Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►**B** **REGLAMENTO (UE) Nº 175/2010 DE LA COMISIÓN**

de 2 de marzo de 2010

por el que se aplica la Directiva 2006/88/CE del Consejo en lo referente a las medidas de lucha contra el aumento de la mortalidad de los ostiones de la especie *Crassostrea gigas* en relación con la detección del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(DO L 52 de 3.3.2010, p. 1)

Modificado por:

		Diario Oficial		
		n°	página	fecha
►**M1**	Reglamento (UE) nº 1153/2010 de la Comisión de 8 de diciembre de 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

REGLAMENTO (UE) Nº 175/2010 DE LA COMISIÓN

de 2 de marzo de 2010

por el que se aplica la Directiva 2006/88/CE del Consejo en lo referente a las medidas de lucha contra el aumento de la mortalidad de los ostiones de la especie *Crassostrea gigas* en relación con la detección del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Vista la Directiva 2006/88/CE del Consejo, de 24 de octubre de 2006, relativa a los requisitos zoosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos [1], y, en particular, su artículo 41, apartado 3, y su artículo 61, apartado 3,

Considerando lo siguiente:

(1) La Directiva 2006/88/CE establece los requisitos zoosanitarios que deben aplicarse a la comercialización de animales y productos de la acuicultura. Además, establece medidas mínimas de prevención que deben aplicarse en caso de sospecha o de aparición de un foco de determinadas enfermedades en animales acuáticos.

(2) El artículo 41 de esta Directiva dispone que los Estados miembros deben adoptar las medidas adecuadas para controlar una situación de enfermedad emergente y evitar su propagación. Ante una situación de enfermedad emergente, el Estado miembro afectado ha de informar inmediatamente a los Estados miembros, a la Comisión y a los Estados miembros de la AELC en caso de obtenerse resultados de relevancia epidemiológica para otro Estado miembro.

(3) En varias zonas de Francia y de Irlanda se observó, a finales de la primavera y en el verano de 2008, un aumento de la mortalidad de los ostiones de la especie *Crassostrea gigas* (en lo sucesivo, «ostiones *Crassostrea gigas*»). Dicho aumento se atribuyó a una combinación de factores ambientales adversos, además de la presencia de bacterias del género *Vibrio* y del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHV-1), incluido un genotipo recientemente descrito de ese virus llamado OsHV-1 µvar.

(4) En agosto de 2008, las autoridades francesas informaron de la situación y de las medidas adoptadas a los Estados miembros, a la Comisión y a los Estados miembros de la AELC, y el asunto se puso en conocimiento del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal en septiembre de 2008.

(5) En la primavera de 2009, un aumento de la mortalidad atribuido a la misma combinación de factores volvió a detectarse en Francia, Irlanda y las Islas Anglonormandas. Si bien las causas de las mortalidades siguen siendo inciertas, las investigaciones epidemiológicas emprendidas en Irlanda y el Reino Unido en 2009 sugieren que el OsHV-1 µvar tiene un papel importante.

[1] DO L 328 de 24.11.2006, p. 14.

▼B

(6) Las autoridades competentes de estos Estados miembros y de las Islas Anglonormandas informaron a la Comisión de la situación y de las medidas adoptadas, y el asunto se notificó en varias ocasiones al Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

(7) Las medidas de confinamiento adoptadas por las autoridades competentes de esos Estados miembros y de las Islas Anglonormandas para controlar la situación de enfermedad emergente consistieron principalmente en restringir los desplazamientos de ostiones *Crassostrea gigas* a partir de las zonas afectadas por el aumento de la mortalidad.

(8) Ante la reaparición de esta situación de enfermedad emergente en 2009, la posibilidad de que se repita y el riesgo de propagación en primavera y verano de 2010, y sobre la base de la experiencia adquirida, es oportuno y necesario extender las medidas ya adoptadas por los Estados miembros afectados.

(9) Para aplicar en condiciones uniformes los requisitos de la Directiva 2006/88/CE en materia de enfermedades emergentes y velar por que las medidas adoptadas ofrezcan suficiente protección frente a la propagación, sin por ello imponer restricciones innecesarias a los desplazamientos de los ostiones *Crassostrea gigas*, es preciso coordinar a nivel de la Unión Europea las medidas relativas a esta situación de enfermedad emergente.

