



# Richtlijnen voor *Bonamia*-vrije broedhuizen voor platte oesters in Nederland

Auteur(s): Pauline Kamermans, Marc Engelsma

Wageningen University &  
Research rapport C027/24

---

# Richtlijnen voor *Bonamia*-vrije broedhuizen voor platte oesters in Nederland

Auteur(s): Pauline Kamermans<sup>1</sup>, Marc Engelsma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wageningen Marine Research, <sup>2</sup>Wageningen Bioveterinary Research

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Marine Research en gesubsidieerd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, in het kader van het Beleidsondersteunend onderzoekthema Ecologische Basiskwaliteit Water 2020 (projectnummer BO-43-021.02-025)

Wageningen Marine Research  
Yerseke mei 2024

---

Wageningen Marine Research rapport C027/24

---

Keywords: platte oester, natuurherstel, broedhuis.

Opdrachtgever: Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselveiligheid, DGNatuur en Visserij  
t.a.v: Mevr. E. Rietsema  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

BO-43-116.01-003

Dit rapport is gratis te downloaden van <https://doi.org/10.18174/658061>  
Wageningen Marine Research verstrekt *geen* gedrukte exemplaren van rapporten.

Wageningen Marine Research is ISO 9001:2015 gecertificeerd.

© Wageningen Marine Research

Wageningen Marine Research, instituut  
binnen de rechtspersoon Stichting  
Wageningen Research, hierbij  
vertegenwoordigd door  
Dr.ir. J.T. Dijkman, Managing director

KvK nr. 09098104,  
WMR BTW nr. NL 8113.83.696.B16.  
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U  
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

Wageningen Marine Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor  
gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de  
resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Wageningen  
Marine Research. Opdrachtgever vrijwaart Wageningen Marine Research van  
aanspraken van derden in verband met deze toepassing.  
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag weergegeven en/of  
gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden  
zonder schriftelijke toestemming van de uitgever of auteur.

A\_4\_3\_1 V30 (2020)

# Inhoud

<b>Samenvatting</b>	<b>4</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>6</b>
1.1 Platte oesters voor natuurherstel in de Nederlandse Noordzee	6
1.2 De ziekte bonamiosis	7
1.3 Nederlandse broedhuisproductie van platte oesters voor natuurherstel	8
1.4 Regelgeving omtrent uitzetten van platte oesters in de Noordzee	9
<b>2 Kennisvraag</b>	<b>10</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>11</b>
<b>4 Resultaten</b>	<b>12</b>
4.1 Monitoringsprotocol voor formele <i>Bonamia</i> -vrije status	12
4.2 Bioveiligheidsmaatregelen voor Nederlandse broedhuizen die zijn omringd door <i>Bonamia</i> -geïnfecteerd water	12
<b>5 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>18</b>
<b>6 Kwaliteitsborging</b>	<b>19</b>
<b>7 Dankwoord</b>	<b>20</b>
<b>Literatuur</b>	<b>21</b>
<b>Verantwoording</b>	<b>24</b>
<b>Bijlage 1 EU regels omtrent Bewakings- en bestrijdingsmethoden voor besmetting met <i>Bonamia ostreae</i></b>	<b>25</b>
<b>Bijlage 2 Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking van en de bevestiging van besmetting met <i>Bonamia ostreae</i></b>	<b>30</b>
<b>Bijlage 3 Testen met inactivatie en detectie van <i>Bonamia</i></b>	<b>31</b>
Test met UV behandeling	31
Test met ultrafiltratie	32
Validatie nieuwe PCR detectiemethode	32
Detectie van <i>Bonamia</i> in water met nieuwe detectiemethode	33

---

# Samenvatting

De platte oester (*Ostrea edulis*) was een algemeen voorkomende soort in de Noordzee, Zuiderzee en Zeeuwse estuaria tot het einde van de 19<sup>de</sup> eeuw. Daarna werd de visserij te intensief en verminderde de populatie in de Noordzee snel tot sporadische exemplaren aan het begin van de 20<sup>ste</sup> eeuw.

Platteoesterbanken zijn een bedreigd habitat waarvoor beschermingsmaatregelen worden aanbevolen. Oesterbanken vormden een sleutelelement in de Noordzee door hard substraat te bieden in een zachtsubstraatomgeving. Oesterriffen zijn belangrijk voor biodiversiteit, koppeling van benthische en pelagische ecosystemen, regulering van waterkwaliteit en verhoging van visproductie.

Omdat platte oesters niet langer in grote hoeveelheden voorkomen in de Noordzee zijn herstelprojecten in de Noordzee afhankelijk van aanvoer van oesters van elders. Productie van oesters in een broedhuis met erkenning volgens de Diergezondheidsverordening en een ziektevrij status voorkomt introductie van exoten/pathogenen.

Er zijn twee belangrijke parasitaire ziekteverwekkers voor *O. edulis*: *Marteilia refringens* en *Bonamia ostrea*. *Bonamia ostreae* komt voor in Nederland, *M. refringens* komt niet voor in Nederland.

Het huidige rapport bevat richtlijnen voor een (monitorings)protocol voor Nederlandse broedhuizen dat kan helpen bij het verwerven van een formele *Bonamia*-vrije status als compartiment en richtlijnen voor bioveiligingsmaatregelen voor die Nederlandse broedhuizen. Dit is geen officieel protocol is om de ziektevrije status te behalen. Naast het volgen van dit protocol is ook een erkenning als aquacultuurinstelling en het aanleveren van documentatie bij NVWA nodig. Dat houdt o.a. in dat elk afzonderlijk bedrijf een gedocumenteerd biobeveiligingsplan moet opstellen dat rekening houdt met de specifieke kenmerken van de individuele aquacultuurinrichting en dat risicobeperkende maatregelen vaststelt voor elk geconstateerd bioveiligheidsrisico.

# Summary

The flat oyster (*Ostrea edulis*) was a common species in the North Sea, Zuiderzee and estuaries in the southwest of the Netherlands until the end of the 19<sup>th</sup> century. Then fisheries became too intense and quickly decimated the population in the North Sea to only a few specimen at the end of the 20<sup>th</sup> century.

Flat oyster beds are a threatened habitat for which protection is recommended. Oyster beds are a key element in the North Sea by providing hard substrate in a soft sediment environment. Oyster reefs are important for biodiversity, benthic-pelagic coupling, regulation of water quality and enhancement of fish production.

As flat oysters are no longer present in large quantities restoration projects in the North Sea depend on oyster supply from elsewhere. Production of oysters in a hatchery with recognition of the disease free status according to EU regulations prevents introduction of non-indigenous species and pathogens.

There are two important pathogens for *O. edulis*: the parasites *Marteilia refringens* and *Bonamia ostreae*. *Bonamia ostreae* occurs in the Netherlands, *M. refringens* does not occur in the Netherlands.

The report presented here contains guidelines for a monitoring protocol that can help Dutch hatcheries in obtaining a formal *Bonamia*-free status as a compartment and guidelines for biosecurity measures for those Dutch hatcheries. This is not an official protocol to acquire the *Bonamia*-free status. Next to following the protocol a recognition as aquaculture facility and supplying documents to the NVWA is needed. This includes a documented biosecurity plan that takes into account the specific characteristics of that aquaculture facility and identifies risk reducing measures for each biosecurity risk.

---

# 1 Inleiding

## 1.1 Platte oesters voor natuurherstel in de Nederlandse Noordzee

De platte oester (*Ostrea edulis*) was een algemeen voorkomende soort in de Noordzee, Zuiderzee en Zeeuwse estuaria tot het einde van de 19<sup>de</sup> eeuw (Olsen, 1883). Daarna werd de visserij te intensief en verminderde de populatie in de Noordzee snel tot sporadische exemplaren aan het begin van de 20<sup>ste</sup> eeuw (Gercken & Schmidt, 2014; Houziaux, 2008). Verschillende factoren motiveren actief herstel van de platte oester. Platte oesterbanken zijn een bedreigd habitat waarvoor beschermingsmaatregelen worden aanbevolen (OSPAR 2008, 2013). Oesterbanken vormden een sleutelelement in de Noordzee door hard substraat te bieden in een zachtsubstraatomgeving. Oesterriffen zijn belangrijk voor biodiversiteit, koppeling van benthische en pelagische ecosystemen, regulering van waterkwaliteit en verhoging van visproductie (Bruno et al., 2003; Bouma et al., 2009, Lenihan & Peterson, 1998; Zu Ermgassen et al., 2016b).

Platte-oesterherstel in de Nederlandse Noordzee begon in 2014 met een aantal haalbaarheidsstudies gefinancierd door de overheid (Smaal et al. 2015, 2017; Kamermans et al., 2018a,b). In 2016 startte de eerste pilot in de Voordelta geïnitieerd door ARK Natuurontwikkeling en het Wereld Natuur Fonds (WNF) en uiteindelijk gefinancierd door diverse partijen (Sas et al., 2016, 2018, 2019; Christianen et al., 2018; Didderen et al., 2019b). Verder offshore zijn drie nieuwe pilots gestart in 2018: Borkumse Stenen gefinancierd door WNF en ARK Natuurontwikkeling (Didderen et al., 2019a), windpark Gemini gefinancierd door Gemini, Edmelja B.V. en WNF (Didderen et al., 2018) en windpark Luchterduinen initieel medegefinancierd als LIFE-IP-project en vervolgens door Eneco, Van Oord, ASN Bank, Stichting de Noordzee en Natuur en Milieu (Didderen et al., 2019c). Daarnaast heeft WNF in 2019 platte oesters geplaatst op een wrak ten noorden van Schiermonnikoog. En tenslotte zijn in 2020 twee pilots gestart in het windpark Borssele in het kader van een natuurinclusief bouwenverplichting (Blauwwind consortium in Borssele II/IV en Two Towers consortium in Borssele V). Sinds 2021 is De Rijke Noordzee samen met partners bezig met actief herstel van de platte oester in de windparken Borssele, Luchterduinen en Gemini.

Omdat platte oesters niet langer in grote hoeveelheden voorkomen in de Noordzee zijn herstelprojecten in de Noordzee afhankelijk van aanvoer van oesters van elders. De kwaliteitseisen voor platte oesters voor natuurherstelprojecten zijn onlangs samengevat door Kamermans et al. (2020). Dit betreft:

- vrij van ziekteverwekkers
- indien mogelijk tolerantie of resistentie tegen ziektes
- geen aanwezigheid van niet-inheemse soorten
- goede overleving, groei en reproductie
- in staat zich aan de lokale omgeving aan te passen
- hoogst mogelijke genetische diversiteit (geldt ook voor gekweekte oesters)
- kostenefficiënt.

