DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 16 maggio 1994

che fissa i piani di campionamento e i metodi diagnostici per individuare e confermare talune malattie dei molluschi

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(94/306/CE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 91/67/CEE del Consiglio, del 28 gennaio 1991, che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura [1], modificata dalla direttiva 93/54/CEE [2], in particolare l'articolo 15,

considerando che per assicurare l'applicazione uniforme delle procedure definite nella direttiva 91/67/CEE è necessario fissare piani di campionamento e metodi diagnostici da seguire per dichiarare una zona o un'azienda litoranea indenne da malattie dei molluschi e per esaminare gli stock qualora si presentino casi di mortalità anormale;

considerando che è stato consultato il comitato veterinario scientifico istituito con decisione 81/651/CEE della Commissione [3];

considerando che le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

I piani di campionamento e i metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza di Bonamiosis (Bonamia Ostreae) e di Marteiliosis (Marteilia Refringens) sono fissati nell'allegato.

Articolo 2

La presente decisione si applica a decorrere dal 1° giugno 1994.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 16 maggio 1994.

Per la Commissione

René STEICHEN

Membro della Commissione

---

[1] GU n. L 46 del 19. 2. 1991, pag. 1.
[2] GU n. L 175 del 19. 7. 1993, pag. 34.
[3] GU n. L 233 del 19. 8. 1981, pag. 32.

ALLEGATO

I. PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO E DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLA BONAMIA OSTREAE E DELLA MARTEILIA REFRINGENS NELLA OSTREA EDULIS

1. Campionamento

1.1. *Punti di campionamento*

Per ciascuna zona di cui all'allegato B, punto III della direttiva 91/67/CEE devono essere selezionati alcuni punti di campionamento onde aumentare al massimo le probabilità di individuare l'eventuale presenza di Bonamia ostreae e/o di Marteilia refringens. A questo scopo è necessario tener conto di parametri che influiscono sullo sviluppo degli agenti patogeni, quali la densità di carico, il flusso d'acqua ed il ciclo di sviluppo dei molluschi.

Per una data zona devono essere selezionati almeno tre punti di campionamento. Nel caso di zone estese, caratterizzate dalla presenza di diverse aree di produzione separate tra loro e in cui vengono allevate le specie sensibili, va selezionato un numero maggiore di punti.

Ove possibile, si preleva almeno 1 campione dagli allevamenti naturali. Vanno selezionati i molluschi che presentano anomalie (crescita anormale, gusci schiusi).

1.2. *Periodo e frequenza del campionamento*

La frequenza della visita di controllo sanitario di cui all'allegato B, punto III.B.2 della direttiva 91/67/CEE si basa sul periodo durante il quale la malattia è manifesta o individuabile, periodo al quale devono essere adeguate dette visite. I periodi di sorveglianza devono essere adeguati altresì ai trasferimenti dei molluschi, che in genere hanno luogo in primavera e in autunno. Di conseguenza il campionamento deve essere effettuato:

— una volta all'anno dopo il periodo estivo per la Marteilia refringens

— due volte all'anno (primavera/autunno) per la Bonamia ostreae.

1.3. *Entità del campionamento*

Durante il periodo di controllo iniziale di due anni, che precede il riconoscimento, l'entità del campione per ciascun punto di campionamento è di 150, onde poter individuare, con un'attendibilità del 95 %, i portatori di agenti patogeni, a un grado di diffusione del 2 %.

Negli anni successivi (mantenimento del riconoscimento) l'entità del campione può essere ridotta a 30 onde poter individuare, con un'attendibilità del 95 %, i portatori di agenti patogeni, a un grado di diffusione del 10 %.

2. Spedizione di campioni

Tutti i molluschi campionati devono pervenire al laboratorio riconosciuto entro 24 ore dal campionamento. Essi devono essere confezionati secondo le correnti norme, in modo da restare in buone condizioni. Al campione dev'essere applicata un'etichetta indicante il luogo del campionamento, la data e gli eventuali antecedenti.

3. Esame macroscopico

I molluschi devono essere aperti con cautela in modo da non danneggiare i tessuti, in particolare il mantello, le branchie, il cuore e la ghiandola digestiva. Devono essere osservate eventuali anomalie e lesioni dei tessuti.

4. Preparazione dei campioni e ricerca della bonamiosi

4.1. *Immunofluorescenza*

4.1.1. La prova dell'immunofluorescenza dev'essere effettuata sulle larve, sulle ostriche piccole e su quelle adulte. Dopo aver essiccato i campioni, schiacciare le larve o fare uno striscio di tessuto cardiaco su un vetrino per microscopio. Essiccare all'aria e fissare mediante immersione in acetone per 5-10 minuti. Queste preparazioni possono essere usate direttamente oppure congelate a - 20 °C.

Preparare una soluzione di anticorpi monoclonali in una soluzione tampone (NaCl 8 g/l, KH_2, PO_4 0,2 g/l, Na_2 HPO_4 $12H_2O$ 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, Azide Na 0,2 g/l, Tween pH 7,4), utilizzando la soluzione raccomandata dal fornitore.

