

ÁKVÖRÐUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

frá 16. maí 1994

um sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir sem á að nota til að greina og staðfesta tiltekna sjúkdóma hjá lindýrum

(Texti sem varðar EES)

(94/306/EB)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 91/67/EBE frá 28. janúar 1991 um skilyrði á sviði heilbrigðis dýra sem hafa áhrif á markaðssetningu fiskeldistegunda og -afurða ⁽¹⁾, eins og henni var breytt með tilskipun 93/54/EBE ⁽²⁾, einkum 15. gr.,*og að teknu tilliti til eftirfarandi:*

Með það í huga að tryggja einsleita beitingu aðferðanna sem kveðið er á um í tilskipun 91/67/EBE er nauðsynlegt að mæla fyrir um sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir sem á að nota til að lýsa strandsvæði eða býli laust við sjúkdóma sem leggjast á lindýr og við rannsóknir á stofnum með afbrigðilega dánartíðni.

Samráð hefur verið haft við vísindanefndina um dýraheilbrigði sem komið var á fót með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 81/651/EBE ⁽³⁾.

Ráðstafanirnar sem kveðið er á um í þessari ákvörðun eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um dýraheilbrigði.

SAMÞYKKT ÁKVÖRÐUN ÞESSA:

1. gr.

Í viðaukanum er kveðið á um sýnatöku- og greiningaraðferðir sem á að nota til að greina og staðfesta bónamíosis (*bonamia ostrae*) og marteilíosis (*martelia refringens*).

2. gr.

Ákvörðun þessi kemur til framkvæmda frá 1. júní 1994.

3. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 16. maí 1994.

*Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,*René STEICHEN
framkvæmdastjóri.⁽¹⁾ Stjttíð. EB nr. L 46, 19. 2. 1991, bls. 1.⁽²⁾ Stjttíð. EB nr. L 175, 19. 7. 1993, bls. 34.⁽³⁾ Stjttíð. EB nr. L 233, 19. 8. 1981, bls. 32.

VIÐAUKI

I. SÝNATÖKU- OG GREININGARAÐFERÐIR TIL EFTIRLITS MEÐ BONAMIA OSTREAE OG MERTEILIA REFRINGENS Í OSTREA EDULIS**1. Sýnataka****1.1. Sýnatökustaðir**

Fyrir hvert svæði sem fjallað er um í III. hluta viðauka B við tilskipun 91/67/EBE skal velja nokkra sýnatökustaði þar sem mestar líkur eru á því að unnt sé að greina hugsanlega tilvist *bonamia ostreae* og/eda *marteilia refringens*. Í þessu skyni skal taka mið af færðbreytum sem geta haft áhrif á þróun sjúkdómsvalda, má þar nefna stærð stofna, straumflæði og þroskamynstur lindýra.

Velja skal minnst þrjú sýnatökustaði fyrir tiltekið svæði. Fjölga skal sýnatökustöðum þegar um er að ræða stór svæði með allmörg aðskilin svæði þar sem smitnæmar tegundir eru ræktaðar.

Ef unnt er skal taka að minnsta kosti eitt sýni af búsvæðum. Velja skal lindýr sem sýna merki um frávik (afbrigðilegan vöxt, gapandi skeljar).

1.2. Hvenær og hve oft sýni eru tekin

Hve oft skoðunin sem um getur í 2. lið B-þáttar í III. hluta viðauka B við tilskipun 91/67/EBE fer fram er háð því á hvaða tíma merki sjúkdómsins koma fram eða hann er greindur og verður skoðun að fara fram í kjölfarið. Við tímasetningu skoðunarinnar skal einnig taka mið af tilflutningum lindýra en þeir fara jafnan fram á vorin og haustin. Því skal sýnataka fara fram:

- einu sinni á ári að sumartímanum liðnum vegna *marteilia refringens*,
- tvisvar á ári (á vorin og haustin) vegna *bonamia ostreae*.

1.3. Stærð sýnis

Á tveggja ára eftirlitstímabilinu sem er undanfari þess að hljóta viðurkenningu er sýnastærðin fyrir hvern sýnatökustað 150 til að tryggja greiningu við 95% öryggismörk á smitberum miðað við 2% algengi.