(10) Cuando se notifique a las autoridades competentes que se ha detectado un aumento de la mortalidad de los ostiones *Crassostrea gigas*, debe efectuarse un muestreo y han de realizarse ensayos para detectar o descartar la presencia del OsHV-1 μvar.

(11) Cuando se confirme la presencia del genotipo del virus OsHV-1 μvar, los Estados miembros deben aplicar medidas de control de la enfermedad y establecer una zona de confinamiento. Al definir la zona de confinamiento han de tenerse en cuenta varios factores que se establecen en el presente Reglamento. Las medidas de control de la enfermedad deben persistir hasta que las inspecciones muestren que la mortalidad excesiva ha cesado.

(12) Para limitar el riesgo de propagación de la enfermedad deben restringirse los desplazamientos de ostiones *Crassostrea gigas* a partir de las zonas de confinamiento. Sin embargo, conviene prever excepciones cuando el riesgo de propagación sea reducido. Estas excepciones son aplicables a los desplazamientos de ostiones *Crassostrea gigas* con destino a zonas de cría o de reinstalación situadas dentro de otra zona de confinamiento, o destinados al consumo humano. Para asegurar la rastreabilidad de las partidas de ostiones *Crassostrea gigas* destinadas a zonas de cría o de reinstalación, tales partidas deben ir acompañadas por un certificado zoosanitario. Al cumplimentar el certificado deben tenerse en cuenta las notas explicativas del anexo V del Reglamento (CE) nº 1251/2008 de la Comisión, de 12 de diciembre de 2008, por el que se aplica la Directiva 2006/88/CE del Consejo en lo referente a las condiciones y los requisitos de certificación para la comercialización y la importación en la Comunidad de animales de la acuicultura y productos derivados y se establece una lista de especies portadoras ([1]).

([1]) DO L 337 de 16.12.2008, p. 41.

▼B

(13) Para recabar más información sobre esta situación de enfermedad emergente en la Unión y, particularmente, en los Estados miembros y compartimentos aún no afectados, y garantizar la detección precoz de cualquier brote del OsHV-1 µvar, los Estados miembros pueden establecer programas de muestreo y ensayos específicos para la detección precoz del OsHV-1 µvar. Los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de zonas que hayan estado sujetas a medidas de confinamiento en 2009, con arreglo a disposiciones nacionales, o en 2010, de conformidad con el presente Reglamento, deben estar sujetos a requisitos zoosanitarios adicionales si se introducen para la cría o la reinstalación en Estados miembros o compartimentos cubiertos por tales programas, siempre que no se haya detectado el OsHV-1 µvar en dichos Estados miembros o compartimentos.

(14) Para que los datos recogidos en diferentes Estados miembros con programas de muestreo y ensayos específicos para la detección precoz del OsHV-1 µvar sean comparables, conviene establecer determinados requisitos para el contenido de esos programas.

(15) A fin de controlar debidamente esta situación de enfermedad emergente es esencial disponer de información exacta y actualizada sobre la detección del OsHV-1 µvar en los Estados miembros. A tal efecto, los Estados miembros deben notificar a la Comisión y a los demás Estados miembros, sin demora injustificada, la primera presencia confirmada del virus OsHV-1 µvar en sus territorios en 2010.

(16) Además, conviene hacer uso de las páginas web de información creadas con arreglo al artículo 10 de la Decisión 2009/177/CE de la Comisión, de 31 de octubre de 2008, por la que se establecen disposiciones de aplicación de la Directiva 2006/88/CE del Consejo en lo que respecta a la vigilancia, los programas de erradicación y la calificación de libre de la enfermedad de Estados miembros, zonas y compartimentos [1].

(17) Para ofrecer transparencia y un acceso rápido a la información pertinente sobre la situación de enfermedad emergente, los Estados miembros han de poner a disposición de la Comisión Europea y de los demás Estados miembros información sobre las zonas de confinamiento, las zonas que antes eran de confinamiento pero donde se ha demostrado la ausencia del OsHV-1 µvar y los programas establecidos para la detección precoz del OsHV-1 µvar.

(18) Ante la incertidumbre que aún persiste sobre esta situación de enfermedad emergente, las medidas previstas en el presente Reglamento deberían aplicarse hasta que finalice diciembre de 2010.

(19) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

[1] DO L 63 de 7.3.2009, p. 15.

