DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 16 de mayo de 1994

por la que se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de ciertas enfermedades de los moluscos

(Texto pertinente a los fines del EEE)

(94/306/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 91/67/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura (1), modificada por la Directiva 93/54/CEE (2) y, en particular, su artículo 15,

Considerando que, con el fin de garantizar la aplicación uniforme de los procedimientos establecidos en la Directiva 91/67/CEE, es necesario determinar los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico necesarios para declarar qué zonas costeras y explotaciones acuícolas se hallan libres de enfermedades de los moluscos y examinar las poblaciones con niveles anómalos de mortalidad;

Considerando que se ha consultado al Comité científico veterinario establecido en la Decisión 81/651/CEE de la Comisión (3);

Considerando que las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

En el Anexo se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la bonamiosis *(Bonamia ostreae)* y la marteiliosis *(Marteilia refrigens)*.

Artículo 2

La presente Decisión será aplicable a partir del 1 de junio de 1994.

Artículo 3

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 16 de mayo de 1994.

Por la Comisión

René STEICHEN

Miembro de la Comisión

(1) DO nº L 46 de 19. 2. 1991, p. 1.
(2) DO nº L 175 de 19. 7. 1993, p. 34.
(3) DO nº L 233 de 19. 8. 1981, p. 32.

ANEXO

I. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO Y REALIZACIÓN DE PRUEBAS PARA EL SEGUIMIENTO DE *BONAMIA OSTREAE* Y *MARTEILIA REFRINGENS* EN *OSTREA EDULIS*

1. Muestreo

1.1. *Puntos de muestreo*

En cada una de las zonas recogidas en el punto III del Anexo B de la Directiva 91/67/CEE se seleccionará un número determinado de puntos de muestreo con el fin de aumentar al máximo las posibilidades de detección de *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens* o ambas enfermedades. Con este objeto, se tendrá en cuenta una serie de parámetros con influencia en el desarrollo de los agentes patógenos, como la densidad de las poblaciones, las corrientes de agua y el ciclo de crecimiento de los moluscos.

En cada una de las zonas se deberán seleccionar al menos tres puntos de muestreo. Este número aumentará en las zonas de amplia extensión que contengan distintas áreas de cultivo de las especies vulnerables a las enfermedades.

Cuando sea posible, se tomará por lo menos una muestra de los lechos naturales, seleccionando los moluscos que presenten anomalías (crecimiento anómalo, conchas entreabiertas).

1.2. *Período y frecuencia del muestreo*

La frecuencia de las visitas de control mencionadas en el apartado 2 de la letra B del punto III del Anexo B de la Directiva 91/67/CEE se determinará en función de los períodos durante los cuales la enfermedad sea manifiesta o pueda detectarse; las inspecciones se llevarán a cabo después. Para escoger el momento de las inspecciones se tendrán también en cuenta las transferencias de moluscos, operaciones que, generalmente, se realizan en primavera y en otoño. Por tanto, el muestreo se llevará a cabo:

— una vez al año, tras el período estival, en el caso de *Marteilia refringens*,

— dos veces al año (en primavera y otoño) en el de *Bonamia ostreae*.

1.3. *Tamaño de las muestras*

Durante el período de control inicial de dos años previo a la autorización, el tamaño de la muestra será de 150 unidades en cada punto de muestreo, para poder garantizar un nivel de fiabilidad de detección de portadores patógenos del 95 %, con una prevalencia del 2 %.

Durante los años siguientes (mantenimiento de la autorización), el tamaño de la muestra podrá reducirse a 30 unidades para poder garantizar un nivel de fiabilidad de detección de portadores patógenos del 95 %, con una prevalencia del 10 %.

2. Envío de muestras

Todas las muestras de moluscos deberán llegar al laboratorio autorizado en un plazo de veinticuatro horas a partir de su recogida. Deberán estar embaladas con arreglo a las normas actuales para que se mantengan en buenas condiciones. Se deberá pegar a la muestra una etiqueta en la que se especifique el lugar de muestreo y su historial (si existiese).

3. Examen macroscópico

Los moluscos deberán abrirse con mucho cuidado para no dañar los tejidos, sobre todo el manto, las branquias, el corazón y la glándula digestiva. Se anotarán todas las anomalías y lesiones de los tejidos.

4. Preparación y examen de las muestras paa detectar la bonamiosis

4.1. *Inmunofluorescencia*

4.1.1. Se podrán realizar pruebas de inmunofluorescencia con larvas, ostras pequeñas y ostras adultas. Una vez secadas las muestras, aplástense las larvas o hágase un frotis de impresión del tejido del corazón sobre un portaobjetos de cristal de microscopio. Séquese al aire y fíjese por inmersión en acetona durante unos cinco a diez minutos. Estos preparados podrán utilizarse directamente o congelarse a − 20 °C.

Prepárese una solución de anticuerpos monoclonantes en una solución amortiguadora [NaCl 8g/l, KH_2PO_4 0,2g/l, Na_2HPO_4 $12H_2O$ 2,9g/l, KCl 0,2g/l, azida de Na 0,2 g/l, polisorbato (Tween) pH 7,4], utilizando la dilución recomendada por el proveedor.