Á næstkomandi árum (viðurkenningu viðhaldið) má minnka sýnastærðina niður í 30 til að tryggja greiningu við 95% öryggismörk á smitberum miðað við 10% algengi.

2. Sýni send inn

Öll lindýrasýni verða að berast viðurkenndri rannsóknarstofu innan 24 klukkustunda frá sýnatöku. Þeim skal pakkað í samræmi við gildandi staðla til að varðveita þau í góðu ásigkomulagi. Festa verður merkimiða við sýnið með upplýsingum um sýnatökustaðinn og dagsetningu sýnis auk athugasemda ef svo ber undir.

3. Stórsæ rannsókn

Gæta verður þess að opna lindýrin varlega til að koma í veg fyrir að vefirnir skaddist, þetta á einkum við um kápuna, tálknin, hjartað og meltingarkirtilinn. Afbrigði og vefjarskemmdir skal skrá sérstaklega.

4. Undirbúningur og rannsókn á sýnum vegna bónamíosis**4.1. Flúrskímumótefnamæling****4.1.1. Flúrskímumótefnamæling getur farið fram á lirlfum, smáostrum og fullvöxnum ostrum. Þegar sýnin hafa verið þurrkuð skal merja lirlfurnar eða bera strok úr hjartavefnum á sýnisgler. Látið er lofta um glerið og því síðan dýpt í asetun til festingar í fimm til tíu mínútur. Þessar efnablöndur má nota beint eða frysta þær við -20°C .**

Útbúa skal lausn úr einklöna mótefnum í jafnalausn ($\text{NaCl } 8\text{g/l}$, KH_2PO_4 , $0,2\text{g/l}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O } 2,9\text{g/l}$, $\text{KCl } 0,2\text{g/l}$, Azide Na $0,2\text{g/l}$, Tween pH 7,4) og skal hún þynnt samkvæmt leiðbeiningum frá söluaðila.

50 μl af lausninni eru settir með rennipípu í hvern bolla eða á sýnisgler til að þekja strokin. Að lokinni ræktun í rakaklefa í 15 mínútur við 20°C skal þvo sýnisglerin með framangreindri jafnalausn og þekja þau síðan með upplausn af geita-músarmótefnum og G mótefni (50 μl í bolla) blandað með samruna við flúrskímuísóþíósýanat. Mótefnalausnina skal þynna í samræmi við fyrirmæli söluaðila og beta Evans-bláu (1 %) við jafnalausnina sem er notuð til þynningar.

Að lokinni ræktun í rakaklefa í 15 mínútur við 20°C skal setja efnablöndurnar í glýserín-jafnalausn og rannsaka þær með U/V-smásjárannsókn.

Tilvist flúrskímugrænna hvollfrumna staðfestir að *bonamia ostreae* sýkingu sé að ræða.

Einnig má nota önnur próf sem einstakar rannsóknarstofur hafa þróað ef þau gefa sambærilegar niðurstöður.

4.2. *Strok úr blóði*

Hvað liffur og ostrur varðar, skal eftir að sýnin hafa verið loftþurrkuð merja lifurnar eða bera strok úr hjartavefnum á sýnisgler fyrir vefjarsýni. Sýnisglerin eru loftþurrkuð og síðan fest í metanóli.

Tilbúnu lifurnar og ostrurnar eru litaðar með þeim staðalaðferðum sem að jafnaði eru notaðar fyrir viðkomandi lit. Að litun lokinni skal hreinsa glerin með kranavatni og leyfa þeim síðan að þorna fullkomlega í köldu eða heitu lofti; loks eru þau meðhöndluð með gerviresíni.

Sníkillinn (stærð: tveir míkrómetrar) þekkist á bláu umfryminu og rauðum kjarnanum. Unnt er að skoða hann í blóðkornunum eða utan við þau. Fimm mínútna skoðunartími nægir fyrir hvert sýnisgler.