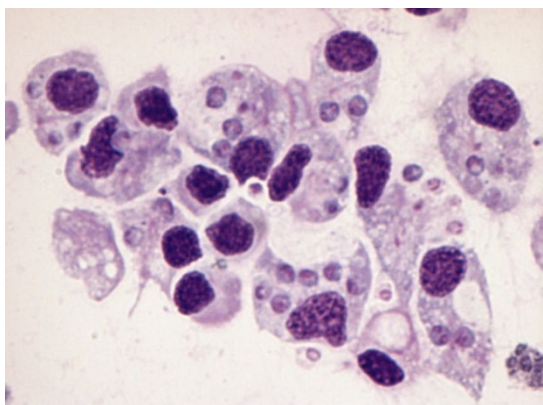
Productie van broed in een broedhuis geeft het minste risico voor de omgeving (Kamermans et al., 2020). Productie van oesters in een broedhuis met erkenning volgens de Diergezondheidsverordening en een ziektevrij status voorkomt introductie van exoten/pathogenen zolang de oesters direct uit het broedhuis worden gebruikt (dus niet uit het buitenwater). Voor gebruik van volwassen oesters uit het buitenwater is een exoten protocol opgesteld (Van der Have et al, 2018; Van den Brink & Magnesen, 2018). Hierbij worden de oesters voor uitzetting behandeld om het risico op verplaatsen van exoten/pathogenen te minimaliseren.

## 1.2 De ziekte bonamiosis

Er zijn twee belangrijke parasitaire ziekteverwekkers voor *O. edulis*: *Marteilia refringens* en *Bonamia ostreae*. *Bonamia ostreae* (hierna *Bonamia* genoemd) komt voor in de Grevelingen en de Oosterschelde in Nederland, (Haenen & Engelsma, 2020), maar hoogstwaarschijnlijk niet in de Waddenzee (Jacobs et al., 2021). In Europa komt *Bonamia* voor onder andere in verschillende oesterkweekgebieden in Frankrijk, Ierland, het Verenigd Koninkrijk en Spanje (Sas et al., 2020). *Marteilia refringens* komt voor langs de Atlantische kust van Frankrijk, Spanje en Portugal, in de Middellandse Zee en in de Adriatische Zee, maar niet in Nederland.

*Bonamia* is een eencellige parasiet van de platte oester welke in Nederland tot nu toe alleen is vastgesteld in de Oosterschelde (1979) en Grevelingen (1988) (Van Banning, 1982, 1991; Engelsma et al., 2010) en onlangs (2017) in een locatie in de Voordelta (grenzend aan de Grevelingen) (Sas et al., 2018). Infectie met *B. ostreae* is aangewezen als een meldingsplichtige dierziekte in de Uitvoeringsverordening 2018/1882 van de Europese Diergezondheidsverordening (EU) 2016/429.

*Bonamia* is een protozoa van 2-4 µm. Deze intracellulaire parasiet komt voor in de bloedcellen en vermenigvuldigt zich daar. De infectie ontwikkelt zich meestal in de kieuwen, de mantel en het verteringsstelsel van de dieren tot een systemische infectie welke uiteindelijk samenvalt met sterfte van de oester. De levenscyclus van de parasiet buiten de gastheer is nog onbekend maar het is mogelijk om experimenteel de ziekte over te brengen door gezuiverde parasieten bij onbesmette oesters te injecteren (Morga et al., 2011). De ziekte bonamiosis veroorzaakt de meeste sterfte in oesters van 3 jaar of ouder, maar sterfte onder jongere oesters kan ook optreden (Lynch et al., 2005).



Figuur 1. Imprint van *Bonamia* parasieten in bloedcellen van de platte oester. Bron: Marc Engelsma WBVR.

Bij platte oesters vindt de bevruchting plaats in de mantelholte. Daar ontwikkelen de larven zich. Na ongeveer 10 dagen worden ze losgelaten in het water (Walne, 1974). Overdracht van de ziekte kan direct van de moederoester naar de larven, maar ook via het water, waarschijnlijk door filtratie van de oester (Lynch et al., 2005, Culloty & Mulcahy, 2007; Arzul et al., 2011). *B. ostreae* is ook aangetroffen in oesterlarven en de larven kunnen daarom bijdragen aan de verspreiding van de parasiet tijdens hun planktonische leven (Arzul et al., 2015). Mariene vertebraten kunnen geen antilichamen maken, maar bij blootstelling aan *Bonamia* laten platte oesters uit gebieden waar *Bonamia* voorkomt een betere overleving zien dan oesters uit gebieden waar geen *Bonamia* voorkomt (Hervio et al., 1995; Culloty et al., 2001; 2004; da Silva et al., 2005).

Naïeve oesters (oesters die nog niet in aanraking zijn geweest met de parasiet) kunnen gedurende het jaar besmet raken met *Bonamia*. In het veld ligt de piek van het aantal besmette oesters aan het einde van de winter en het begin van het voorjaar (Culloty and Mulcahy, 1996; Engelsma et al., 2010). Tijdens de voortplantingsperiode vindt vervolgens een daling in het aantal besmette dieren plaats. Waarschijnlijk omdat dan de meest besmette oesters sterven en dus uit de populatie verdwijnen (Engelsma et al., 2010).



---

## 1.3 Nederlandse broedhuisproductie van platte oesters voor natuurherstel

Productie in een broedhuis houdt in dat moederoesters worden verzameld in het wild (de broedstock). Afhankelijk van het seizoen dat de oesters worden verzameld zullen ze direct larven produceren, of moeten ze eerst nog gereed gemaakt worden (conditioneren). De larven worden in 10-14 dagen opgekweekt tot broed dat zich vastzet op substraat zoals lege schelpen (Figuur 2). Uit studies in de USA blijkt dat deze schelpen met broed (spat on shell) zeer geschikt zijn voor oesterherstelprojecten (<https://oysterrecovery.org>).

Nederland heeft momenteel twee commerciële schelpdierbroedhuizen die platte oesters produceren: de Roem van Yerseke in Yerseke en Stichting Zeeschelp in Kamperland. In 2023 is ook BlueLinked gestart met het produceren van platte oesters. Daarnaast zijn de onderzoeksinstituten Koninklijk Nederlands Instituut voor Zeeonderzoek (NIOZ) op Texel en Wageningen Marine Research (WMR) in Yerseke actief (geweest) op het gebied van productie van platte oesters in een broedhuis.

Met behulp van gerichte fokprogramma's kan voortgang worden geboekt als het gaat om tolerantie tegen bonamiosis. *Bonamia* wordt sinds 1980 aangetroffen in Oosterschelde en sinds 1988 in de Grevelingen (Van Banning 1982, 1991; Engelsma et al., 2010). Culloty et al. (2004) vergeleken oesters uit vier gebieden waar *Bonamia* al lang voor komt (waaronder de Grevelingen) met oesters uit vier gebieden waar *Bonamia* niet voorkomt. De overleving van deze acht groepen oesters werd gevolgd in drie gebieden waar *Bonamia* voorkomt (waaronder de Grevelingen). De lang blootgestelde oesters lieten de beste overleving zien. In een vervolgstudie is broed van drie populaties platte oesters geproduceerd door de Roem van Yerseke; Grevelingenoesters, Oosterschelde oesters en oesters uit een *Bonamia*-vrij gebied in Denemarken (OYSTERECOVER, 2013). Dit broed is uitgezet in de Grevelingen en de beste overleving werd gevonden voor nakomelingen van Grevelingen oesters.



Figuur 2. Broed van platte oester op Japanse oesterschelp (spat on shell). Bron: Roem van Yerseke.

Recentelijk heeft WMR een voorselectiemethode ontwikkeld voor productie van *Bonamia*-vrije oesters met onbesmette ouderdieren uit de geïnfecteerde gebieden Grevelingen en Oosterschelde (Kamermans et al., 2023). Met behulp van deze methode zijn *Bonamia*-vrije oesters gekweekt door het broedhuis van de Roem van Yerseke. In samenwerking met de Roem van Yerseke, de Universiteit van Santiago de Compostela en het NIOZ (gefinancierd door LNV en Programma Rijke Waddenzee) is aangetoond dat deze oesters genetische kenmerken hebben die wijzen op tolerantie voor de ziekte, terwijl oesters uit de Waddenzee deze kenmerken veel minder hebben (Kamermans et al., 2023). Daarnaast is onderzocht of de voorgeselecteerde oesters ook betere overleving laten zien bij blootstelling aan *Bonamia* dan platte oesters uit de Waddenzee die daarvoor nooit in aanraking waren geweest met de ziekte. De resultaten van de test laten inderdaad betere overleving zien van de voorgeselecteerde oesters dan de naïeve oesters, maar geen van de oesters is besmet geraakt met

*Bonamia*, ook de naïeve oesters niet (Kamermans et al., 2023). Het gebrek aan besmetting van de naïeve oesters is vooralsnog onverklaard, maar de betere overleving van de voorgeselecteerde oesters betekent dat broedhuizen *Bonamia*-vrije platte oesters kunnen produceren voor herstelprojecten en dat deze oesters bestand zijn tegen de ziekte mocht deze onverhoopt de locatie van het herstelproject bereiken.

## 1.4 Regelgeving omtrent uitzetten van platte oesters in de Noordzee

Daar waar geen natuurlijke platte oesterbestanden meer aanwezig zijn, zoals in de Noordzee, is in internationaal Europees verband (NORA, de Native Oyster Restoration Alliance) afgesproken om te werken met oesters die vrij zijn van infectie met schelpdierziekteverwekkers (<https://nora-europe.eu/wp-content/uploads/2018/Berlin-Oyster-Recommendation-Part-1.pdf>).

Tot op heden wordt door het ministerie van LNV de Omgevingswet (voorheen: Wet Natuurbescherming) toegepast om te voorkomen dat met *Bonamia* geïnfecteerde oesters in Nederlandse wateren worden geïntroduceerd (Passende Beoordeling, vergunning). Het daarbij gehanteerde juridische argument is dat met het uitzetten van niet-*Bonamia*-vrije platte oesters, het risico bestaat dat *Bonamia* mariene Natura 2000-gebieden met door dergelijke uitzettingen kan bereiken ('externe werking') en dat dient te worden voorkomen. De reikwijdte hiervan is inhoudelijk onzeker, omdat niet in alle gevallen duidelijk is of *Bonamia* Natura 2000-gebieden zou kunnen bereiken. Platte oesterbanken zijn onderdeel van habitattypen met schelpdierbanken of biogene structuren als te beschermen onderdelen onder de Natura 2000-instandhoudingsdoelen. De Europese Verordening (EU) 2016/429 biedt lidstaten de mogelijkheid om het uitzetten van waterdieren in het wild louter goed te keuren wanneer deze afkomstig zijn van een compartiment, aquacultuurinstelling of lidstaat die ziektevrij is verklaard (artikel 199 van Europese Verordening (EU) 2016/429).

