394D0306

KOMISSION PÄÄTÖS,

tehty 16 päivänä toukokuuta 1994,

näytteenottosuunnitelmista ja taudinmääritysmenetelmistä tiettyjen nilviäisten tautien havaitsemiseksi ja niiden esiintymisen varmistamiseksi

(ETA:n kannalta merkityksellinen)

(94/306/EY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon eläinten terveyttä koskevista edellytyksistä saatettaessa vesiviljeltyjä eläimiä ja tuotteita markkinoille 28 päivänä tammikuuta 1991 annetun neuvoston direktiivin 91/67/ETY([1]), sellaisena kuin se on muutettuna direktiivillä 93/54/ETY([2]), ja erityisesti sen 15 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 91/67/ETY säädettyjen menettelyjen yhdenmukaisen soveltamisen varmistamiseksi olisi laadittava näytteenottosuunnitelmia ja taudinmääritysmenetelmiä, joiden avulla voidaan vahvistaa rannikkoalue tai viljelylaitos vapaaksi nilviäisissä esiintyvistä taudeista ja tarkastaa kannat alueilla, joilla on todettu tavanomaisesta poikkeavaa kuolleisuutta,

komission päätöksellä 81/651/ETY([3]) perustettua eläinlääkintäalan tiedekomiteaa on kuultu, ja

tässä päätöksessä määrätyt toimenpiteet ovat pysyvän eläinlääkintäkomitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Näytteenotto- ja taudinmääritysmenetelmät bonamioosin *(Bonamia ostreae)* ja marteilioosin *(Marteilia refringens)* havaitsemiseksi ja niiden esiintymisen varmistamiseksi määritellään liitteessä.

2 artikla

Tätä päätöstä sovelletaan 1 päivästä kesäkuuta 1994.

3 artikla

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 16 päivänä toukokuuta 1994.

Komission puolesta

René STEICHEN

Komission jäsen

([1]) EYVL N:o L 46, 19.2.1991, s. 1
([2]) EYVL N:o L 175, 19.7.1993, s. 34
([3]) EYVL N:o L 233, 19.8.1981, s. 32

LIITE

I NÄYTTEENOTTO- JA KOEMENETTELYT *BONAMIA OSTREAEN* JA *MARTEILIA REFRINGENSIN* ESIINTYMISEN TARKKAILEMISEKSI *OSTREA EDULIS* -LAJISSA

1 Näytteenotto

1.1 *Näytteenottopaikat*

Kultakin direktiivin 91/67/ETY liitteessä B olevassa III kohdassa tarkoitetulta vyöhykkeeltä olisi valittava joitakin näytteenottopaikkoja siten, että *Bonamia ostreaen* ja *Marteilia refringensin* havaitsemisen mahdollisuudet ovat mahdollisimman suuret, jos toista tai kumpaakin niistä esiintyy. Tätä varten on otettava huomioon taudinaiheuttajien kehitykseen vaikuttavat tekijät, kuten kannan tiheys, virtaukset ja nilviäisten elinkierto.

Kultakin vyöhykkeeltä on valittava vähintään kolme näytteenottopaikkaa. Paikkojen määrää on lisättävä sellaisten suurten vyöhykkeiden osalta, joihin kuuluu useita erillisiä kyseisten lajien viljelyalueita.

Aina kun on mahdollista, on syytä ottaa vähintään yksi näyte luonnonvaraisista kannoista. Tähän tarkoitukseen on valittava nilviäisiä, joissa esiintyy poikkeavuuksia (poikkeava kasvu, auennut kuori).

1.2 *Näytteenottoaika ja -tiheys*

Direktiivin 91/67/ETY liitteessä B olevassa III. B.2 kohdassa tarkoitettujen tarkastusten tiheys vahvistetaan sen ajan perusteella, jona tauti on selvästi nähtävissä tai havaittavissa; tarkastuskäynnit on tehtävä tämän jakson jälkeen. Tarkastusten ajankohtia määritettäessä on otettava huomioon myös nilviäisten siirrot, jotka yleensä tapahtuvat keväällä ja syksyllä. Näytteet on siten otettava:

— *Marteilia refringensin* osalta kerran vuodessa loppukesällä,

— *Bonamia ostreaen* osalta kaksi kertaa vuodessa (keväällä ja syksyllä).

