DECISÃO DA COMISSÃO

de 16 de Maio de 1994

que estabelece planos de colheita de amostras e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação de determinadas doenças dos moluscos

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(94/306/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 91/67/CEE do Conselho, de 28 de Janeiro de 1991, relativa às condições de polícia sanitária que regem a introdução no mercado de animais e produtos da aquicultura [1], alterada pela Directiva 93/54/CEE [2], e, nomeadamente, o seu artigo 15º,

Considerando que é necessário, para garantir a aplicação uniforme dos processos previstos na Directiva 91/67/CEE, estabelecer planos de colheitas de amostra e métodos de diagnóstico a utilizar na concessão do estatuto de zona costeira ou exploração indemne de doenças que afectam os moluscos, bem como para o exame de populações com taxas de mortalidade anormais;

Considerando que foi consultado o Comité científico veterinário, criado pela Decisão 81/651/CEE da Comissão [3];

Considerando que as medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité veterinário permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1º

Os métodos de colheita de amostras e de diagnóstico para detecção e confirmação da Bonamiose *(Bonamia ostreae)* e da Marteiliose *(Marteilia refringens)* são estabelecidos no anexo.

Artigo 2º

A presente decisão é aplicável a partir de 1 de Junho de 1994.

Artigo 3º

Os Estados-membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 16 de Maio de 1994.

Pela Comissão

René STEICHEN

Membro da Comissão

---

[1] JO nº L 46 de 19. 2. 1991, p. 1.
[2] JO nº L 175 de 19. 7. 1993, p. 34.
[3] JO nº L 233 de 19. 8. 1981, p. 32.

ANEXO

I. PROCESSO DE COLHEITA DE AMOSTRAS E DE ANÁLISE PARA PESQUISA DE *BONAMIA ,OSTREAE* E DE *MARTEILIA REFRINGENS* EM *OSTREA EDULIS*

1. Colheita de amostras

1.1. *Pontos de colheita de amostras*

Em cada uma das zonas referidas no ponto III do anexo B da Directiva 91/67/CEE serão seleccionados diversos pontos de colheita, de forma a garantir uma probabilidade máxima de detectar a presença eventual de *Bonamia ostreae* ou de *Marteilia refringens*, ou de ambas. Para tal devem ser tomados em consideração os parâmetros que afectam o desenvolvimento dos agentes patogénicos, tal como a densidade dos efectivos, os fluxos de água e o ciclo de desenvolvimento dos moluscos.

Devem ser seleccionados pelo menos três pontos de colheita de amostras para cada zona. O número de pontos de colheita deve ser maior em zonas extensas com diversas áreas distintas de cultura das espécies susceptíveis.

Sempre que possível deve ser colhida pelo menos uma amostra em bancos naturais. Os moluscos que apresentam anomalias (crescimento anormal, conchas abertas) devem ser seleccionados.

1.2. *Período e frequência da colheita de amostras*

As datas das inspecções referidas no ponto III.B.2. do anexo B da Directiva 91/67/CEE devem ser fixadas com base no período em que a doença se manifesta, ou é detectável, devendo as inspecções ser efectuadas de acordo com esse período. As datas das inspecções devem também ser fixadas tendo em conta a transferência dos moluscos, que tem geralmente lugar na Primavera e no Outono. A colheita de amostras deve, portanto, ser efectuada :

— uma vez por ano, depois do Verão, para a *Marteilia refringens,*

— duas vezes por ano (Primavera/Outono), para a *Bonamia ostreae.*

1.3. *Dimensão da amostra*

Durante o período de controlo inicial de dois anos que antecede a concessão da aprovação, a amostra deve ser constituída, em cada ponto de colheita, por 150 indivíduos, de forma a garantir, a um nível de confiança de 95 %, a detecção de portadores do agente patogénico com uma prevalência de 2 %.

Em anos posteriores (manutenção da aprovação), a dimensão da amostra pode ser reduzida para 30, para garantir, a um nível de confiança de 95 %, a detecção de portadores do agente patogénico com uma prevalência de 10 %.

2. Expedição das amostras

Todas as amostras de moluscos devem chegar ao laboratório aprovado nas 24 horas que se seguem à colheita. Os moluscos devem ser embalados segundo as normas existentes, de forma a mantê-los em boas condições. Deve ser fixado à embalagem um rótulo indicando o local e data da colheita, bem como eventuais antecedentes.

3. Exame macroscópico

Os moluscos devem ser abertos com precaução, evitando danificar os tecidos, nomeadamente o manto, brânquias, coração e glândula digestiva. As anomalias e lesões dos tecidos serão registadas.

4. Preparação e exame das amostras para pesquisa de Bonamiose

4.1. *Imunofluorescência*

4.1.1. Esta técnica pode ser utilizada com larvas, ostras pequenas e ostras adultas. Depois de secar as amostras, esmagar as larvas ou fazer um esfregaço por impressão do tecido cardíaco numa lâmina de microscópio. Secar ao ar e fixar por imersão em acetona durante 5 a 10 minutos. Estas preparações podem ser utilizadas imediatamente ou congeladas a − 20 °C.