Het Rijk staat uitsluitend platte oesters met een ziektevrije status toe als bronmateriaal voor platte oester herstelprojecten in de Noordzee (behoudens een gebied in de Voordelta, zie Kamermans et al., 2018c). Een inventarisatie van de ziektestatus van EU-lidstaten en Noorwegen laat zien dat meerdere gebieden/bronnen binnen de EU en Noorwegen een ziektevrije status voor infectie met *Bonamia* hebben (Tabel 5 in Kamermans et al. 2020). De huidige lijst van lidstaten met ziektevrije gebieden is hier te vinden: [https://food.ec.europa.eu/animals/aquatic-animals/status-and-eradication\\_en](https://food.ec.europa.eu/animals/aquatic-animals/status-and-eradication_en). Daarnaast kunnen initiatiefnemers van platte oester introducties *Bonamia*-vrij bronmateriaal betrekken van Nederlandse kwekerijen (= compartimenten of broedhuis), waarbij die kwekerijen eerst de status ziektevrij dienen te verwerven. Gezien dat in de praktijk een aantal beoogde Nederlandse kwekerijen te midden van *Bonamia*-geïnfecteerd water zitten, zal voor het verkrijgen van de ziektevrije status in het bijzonder moeten worden voldaan aan de bepalingen van de Gedelegeerde verordening (EU) 2020/689 die gaan over compartimenten die onafhankelijk zijn van de gezondheidsstatus van de aangrenzende natuurlijke wateren (artikel 79 van Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689).

Het voorliggende rapport gaat over richtlijnen die kunnen helpen bij het verkrijgen van de ziektevrije status voor infectie met *Bonamia* van broedhuizen voor platte oesters in Nederland.

---

## 2 Kennisvraag

Ten behoeve van de productie van *Bonamia*-vrij broed van platte oesters in Nederlandse broedhuizen voor gebruik in natuurherstelprojecten op de Nederlandse Noordzee vraagt de opdrachtgever

- (a) Het opstellen van richtlijnen voor een (monitorings)protocol voor Nederlandse broedhuizen die kunnen helpen bij het – binnen drie jaar - kunnen verwerven van een formele *Bonamia*-vrije status als compartiment;
- (b) Het tevens opstellen van richtlijnen voor bioveiligheidsmaatregelen voor die Nederlandse broedhuizen die daarbij zijn omringd door *Bonamia*-geïnfecteerd water en dat water willen gebruiken voor de kweek.

Dit is geen officieel protocol is om de ziektevrije status te behalen. Naast het volgen van dit protocol is ook een erkenning als aquacultuurinstelling en het aanleveren van documentatie bij NVWA nodig. Dat houdt o.a. in dat elk afzonderlijk bedrijf een gedocumenteerd biobeveiligingsplan moet opstellen dat rekening houdt met de specifieke kenmerken van de individuele aquacultuurinrichting en dat risicobeperkende maatregelen vaststelt voor elk geconstateerd bioveiligheidsrisico.

# 3 Methoden

Uitgangspunt voor de richtlijnen is het Europese gedelegeerde verordening (EU) 2020/689 tot aanvulling van bepalingen van Europese Verordening (EU) 2016/429 wat betreft voorschriften voor bewaking en diagnosemethoden (zie bijlage 1 en 2).

Bij het opstellen van de richtlijnen is samengewerkt met:

- het EU Reference Laboratory for diseases of molluscs dat is ondergebracht bij het Franse instituut Ifremer (met name voor het waterzuiveringsprotocol);
- LNV Team Visserij
- NVWA

Daarnaast is gebruik gemaakt van het NORA biosecurity protocol (zu Ermgassen et al., 2020).

De opgestelde richtlijnen zijn getoetst op werkbaarheid en duidelijkheid bij potentiële Nederlandse kwekerijen van *Bonamia*-vrij bronmateriaal.

---

## 4 Resultaten

### 4.1 Monitoringsprotocol voor formele *Bonamia*-vrije status

De richtlijnen voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrrije gezondheidsstatus ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae* staan beschreven in bijlage 1 en worden hieronder gespecificeerd voor broedhuizen. Deze richtlijnen zijn overeenkomstig met bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5 van Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689.

1. Het broedhuis moet een gedocumenteerd biobeveiligingsplan opstellen dat rekening houdt met de specifieke kenmerken van de individuele aquacultuurinrichting en dat risicobeperkende maatregelen vaststelt voor elk geconstateerd bioveiligheidsrisico (zie 4.2).
2. Het broedhuis moet van behandeld water worden voorzien, om het risico op de insleep van *Bonamia* tot een aanvaardbaar niveau in te perken (zie 4.2).
3. Het broedhuis moet zijn onderworpen aan gezondheidsinspecties door een inspecteur van de NVWA en een bewakingsprogramma met een looptijd van drie jaar.
4. Het aantal dieren dat per jaar binnen het bewakingsprogramma minimaal moet worden bemonsterd is 150. Dit kan naast volwassen oesters ook zo groot mogelijk broed zijn. Larven mogen niet in de selectie zitten, omdat nog onduidelijk is hoe gevoelig larven zijn voor *Bonamia*.
5. Monsterafname vindt plaats in de periode van het jaar wanneer de prevalentie van *Bonamia* in het compartiment het hoogste is. Voor de Nederlandse situatie in het veld komt dit neer op een bemonstering in de maanden februari, maart of april.
6. Indien sterfte optreedt van broedstock in het broedhuis moeten alle dode dieren worden verzameld voor *Bonamia* analyse.
7. De monsters worden getest op aanwezigheid van *Bonamia* met behulp van een van een diagnostische testen volgens een methode beschreven door het EURL (<https://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>).
8. De monsters worden levend of bevroren verzonden naar het laboratorium.
9. Gedurende de periode van drie jaar hebben alle testen negatieve resultaten opgeleverd voor *Bonamia*.
10. De ziektevrrije status ten aanzien van infectie met *Bonamia* kan slechts behouden blijven zolang alle monsters bij gebruik van de diagnostische methoden van punt 6 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor *Bonamia*.
11. Om de status te behouden zal 1x per jaar (hoog risico) een bemonstering moeten plaatsvinden.

### 4.2 Bioveiligheidsmaatregelen voor Nederlandse broedhuizen die zijn omringd door *Bonamia*-geïnfecteerd water

Bioveiligheidsmaatregelen betreffen een pakket aan preventieve maatregelen met als doel de kans op transmissie van besmettelijke ziekten te minimaliseren (preambule 43 van Europese Verordening (EU) 2016/429). Dit betreft alle niveaus waar besmetting op kan treden (zie tabel 1). Hieronder worden richtlijnen uiteengezet per methode van overdracht.

#### Broedstock

Wanneer broedstock wordt verzameld in een gebied waar *Bonamia* voorkomt, zoals de Oosterschelde en Grevelingen, is het van belang dat de broedstock vrij is van *Bonamia* voordat het broedhuis, of het *Bonamia*-vrije gedeelte van het broedhuis, binnenkomt. Bijvoorbeeld door gebruik te maken van de recentelijk ontwikkelde voorselectiemethode kunnen onbesmette ouderdieren uit geïnfecteerde gebieden worden gebruikt (Kamermans et al., 2023). Hierbij wordt aangeraden om de dieren na

selectie een maand in quarantaine te houden en vervolgens te herbemonsteren voordat ze worden verplaatst naar het ziekte-vrije gedeelte van de hatchery. De dieren mogen in het broedhuis alleen in onbesmette ruimtes en tanks verblijven en er zal een jaarlijkse herbemonstering moeten plaatsvinden. Zodra sterfte van de broedstock optreedt moet het dode dier worden ingevroren voor een test op aanwezigheid van *Bonamia* (zie punt 5 in paragraaf 4.1 hierboven). Dit geldt niet wanneer een bedrijf een officiële ziekte-vrij status wil aanvragen/heeft. Dan mag enkel broedstock gebruikt worden dat afkomstig is van officieel vrij verklaard gebied.

### Algen

Bij aanschaf van nieuwe algencultures kan overwogen worden een *Bonamia* analyse uit te laten voeren. Besmetting met *Bonamia* lijkt echter onwaarschijnlijk. Er zijn geen publicaties gevonden waarin dit wordt vermeld.

### Water

In artikel 73 van Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689 staat dat een ziekte-vrije status kan worden verleend aan compartimenten die afhankelijk of onafhankelijk zijn van de gezondheidsstatus van aangrenzende natuurlijke wateren.

In het geval dat een compartiment dat afhankelijk is van de gezondheidsstatus van aangrenzende natuurlijke wateren een ziekte-vrije status aanvraag wil doen, kan dit wanneer er een doeltreffende ziektespecifieke scheiding plaatsvindt tussen het compartiment en andere populaties van waterdieren die besmet kunnen zijn (artikel 73, lid 2(b) van Gedelegeerde Verordening 2020/689). Ook moeten er verschillende epidemiologische factoren beoordeeld worden door de NVWA. Deze zijn gespecificeerd in artikel 73, lid 3(a) van Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689.

Een compartiment wordt geclassificeerd als onafhankelijk van de gezondheidsstatus van aangrenzende natuurlijke wateren wanneer deze wordt gevoed met water dat via een waterzuiveringsinstallatie de desbetreffende ziekteverwekker inactieveert, of met water dat rechtstreeks uit een put, boorgat of bron komt (artikel 79, lid 3 van Gedelegeerde Verordening 2020/689).

In het geval van *Bonamia* bestaat er geen waterbehandelingsprotocol (persoonlijke mededeling C. Stavrakakis) en geen EU regelgeving (persoonlijke mededeling E. Knegtering). In bijlage 3 worden de resultaten van een test met UV behandeling en een test met ultrafiltratie gepresenteerd. Hieruit bleek dat UV niet, maar ultrafiltratie wel in staat was om *Bonamia* uit het water te verwijderen.

### Materiaal

Al het materiaal dat gebruik is in een broedhuis, zoals tanks en zeven zal gescheiden moeten worden gehouden van eventueel besmet materiaal. Daarnaast is het belangrijk de materialen voor en na gebruik schoon te maken met chloor, biotex of een andere zeepoplossing. Voor vestigingssubstraat zoals lege oesterschelpen wordt een verweerperiode op het land van 12 maanden aangeraden (zu Ermgassen et al., 2020). Ook bij het transport van het oesterbroed naar de restoratielocatie moet schoon materiaal worden gebruikt. Dit betreft de container of tank waar het broed in zit, maar ook de vrachtwagen of het schip waar het broed op geplaatst wordt. Arthur et al. (2008) geeft in Annex 2 een overzicht van desinfectiemiddelen en procedures. Veelgebruikte middelen in broedhuizen zijn chloor en peroxide.

