394D0306

28.5.94 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 133/51

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 16 maj 1994

om planer för provtagning och diagnostiseringsmetoder för att påvisa och bekräfta vissa sjukdomar hos mollusker

(Text av betydelse för EES)

(94/306/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 91/67/EEG av den 28 januari 1991 om djurhälsovillkor för utsläppande på marknaden av djur och produkter från vattenbruk[1], ändrad genom direktiv 93/54/EEG[2], särskilt artikel 15 i detta, och

med beaktande av följande:

För att säkerställa en enhetlig tillämpning av förfarandena i direktiv 91/67/EEG är det nödvändigt att införa planer för den provtagning och de diagnostiseringsmetoder som skall tillämpas för att förklara kustområden eller anläggningar fria från sådana sjukdomar som angriper mollusker och för att undersöka bestånd med onormal dödlighet.

Samråd har skett med Vetenskapliga veterinärmedicinska kommittén som inrättats genom kommissionens beslut 81/651/EEG[3].

De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med yttrandet från Ständiga veterinärkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Provtagnings- och diagnostiseringsmetoder för att påvisa och bekräfta bonamios (*Bonamia ostreae*) och marteilios (*Marteilia refringens*) fastställs i bilagan.

Artikel 2

Detta beslut skall tillämpas från och med den 1 juni 1994.

Artikel 3

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 16 maj 1994.

På kommissionens vägnar

René STEICHEN

Ledamot av kommissionen

(1) EGT nr L 46, 19.2.1991, s. 1.
(2) EGT nr L 175, 19.7.1993, s. 34.
(3) EGT nr L 233, 19.8.1981, s. 32.

BILAGA

I. PROVTAGNINGS- OCH UNDERSÖKNINGSFÖRFARANDEN VID KONTROLL AV *BONAMIA OSTREAE* OCH *MARTEILIA REFRINGENS* HOS *OSTREA EDULIS*

1. Provtagning

1.1 *Provtagingsställen*

För varje zon som anges i punkt III i bilaga B till direktiv 91/67/EEG skall ett antal provtagningsställen väljas ut på ett sätt som ger bästa möjliga förutsättningar att upptäcka förekomst av *Bonamia ostreae* och/eller *Marteilia refringens*. Hänsyn skall därför tas till de parametrar som påverkar utvecklingen av de sjukdomsalstrande orsakerna, t. ex populationstäthet, vattenströmmar och molluskernas livscykel.

För varje bestämd zon måste minst tre provtagningsställen väljas ut. Antalet provtagningsställen skall utökas för stora zoner som innehåller flera separata områden för odling av mottagliga arter.

Om möjligt skall minst ett prov tas från naturliga bankar. Sådana mollusker som uppvisar avvikelser från det normala (onormal växt, öppna skal) skall väljas ut.

1.2 *När och hur ofta provtagning skall ske*

Hur ofta kontroller enligt III B 2 i bilaga B till direktiv 91/67/EEG skall utföras avgörs av den tidsrymd under vilken sjukdomen är manifest eller går att påvisa och kontrollen skall ske därefter. Vid valet av tidpunkt för kontroll skall också hänsyn tas till molluskernas förflyttningar vilka i allmänhet äger rum på våren och hösten. Prover skall därför tas

— en gång om året efter sommarperioden för *Marteilia refringens*,

— två gånger om året (vår/höst) för *Bonamia ostreae*.

1.3 *Provtagningens omfattning*

Under den inledande tvååriga kontrollperiod som föregår ett godkännande skall på varje provtagningsställe 150 prover tas för att med 95-procentig säkerhet kunna påvisa en tvåprocentig förekomst av sjukdomsbärare.

Under de följande åren (bibehållande godkänd status) kan antalet prover minskas till 30 för att med 95-procentig säkerhet kunna påvisa en tioprocentig förekomst av sjukdomsbärare.

2. Leverans av prover

Alla prover av mollusker skall levereras till det godkända laboratoriet senast 24 timmar efter prov-tagningen. De skall vara förpackade i enlighet med gällande normer så att de hålls i gott skick. En etikett som anger provtagningsställe, datum för provtagningen och eventuella anmärkningar skall vara fäst vid provet.

3. Makroskopisk undersökning

Molluskerna skall öppnas försiktigt så att vävnaderna inte tar skada, särskilt inte manteln, gälarna, hjärtat och matsmältningskörteln. Avvikelser och sjukliga förändringar av vävnaderna skall noteras.

4. Beredning och undersökning av prover för bonamios

4.1 *Immunfluorescens*

4.1.1 Immunfluorescens kan användas vid undersökning av larver, små ostron och vuxna ostron. Torka proverna, mosa larverna eller gör ett utstryk av hjärtvävnaden på ett objektglas. Låt glaset lufttorka och fixera det genom att sänka ner det i aceton i 5 – 10 minuter. Dessa preparat kan användas direkt eller frysas ner till –20 °C.

Bered en lösning av monoklonala antikroppar i buffertlösning (NaCl 8g/l, KH_2 PO_4 0,2g/l, Na_2 HPO_4 $12H_2O$ 2,9g/l, KCl 0,2g/l, Azide Na 0,2g/l, Tween pH 7,4), utspädd i enlighet med leverantörens rekommendationer.