▼B

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Definición

A los efectos del presente Reglamento, «OsHV-1 µvar» designa un genotipo del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHV-1) que se define en base a datos sobre la secuencia parcial que muestran una deleción sistemática de doce pares de bases en ORF 4 del genoma en comparación con el OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artículo 2

Muestreo, ensayos y establecimiento de zonas de confinamiento

1. Cuando se detecte un aumento de la mortalidad de los ostiones de la especie *Crassostrea gigas* (en lo sucesivo, «ostiones *Crassostrea gigas*»), la autoridad competente:

a) tomará muestras con arreglo a la parte A del anexo I;

b) realizará ensayos para detectar la presencia del OsHV-1 µvar con los métodos de diagnóstico que se establecen en la parte B del anexo I.

2. Cuando los resultados de los ensayos previstos en el apartado 1, letra b), revelen la presencia del OsHV-1 µvar, la autoridad competente establecerá una zona de confinamiento. Esta zona se definirá atendiendo a un análisis de cada caso particular que tenga en cuenta los factores que influyen en el riesgo de propagación de la enfermedad señalados en el anexo I, parte C.

3. Los Estados miembros notificarán a la Comisión y a los demás Estados miembros, sin demora injustificada, la primera zona de confinamiento que establezcan en su territorio en 2010.

Artículo 3

Requisitos de comercialización de los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de una zona de confinamiento contemplada en el artículo 2

1. Los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de una zona de confinamiento establecida con arreglo al artículo 2, apartado 2, no se sacarán de esa zona.

2. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, las partidas de ostiones *Crassostrea gigas* podrán salir de la zona de confinamiento cuando:

a) vayan destinadas a otra zona de confinamiento establecida con arreglo al artículo 2, apartado 2;

b) procedan de una parte de la zona de confinamiento, incluidos los criaderos, no afectada por el aumento de la mortalidad y hayan sido sometidas a:

   i) muestreo con arreglo al anexo I, parte A, y

   ii) ensayos para detectar la presencia del OsHV-1 µvar con los métodos de diagnóstico que se establecen en el anexo I, parte B, con todos los resultados negativos;

▼B

c) vayan destinadas a la transformación ulterior, antes del consumo humano, en centros de depuración, centros de expedición o establecimientos de transformación equipados con un sistema de tratamiento de efluentes validado por la autoridad competente que:

i) inactive los virus con envoltura, o

ii) reduzca a un nivel aceptable el riesgo de transmisión de enfermedades a las aguas naturales;

d) vayan destinadas al consumo humano y estén embaladas y etiquetadas para ello con arreglo al Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo ([1]), y:

i) consten de animales que ya no podrían sobrevivir de ser devueltos a su entorno de origen, o

ii) se destinen a una transformación complementaria sin almacenamiento temporal en el lugar de transformación;

e) se destinen (las partidas o sus productos) al consumo humano sin transformación ulterior, siempre que estén embaladas para la venta al por menor en embalajes que se ajusten a lo dispuesto para ellos en el Reglamento (CE) nº 853/2004.

3. Las partidas contempladas en el apartado 2, letras a) y b), destinadas a zonas de cría o de reinstalación irán acompañadas de un certificado zoosanitario cumplimentado conforme al modelo del anexo II del presente Reglamento y a las notas explicativas del anexo V del Reglamento (CE) nº 1251/2008.

Artículo 4

Levantamiento de las medidas previstas en los artículos 2 y 3

La autoridad competente podrá levantar las medidas de control de las zonas de confinamiento establecidas en virtud del artículo 2, apartado 2, y las restricciones a la comercialización previstas en el artículo 3 una vez que haya llevado a cabo dos inspecciones, con un intervalo de quince días, que muestren que ha cesado el aumento de la mortalidad.

Artículo 5

Requisitos de comercialización de los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de un compartimento anteriormente sujeto a medidas de control por un aumento de la mortalidad de ostiones *Crassostrea gigas* relacionado con el OsHV-1 µvar

1. Para ser comercializados, los ostiones *Crassostrea gigas* que sean originarios de un compartimento que haya estado sujeto a medidas de confinamiento en 2009 o 2010 por un aumento de la mortalidad de los ostiones *Crassostrea gigas* relacionado con el OsHV-1 µvar deberán:

a) ir acompañados de un certificado zoosanitario cumplimentado conforme al modelo del anexo II del presente Reglamento y a las notas explicativas del anexo V del Reglamento (CE) nº 1251/2008, si:

i) están destinados a Estados miembros o compartimentos que han establecido un programa de detección precoz del OsHV-1 µvar y en los que no se ha detectado el OsHV-1 µvar, y

([1]) DO L 139 de 30.4.2004, p. 55.