Onderzoekers van Ifremer hebben recentelijk een eDNA/eRNA methode ontwikkeld om *Bonamia* in zeewater te detecteren en te kwantificeren (Merou et al., 2020). Uit hun studie bleek o.a. dat 90% van de *Bonamia* parasieten vrij in het zeewater na twee dagen niet meer levensvatbaar waren. Dit biedt een mogelijkheid voor een extra behandeling voorafgaand aan transport van oesters in tanks met water. Door gefiltreerd water twee dagen in een schone tank zonder oesters te laten staan is de kans dat er nog levende parasieten aanwezig zijn zeer klein.



Tabel 1. Niveaus waar besmetting van het broed met *Bonamia* kan treden en aangeraden maatregelen op het risico te minimaliseren. Uitgangspunt is het biosecurity protocol van zu Ermgassen et al., (2020).

Niveau van overdracht	Methode van overdracht	Route van overdracht	Maatregel
Binnenkomst	Broedstock	Besmet in het veld	Houd broedstock in aparte ruimte en voer pre-selectie uit volgens Kamermans et al, 2023). Na selectie een maand in quarantaine houden en vervolgens herbemonsteren. Alleen 2x negatief geteste dieren kunnen het ziekte-vrije deel van het broedhuis in.
	Algen	Aanschaf besmette algen.	Een <i>Bonamia</i> analyse kan overwogen worden als bron van besmetting onduidelijk is.
	Water	Inname besmet water.	Gebruik ultrafiltratie met 0,02 µm porositeit.
	Materiaal	Afkomstig van besmet gebied.	Voor toegang tot broedhuis schoon maken met chloor, biotex of een andere zeepoplossing.
	Mensen	Bij binnenkomst vanuit besmet gebied (b.v. bezoekers).	Niets aanraken in broedhuis voordat schoeisel en handen ontsmet zijn met zeep.
	Vestigingssubstraat	Schelpen uit besmet gebied die niet zijn verweerd.	Schelpen 12 maanden verweren op het land.
Intern	Broedstock	Bewegen van broedstock tussen besmette en schone ruimte.	Alleen negatief geteste dieren kunnen het broedhuis in.
	Algen	Besmette algen cultures die worden gevoerd.	Een <i>Bonamia</i> analyse kan overwogen worden als bron van besmetting onduidelijk is.
	Materiaal	Gebruik van besmet materiaal in schone ruimte.	Voor gebruik schoon maken met chloor, biotex of een andere zeepoplossing.
	Mensen	Beweging van mensen tussen besmette en schone ruimtes.	Niets aanraken in broedhuis voordat schoeisel en handen ontsmet zijn met chloor.
Uitgaand	Materiaal	Besmette tank, vrachtwagen of schip voor vervoer.	Gebruik schoon materiaal bij transport.
	Water	Besmet water in tanks voor vervoer.	Gebruik ultrafiltratie met 0,02 µm porositeit en als extra optie water 2 dagen in een schone tank zonder oesters te laten staan.
	Mensen	Vervoer door mensen uit besmet gebied.	Handen ontsmetten met zeep.





## Mensen

Het gedrag van mensen kan besmetting met *Bonamia* veroorzaken door bijvoorbeeld oesters waarvan onbekend is of ze besmet zijn met *Bonamia*, naar een schoon deel van het broedhuis te verplaatsen. Maar ook door handschoenen waarmee besmette oesters aangeraakt zijn vervolgens te gebruiken in het broedhuis. Gebruik daarom altijd schone handschoenen in het broedhuis. Voor binnenkomst in het *Bonamia*-vrije gedeelte van het broedhuis dienen handen met zeep ontsmet te worden. Gebruik een sluis waarbij andere schoenen binnen het broedhuis gebruikt worden dan daar buiten de sluis gevolgd door een bad met loog voor het schoeisel voor de ingang. Werk vervolgens van *Bonamia*-vrij naar niet *Bonamia*-vrij (beginnen bij de *Bonamia*-vrij verklaarde ruimtes en eindigen bij de niet *Bonamia* vrij verklaarde ruimtes op een dag). In principe zouden er geen materialen heen en weer moeten gaan tussen verschillende delen van het broedhuis maar alle noodzakelijke materialen in beide delen aanwezig moeten zijn.

---

## 5 Conclusies en aanbevelingen

Dit is geen officieel protocol is om de ziektevrige status te behalen. Wanneer de richtlijnen zoals beschreven in hoofdstuk 4 worden gevolgd kan dit de Nederlandse broedhuizen helpen – binnen ca. drie jaar - een formele *Bonamia*-vrije status als compartiment verwerven. De eisen daarvoor staan opgesomd in Verordening (EU) 2016/429 en Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689. Naast het volgen van dit protocol is ook een erkenning als aquacultuurinstelling en het aanleveren van documentatie bij NVWA nodig. Een aquacultuurinrichting moet een erkenning hebben volgens de Diergezondheidsverordening en kan daarnaast een ziektevrige status aanvragen. Dat houdt o.a. in dat elk afzonderlijk bedrijf een gedocumenteerd biobeveiligingsplan moet opstellen dat rekening houdt met de specifieke kenmerken van de individuele aquacultuurinrichting en dat risicobeperkende maatregelen vaststelt voor elk geconstateerd bioveiligheidsrisico.

De broedstock is *Bonamia*-vrij. Dit kan worden gegarandeerd door gebruik te maken van oesters die afkomstig zijn uit een *Bonamia*-vrij gebied of door broedstock vooraf te screenen. Dat laatste kan door gebruik te maken van de voorselectiemethode van Kamermans et al. (2023). Bijkomend voordeel is dat deze oesters, in tegenstelling tot oesters uit *Bonamia*-vrije gebieden, bestand zijn tegen de ziekte mocht deze onverhoopt de locatie van het herstelproject bereiken. Dit geldt niet wanneer een bedrijf een officiële ziektevrige status wil aanvragen/heeft. Dan mag enkel broedstock gebruikt worden dat afkomstig is van officieel vrij verklaard gebied.

Het broedhuis heeft een biobeveiligingsplan en is onderworpen aan gezondheidsinspecties en een bewakingsprogramma. De gezondheidsinspectie wordt jaarlijks uitgevoerd door een inspecteur van de NVWA. Het bewakingsprogramma heeft een looptijd van minimaal drie jaar waarbij 150 geproduceerd broed per jaar worden bemonsterd voor *Bonamia* analyse met behulp van PCR. Bij sterfte van onder platte oesters op het bedrijf moet deze gecheckt worden op *Bonamia*.

Het broedhuis heeft een waterzuiveringsinstallatie waarin *Bonamia* geïnactiveerd wordt. Uit onderzoek gepresenteerd in bijlage 3 van dit rapport blijkt dat ultrafiltratie met 0,02 µm porositeit *Bonamia* tegen kan houden.

De aanvraag van de ziekte vrijstatus kan bij de NVWA gedaan worden. De ziektevrige status kan slechts behouden blijven zolang alle monsters negatieve resultaten hebben opgeleverd voor *Bonamia*.

Het verdient aanbeveling om te onderzoeken of gebruik van eDNA testen zoals beschreven in Merou et al. (2020) en Von Gersdorf Jørgensen et al. (2020) een snelle *Bonamia* detectiemethode oplevert die kan worden ingezet bij het managen van de ziekte vrige productie. In 2022 heeft WMR in samenwerking met het Vlaamse Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) een eerste test van een dergelijke methode uitgevoerd (zie bijlage 3). Hieruit blijkt dat de nieuwe methode gevoelig genoeg is voor de detectie van de parasieten in het water. De infectiegraad van de oester lijkt vooral de detectie in het water te bepalen, meer dan het aantal besmette oesters. eDNA valt vooralsnog buiten de door het EURL goedgekeurde testen. Daardoor is er momenteel geen toegevoegde waarde van deze test voor vrij verklaring van de bedrijven.

# 6 Kwaliteitsborging

Wageningen Marine Research beschikt over een ISO 9001:2015 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV GL.

---

## 7 Dankwoord

Graag bedanken wij Isabel Arzul en Christophe Stavrakakis (Ifremer) voor informatie over waterbehandeling, Pim van Dalen (WMR) voor het uitvoeren van waterbehandelings- en detectie-testen, Michal Voorbergen-Laarman (WBVR) voor het analyseren van *Bonamia* monsters van de waterbehandelingstesten, Sophie Derycke (ILVO) voor haar inbreng bij de opzet van de detectietesten en Delphine Tanghe (ILVO) voor het analyseren van *Bonamia* monsters van de detectie-testen. Ellen Rietsema (LNV) en Cristina Ruiz Espinosa (NVWA) danken wij voor commentaar op eerdere versies van het rapport.

