DÉCISION DE LA COMMISSION

du 16 mai 1994

établissant les plans d'échantillonnage et les méthodes de diagnostic concernant la détection et la confirmation de la présence de certaines maladies des mollusques

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(94/306/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 91/67/CEE du Conseil, du 28 janvier 1991, relative aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché des animaux et des produits de l'aquaculture [1], modifiée par la directive 93/54/CEE [2] et notamment son article 15,

considérant que, afin d'assurer l'application uniforme des procédures définies dans la directive 91/67/CEE, il convient d'établir des plans d'échantillonnage et des méthodes de diagnostic permettant de déclarer une zone côtière ou une exploitation indemne des maladies affectant les mollusques et permettant l'examen des stocks dans les zones où des mortalités anormales sont enregistrées ;

considérant que le comité vétérinaire scientifique, instauré par la décision 81/651/CEE de la Commission [3], a été consulté ;

considérant que les mesures prévues dans la présente décision sont conformes à l'avis du comité vétérinaire permanent,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION :

Article premier

Les méthodes d'échantillonnage et de diagnostic permettant la détection et la confirmation de la présence de la bonamiose *(Bonamia ostreae)* et de la marteiliose *(Marteilia refringens)* sont définies dans l'annexe.

Article 2

La présente décision est applicable à partir du 1er juin 1994.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 16 mai 1994.

Par la Commission

René STEICHEN

Membre de la Commission

---

[1] JO n° L 46 du 19. 2. 1991, p. 1.
[2] JO n° L 175 du 19. 7. 1993, p. 34.
[3] JO n° L 233 du 19. 8. 1981, p. 32.

ANNEXE

I. PROCÉDURES D'ÉCHANTILLONNAGE ET D'ESSAIS POUR LA SURVEILLANCE DE *BONAMIA OSTREAE* ET DE *MARTEILIA REFRINGENS* DANS L'ESPÈCE *OSTREA EDULIS*

1. Échantillonnage

1.1. *Points de prélèvement*

Pour chacune des zones visées à l'annexe B point III de la directive 91/67/CEE, il convient de choisir un nombre de points de prélèvement de nature à maximiser les chances de détecter *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* que l'un ou les deux soient présents. À cet effet, il faut tenir compte des paramètres ayant une incidence sur le développement des agents pathogènes comme la densité de peuplement, les courants et le cycle de croissance des mollusques.

Trois points de prélèvement au moins doivent être retenus pour chaque zone. Le nombre de points est augmenté pour les grandes zones comportant plusieurs sites distincts de culture des espèces en cause.

Chaque fois que ce cera possible, il y a lieu de prélever au moins un échantillon sur des gisements naturels. Les mollusques présentant des anomalies (croissance anormale, coquilles béantes) seront sélectionnés.

1.2. *Période et fréquence de prélèvement*

La fréquence des contrôles visés à l'annexe B point III.B.2 de la directive 91/67/CEE est fixée en fonction de la période au cours de laquelle la maladie est patente ou décelable, les visites de contrôle devant avoir lieu après cette période. Les périodes de contrôles doivent aussi tenir compte des transferts de mollusques, qui ont lieu généralement au printemps et en automne. L'échantillonnage doit donc être effectué

— une fois par an, à la fin de l'été pour *Marteilia refringens,*

— deux fois par an (printemps et automne), pour *Bonamia ostreae.*

1.3. *Volume des prélèvements*

Au cours de la période de contrôle de deux ans qui précède l'octroi de l'agrément, le volume des prélèvements à chaque point est de 150, pour assurer avec un niveau de confiance de 95 % la détection d'une prévalence de 2 % des porteurs d'agents pathogènes.

Pendant les années qui suivent (maintien de l'agrément), le volume de prélèvement peut être abaissé à 30, pour assurer avec un niveau de confiance de 95 % la détection d'une prévalence de 10 % des porteurs d'agents pathogènes.

2. Transport des échantillons

Tous les échantillons de mollusques doivent arriver au laboratoire agréés dans les vingt-quatre heures suivant leur prélèvement. Ils doivent être emballés conformément aux normes en vigueur afin d'être gardés en bon état. Une étiquette précisant le lieu de prélèvement, la date et (éventuellement) les antécédents doit être fixée à l'échantillon.

3. Examen macroscopique

Les mollusques doivent être ouverts avec précaution pour éviter que les tissus soient endommagés, en particulier le manteau, les branchies, le cœur et la glande digestive. On notera les anomalies et les lésions des tissus.

4. Préparation et examen des échantillons pour la détection de la bonamiose

4.1. *Immunofluorescence*

4.1.1. L'immunofluorescence peut être effectuée sur des larves, de petites huîtres et des huîtres adultes. Après avoir séché les échantillons, il convient d'étaler les larves en les pressant ou de faire un frottis du tissu cardiaque sur une lame pour microscope. Faire sécher à l'air et fixer par immersion dans l'acétone pendant 5 à 10 minutes. Ces préparations peuvent être utilisées immédiatement ou congelées à − 20 °C.

Préparer une solution d'anticorps monoclonaux dans une solution tampon (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), en utilisant la dilution recommandée par le fournisseur.