▼B

ii) se destinan a zonas de cría o de reinstalación;

b) ser originarios de un compartimento en el que haya quedado demostrada la ausencia del OsHV-1 µvar mediante muestreo y ensayos efectuados de conformidad con la parte A del anexo I, y

c) cumplir los requisitos zoosanitarios establecidos en el modelo de certificado al que se hace referencia en la letra a).

2. El programa de detección precoz del OsHV-1 µvar contemplado en el apartado 1, letra a), inciso i), cumplirá los siguientes requisitos:

a) el programa deberá ser declarado al Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal;

b) la declaración deberá ajustarse a los puntos 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 y 5.9, así como los puntos 6 y 7, del modelo de formulario establecido en el anexo II de la Decisión 2009/177/CE;

c) el programa deberá incluir las siguientes medidas:

i) muestreo con arreglo al anexo I, parte A,

ii) ensayos para detectar la presencia del OsHV-1 µvar con los métodos de diagnóstico que se establecen en el anexo I, parte B.

3. El apartado 1 se aplicará una semana después de la fecha de la reunión del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal en la que haya sido declarado el programa referido en el apartado 1, letra a), inciso i).

Artículo 6

Página web de información

1. Los Estados miembros pondrán a disposición de la Comisión y de los demás Estados miembros:

a) una lista de las zonas de confinamiento y de los factores que se han tenido en cuenta para definirlas, con una descripción de sus límites geográficos, conforme a lo dispuesto en el artículo 2, apartado 2;

b) una lista, con descripción de límites geográficos, de los compartimentos:

i) que hayan estado sujetos a medidas de confinamiento en 2009 por un aumento de la mortalidad de los ostiones *Crassostrea gigas* relacionado con el OsHV-1 µvar,

ii) en los que la ausencia del OsHV-1 µvar se haya demostrado mediante un ensayo efectuado de conformidad con el anexo I, partes A y B, en muestras recogidas en la zona de confinamiento;

c) las declaraciones de los programas contemplados en el artículo 5, apartado 2, con descripción de los límites geográficos de la zona pertinente.

2. La información prevista en el apartado 1 se mantendrá actualizada y se pondrá a disposición a través de las páginas web de información creadas conforme al artículo 10 de la Decisión 2009/177/CE.

▼B

Artículo 7

Elaboración de informes

A más tardar el 1 de octubre de 2010, los Estados miembros presentarán un informe a la Comisión sobre los programas declarados de conformidad con el artículo 5, apartado 2.

El informe se elaborará conforme al modelo establecido en el anexo VI de la Decisión 2009/177/CE.

Artículo 8

Entrada en vigor y aplicación

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable del 15 de marzo al ►M1 30 de abril de 2011 ◄.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

▼B

ANEXO I

PARTE A

Muestreo

1. *Muestreo a efectos de lo dispuesto en el artículo 2*

Las muestras contempladas en el artículo 2 consistirán en al menos doce individuos de ostiones *Crassostrea gigas*. Para ello se seleccionarán y recogerán animales débiles, abiertos o que acaben de morir (no descompuestos) del compartimento donde se observe la mortalidad.

2. *Muestreo a efectos de lo dispuesto en el artículo 3, apartado2, letra b), artículo 5, apartado 1, letra b), y artículo 5, apartado 2*

a) el muestreo a efectos de lo dispuesto en el artículo 3, apartado 2, letra b), consistirá:

i) para las larvas, en cinco grupos de al menos 50 mg de animales enteros recogidos entre cuatro y ocho días después de la fecundación, con concha, por partida,

ii) para las semillas de tamaño inferior a 6 mm, en treinta grupos de 300 mg de animales enteros, con concha, por partida,

iii) para los ostiones de más de 6 mm, en 150 individuos por partida.

Al seleccionar a estos animales, todas las partes de la partida deberán quedar proporcionalmente representadas en la muestra. Si están presentes animales débiles, abiertos o que acaben de morir (no descompuestos), estos se seleccionarán de manera prioritaria;

b) el muestreo a efectos de lo dispuesto en el artículo 5, apartado 2, consistirá en al menos 150 individuos de *Crassostrea gigas* por cada punto de muestreo. Se muestrearán todas las explotaciones o zonas de cría de moluscos del Estado miembro o compartimento cubierto por el programa.