# Literatuur

- Arthur R.J., M.G. Bondad-Reantaso, R.P. Subasinghe (2008) Procedures for the quarantine of live aquatic animals A manual FAO Fisheries Technical paper 502
- Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Ferrand S., Omnes E., Lerond S., Couraleau Y., Joly J.P., François C., Garcia C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology* 179, 69–76.
- Arzul, I. & Carnegie, R. B. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* **131**, 32–42 (2015)
- Bouma TJ, S Olenin, K Reise, T Ysebaert. 2009. Ecosystem engineering and biodiversity in coastal sediments: posing hypotheses. *Helgoland Marine Research* 63: 95-106.
- Bruno, J.F., Stachowicz, J.J., Bertness, M.D., 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends Ecol. Evol.* 18, 119–125.
- Christianen M.J.A., W. Lengkeek, J.H. Bergsma, J.W.P. Coolen, K. Dideren, M. Dorenbosch, F.M.F. Driessen, P. Kamermans, E. Reuchlin-Hugenholtz, H. Sas, A. Smaal, K.A. van den Wijngaard, T.M. van der Have (2018) Return of the native facilitated by the invasive? Population composition, substrate preferences, and epibenthic species richness of a recently discovered shellfish reef with native European flat oysters (*Ostrea edulis*) in the North Sea. *Marine Biology Research* <https://doi.org/10.1080/17451000.2018.1498520>
- Culloty, S.C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M.F., Feist, S.W., A. Figueras. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as a vector for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms* 37: 73-80.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., M.F. Mulcahy (2001). An investigation onto the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980). *Aquaculture* 199: 229-244.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., M.F. Mulcahy (2004). Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237: 41-58.
- Culloty, S.C., M.F. Mulcahy (2007). *Bonamia ostreae* in the Native Oyster *Ostrea edulis*. A Review. *Marine Environment and Health Series*, 29: 3-30.
- da Silva P.M., Fuentes J., Villalba A. (2005). Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology*. 147: 965-977
- Dideren K., P. Kamermans, W. Lengkeek (2018) Gemini wind farm oyster pilot Results 2018. Bureau Waardenburg Rapport
- Dideren K, Lengkeek W, Kamermans P, Deden B, Reuchlin-Hugenholtz E (2019a) Pilot to actively restore native oyster reefs in the North Sea ([https://www.ark.eu/sites/default/files/media/Schelpdierbanken/Report\\_Borkumse\\_Stenen.pdf](https://www.ark.eu/sites/default/files/media/Schelpdierbanken/Report_Borkumse_Stenen.pdf)). BuWa. Report 19-013
- Dideren K., T.M. van der Have, J.H. Bergsma, H. van der Jagt, W. Lengkeek, P. Kamermans, A. van den Brink, M. Maathuis, H. Sas (2019b) Shellfish bed restoration pilots Voordelta, Netherlands Annual report 2018, ARK Report
- Dideren K., J.H. Bergsma, P. Kamermans (2019c) Offshore flat oyster pilot Luchterduinen wind farm. Results campaign 2 (July 2019) and lessons learned. Report 19-184 Bureau Waardenburg, Culemborg
- Dijkema, R. (1990). Balans van de activiteiten om de cultuur van de platte oester in Bretange weer op gang te krijgen, einde 1989. Vertaling van Equinoxe 30.
- Engelsma, M.Y., Kerkhoff, S., Roozenburg, I., Haenen, O.L.M., Van Gool, A., Sistermans, W., Wijnhoven, S. & Hummel, H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oysters *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series* 409: 131–142.
- European Union Reference Laboratory for Mollusc Diseases (EURL) (2020) Standard Operating Procedures. Available at: <https://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>

- 
- Gercken & Schmidt 2014. Current Status of the European Oyster (*Ostrea edulis*) and Possibilities for Restoration in the German North Sea 2014. BFN report
- Grizel, H., G. Tige. (1982). Evolution of the hemocytic disease caused by *Bonamia ostreae*. 3 rd 726 Int. Coll. 727 Invert. Pathol., 6-10 Sept., Brighton, 258-260.
- Haenen, O.L.M., Engelsma, M.Y., 2020. Jaarverslag schelpdierziekten 2019; Resultaten van het onderzoek naar ziekten in schelpdierbestanden van het Grevelingenmeer en de Oosterschelde. Wageningen Bioveterinary Research, WBVR Report 2010660.
- Hervio, D., Bachère E., Boulo V., Cochennec N., Vuillemin V., Le Coguic Y., Cailletaux G., Mazurié J., Mialhe E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite resistant oysters. *Aquaculture*. 132: 183-194.
- Houziaux, J.-S., Kerckhof, F., Degrendele, K., Roche, M. Norro A., 2008. The Hinder Banks Yet an important region for the Belgian marine biodiversity? Final report HINDERS project, Belgian Science Policy Office, pp.249. Available online at URL: [http://www.belspo.be/belspo/home/publ/pub\\_ostc/EV/rappEV45\\_en.pdf](http://www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/EV/rappEV45_en.pdf).
- Jacobs P, S Holthuijsen, M Sikkema, K Philippart, P Kamermans (2021) Verslag 'pilot onderzoek overleving platte oesters in Waddenzee'. NIOZ
- Kamermans P, Van Duren L, Kleissen F (2018a) European flat oysters on offshore wind farms: additional locations : opportunities for the development of European flat oyster (*Ostrea edulis*) populations on planned wind farms and additional locations in the Dutch section of the North Sea (<http://dx.doi.org/10.18174/456358>). Wageningen Marine Research / Deltares. Report C053/18
- Kamermans P., B. Walles, M. Kraan, L.A. van Duren, F. Kleissen & T.M. van der Have, A.C. Smaal, M. Poelman (2018b) Offshore wind farms as potential locations for flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration in the 1 Dutch North Sea. *Sustainability* 10, 3942; doi:10.3390/su10113942
- Kamermans P, F Kleissen, L van Duren, M Engelsma (2018c) Begrenzing deel Voordelta als niet *Bonamia* – vrij gebied binnen de Nederlandse Noordzee. Wageningen University & Research rapport C112/18
- Kamermans, P., Blanco, A. & Van Dalen, P. (2020). Sources of European flat oysters (*Ostrea edulis* L.) for restoration projects in the Dutch North Sea. Wageningen University & Research report C085/20. Yerseke, the Netherlands: Wageningen Marine Research. <https://edepot.wur.nl/532003>
- Kamermans P, Blanco A, van Dalen P, Engelsma M, Bakker N, Jacobs P, Dubbeldam M, Sambade IM, Vera M, Martinez P. 2023. *Bonamia*-free flat oyster (*Ostrea edulis* L.) seed for restoration projects: non-destructive screening of broodstock, hatchery production and test for *Bonamia*-tolerance. *Aquat. Living Resour.* 36: 11 <https://doi.org/10.1051/alr/2023005>
- Lenihan, H. S., & Peterson, C. H. (1998). How habitat degradation through fishery disturbance enhances impacts of hypoxia on oyster reefs. *Ecological Applications*, 8(1), 128-140.
- Lynch, S.A., D.V. Armitage, S. Wylde, M.F. Mulcahy, S.C. Culloty (2005). The susceptibility of young pre-spawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*, *Journal of Shellfish Research* 24(4):1019- 819 1025.
- Lynch, S. A., Abollo, E., Ramilo, A., Cao, A., Culloty, S.C., Villalba, A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, 137(10), 1515-1526.
- Merou N, C Lecadet, S Pouvreau, I Arzul (2020) An eDNA/eRNA-based approach to investigate the life cycle of non-cultivable shellfish micro-parasites: the case of *Bonamia ostreae*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* *Microbial Biotechnology* 13: 1807–1818 doi:10.1111/1751-7915.13617
- Morga B, T Renault, N Faury, B Chollet, I Arzul (2011) Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during in vitro infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *International Journal for Parasitology* 41: 755-764. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.013>
- Olsen, O. T. 1883. The piscatorial atlas of the North Sea, English and St. George's Channels. Grimsby, London.
- OSPAR Commission (2008). OSPAR List of Threatened and/or Declining Species and Habitats. Reference Number: 2008-6. (<http://www.ospar.org/documents?d=32794>).
- OSPAR Commission (2013). OSPAR Recommendation 2013/4 on furthering the protection and conservation of *Ostrea edulis* in Region II of the OSPAR maritime area and *Ostrea edulis* beds in Regions II, III and IV of the OSPAR maritime area. OSPAR(2) 13/4/1, Annex 7. <https://www.ospar.org/documents?d=32968>.

- OYSTERECOVER (2013). Deliverable 15. Report identifying and describing best performing populations.
- Sas, H., Kamermans, P., van der Have, T., Lengkeek, W. & Smaal, A. 2016. Shellfish reef restoration pilots: Voordelta The Netherlands, Annual report 2016.
- Sas H., P. Kamermans, T. van der Have, M. Christianen et al (2018) Shellfish reef restoration pilots Voordelta The Netherlands, Annual report 2017.
- Sas H, B Deden, P Kamermans, PSE zu Ermgassen, B Pogoda, J Preston, L Helmer, Z Holbrook, I Arzul, T van der Have, A Villalba, B Colsohl, V Merk, A Lown, N Zwerschke, E Reuchlin. (2020) *Bonamia* infection in flat oysters (*Ostrea edulis*) in relation to European restoration projects. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 30: 2150-2162  
<https://doi.org/10.1002/aqc.3430>
- Smaal AC, P. Kamermans, T.M. van der Have, M. Engelsma & H.J.W.Sas (2015) Feasibility of Flat Oyster (*Ostrea edulis* L.) restoration in the Dutch part of the North Sea. IMARES Report C028/15
- Smaal, A; Kamermans, P; Kleissen, F; Duren, L van; Have, T van der (2017) Flat oysters on offshore wind farms : opportunities for the development of flat oyster populations on existing and planned wind farms in the Dutch section of the North Sea. Yerseke : Wageningen Marine Research, (Wageningen Marine Research report C052/17) – 53
- UITVOERINGSBESLUIT (EU) 2015/1554 VAN DE COMMISSIE van 11 september 2015 tot vaststelling van bepalingen ter uitvoering van Richtlijn 2006/88/EG wat betreft voorschriften voor bewaking en diagnosemethoden
- Van Banning, P. (1982). Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the Dutch oyster culture. Invertebrate pathology and microbial control: proceedings: IIIrd International Colloquium on Invertebrate Pathology and XVth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, September 6-10, 1982 University of Sussex, pp. 243-245. United Kingdom: Brighton.
- Van Banning, P. (1991). Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. Aquaculture 93: 205–211.
- Van den Brink A. & T. Magnesen (2018) Follow-up test 'treatment protocol flat oysters' with Norwegian oysters. Memo Wageningen Marine Research
- Van der Have T.M., M. Schutter, P. Kamermans, A. van den Brink (2018) Treatment protocol flat oysters Memo Bureau Waardenburg
- Von Gersdorf Jørgensen L, JW Nielsen, MK Villadsen, B Vismann, S Dalvin, H Mathiessen, L Madsen, PW Kania, K Buchmann (2020). A non-lethal method for detection of *Bonamia ostreae* in flat oyster (*Ostrea edulis*) using environmental DNA Scientific Reports 10:16143  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72715-y>
- Walne, P.R. (1974). Culture of bivalve molluscs; 50 years of experience at Conwy. Fishing News Books Ltd, Farnham-Surrey-England, 189 pp.
- zu Ermgassen, P.S.E., Gamble, C., Debney, A., Colsohl, B., Fabra, M., Sanderson, W.G., Strand, Å. and Preston, J. (eds) (2020). European Guidelines on Biosecurity in Native Oyster Restoration. The Zoological Society of London, UK., London, UK.