Pipettare 50 µl della soluzione in ciascun pozzetto o su vetrini, per coprire gli strisci. Dopo incubazione in un umidificatore per 15 minuti a 20 °C, lavare i vetrini con il succitato tampone e ricoprirli quindi con una soluzione di anticorpi di capra antitopo Ig G (50 µl per pozzetto) coniugata con isotiocianato di fluorescina. Diluire questa soluzione di anticorpi seguendo le raccomandazioni del fornitore, ed aggiungere del blu di Evans (1 %) al tampone usato per la diluizione.

Dopo incubazione in un umidificatore per 15 minuti a 20 °C, immettere le preparazioni in un tampone di glicerina ed esaminarle con microscopio U/V.

Se si osservano delle cellule sferiche, di color verde fluorescente, ciò conferma l'infezione da Bonamia ostreae.

Si possono effettuare anche altre prove nei singoli laboratori, che diano risultati analoghi.

4.2. *Strisci di sangue*

Per le larve e le ostriche, una volta che i campioni sono stati essiccati all'aria, fare una poltiglia con le larve oppure uno striscio di tessuto cardiaco su un vetrino istologico. Essiccare i vetrini all'aria e fissarli quindi in metanolo.

Colorare le larve e le ostriche preparate con i metodi standard specifici di quella data colorazione. Dopo la colorazione, sciacquare con acqua di rubinetto e lasciar essiccare completamente all'aria fredda o calda e fissare mediante resina sintetica.

Il parassita (della dimensione di 2 micron) si evidenzia con il suo citoplasma blu comprendente un nucleo rosso. È osservabile negli ematociti o al di fuori di essi. È sufficiente un periodo di osservazione di 5 minuti per ciascun vetrino.

4.3. *Istologia*

Per predisporre l'esame istologico, tagliare una sezione (« fettina ») di ostrica lungo il cuore, la ghiandola digestiva e le branchie e sistemare il campione in un liquido di fissazione quale il Davidson, il Bouin o il Carson, l'ultimo dei quali consente, all'occorrenza, l'esame di campioni al microscopio elettronico. Dev'essere rispettato un rapporto tra volume del campione e volume del liquido di fissazione di 1 : 10.

Parecchie colorazioni aspecifiche, ad esempio ematossilina-eosina o il processo tricromatico di Masson, consentono di visualizzare la Bonamia ostreae. Questi esempi non sono limitativi e possono essere usati altri metodi di colorazione. Si raccomanda di esaminare due sezioni per ostrica.

Il parassita (2 micron) viene evidenziato liberamente nel tessuto connettivo o negli ematociti.

5. **Preparazione dei campioni e ricerca della marteiliosi**

5.1. *Esame citologico*

Per preparare gli strisci, tagliare una sezione della ghiandola digestiva e delle branchie, rimuovere l'acqua in eccesso sistemando il campione su carta assorbente, quindi fare sul vetrino uno striscio del campione usando la sezione che passa attraverso l'apparato digestivo. Essiccare i vetrini all'aria e fissarli in metanolo (2-3 minuti).

Colorare i campioni preparati conformemente ai metodi standard specifici di quella data colorazione. Dopo la colorazione, sciacquare con acqua di rubinetto, lasciare essiccare completamente all'aria fredda o calda e fissare mediante resina sintetica.

Il parassita, le cui dimensioni nelle fasi precoci di sviluppo sono di 5-8 micron, può raggiungere i 40 micron durante la sporulazione. Il citoplasma delle cellule raggiunge una colorazione blu di maggiore o minore entità, mentre il nucleo è di colore intensamente rosso. Le cellule secondarie o sporoblasti sono circondate da un alone brillante. È sufficiente un periodo di osservazione di 5 minuti per ciascun vetrino.

5.2. *Esame istologico*

Per effettuare l'esame istologico, tagliare una sezione della ghiandola digestiva mediante forbicine e sistemare il campione in un liquido di fissazione quale il Davidson, il Bouin o il Carson, l'ultimo dei quali consente il riutilizzo dei campioni al microscopio elettronico, se necessario. Rispettare un rapporto massimo di 1 : 10 tra il volume del tessuto e quello del liquido di fissazione.

Trattare quindi i campioni con i classici metodi istologici. Parecchie colorazioni consentono di visualizzare la Marteilia refringens : ad esempio ematossilina-eosina o processo tricromatico di Masson. Questi esempi non sono limitativi e possono essere usati altri metodi di colorazione. Si raccomanda di esaminare due sezioni per ostrica.

Gli stadi giovani di sviluppo della Marteilia sono presenti nell'epitelio dello stomaco, quelli successivi possono essere trovati nell'epitelio dei diverticoli digestivi. Nel lume dell'intestino possono essere osservati anche sporangi liberi.

II. ESAME DELLE PARTITE DI O. EDULIS NELLE QUALI SI VERIFICANO MORTALITÀ INCONSUETE

L'osservazione di mortalità anormali nelle partite di O. edulis deve far scattare una procedura di emergenza per la determinazione dell'eziologia del fenomeno.

In tal caso il campione prelevato dev'essere costituito da 100 ostriche. Il campione dev'essere sottoposto alla procedura di analisi istologica di cui al capitolo I. Questa tecnica dev'essere usata prima di effettuare altri tipi di analisi.

I campioni vengono fissati di preferenza con liquido di fissazione di Carson, che consente altresì il riutilizzo del campione nelle tecniche di microscopia elettronica.