El muestreo a efectos del artículo 5, apartado 1, letra b), consistirá en al menos 150 individuos de *Crassostrea gigas* por cada compartimento.

Al seleccionar estos animales se tendrán en cuenta los siguientes criterios:

— si están presentes animales débiles, abiertos o que acaben de morir (no descompuestos), estos se seleccionarán de manera prioritaria. Si tales animales no están presentes, entre los animales seleccionados habrá moluscos sanos de menos de doce meses,

— en las explotaciones en que se utilice más de una fuente de agua para la producción, deberán incluirse en el muestreo animales que representen todas las fuentes de agua, de modo tal que todas las partes de la explotación estén proporcionalmente representadas en la muestra,

— en las zonas de crías de moluscos se incluirán en la muestra animales de un número suficiente de puntos de muestreo, a saber, al menos tres, de manera que todas las partes de la zona de cría estén proporcionalmente representadas en la muestra, incluidos los bancos naturales presentes en la zona de cría de moluscos. Los principales factores que deben considerarse para seleccionar estos puntos de muestreo serán: detección previa del OsHV-1 µvar en la zona, densidad de cría, flujos de agua, batimetría y prácticas de gestión;

▼B

c) el muestreo previsto en el artículo 5, apartado 2, se hará en el período del año para el que se conozca la máxima prevalencia del OsHV-1 µvar en el Estado miembro o compartimento. Cuando no se disponga de estos datos, el muestreo se llevará a cabo inmediatamente después del período en el que la temperatura del agua supere los 16 °C o en el momento en que la temperatura suela alcanzar su máximo anual;

d) el muestreo previsto en el artículo 5, apartado 1, letra b), se hará preferiblemente en el período del año descrito en la letra c). Si las muestras se recogen fuera de ese período, los ostiones muestreados deberán mantenerse, antes de los ensayos, en condiciones equivalentes a las descritas en la letra c) durante un período adecuado para la detección del OsHV-1 µvar.

PARTE B

Métodos de diagnóstico para la detección del OsHV-1 µvar

1. *Ámbito de aplicación*

El presente procedimiento describe un método estándar de diagnóstico que ha de usarse para la detección e identificación del OsHV-1 µvar mediante reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo, «RCP»). Dicho método permite la distinción entre el OsHV-1 y el OsHV-1 µvar.

Los laboratorios pueden modificar los métodos descritos en el presente anexo cuando así convenga para optimizar las condiciones de reacción y adaptarse al equipo y las condiciones de que dispongan, siempre que pueda demostrarse que se obtienen idénticas sensibilidad y especificidad.

2. *Definición*

En el artículo 1 del presente Reglamento se define el OsHV-1 µvar.

3. *Equipo y condiciones ambientales*

La prueba de diagnóstico utilizada para la detección e identificación del OsHV-1 µvar mediante RCP exige el equipo y las condiciones ambientales habituales para las pruebas con RCP, a saber:

— una campana cerrada equipada con un sistema de producción de rayos ultravioleta para eliminar posibles contaminaciones al preparar la mezcla de RCP,

— dos juegos completos de pipetas (2 µl, 20 µl, 200 µl y 1 000 µl); el primero para la extracción del ADN y el segundo para la preparación de la mezcla de RCP,

— tres pipetas diferentes: una pipeta (2 µl) para distribuir las muestras en la mezcla de RCP, una pipeta (20 µl) para añadir el bromuro de etidio (BE) y otra pipeta (20 µl) para transferir los productos de RCP a los geles de azarosa,

— puntas de pipeta con filtro (2 µl, 20 µl, 200 µl y 1 000 µl) para la extracción de ADN, la preparación de mezcla de RCP y la distribución de las muestras,

— puntas de pipeta (20 µl) para recoger el BE y transferir los productos de amplificación al gel de azarosa,

— un termociclador para efectuar amplificaciones,

— un sistema de electroforesis horizontal para la electroforesis de los productos de RCP,

— un dispositivo de UV para observar los productos de RCP después de la electroforesis en gel de azarosa,

— un sistema para obtener imágenes de los geles.

▼B

El manipulador debe llevar bata de laboratorio y guantes durante todas las fases que se describen a continuación. Preferiblemente, la bata y los guantes deben cambiarse tras cada paso principal: Extracción de ADN, preparación de la mezcla de RCP, distribución de las muestras, amplificación y transferencia al gel.