---

# Verantwoording

Rapport C027/24

Projectnummer: 4318100323

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het verantwoordelijk lid van het managementteam van Wageningen Marine Research

Akkoord: Ainhoa Blanco  
Onderzoeker

Handtekening:



Datum: 13 mei 2024

Akkoord: Dr.ir. T.P. Bult  
Director

Handtekening:



Datum: 13 mei 2024

# Bijlage 1 EU regels omtrent Bewakings- en bestrijdingsmethoden voor besmetting met *Bonamia ostreae*

Uit:

Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689 tot aanvulling van Verordening 2016/429 wat betreft regels voor bewaking, uitroeiingsprogramma's en de ziektevrije status voor bepaalde in de lijst opgenomen ziekten en nieuwe ziekten. Onderstaande ziektespecifieke voorwaarden voor *Bonamia ostreae* zijn te vinden Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689. De voorschriften zijn aangepast aan de Nederlandse situatie. De meest recente versie van de verordening is te vinden op <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=CELEX%3A32020R0689>

## **I. Voorschriften voor bewakings- of uitroeiingsprogramma's voor het verkrijgen en behouden van een ziektevrije gezondheidsstatus ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae***

### I.1. Algemene voorschriften (Bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5, afdeling 1 van Gedelegeerde Verordening 2020/689).

De gezondheidsinspecties en, in voorkomend geval, de bemonstering van productie-eenheden worden uitgevoerd in de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van *Bonamia ostreae* in de lidstaat, het gebied of het compartiment maximaal is. Indien dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, wordt de bemonstering in de winter of in het vroege voorjaar uitgevoerd.

Indien overeenkomstig de voorschriften van deel 5 weekdieren moeten worden bemonsterd, zijn de volgende criteria van toepassing:

- a) Indien *Ostrea edulis* aanwezig is, bestaat het monster volledig uit die oestersoort. Indien *Ostrea edulis* niet aanwezig is, moet het monster representatief zijn voor alle andere aanwezige gevoelige soorten;
- b) als zwakke, openstaande of pas gestorven, maar nog niet in staat van ontbinding verkerende weekdieren aanwezig zijn, worden bij voorkeur die weekdieren geselecteerd. Indien dergelijke weekdieren niet aanwezig zijn, moet de selectie de oudste gezonde weekdieren omvatten;
- c) bij de bemonstering van kwekerijen waar meer dan één waterbron voor de productie van weekdieren wordt gebruikt, worden weekdieren die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster opgenomen, zodat alle delen van het bedrijf evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn;
- d) bij de bemonstering in weekdierkweekgebieden worden weekdieren van een voldoende aantal bemonsteringspunten in het monster opgenomen. De voornaamste factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij de selectie van die bemonsteringspunten zijn: punten waar *Bonamia ostreae* eerder is geconstateerd, dichtheid van de bestanden, waterstromen, de aanwezigheid van gevoelige soorten, de aanwezigheid van vectorsoorten, bathymetrische kenmerken en beheerpraktijken. De bemonstering omvat ook natuurlijke gronden binnen de kweekgebieden of aangrenzend daaraan.

### I.2. Specifieke voorschriften voor de verlening van status vrij van infectie met *Bonamia ostreae* (Bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5, afdeling 2 van Gedelegeerde Verordening 2020/689)

#### *I.2.1. Bewakingsprogramma's*

---

Een lidstaat, gebied of compartiment met een onbekende gezondheidsstatus van ten aanzien van infectie met *Bonamia ostreae* kan een ziektevrije status verleend krijgen indien alle inrichtingen of groepen inrichtingen die in de lidstaat, de zone of het compartiment in de lijst opgenomen soorten houden, en, waar nodig, bemonsteringspunten bij in het wild levende populaties, zijn onderworpen aan de volgende driejarige regeling:

- a) de inrichtingen en groepen inrichtingen waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden, moeten aan gezondheidsinspecties zijn onderworpen en zijn bemonsterd gedurende een periode van ten minste 3 opeenvolgende jaren, zoals vermeld in tabel 5.A van dit deel;
- b) gedurende die periode van drie jaren heeft het testen van alle monsters met behulp van de diagnosemethoden van punt II.2 negatieve resultaten opgeleverd voor *Bonamia ostreae* en is elk vermoeden van *Bonamia ostreae* overeenkomstig de diagnosemethoden van punt II.3 uitgesloten;
- c) indien *Ostrea edulis*, afkomstig uit een lidstaat, gebied of compartiment met een ziektevrije status, in het monster moeten worden opgenomen, moeten zij tenminste één jaar vóór de uitvoering van de regeling zijn binnengebracht in de inrichting of de groep van inrichtingen.

Indien infectie met *Bonamia ostreae* wordt geconstateerd tijdens de driejarige regeling; moeten betrokken inrichtingen in de lidstaat, de zone of het compartiment, vóór het begin van een nieuwe driejarige regeling:

- a) Onderworpen zijn aan de in de artikelen 58 tot en met 65 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 vastgestelde minimale ziektebestrijdingsmaatregelen.
- b) worden herbevolkt met weekdieren van een inrichting in een lidstaat of zone die een compartiment dat vrij is van infectie met *Bonamia ostreae*, of van een inrichting in een door een uitroeiingsprogramma voor die ziekte bestreken lidstaat, zone of compartiment.

*I.2.2. Uitroeiingsprogramma's* (Bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5, afdeling 3 van Gedelegeerde Verordening 2020/689)

De uitroeiing van *Bonamia ostreae* wordt in de meeste gevallen als onmogelijk beschouwd, maar in het geval de lidstaat dit wel haalbaar acht, is het volgende model voor een uitroeiingsprogramma van toepassing. Een lidstaat, gebieden of compartiment besmet met infectie *Bonamia ostreae* kan opnieuw een ziektevrije status verleend krijgen, indien op alle inrichtingen of groepen inrichtingen waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden in die lidstaat of zone of dat compartiment, een uitroeiingsprogramma is toegepast dat aan de volgende vereisten voldoet:

- a) de minimale bestrijdingsmaatregelen van de artikelen 55 tot en met 65 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 moeten daadwerkelijk zijn toegepast, en in voorkomend geval moet een beperkingszone van een passende omvang, zoals bedoeld in artikel 58, lid 1 onder c), verdeeld in een beschermings- en een bewakingszone, zijn ingesteld in de nabijheid van de met *Bonamia ostreae* besmet verklaarde inrichting of groep inrichtingen, rekening houdend met de voorschriften van punt 2;
- b) alle zich binnen de beschermingszone of, indien geen beschermingszone is ingesteld, binnen de beperkingszone bevindende inrichtingen en groepen inrichtingen waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden en die niet besmet zijn met *Bonamia ostreae*, moeten worden onderworpen aan een onderzoek dat ten minste de verzameling van monsters voor het testen van 150 weekdieren van vatbare soorten na aanvang van de periode waarin *Bonamia ostreae* wordt overgebracht, omvat. Wanneer die periode niet bekend is, moet de bemonstering in de winter of het vroege voorjaar beginnen;
- c) betrokken inrichtingen en groepen inrichtingen moeten overeenkomstig artikel 62 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 worden geleeft en, indien mogelijk, overeenkomstig artikel 63 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 worden gereinigd en ontsmet.

Er moet stillegging plaatsvinden overeenkomstig artikel 64 van Gedelegeerde Verordening

2020/689 en de stillegging duurt ten minste zes maanden.

Wanneer alle besmette inrichtingen of besmette groepen inrichtingen zijn leeggemaakt, moet gedurende ten minste vier weken een gelijktijdige stillegging plaatsvinden;

- d) herbevolking mag pas plaatsvinden wanneer alle besmette groepen inrichtingen zijn leeggemaakt, gereinigd, ontsmet en stilgelegd overeenkomstig het bepaalde onder c);
- e) alle andere dan de onder f) bedoelde inrichtingen en groepen inrichtingen in de lidstaat of de zone die of het compartiment dat door het uitroeiingsprogramma wordt bestreken, waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden, moeten vervolgens aan de regeling van I.2 voldoen;
- f) een afzonderlijke inrichting waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden en die een gezondheidsstatus heeft die onafhankelijk is van de gezondheidsstatus van de omringende wateren, is niet verplicht om na een uitbraak van een ziekte die in I.2 bedoelde bewakingsregeling in acht te nemen, mits de inrichting voldoet aan de voorschriften van artikel 80, lid 3 van Gedelegeerde Verordening 2020/689, en wordt herbevolkt met weekdieren afkomstig uit lidstaten, zones of compartimenten met de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae*.

2) De beperkingszone moet met het oog op de specifieke situatie worden vastgesteld en:

a) zij moet rekening houden met factoren die van invloed zijn op de risico's van verspreiding van infectie met *Bonamia ostreae*, met inbegrip van andere inrichtingen en in het wild levende weekdieren, zoals:

- i) het aantal, de leeftijd, het percentage en de spreiding van de sterfgevallen bij weekdieren in de met *Bonamia ostreae* besmette inrichting of groep inrichtingen;
- ii) de afstand tot en dichtheid van naburige inrichtingen of groepen inrichtingen en in het wild levende weekdieren;
- iii) de nabijheid van verwerkingsinrichtingen, contactinrichtingen of groepen inrichtingen;
- iv) de in de inrichting of groepen inrichtingen aanwezige soorten, in het bijzonder vatbare soorten en vectorsoorten;
- v) de kweekpraktijken die in de getroffen en naburige inrichtingen en groepen inrichtingen worden toegepast;
- vi) de hydrodynamische omstandigheden, en
- vii) andere vastgestelde epidemiologisch significante factoren;

b) de geografische afbakening moet aan de volgende minimumvoorschriften voldoen:

- i) de beschermingszone moet bestaan uit een gebied dat valt binnen een cirkel met een straal die ten minste de breedte van één intergetijdengebied of, als dit meer is, ten minste 5 km bedraagt, gecentreerd op de met *Bonamia ostreae* besmette inrichting, of een vergelijkbaar gebied dat op basis van de geschikte hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald, en
- ii) de bewakingszone moet bestaan uit een rondom de beschermingszone gelegen gebied van overlappende intergetijdgebieden, of een rondom de beschermingszone gelegen gebied dat valt binnen een cirkel met een straal van 10 km vanaf het middelpunt van de beschermingszone, of een vergelijkbaar gebied dat op basis van toepasselijke hydrodynamische of epidemiologische gegevens wordt bepaald,  
of
- iii) indien geen afzonderlijke beschermings- en bewakingszones zijn ingesteld, moet de beperkingszone bestaan uit een gebied dat zowel de beschermingszone als bewakingszone omvat.

I.3. Specifieke voorschriften voor het behouden van de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae* (Bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5, afdeling 4 van Gedelegeerde Verordening 2020/689)

1. Wanneer overeenkomstig artikel 81 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 gerichte bewaking vereist is om de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae* van en lidstaat, een zone of een compartiment te handhaven, moeten alle inrichtingen waar in de lijst opgenomen soorten worden gehouden in de lidstaat, de zone of het compartiment in kwestie onderworpen aan gezondheidsinspecties en moeten weekdieren worden bemonsterd overeenkomstig tabel 5.B, rekening

---

houdend met het risiconiveau van de inrichting ten aanzien van de insleep van infectie met *Bonamia ostreae*.