Pipettera 50 µl av lösningen i varje brunn eller på objektglas så att utstryken täcks. Efter inkubation i en fuktkammare i 15 minuter vid 20 °C tvätta objektglasen med den ovan nämnda buffertlösningen och täck sedan med en lösning av getantikroppar mot mus och Ig G-antikropp (50 µl per brunn) i förening med fluorescerande isothiocyanat. Späd antikropplösningen i enlighet med leverantörens rekommendationer och tillsätt Evans-blått (1 %) till den buffert som används som spädning.

Placera efter inkubation i en fuktkammare i 15 minuter vid 20 °C preparaten i en glycerinbuffert och undersök dem med U/V-mikroskopering.

Förekomst av klotrunda celler som är fluorescerande gröna bekräftar *Bonamia ostreae* -infektion.

Andra provningsmetoder som utvecklats i enskilda laboratorier och som ger jämförbara resultat kan också användas.

4.2 *Utstryk av blod*

Låt larver och ostron lufttorka. Mosa larverna eller gör ett utstryk av hjärtvävnaden på ett histologiskt objektglas. Låt objektglasen lufttorka och fixera dem sedan i metanol.

Färga de beredda larverna och ostronen enligt de vanliga standardmetoderna för det aktuella färgämnet. Skölj glasen efter färgningen med kranvatten och låt dem torka fullständigt i kall eller varm luft och montera dem med hjälp av konstharts.

Parasiten (två mikrometer) identifieras genom sin blå cytoplasma och röda kärna. Den kan iakttas i eller utanför hematocyterna. En observationstid på fem minuter per objektglas är tillräcklig.

4.3 *Histologi*

Vid den histologiska undersökningen skärs ut ett snitt ('steken') genom hjärtat, matsmältningskörteln och gälarna på ostronet och provet placeras i en fixeringsvätska, t. ex. Davidsons, Bouins eller Carsons. Den sistnämnda gör det möjligt att vid behov använda provet för elektronisk mikroskopering. Förhållandet 1:10 mellan provets volym och fixeringsvätskans volym måste iakttas.

Flera icke-specifika färgmetoder, t. ex. Hematoxylin-Eosin eller Massons trefärgs-metod, gör det möjligt att tydligt se *Bonamia ostreae*.

Dessa exempel är inte uttömmande — andra färgmetoder kan användas. Det rekommenderas att två snitt per ostron undersöks.

Parasiten (två mikrometer) framträder tydligt i bindväven eller i hematocyterna.

5. **Beredning och undersökning av prover förmarteilios**

5.1 *Cytologisk undersökning*

För att bereda preparaten, skär ut ett snitt genom matsmältningskörteln och gälarna, avlägsna överskott av vatten genom att placera provet på ett läskpapper och gör ett utstryk på objektglaset av den del som passerar genom matsmältningskanalen. Låt objektglasen lufttorka och fixera dem sedan i metanol (två till tre minuter).

De beredda proverna färgas enligt de vanliga standardmetoderna för det aktuella färgämnet. Skölj efter färgningen glasen i kranvatten, låt dem torka fullständigt i kall eller varm luft och montera dem med hjälp av konstharts.

Parasiten, vars storlek är fem till åtta mikrometer i de första utvecklingsstadierna, kan bli upp till 40 mikrometer under sporbildningen. Cellernas cytoplasma färgas mer eller mindre intensivt blåa, kärnan intensivt röd. De sekundära cellerna eller sporoblasterna omges av en ljus ring. En observationstid på fem minuter per objektglas är tillräcklig.

5.2 *Histologisk undersökning*

Vid den histologiska undersökningen skärs ett snitt genom matsmältningskörteln ut med en liten sax och proven placeras i en fixeringsvätska, t. ex. Davidsons, Bouins eller Carsons. Den sistnämnda gör det möjligt att vid behov använda provet även för elektronisk mikroskopering. Förhållandet mellan vävnadens volym och fixeringsvätskans volym får inte vara mer än 1:10.

Proverna behandlas sedan i enlighet med de klassiska histologiska metoderna. Flera färgmetoder gör det möjligt att iaktta *Marteilia refringens*, t. ex. Hematoxylin-Eosin eller Massons trefärgs-metod. Dessa exempel är inte uttömmande — andra färgmetoder kan användas. Det rekommenderas att två snitt per ostron undersöks.

De tidigare stadierna av *Marteilia refringens* förkommer i magens epitel; senare utvecklade stadier kan återfinnas i tarmdivertikelns epitel. Fria sporgömmen kan också iakttas i tarmens lumen.

II. UNDERSÖKNING AV BESTÅND AV *OSTREA EDULIS* MED ONORMAL DÖDLIGHET

Om onormalt hög dödlighet drabbar bestånd av *Ostrea edulis* skall en undersökning omedelbart företas för att fastställa etiologin.

De prov som tas måste bestå av 100 ostron. Proven skall behandlas i enlighet med det förfarande som fastställts för histologisk analys i avsnitt I. Denna teknik skall användas initialt innan någon annan typ av undersökning görs.

Proverna fixeras med fördel i Carsons fixeringsvätska som gör det möjligt att använda dem även för elektronisk mikroskopering.