα σύμφωνα με τα ισχύοντα πρότυπα προκειμένου να διατηρούνται σε καλή κατάσταση. Στο δείγμα επισυνάπτεται ετικέτα στην οποία αναγράφεται ο τόπος δειγματοληψίας, η ημερομηνία και το ιστορικό (αν υπάρχει).

3. **Μακροσκοπική εξέταση**

Τα μαλάκια πρέπει να ανοίγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην προκαλείται ζημία στους ιστούς, κυρίως στο μανδύα, τα βράγχια, την καρδιά και τον πεπτικό αδένα. Ανωμαλίες και κακώσεις πρέπει να σημειώνονται.

4. **Προετοιμασία και εξέταση δειγμάτων για τη βοναμίωση**

4.1. *Ανοσοφθορισμός*

4.1.1. Ο ανοσοφθορισμός μπορεί να διενεργείται σε νύμφες, μικρά στρείδια και στρείδια μεγαλύτερης ηλικίας. Μετά την ξήρανση των δειγμάτων, συνθλίβονται οι νύμφες ή πραγματοποιείται αποτυπωτικό επίχρισμα του καρδιακού ιστού σε γυάλινη πλάκα μικροσκοπίου. Ξηραίνεται στον αέρα και σταθεροποιείται με εμβάπτιση σε ακετόνη για 5 έως 10 λεπτά. Το παρασκεύασμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως και να ψυχθεί σε – 20° C.

Παρασκευάστε διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα (NaCl 8g/l, KH_2 PO4 0,2g/l, Na_2 HPO_4 $12H_2O$ 2,9g/l, KCl 0,2g/l, Διπλό pH 7,4), με τη χρήση της αραίωσης που συνιστάται από τον προμηθευτή.

Εγχύσατε με πιπέτα 50 μl του διαλύματος σε κάθε κυψελίδα ή στις πλάκες για να καλύψετε τα επιχρίσματα. Μετά από επώαση σε υγρό θάλαμο επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία 20° C, πλύνατε τις πλάκες με το ως άνω ρυθμιστικό διάλυμα και έπειτα καλύψατε με διάλυμα αντισωμάτων αιγός κατά ποντικού 1g G (50 μl ανά κυψελίδα) σε συνδυασμό με ισοθειονυανική φθορίζουσα ουσία. Αραιώσατε το διάλυμα των αντισωμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή και προσθέσατε χρωστική Evans blue κατά 1 % στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αραίωση.

Μετά την επώαση σε υγρό θάλαμο επί 15 λεπτά σε 20° C, τα παρασκευάσματα τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης και εξετάζονται με μικροσκόπιο U/V.

Αν παρατηρηθούν φθορίζοντα πράσινα σφαιρικά κύτταρα, αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη μόλυνσης Bonamia ostreae.

Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν άλλες δοκιμές που έχουν αναπτυχθεί σε συγκεκριμένα εργαστήρια και παρουσιάζουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

4.2. *Επιχρίσματα με αίμα*

Για τις νύμφες και τα στρείδια, μετά την ξήρανση των δειγμάτων στον αέρα, κάνουμε σύνθλιψη για τις νύμφες ή αποτυπωτικό επίχρισμα των καρδιακών ιστών σε ιστολογική πλάκα. Οι πλάκες ξηραίνονται στον αέρα και ύστερα σταθεροποιούνται σε μεθανόλη.

Ακολουθεί χρώση των παρασκευασμάτων νυμφών και στρειδιών σύμφωνα με τις ακόλουθες τυποποιημένες μεθόδους για τη συγκεκριμένη χρώση. Μετά την εμβάπτιση ξεπλένουμε με νερό της βρύσης, τα αφήνουμε να ξηρανθούν πλήρως σε ρεύμα ψυχρού ή θερμού αέρα και στερεώνουμε χρησιμοποιώντας συνθετική ρητίνη.

Το παράσιτο (μέγεθος 2 μικρόμετρα) αναγνωρίζεται από το κυανούν το κυτταροπλασμάτου και τον ερυθρό πυρήνα του. Δύναται να παρατηρηθεί εντός ή εκτός των αιματοκυττάρων. Χρόνος παρατήρησης 5 λεπτών επαρκεί για την εξέταση αυτή.

4.3. *Ιστολογία*

Προκειμένου να γίνει η ιστολογική εξέταση, αφαιρούμε τμήμα (φιλέτο) από την καρδιά, τον πεπτικό αδένα και βράγχια και τοποθετούμε το δείγμα σε σταθεροποιητικό υγρό όπως αυτό του Davidson, του Bouin ή του Carson · το τελευταίο διευκολύνει την εξέταση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όταν χρειάζεται. Πρέπει να τηρείται αναλογία 1 προς 10 μεταξύ του όγκου των δειγμάτων και του όγκου του στεθεροποιητικού υγρού.