2. Bij de vaststelling van de frequentie van de gezondheidsinspecties die nodig zijn om de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae* van compartimenten te handhaven, moet, indien de gezondheidsstatus ten aanzien van de ziekte afhankelijk is van de gezondheidsstatus van de populaties van waterdieren in de omringende natuurlijke wateren, het risico op de insleep van infectie met *Bonamia ostreae* als hoog worden beschouwd.

3. De status vrij van infectie met *Bonamia ostreae* kan slechts behouden blijven zolang alle monsters, bij gebruik van de diagnostische methoden II.2 negatieve resultaten hebben opgeleverd voor *Bonamia ostreae* en elk vermoeden van infectie met *Bonamia ostreae* overeenkomstig de diagnostische methoden van II.3, is uitgesloten.

## **II. Diagnosemethoden en diagnostische criteria** (Bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5, afdeling 5 van Gedelegeerde Verordening 2020/689)

### II.1. Monsters

Het hele dier wordt naar het laboratorium (Wageningen Bioveterinary Research in Lelystad) gezonden voor de uitvoering van de in de punten II.2 en II.3 bedoelde diagnostische tests.

### II.2. Diagnosemethoden voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae*

De te gebruiken diagnosemethode voor het verkrijgen of behouden van de ziektevrije status ten aanzien van besmetting met *Bonamia ostreae* zijn histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel, of PCR. Bij de toepassing van deze diagnosemethoden worden de desbetreffende gedetailleerde methoden en procedures van bijlage 2 gevolgd.

### II.3. Diagnostische criteria om de aanwezigheid van besmetting met *Bonamia ostreae* te bevestigen of de verdenking van een dergelijke besmetting te weerleggen

Wanneer overeenkomstig artikel 58 van Gedelegeerde Verordening 2020/689 een verdenking van besmetting met *Bonamia ostreae* moet worden bevestigd dan wel weerlegd, wordt de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure nageleefd:

- a) het officiële onderzoek omvat ten minste één bemonstering van 30 weekdieren van gevoelige soorten, indien de verdenking op een mortaliteitsverslag berust of, indien dit niet het geval is, van 150 weekdieren van gevoelige soorten na aanvang van de periode waarin *Bonamia ostreae* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de winter of het vroege voorjaar.
- i. De monsters worden getest met behulp van de in punt i) vermelde diagnosemethoden, volgens de door het EURL voor ziekten van weekdieren goedgekeurde gedetailleerde diagnostische methoden en procedures: de aanwezigheid van *Bonamia ostreae* wordt als bevestigd beschouwd bij een positief resultaat op basis van histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of in-situhybridisatie, in combinatie met een positief resultaat op basis van PRC gevolgd door sequencing. Indien geen biologisch materiaal beschikbaar is voor histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of *in-situ* hybridisatie, moet de aanwezigheid van *Bonamia ostreae* worden geacht te zijn bevestigd wanneer positieve resultaten worden verkregen met behulp van twee PCR-tests die op verschillende fragmenten van het genoom van de parasiet zijn gericht en met sequencing zijn aangevuld;
- ii. Het vermoeden van infectie met *Bonamia ostreae* moet worden uitgesloten indien die tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van *Bonamia ostreae*.

Tabel 5.A

**Regeling voor lidstaten, zones en compartimenten voor de driejarige controleperiode voorafgaande aan het behalen van de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae***

Jaar van het bewakingsprogramma	Aantal gezondheidsinspecties per jaar in elke inrichting of groep van inrichtingen	Aantal laboratoriumonderzoeken per jaar	Aantal weekdieren in de steekproef
Jaar 1	1	1	150
Jaar 2	1	1	150
Jaar 3	1	1	150

Tabel 5.B

**Regeling voor lidstaten, zones of compartimenten voor het handhaven van de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae***

Risiconiveau <sup>(1)</sup>	Aantal gezondheidsinspecties in elke inrichting/groep van inrichtingen	Aantal laboratoriumonderzoeken	Aantal weekdieren in de steekproef
Hoog	1 per jaar	1 per 2 jaar	150
Middelgroot	1 per 2 jaar	1 per 2 jaar	150
Laag	1 per 3 jaar	1 per 3 jaar	150

<sup>(1)</sup> Risiconiveau dat aan de inrichting is toegekend door de bevoegde autoriteit, zoals bedoeld in deel I, hoofdstuk 2, eerste alinea, behalve in het geval van afhankelijke compartimenten waar alle inrichtingen worden geacht de risicoscore "hoog" te hebben.

---

# Bijlage 2 Gedetailleerde diagnosemethoden en -procedures voor de bewaking van en de bevestiging van besmetting met *Bonamia ostreae*

Uit:

Gedelegeerde Verordening 2020/689 tot aanvulling van Verordening 2016/429 wat betreft regels voor bewaking, uitroeiingsprogramma's en de ziektevrije status voor bepaalde in de lijst opgenomen ziekten en nieuwe ziekten. Gedetailleerde ziekte specifieke voorwaarden voor *Bonamia ostreae* zijn te vinden in bijlage VI, deel II, hoofdstuk 5 van Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/689. De meest recente informatie over goedgekeurde diagnostische methoden is te vinden op de site van het EURL: <https://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>

## Diagnostische en bemonsteringsmethoden

- 1) Het hele dier moet naar het laboratorium worden gezonden voor de uitvoering van de in de punten 2 en 3 bedoelde diagnostische tests.
- 2) De diagnostische methoden die moeten worden gebruikt voor het verlenen of het handhaven van de status vrij van infectie met *Bonamia ostreae*, overeenkomstig de punten 2, 3 en 4, moeten de door het EURL voor ziekten van weekdieren goedgekeurde gedetailleerde diagnostische methoden en procedures volgen, en zijn: histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of PCR.
- 3) Wanneer overeenkomstig artikel 58 een vermoeden van infectie met *Bonamia ostreae* moet worden bevestigd dan wel uitgesloten, moet de volgende inspectie-, bemonsterings- en testprocedure worden nageleefd:
  - a. het officiële onderzoek omvat ten minste één bemonstering van 30 weekdieren van gevoelige soorten, indien het vermoeden op een mortaliteitsverslag berust of, indien dit niet het geval is, van 150 weekdieren van gevoelige soorten na aanvang van de periode waarin *Bonamia ostreae* wordt overgebracht. Wanneer die periode niet bekend is, begint de bemonstering in de winter of het vroege voorjaar;
  - b. de monsters moeten worden getest aan de hand van de in punt i) vermelde diagnostische methoden, volgens de door het EURL voor ziekten van weekdieren goedgekeurde gedetailleerde diagnostische methoden en procedures:
    - i. de aanwezigheid van *Bonamia ostreae* moet als bevestigd worden beschouwd bij een positief resultaat op basis van histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of in-situ hybridisatie, in combinatie met een positief resultaat op basis van PCR gevolgd door sequencing. Indien geen biologisch materiaal beschikbaar is voor histopathologie, imprints (afdrukken) van weefsel of in-situhybridisatie, moet de aanwezigheid van *Bonamia ostreae* worden geacht te zijn bevestigd wanneer positieve resultaten worden verkregen met behulp van twee PCR-tests die op verschillende fragmenten van het genoom van de parasiet zijn gericht en met sequencing zijn aangevuld;
    - ii. het vermoeden van infectie met *Bonamia ostreae* moet worden uitgesloten indien die tests geen verdere aanwijzingen opleveren voor de aanwezigheid van *Bonamia ostreae*.

# Bijlage 3 Testen met inactivatie en detectie van *Bonamia*

## Test met UV behandeling

In 2020 hebben WMR en WBVR een test uitgevoerd met UV behandeling. *Bonamia* besmette oesters (48 stuks) waren over na de niet destructieve pre-screening van de broedstock voor gebruik van *Bonamia*-vrije individuen door het broedhuis van Stichting Zeeschelp. De besmette oesters zijn in een 300L tank met gefiltreerd zeewater en beluchting geplaatst. De sterfte van de oesters is gemonitord en zodra sterfte optrad is 1L water gefiltreerd over een GFC filter. Daarnaast is het water ook door een UV filter gehaald voordat het werd gefiltreerd. Het water is 1x, 2x en 3x met UV behandeld.

De resultaten van de vier behandelingen zijn weergegeven in Tabel 1. De UV behandeling veroorzaakte een afname in detectie van de *Bonamia* besmetting in het water, maar kon de parasiet niet verwijderen. Meerdere keren achter elkaar met UV behandelen van het water leverde geen verbetering (Tabel 2). De PCR test toont alleen genetisch materiaal en maakt geen onderscheid tussen levensvatbare parasieten of restanten genetisch materiaal. Het is dus mogelijk dat er geen parasiet meer in het water zat maar alleen fragmenten genetisch materiaal. Dat kan met deze test niet bepaald worden.

Onderzoekers van Ifremer hebben met doses UV die hoger waren dan voor andere pathogenen de parasiet *Perkinsus olseni* wel kunnen uitschakelen (persoonlijke mededeling C. Stavarakakis). Zij durven zonder extra onderzoek geen uitspraak te doen over de effectiviteit bij *Bonamia*. Hun inschatting is dat ultrafiltratie met 0,02 µm porositeit, *Bonamia* tegen zal kunnen houden. Maar het terugspoelen van de filter dient zorgvuldig te gebeuren (water apart opvangen en afvoeren), want dit kan een potentiële bron van *Bonamia* zijn.

Tabel 1. Aanwezigheid *Bonamia* in water voor en na UV behandeling. De behandelingen zijn in triplo uitgevoerd. Hoe lager het Ct getal, hoe hoger de besmetting.

Behandeling	Bonamia-pcr Ct
geen UV	29,23
geen UV	29,03
geen UV	29,20
1x UV	30,14
1x UV	30,21
1x UV	30,14
2x UV	30,63
2x UV	30,96
2x UV	32,14
3x UV	30,59
3x UV	33,77
3x UV	34,00



---

## Test met ultrafiltratie

In het EU project VIVALDI is o.a. door Ifremer gewerkt aan waterzuivering voor inactivatie van het oosterherpesvirus OsHV-1 dat voorkomt bij Japanse oesters (Stavrakakis, 2019). Hydro-Optic Disinfection (HOD) is een nieuwe techniek die is ontwikkeld door het Israëlische bedrijf Atlantium. Ifremer heeft deze techniek vergeleken met behandelingen met chloor en ozon en membraan filtratie. Alle technieken waren in staat om het OsHV-1 virus te inactiveren, maar chloor en ozon leverde potentieel toxische bijproducten.