Añadir con una pipeta 50µl de la dilución en cada uno de los pocillos o en los portaobjetos hasta cubrir los frotis. Tras haberlos incubado en una cámara húmeda a 20 °C durante quince minutos, lávense los portaobjetos con la solución amortiguadora mencionada más arriba y cúbranse con una dilución de anticuerpos de cabra del tipo lgG anti-ratón (50 µl por pocillo) ligada con isotiocianato de fluoresceína. La solución de anticuerpos se deberá diluir con arreglo a las recomendaciones del proveedor. Se añadirá azul de Evans (1 %) a la solución amortiguadora utilizada para la dilución.

Introdúzcanse los preparados en una solución amortiguadora de glicerina tras haberlos incubado en una cámara húmeda a 20 °C durante quince minutos y examínense con un microscopio de rayos UV.

La aparición de células esféricas con fluorescencia verde confirma la presencia de infección por *Bonamia ostreae*.

Podrá recurrirse también a otras pruebas de laboratorio que ofrezcan resultados comparables.

4.2. *Frotis sanguíneos*

Una vez que las muestras de larvas y ostras se hayan secado al aire, aplástense las larvas o hágase un frotis de impresión de los tejidos cardíacos en un portaobjetos histológico. Séquense los portaobjetos al aire y fíjense con metanol.

A continuación tíñanse las larvas y ostras preparadas de acuerdo con los métodos normalizados habituales para este tipo de tinción. Aclárense con agua del grifo, déjense secar completamente al aire frío o caliente y móntense en resina sintética.

El parásito (de un tamaño de 2 micrómetros) se identifica por su citoplasma azul y su núcleo rojo. Se puede observar en los hematocitos o fuera de ellos. Es suficiente un tiempo de observación de cinco minutos por portaobjetos.

4.3. *Histología*

Para poder realizar un examen histológico, hágase una sección que abarque el corazón, la glándula digestiva y las agallas, y colóquese la muestra en un líquido fijador como el de Davidson, Bouin o Carson. Éste último permite el examen de las muestras mediante un microscopio electrónico en caso necesario. Deberá respetarse la proporción del volumen de la muestra con respecto al volumen del fijador (de uno a diez).

Hay varias tinciones no específicas (por ejemplo, Hematoxilina-Eosina o el proceso tricomático de Masson) que permiten ver la *Bonamia ostreae.* Estos ejemplos no son los únicos válidos y pueden utilizarse otros métodos de tinción. Se recomienda examinar dos secciones por ostra.

El parásito (de un tamaño de 2 micrómetros) aparece profusamente en el tejido conjuntivo o en los hematocitos.

5. **Preparación y examen de muestras para la detección de marteiliosis**

5.1. *Diagnóstico citológico*

Para poder preparar los frotis, hágase una sección de la glándula digestiva y las branquias, elimínese el exceso de agua colocando la muestra en un papel secante y hágase un frotis de impresión en el portaobjetos utilizando el corte a través del tracto digestivo. Tras haber secado al aire los portaobjetos, fíjense con metanol durante dos o tres minutos.

Tíñanse las muestras preparadas de acuerdo con los métodos normalizados habituales para este tipo de tinción. Aclárense con agua del grifo, déjense secar completamente al aire frío o caliente y móntense en resina sintética.

El parásito, que en las fases iniciales de su desarrollo alcanza un tamaño comprendido entre 5 y 8 micrómetros, puede llegar a alcanzar 40 micrómetros durante la esporulación. El citoplasma de las células adquiere un color azul de mayor o menor intensidad, y el núcleo es de un color rojo intenso. Un halo brillante rodea las células secundarias o esporoblastos. Es suficiente un tiempo de observación de cinco minutos por portaobjetos.

5.2. *Examen histológico*

Para obtener secciones histológicas, córtese un segmento de la glándula digestiva con unas tijeras pequeñas y colóquese la muestra en un líquido fijador, como el de Davidson, Bouin o Carson. El último presenta la ventaja de que las muestras pueden volverse a examinar mediante un microscopio electrónico en caso necesario. Deberá respetarse la proporción del volumen del tejido con respecto al volumen del fijador (no superior de uno a diez).

Posteriormente, las muestras se manipularán con arreglo a los métodos histológicos tradicionales. La *Marteilia refringens* se puede observar mediante varias tinciones, como la Hematoxilina-Eosina o la tricromática de Masson, aunque estos ejemplos no son los únicos, pudiendo utilizarse otros métodos. Se recomienda examinar dos secciones por ostra.

Las fases iniciales de *Martelia* están presentes en el epitelio del estómago y las fases posteriormente desarrolladas, en el epitelio de los divertículos digestivos. También se pueden hallar esporangios libres en el lumen del intestino.

II. EXAMEN DE LAS POBLACIONES DE *OSTREA EDULIS* CUANDO SE PRODUZCAN MUERTES ANORMALES

Cuando se produzcan muertes anormales entre las poblaciones de *Ostrea edulis,* se efectuará una investigación de emergencia para determinar la etiología del fenómeno.

La muestra, que deberá constar de cien ostras, se manipulará con arreglo al procedimiento de análisis histológico que se describe en la sección I. Esta técnica deberá aplicarse prioritariamente antes de realizar cualquier otro tipo de examen.

Las muestras se fijarán preferentemente en el líquido fijador de Carson, que también permite reutilizar la muestra para examinarla mediante un microscopio electrónico.