1.3 *Näytteiden koko*

Hyväksynnän myöntämistä edeltävän kahden vuoden mittaisen tarkkailuajan kuluessa kultakin paikalta otettava näyte on 150 yksilön suuruinen, jolloin havaitsemisen luotettavuustaso on 95 prosenttia taudinkantajien esiintyvyyden ollessa 2 prosenttia.

Seuraavien vuosien kuluessa (hyväksynnän säilyttäminen) näytteen kokoa voidaan pienentää 30 yksilöön, jolloin havaitsemisen luotettavuustaso on 95 prosenttia taudinkantajien esiintyvyyden ollessa 10 prosenttia.

2 Näytteiden kuljetus

Kaikkien nilviäisnäytteiden on saavuttava hyväksyttyyn laboratorioon vuorokauden kuluessa niiden keräämisestä. Ne on pakattava voimassaolevien standardien mukaisesti, jotta ne pysyvät hyvässä kunnossa. Näytteeseen on kiinnitettävä nimilappu, josta ilmenee näytteenottopaikka, päivämäärä ja (mahdollisesti) tiedot aikaisemmista kokeista.

3 Silmämääräinen tutkimus

Nilviäiset on avattava varovasti välttäen kudosten, erityisesti vaipan, kidusten, sydämen ja ruuansulatusrauhasen vahingoittamista. Poikkeavuudet ja kudosten vauriot merkitään muistiin.

4 Näytteiden esikäsittely ja tutkiminen bonamioosin havaitsemiseksi

4.1 *Immunofluoresenssi*

4.1.1 Immunofluoresenssikoe voidaan suorittaa toukille, nuorille ostereille ja täysikasvuisille ostereille. Näytteiden kuivaamisen jälkeen toukat murskataan tai sivellään sydänkudosta mikroskoopin lasilevylle. Kuivataan ilmassa ja kiinnitetään upottamalla asetoniin 5–10 minuutin ajaksi. Nämä preparaatit voidaan käyttää heti tai jäädyttää – 20 °C:n lämpötilassa.

Valmistetaan monokloonisista vasta-aineista liuos puskuriliuokseen (NaCl 8 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, Na_2HPO_4 $12H_2O$ 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, Na-atsidi 0,2 g/l, Tween pH 7,4) käyttäen toimittajan suosittelemaa laimennosta.

Pipetoidaan joka seen syvennykseen tai levyille 50 µl liuosta siten, että näyte peittyy. Inkuboidaan kosteassa tilassa 20 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan, minkä jälkeen levyt pestään edellä mainitulla puskuriliuoksella ja peitetään sitten vuohen hiirivasta-aineliuoksella Lg G (50 µl syvennystä kohti), joka on konjugoitu fluoreseiini-isotiosyanaatin kanssa. Laimennetaan vasta-aineliuos toimittajan suositusten mukaisesti ja lisätään Evansin sinistä (1 %) laimennuksessa käytettyyn puskuriliuokseen.

Preparaatteja inkuboidaan kosteassa tilassa 20 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan, minkä jälkeen ne asetetaan glyserolipuskuriliuokseen ja tutkitaan U/V-mikroskoopin avulla.

Pallomaisten, hohtavan vihreiden solujen esiintyminen varmistaa *Bonamia ostreae* -tartunnan.

Myös muita laboratorioiden kehittämiä, vastaavia tuloksia antavia kokeita voidaan käyttää.

4.2 *Veren sivelykokeet*

Toukkien ja ostereiden tutkimiseksi näytteiden ilmakuivauksen jälkeen toukat murskataan tai sydänkudosta sivellään histologiselle levylle. Levyt kuivataan ilmassa ja kiinnitetään sitten metanolissa.

Esikäsitellyt toukat ja osterit värjätään tavanomaisten standardimenetelmien mukaisesti. Tämän jälkeen ne huuhdotaan vesijohtovedellä ja annetaan täysin kuivua kylmässä tai kuumassa ilmassa ennen niiden kiinnittämistä paikoilleen synteettisen hartsin avulla.

Loinen (koltaan 2 mikronia) voidaan tunnistaa sen sinisestä solulimasta, jossa on punainen tuma. Se voidaan havaita verisolujen sisä- tai ulkopuolella. Tätä tutkimusta varten kunkin levyn tarkasteluun riittää 5 minuuttia.