*Bonamia* besmette oesters die over waren na de niet destructieve pre-screening van de broedstock voor gebruik van *Bonamia*-vrije individuen door de broedhuizen van Roem van Yerseke en Stichting Zeeschelp zijn op 16 april 2021 (19 stuks) en 21 mei 2021 (31 stuks) in een 300L tank met gefiltreerd zeewater en beluchting geplaatst. De sterfte van de oesters is gemonitord en op 30 juni trad sterfte op en is de test uitgevoerd. Water is behandeld door ultrafiltratie met een Alapure FT-91 Waterfilter Ultrafiltratie Membraan. Van dit behandelde water is driemaal 1L water gefiltreerd over een GFC filter. Ter vergelijking is ook driemaal 1L onbehandeld water gefiltreerd over een GFC filter.

In de test waren twee van de drie controle monsters besmet met *Bonamia*, terwijl alle drie de met ultrafiltratie behandelde monsters geen *Bonamia* lieten zien (Tabel 2). Dit geeft aan dat ultrafiltratie *Bonamia* buiten de deur kan houden.

Tabel 2. Aanwezigheid *Bonamia* in water met of zonder ultrafiltratie behandeling.

Datum	Behandeling ultrafiltratie	Uitslag
30-6-2021	ja no 1	negatief
30-6-2021	ja no 2	negatief
30-6-2021	ja no 3	negatief
30-6-2021	nee no 1	negatief
30-6-2021	nee no 2	dubieus
30-6-2021	nee no 3	dubieus

## Validatie nieuwe PCR detectiemethode

### Methode

In 2022 heeft het Vlaamse Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) een nieuwe methode voor detectie van *Bonamia*, hieronder genaamd dPCR, opgezet en getest met DNA van platte oesters die gescreend waren op aanwezigheid van *Bonamia* door WMR en WBVR. Een deel van de door WBVR met PCR geanalyseerde monsters zijn opnieuw getest op de aanwezigheid van *Bonamia* via dPCR. Op de dPCR werden de monsters enkel geladen.

### Resultaten

Bij dPCR 1 testten enkele oesters positief die negatief waren bij de PCR (Tabel 3). De bekomen concentraties van die oesters zijn wel eerder aan de lage kant. Een aantal monsters werden opnieuw geladen op de dPCR ter controle (dPCR 2). Bij dPCR 2 werden dezelfde resultaten bekomen als bij dPCR 1, behalve bij oester 113, die ofwel negatief is ofwel zeer licht besmet.

Tabel 3. *Bonamia*-analyse resultaten van platte oestermonsters door WBVR en ILVO.

Oester	WBVR PCR	ILVO dPCR 1: Concentratie (c / µl)	ILVO dPCR 2: Concentratie (c / µl)
97	-	8417,0	/
98	+	50455,3	/
99	+	78,7	70,2
100	dubieus	19,1	21,3
101	dubieus	4,3	8,5
102	-	-	/
103	-	-	/
104	-	-	/
105	+	17,0	19,1
106	-	-	/
107	-	-	/
108	+	gesatureerd	gesatureerd
109	+	32657,4	/
110	dubieus	25,5	17,0
111	+	136,2	123,4
112	dubieus	12,8	2,1
113	-	4,3	0,0
114	-	-	/
115	-	-	/
116	dubieus	51,1	31,9

Legenda	
	Negatief voor <i>Bonamia</i>
	Positief voor <i>Bonamia</i>
/	Monster niet geladen

De dubieuze resultaten van WBVR zijn dus wel degelijk positief, maar met een lagere concentratie. De dPCR blijkt dus gevoeliger te zijn voor lagere concentraties aan parasiet-DNA, Alle resultaten die met de dPCR werden bekomen, komen dus overeen met die van WBVR. Er is één uitzondering, namelijk oester 97. Deze zou negatief moeten zijn, maar testte positief. Het zou kunnen dat de well van oester 97 gecontamineerd is door de well van de positieve oester 98.

## Detectie van *Bonamia* in water met nieuwe detectiemethode

### Methode

#### Test 1

In 2022 heeft WMR 52 positieve en 26 dubieuze oesters die na screening op afwezigheid van *Bonamia* over waren op 29 april in een 300L tank met gefiltreerd zeewater en beluchting geplaatst. Hieruit zijn op 2 mei drie watermonsters van 2L verzameld en ingevroren bij -20 °C. Daarnaast zijn drie watermonsters van 2L verzameld uit het waterreservoir waar het gefiltreerde zeewater in wordt opgeslagen. Deze monsters zijn door het ILVO geanalyseerd met dPCR.

#### Test 2

Voor test 2 is een reeks met verschillende dichtheden aan besmette oesters gebruikt. In zes 30L tanks gevuld met gefiltreerd zeewater en beluchting zijn 2x5 oesters, 2x2 oesters en 2x1 oester ingezet op 16 mei 2022. Voordat de oesters werden toegevoegd is uit elke tank 2L water genomen (T0) en

---

ingevroren bij -20 °C. Een uur na toevoegen van de oesters aan de tanks is uit elke tank opnieuw 2L genomen (T1) en in de diepvries gezet. 24 uur na toevoegen van de oesters aan de tanks is uit elke tank opnieuw 2L genomen (T2) en in de diepvries gezet en 72 uur na toevoegen van de oesters aan de tanks is uit elke tank opnieuw 2L genomen (T3) en in de diepvries gezet.

## Resultaten

### *Test 1*

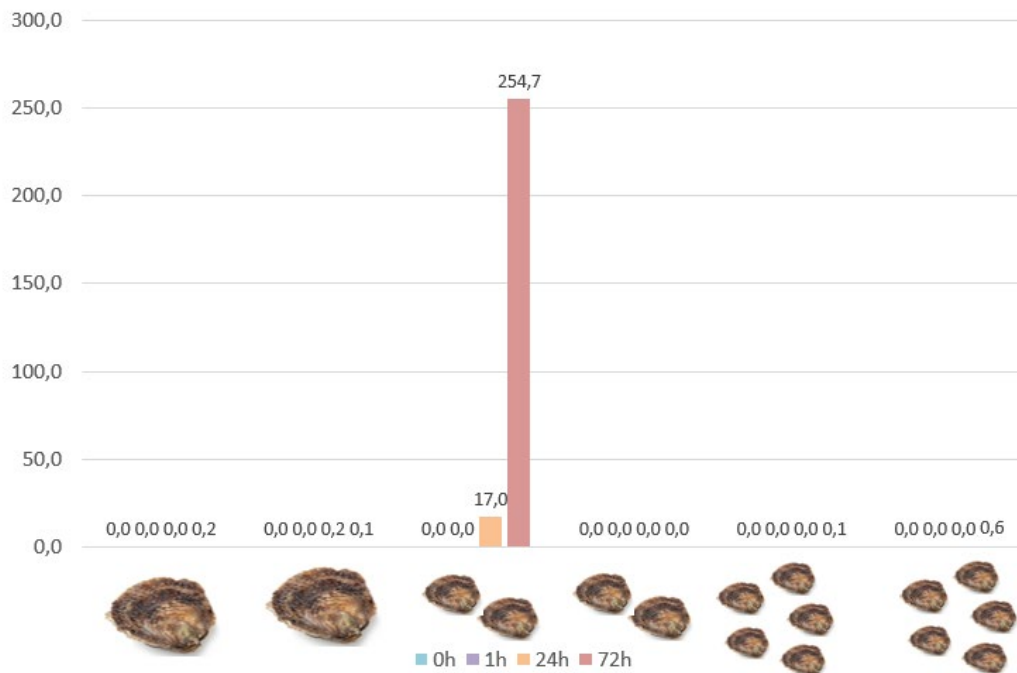
Van de 3 replicaten van het water met besmette oesters testten er 3 positief (Tabel 4). De dPCR blijkt dus gevoelig genoeg voor de detectie van de parasieten in het water. Van de 3 replicaten van het water uit het reservoir testten er 0 positief. Het water vanuit het reservoir is dus niet besmet met de parasieten en er is geen contaminatie opgetreden tijdens het laboratoriumwerk.

*Tabel 4. dPCR detectie van Bonamia in watermonsters (n=3) verzameld uit een tank met gefiltreerd zeewater en besmette platte oesters en het waterreservoir waar het gefiltreerde zeewater in wordt opgeslagen.*

Waterstaal	dPCR	Gemiddelde concentratie (c / µl)
Water besmette oesters 1	+	1950,0
Water besmette oesters 2	+	1717,0
Water besmette oesters 3	+	2186,2
Water reservoir 1	-	0
Water reservoir 2	-	0
Water reservoir 3	-	0

### *Test 2*

Enkel in 1 biologisch replicaat met twee oesters werd een signaal van *Bonamia* opgepikt na 24h en 72h (zie Figuur 1). Het kieuwweefsel van die twee oesters had een zeer hoge infectiegraad. De andere oesters zijn niet geanalyseerd op mate van infectie. Dit resultaat suggereert dat de infectiegraad van de oester vooral zorgt voor het eDNA in het water, eerder dan het aantal besmette oesters. Een oester met een hoge infectiegraad zal vermoedelijk veel meer eDNA los laten dan meerdere oesters met lage infectie.



*Figuur 1. dPCR detectie van Bonamia in watermonsters verzameld uit tanks met verschillende dichtheden aan oesters (1, 2 en 5 oesters) en op verschillende tijdstippen (voorafgaand aan introductie oesters op 0 uur en na 1,24 en 72 uur). De gemiddelde concentratie (c / µl) is aangegeven op de y-as.*

### Referentie

Stavarakakis C. (2019) Biosecurity measures and inactivation of pathogenic organisms in shellfish aquaculture facilities. Abstract VIVALDI Meeting Brest Nov 2019

---

Wageningen Marine Research  
T: +31 (0)317 48 09 00  
E: [marine-research@wur.nl](mailto:marine-research@wur.nl)  
[www.wur.nl/marine-research](http://www.wur.nl/marine-research)

Bezoekers adres:

- Ankerpark 27 1781 AG Den Helder
- Korringaweg 7, 4401 NT Yerseke
- Haringkade 1, 1976 CP IJmuiden

---

**Wageningen Marine Research** levert met kennis, onafhankelijk wetenschappelijk onderzoek en advies een wezenlijke bijdrage aan een duurzamer, zorgvuldiger beheer, gebruik en bescherming van de natuurlijke rijkdommen in zee-, kust- en zoetwatergebieden.



Wageningen Marine Research is onderdeel van Wageningen University & Research. Wageningen University & Research is het samenwerkingsverband tussen Wageningen University en Stichting Wageningen Research en heeft als **missie**: 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'

---