Prélever à la pipette 50 µl de la solution dans chaque puits ou sur les lames pour couvrir les frottis. Après incubation en chambre humide pendant 15 minutes à 20 °C, laver les lames avec le tampon précité, puis couvrir avec une solution d'anticorps de chèvre antisouris Lg G (50 µl par puits), liés avec de l'isothiocyanate de fluorescéine. Diluer la solution d'anticorps conformément aux recommandations du fournisseur et ajouter du bleu d'Evans (1 %) au tampon utilisé pour la dilution.

Après incubation en chambre humide à 20 °C pendant 15 minutes, les préparations sont placées dans un tampon de glycérine et examinées à l'aide d'un microscope U/V.

La présence de cellules sphériques d'un vert fluorescent confirme l'infection par *Bonamia ostreae.*

D'autres essais mis au point par des laboratoires et donnant des résultats comparables peuvent également être utilisés.

4.2. *Frottis sanguins*

Pour examiner les larves et les huîtres après que les échantillons ont séché à l'air, faire un frottis de larves ou étaler par pression les tissus cardiaques sur une lame histologique. Les lames sont séchées à l'air puis fixées dans le méthanol.

Les larves et les huîtres préparées sont colorées conformément aux méthodes normalisées applicables en l'occurrence. Ensuite, rincer à l'eau du robinet et laisser sécher complètement à l'air froid ou chaud avant de monter dans une résine synthétique.

Le parasite (taille : 2 microns) se reconnaît à son cytoplasme (bleu) doté d'un noyau rouge. Il peut se trouver à l'intérieur ou à l'extérieur des hématocytes. Un temps d'observation de 5 minutes par lame suffit pour cet examen.

4.3. *Histologie*

Pour préparer l'examen histologique, procéder à une découpe de l'huître à travers le cœur, la glande digestive et les branchies, et placer l'échantillon dans un liquide fixateur, par exemple celui de Davidson, de Bouin ou de Carson, ce dernier permettant d'utiliser si nécessaire les échantillons pour l'examen au microscope électronique. Il faut respecter une proportion de 1 à 10 entre le volume de l'échantillon et celui du fixateur.

Plusieurs colorants non spécifiques tels que l'hématoxyline-éosine ou le procédé trichrome de Masson, permettent de faire apparaître *Bonamia ostreae.* Ces exemples ne sont pas limitatifs et d'autres méthodes de coloration peuvent être utilisées. Il est recommandé d'examiner deux coupes pour chaque huître.

Le parasite (taille : 2 microns) apparaît libre dans le tissu conjonctif ou dans les hématocytes.

5. **Préparation et examen des échantillons pour la détection de la marteiliose**

5.1. *Examen cytologique*

Pour préparer les frottis, procéder à une coupe à travers la glande digestive et les branchies, enlever l'excédent d'eau en plaçant l'échantillon sur un papier buvard, puis faire un frottis en utilisant la section qui correspond à la coupe du système digestif. Les lames séchées à l'air sont alors fixées dans le méthanol (pendant 2 à 3 minutes).

Les échantillons préparés sont colorés à l'aide des méthodes normalisées applicables en l'occurrence. Ensuite, rincer à l'eau du robinet et laisser sécher complètement à l'air froid ou chaud puis monter dans une résine synthétique.

Le parasite, dont la taille est de 5 à 8 microns pendant les premiers stades du développement, peut atteindre 40 microns pendant la sporulation. Le cytoplasme des cellules prend une couleur bleue plus ou moins intense, avec un noyau d'un rouge intense. Les cellules secondaires ou sporoblastes sont entourés d'un halo brillant. Un temps d'observation de 5 minutes par lame suffit pour cet examen.

5.2. *Examen histologique*

Pour réaliser les coupes histologiques, procéder à une découpe à travers la glande digestive à l'aide de petits ciseaux et placer l'échantillon dans un liquide fixateur, par exemple celui de Davidson, de Bouin ou de Carson, ce dernier permettant de se resservir si nécessaire des échantillons pour un examen au microscope électronique. Il faut respecter une proportion maximale de 1 à 10 entre le volume du tissu et celui du fixateur.

Les échantillons sont ensuite manipulés selon les méthodes histologiques courantes. Plusieurs colorants permettent de faire apparaître *Marteilia refringens :* l'hématoxyline-éosine, le trichrome de Masson. Ces exemples ne sont pas limitatifs et d'autres méthodes de coloration peuvent être utilisées. Il est recommandé d'examiner deux coupes par huître.

Dans ses premiers stades de développement, *Marteilia* se rencontre dans l'épithélium de l'estomac ; lors des stades ultérieurs, on peut trouver le parasite dans l'épithélium des diverticules digestifs. Des sporanges libres peuvent aussi être détectés dans la lumière de l'intestin.

II. EXAMEN DES STOCKS D'*OSTREA EDULIS* DANS LES ZONES OU DES MORTALITÉS ANORMALES ONT ÉTÉ ENREGISTRÉES

Chaque fois que des mortalités anormales sont observées dans les stocks d'*Ostrea edulis,* il y a lieu de procéder de toute urgence à une enquête destinée à en déterminer l'étiologie.

La taille de l'échantillon prélevé doit être de 100 huîtres et doit être traité selon la procédure définie pour l'analyse histologique à la section I. Cette technique doit être utilisée tout d'abord avant qu'il ne soit fait appel à un autre type d'examen.

Les échantillons sont fixés de préférence avec le liquide fixateur de Carson qui permet également de les réutiliser pour l'examen au microscope électronique.