4.3 *Histologia*

Histologista tutkimusta varten osteri leikataan sydämen, ruuansulatusrauhasen ja kidusten poikki ja asetetaan näyte kiinnitysnesteeseen, esimerkiksi Davidsonin, Bouinin tai Carsonin nesteeseen, joista viimeksi mainitun avulla on mahdollista tarvittaessa tutkia näytteitä elektronimikroskoopilla. Näytteen koon ja kiinnitysnesteen määrän suhteen on oltava 1:10.

Bonamia ostreae saadaan näkyviin usean epäspesifisen väriaineen, kuten hematoksyliini-eosiinin tai Massonin kolmivärimenetelmän avulla. Nämä esimerkit eivät ole rajoittavia ja muita värjäysmenetelmiä voidaan käyttää. Kustakin osterista on suotavaa tutkia kaksi koepalaa.

Loinen (kooltaan 2 mikronia) näkyy vapaana sidekudoksessa tai verisoluissa.

5 **Näytteiden esikäsittely ja tutkiminen marteilioosin havaitsemiseksi**

5.1 *Sytologinen tutkimus*

Sivelynäytteiden valmistamiseksi leikataan ruuansulatusrauhasen ja kidusten poikki, ylimääräinen vesi poistetaan asettamalla näyte imupaperille, minkä jälkeen otetaan sivelynäyte ruuansulatusjärjestelmän poikki tehdystä viillosta. Levyt kuivataan ilmassa ja kiinnitetään sitten metanolissa (2–3 minuutin ajan).

Esikäsitellyt näytteet värjätään kullekin värille tavanomaisten standardimenetelmien mukaisesti. Tämän jälkeen ne huuhdotaan vesijohtovedellä ja annetaan täysin kuivua kylmässä tai kuumassa ilmassa ennen niiden kiinnittämistä paikoilleen synteettisen hartsin avulla.

Loinen, jonka koko on 5–8 mikronia ensimmäisten kehitysvaiheiden aikana, voi saavuttaa monistumisvaiheessa 40 mikronin koon. Solujen solulima värjäytyy voimakkuudeltaan enemmän tai vähemmän siniseksi, ja tuma on voimakkaan punainen. Jälkeläissoluja tai sporoplasteja ympäröi kirkas kehä. Tätä tutkimusta varten kunkin levyn tarkasteluun riittää 5 minuuttia.

5.2 *Histologinen tutkimus*

Histologisia koepaloja varten leikataan pienillä saksilla ruuansulatusrauhasen poikki ja asetetaan näyte kiinnitysnesteeseen, esimerkiksi Davidsonin, Bouinin tai Carsonin nesteeseen, joista viimeksi mainitun avulla on mahdollista tarvittaessa tutkia näytteitä elektronimikroskoopilla. Näytteen koon ja kiinnitysnesteen määrän suhteen on oltava enintään 1:10.

Tämän jälkeen näytteet käsitellään tavanomaisten histologisten menetelmien mukaisesti. *Marteilia refringens* saadaan näkyviin useiden väriaineiden avulla: hematoksyliini-eosiini, Massonin kolmivärimenetelmä. Nämä esimerkit eivät ole rajoittavia ja muita värjäysmenetelmiä voidaan käyttää. Kustakin osterista on suotavaa tutkia kaksi koepalaa.

Kehityksensä alkuvaiheissa *Marteilia* voidaan havaita vatsan epiteelissä; myöhemmissä vaiheissa loisen voi löytää ruuansulatuselinten epiteelistä. Vapaita skitsontteja voidaan havaita myös suoliston ontelossa.

II *OSTREA EDULIS* **-KANTOJEN TUTKIMINEN VYÖHYKKEILLÄ, JOILLA ON ESIINTYNYT POIKKEAVAA KUOLLEISUUTTA**

Aina kun *Ostrea edulis* -kannoissa havaitaan poikkeavaa kuolleisuutta, on syytä ryhtyä kiireellisesti tutkimukseen sen syyn selvittämiseksi.

Näytteen koon on oltava 100 osteria ja ne on käsiteltävä I jaksossa histologista analyysiä varten määriteltyä menettelyä noudattaen. Tätä menetelmää on käytettävä ensimmäisenä, ennen kuin turvaudutaan muuntyyppisiin tutkimuksiin.

Näytteet kiinnitetään mieluiten Carsonin kiinnitysnesteen avulla, jolloin niitä on myös mahdollista käyttää uudelleen elektronimikroskoopilla tehtävässä tutkimuksessa.