Preparar uma solução de anticorpos monocloidais numa solução tampão (8 g/l de NaCl, 0,2 g/l de $KH_2 PO_4$, 2,9 g/l de $Na_2 HPO_4 12H_2O$, 0,2 g/l de KCl, 0,2 g/l de azida de Na, Tween pH 7,4), utilizando a diluição recomendada pelo fabricante.

Com uma pipeta, introduzir 50 µl da solução em cada cavidade, ou depositar este volume sobre cada lâmina, de forma a cobrir os esfregaços. Após incubação em câmara húmida durante 15 minutos a 20 °C, lavar as lâminas com o tampão acima indicado e cobrir depois com uma solução de anticorpos de cabra anti-lg G de rato (50 µl por cavidade) conjugados com isotiocianato de fluoresceína. Diluir a solução de anticorpos segundo as recomendações do fabricante e juntar azul de Evans (1 %) ao tampão utilizado na diluição.

Após incubação em câmara húmida durante 15 minutos a 20 °C, colocar as preparações num tampão de glicerina e examinar ao microscópio UV.

A presença de células esféricas de cor verde fluorescente confirma a infecção por *Bonamia ostreae.*

Podem também ser utilizados outros testes criados por laboratórios individuais e que produzam resultados comparáveis.

4.2. *Esfregaços de sangue*

Para as larvas e ostras, após secagem das amostras ao ar, esmagar as larvas ou fazer um esfregaço por impressão do tecido cardíaco numa lâmina histológica. Secar as lâminas ao ar, depois fixar com metanol. Corar as preparações de larvas e de ostras segundo o método normalmente utilizado para o corante em questão. Lavar com água da torneira e deixar secar completamente ao ar frio ou quente, depois impregnar com uma resina sintética.

O parasita (tamanho : 2 micrometros) é então identificável pelo seu citoplasma azul e núcleo vermelho. Pode observar-se dentro ou fora dos hematócitos. É suficiente um tempo de observação de 5 minutos por lâmina.

4.3. *Histologia*

Para o exame histológico, preparar um corte (« fatia ») da ostra que atravesse o coração, glândula digestiva e brânquias, e colocar a amostra num fixador, tal como o de Davidson, Bouin ou Carson — este último permite utilizar as amostras em microscopia electrónica, quando necessário. Deve ser respeitada a relação de 1 para 10 entre o volume do material a fixar e o volume de fixador.

Várias colorações não específicas, tais como a de Hematoxilina-eosina ou a tricromática de Masson, permitem visualizar a *Bonamia ostreae.* Estes exemplos não são limitantes, podendo utilizar-se outras colorações. Recomenda-se o exame de dois cortes por ostra.

O parasita (tamanho : 2 micrometros) pode ser observado nos hematócitos ou livre, no tecido conjuntivo.

5. Preparação e exame das amostras para pesquisa de Marteiliose

5.1. *Exame citológico*

Preparação dos esfregaços : fazer um corte que atravesse a glândula digestiva e as brânquias, retirar o excesso de água colocando a amostra em papel de filtro, depois colocar sobre a lâmina a secção que atravessa o tubo digestivo e retirá-la, fazendo assim um esfregaço por impressão. Secar as lâminas ao ar, depois fixá-las com metanol (2 a 3 minutos).

Corar a preparação segundo o método normalmente utilizado para o corante em questão. Lavar com água da torneira e deixar secar completamente ao ar frio ou quente, depois impregnar com uma resina sintética.

O parasita, que mede 5 a 8 micrometros nos primeiros estádios de desenvolvimento, pode atingir 40 micrometros durante a esporulação. O citoplasma das células ganha uma coloração azul mais ou menos intensa, sendo o núcleo de um vermelho vivo. As células secundárias ou esporoblastos aparecem rodeadas de um halo brilhante. É suficiente um tempo de observação de 5 minutos por lâmina.

5.2. *Exame histológico*

Para os cortes histológicos, cortar uma « fatia » que atravesse a glândula digestiva, utilizando uma tesoura pequena, e colocar a amostra num fixador, como o de Davidson, Bouin ou Carson ; este último permite a utilização das amostras em microscopia electrónica, se necessário. Não deve exceder-se uma proporção de 1 para 10 entre o volume de tecido e o volume de fixador.

Em seguida, as amostras são tratadas segundo os métodos histológicos clássicos. Existem várias colorações que permitem observar a *Marteilia refringens,* tais como a Hematoxilina-eosina e a tricromática de Masson. Estes exemplos não são limitantes, podendo utilizar-se outras colorações. Recomenda-se o exame de dois cortes por ostra.

As formas jovens de *Marteilia* encontram-se no epitélio do estômago, podendo os estádios posteriores de desenvolvimento ser observados no epitélio dos divertículos digestivos. Podem também observar-se esporângios livres no lúmen do intestino.

II. EXAME DE POPULAÇÕES COM TAXAS DE MORTALIDADE ANORMAIS

Sempre que se observem taxas de mortalidade anormais em *Ostrea edulis* deve efectuar-se um inquérito de emergência para determinação da etiologia.

Nesse caso, a amostra deve ser constituída por 100 ostras, e ser tratada de acordo com o processo definido na secção I para o exame histológico. Essa técnica deve ser utilizada em primeiro lugar, antes de se proceder a qualquer outro tipo de exame.

As amostras devem ser fixadas, de preferência, com o fixador de Carson, que permite a reutilização da amostra para técnicas de microscopia electrónica.