Πολλές μη ειδικές χρώσεις, όπως π.χ. Haematoxylin-Eosine ή τριχρωματική μέθοδος του Masson, διευκολύνουν την εμφάνιση της Bonamia ostreae. Τα παραδείγματα αυτά δεν είναι περιοριστικά και είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται άλλες χρωστικές μέθοδοι. Συστήνεται η εξέταση δύο τομών ανά στρείδι.

Το παράσιτο (μεγέθους 2 μικρομέτρων) εμφανίζεται ελεύθερο στο συνδετικό ιστό ή στα αιματοκύτταρα.

5. **Παρασκευή και εξέταση των δειγμάτων για τη μαρτειλίωση**

5.1. *Κυτταρολογική εξέταση*

Προκειμένου να εξεταστούν τα επιχρίσματα: αφαιρούμε τμήμα από τον πεπτικό αδένα και βράγχια, απομακρύνουμε το επιπλέον νερό τοποθετώντας το δείγμα σε απορροφητικό χαρτί, έπειτα πραγματοποιούμε αποτυπωτικό επίχρισμα στο πλακίδιο χρησιμοποιώντας το δείγμα που αντιστοιχεί στην τομή του πεπτικού συστήματος. Τα πλακίδια, αφού ξεραθούν στον αέρα σταθεροποιούνται σε μεθανόλη (2 έως 3 λεπτά).

Πραγματοποιείται χρώση των παρασκευασθέντων δειγμάτων σύμφωνα με τις συνήθεις τυποποιημένες μεθόδους για τη συγκεκριμένη χρώση. Μετά την εμβάπτιση ξεπλένουμε με νερό της βρύσης, τα αφήνουμε να ξηρανθούν πλήρως σε ρεύμα ψυχρού ή θερμού αέρα και στερεώνονται χρησιμοποιώντας συνθετική ρητίνη.

Το παράσιτο, το μέγεθος του οποίου στα αρχικά στάδια ανάπτυξής του είναι 5 έως 8 μικρόμετρα, μπορεί να φτάσει τα 40 μικρόμετρα κατά το στάδιο της σποριογένεσης. Το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται κυανό περισσότερο ή λιγότερο έντονο, ενώ ο πυρήνας έχει έντονο ερυθρό χρωματισμό. Τα δευτερεύοντα κύτταρα ή σποροβλάστες περιβάλλονται από φωτεινή άλω. Ο χρόνος παρατήρησης 5 λεπτών ανά αντικειμενοφόρα πλάκα είναι ικανοποιητικός.

5.2. *Ιστολογική εξέταση*

Προκειμένου να γίνει ιστολογική εξέταση, αφαιρούμε τμήμα από τον πεπτικό αδένα, χρησιμοποιώντας μικρό ψαλίδι και τοποθετούμε το δείγμα σε σταθεροποιητικό υγρό όπως είναι το Davidson, Bouin ή Carson · το τελευταίο διευκολύνει την εξέταση των δειγμάτων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όταν χρειάζεται. Πρέπει να τηρείται αναλογία πάνω από 1 προς 10 μεταξύ του ιστού και του όγκου του σταθεροποιητικού υγρού.

Τα δείγματα χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις κλασικές ιστολογικές μεθόδους. Πολλές χρώσεις, όπως π.χ. Haematoxylin-Eosine, ή τριχρωματική μέθοδος του Masson, επιτρέπουν να παρατηρηθεί η Marteilia refrigens. Τα παραδείγματα αυτά δεν είναι περιοριστικά και είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται άλλες χρωστικές μέθοδοι. Συστήνεται η εξέταση δύο τομών ανά στρείδι.

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξής της η μαρτειλίωση εμφανίζεται στο επιθήλιο του στομάχου, ενώ σε επόμενα στάδια ανάπτυξης παρουσιάζεται στο επιθήλιο των εκκολπωμάτων του πεπτικού συστήματος. Ελεύθερα σποριαγγεία μπορούν να εντοπισθούν στον αυλό του εντέρου.

II. ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Όταν παρατηρείται μη φυσιολογική θνησιμότητα σε αποθέματα O. edulis πρέπει να διεξαχθεί επείγουσα διαδικασία για τον προσδιορισμό της αιτιολογίας του φαινομένου.

Στην περίπτωση αυτή, το μέγεθος του λαμβανομένου δείγματος πρέπει να αποτελείται από 100 μεμονωμένα στρείδια. Το δείγμα πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τη διαδικασία που ορίζεται για την ιστολογική ανάλυση στο κεφάλαιο I. Η τεχνική αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται καταρχήν πριν πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε άλλη εξέταση.

Τα δείγματα σταθεροποιούνται, κατά προτίμηση με τη χρησιμοποίηση σταθεροποιητικού υγρού Carson το οποίο επίσης επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση του δείγματος για εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.