4.3. *Vefjafraeði*

Við vefjafraeðilegu rannsóknina er tekin sneið („bauti“) úr ostrunni í gegnum hjarta, meltingarkirtil og tálkn og sýnið lagt í festingarvökva eins og þá sem eru kenndir við Davidson, Bousin eða Carson, sá síðastnefndi gerir jafnframt kleift að nota sýnin í rafeindasmásjarrannsókn gerist þess þörf. Hlutfallið 1 : 10 verður að haldast á milli rúmmáls sýnisins og rúmmáls festingarvökvans.

Ýmsar ósértækar litunaraðferðir, eins og Hematoxylin-Eosin eða þrlitaaðferð Massons, geta gert *bonamia ostreae* sýnilega. Hér er ekki um tæmandi upptalningu að ræða og unnt er að nota aðrar litunaraðferðir. Mælt er með því að tvær sneiðar séu rannsakaðar fyrir hverja ostru.

Sníkillinn (stærð: 2 míkrómetrar) sést greinilega í bandvefnum eða blóðkornunum.

5. Undirbúningur og rannsókn á sýnum vegna marteilíosis

5.1. *Frumufraeðileg rannsókn*

Við töku stroka er tekin sneið í gegnum meltingarkirtil og tálkn, umframvökvi er fjarlægður með því að leggja sýnið á þerripappír, síðan er strokið, sem tekið er úr meltingarveginum, borið á sýnisglerið. Að lokinni loftþurrkun eru glerin fest með því að nota metanól (tvær til þrjár mínútur).

Tilbúnu sýnin eru lituð með þeim staðalaðferðum sem að jafnaði eru notaðar fyrir viðkomandi lit. Að litun lokinni skal hreinsa glerin með kranavatni og leyfa þeim síðan að þorna fullkomlega í köldu eða heitu lofti; loks eru þau meðhöndluð með gerviresíni.

Sníkillinn, en hann er fimm til átta míkrómetrar að stærð framan af á þroskaferlinum, getur orðið allt að 40 míkrómetrar við grómyndunina. Umfrymi frumnanna verður blátt í meiri eða minni mæli en kjarninn verður sterkrauður. Umhverfis aukafrumurnar eða gróin myndast sterkur ljósbjarni. Fimm mínútna skoðunartími nægir fyrir hvert sýnisgler.

5.2. *Vefjafraeðileg rannsókn*

Við vefjafraeðilegu rannsóknina er tekin sneið í gegnum meltingarkirtilinn með því að nota fingurð skæri og sýnið lagt í festingarvökva eins og þá sem eru kenndir við Davidson, Bousin eða Carson, sá síðastnefndi gerir jafnframt kleift að nota sýnin í rafeindasmásjarrannsókn gerist þess þörf. Hlutfallið á milli vefjarins og rúmmáls festingarvökvans má ekki vera yfir 1 : 10.

Sýnin eru síðan meðhöndluð í samræmi við hefðbundnar vefjafraeðilegar aðferðir. Unnt er að nota ýmsar litunaraðferðir til að greina *martelia refringens*, eins og Hematoxylin-Eosin eða þrlitaaðferð Massons. Hér er ekki um tæmandi upptalningu að ræða og unnt er að nota aðrar litunaraðferðir. Mælt er með því að tvær sneiðar séu rannsakaðar fyrir hverja ostru.

Martelia á frumþroskastigum finnst í útþekju magans en þegar síðari þroskastigum er náð getur hún fundist í útþekju þarmatötnanna. Einnig er unnt að greina aðskildar gróhirslur í þarmaholinu.

II. RANNSÓKN Á STOFNUM OSTREA EDULIS MEÐ ÓEÐLILEGA DÁNARTÍÐNI

Í hvert sinn sem óeðlileg dánartíðni verður í stofnum af *ostrea edulis* skal þegar í stað fara fram rannsókn til að komast að orsökum hennar.

Í sýnaúrtaki skulu vera 100 einstakar ostrur og skal meðhöndla það samkvæmt aðferðinni sem er skilgreind fyrir vefjafraeðilega rannsókn í I. hluta. Þessa aðferð verður að nota í upphafi, áður en nokkur önnur rannsókn er gerð.

Festa ber sýnin, helst í Carsons-festingarvökva sem gerir kleift að nota sýnin aftur við rafeindasmásjarrannsókn.