Se recomienda llevar a cabo estas fases en diferentes salas. En particular, la amplificación y la transferencia al gel/la electroforesis deberían efectuarse en una sala separada de la extracción del ADN, la preparación de la mezcla de RCP y la distribución del ADN.

4. *Procedimiento*

4.1. Preparación de las muestras

Se tratan para la extracción de ADN los ostiones vivos o que acaben de morir (no descompuestos), que pueden congelarse previamente.

Las muestras se tratan de modos diferentes según su tamaño:

a) con las larvas se hacen grupos de 50 mg de animales enteros (con concha), que se completan con 200 µl de agua destilada, se trituran y se centrifugan a 1 000 G durante 1 minuto;

b) con las semillas de tamaño inferior o igual a 6 mm se hacen grupos de 300 mg de animales enteros (con concha), que se completan con 1 200 µl de agua destilada, se trituran y se centrifugan a 1 000 G durante 1 minuto;

c) en el caso de las semillas de tamaño comprendido entre 6 y 15 mm, se trituran individualmente todos los tejidos blandos de cada animal;

d) en el caso de los animales de más 15 mm, se aíslan pedazos de las branquias y del manto.

La extracción del ADN se efectúa utilizando el kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del protocolo de ensayo con tejidos.

La preparación ulterior de la muestra se lleva a cabo en el orden siguiente:

1. Poner 100 µl del sobrenadante, en el caso de las muestras contempladas en las letras a) y b), o entre 10 y 50 mg de tejidos, en el caso de las muestras de las letras c) y d), en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, y añadir 180 µl de tampón ATL.

2. Añadir 20 µl de proteinasa K, mezclar con agitador vortex e incubar a 56 °C hasta que el tejido quede completamente lisado (hasta el día siguiente). Agitar con vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrifugación de 1,5 ml para retirar las gotas de la tapa.

3. Añadir 200 µl de tampón AL a la muestra, mezclar con agitador vortex con sacudidas durante 15 s e incubar a 70 °C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrifugación de 1,5 ml para retirar las gotas de la tapa.

4. Añadir 200 µl de etanol (96-100 %) a la muestra y mezclar con agitador vortex con sacudidas durante 15 s. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrifugación de 1,5 ml para retirar las gotas de la tapa.

5. Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 4 a la columna QIAamp (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde. Cerrar el tapón y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min. Poner la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida limpio de 2 ml (suministrado en el kit) y desechar el tubo que contiene el filtrado.

▼B

6. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500 µl de tampón AW1 sin mojar el borde. Cerrar el tapón y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min. Poner la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida limpio de 2 ml (suministrado en el kit) y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.

7. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500 µl de tampón AW2 sin mojar el borde. Cerrar el tapón y centrifugar a toda velocidad (14 000 rpm) durante 3 min.

8. (Optativo) Poner la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida nuevo de 2 ml (no suministrado en el kit) y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado. Centrifugar a toda velocidad (14 000 rpm) durante 1 min.

9. Poner la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de microcentrifugación limpio de 1,5 ml (no suministrado en el kit) y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp y añadir 100 µl de agua destilada. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min.

10. Controlar la calidad y la eficacia de la extracción [por ejemplo, midiendo la DO (260 nm) bajo el espectrofotómetro o tras la electroforesis en gel de agarosa].

11. Preparar la dilución de las muestras para tener una concentración final de ADN de 50-100 ng/µl.

12. Las soluciones de ADN se guardan a 4 °C hasta que se efectúen los análisis por RCP.

Para las extracciones del ADN pueden usarse otros kits comerciales, siempre que se haya demostrado que dan resultados similares.

4.2. *Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)*

4.2.1. Reactivos

— Tampón 10 X (suministrado con la Taq ADN polimerasa)

— $MgCl_2$ (suministrado con la Taq ADN polimerasa) (25 mM)

— Taq ADN polimerasa (Goldstar, Eurogentec) 5 U/µl

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM), diluido diez veces (a 2 mM) antes de su uso

— dH_2O (H_2O destilada libre de ADN y ARN)

4.2.2. Cebadores

Deberán utilizarse los siguientes cebadores ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Estos cebadores o sus descripciones pueden obtenerse del Laboratorio Comunitario de Referencia para las enfermedades de los moluscos (LGP-Ifremer, av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francia).

▼B

4.2.3. Mezcla de RCP

La mezcla de RCP para cada tubo será:

	Volumen por tubo	Concentración final
Tampón (10 X)	5 µl	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— En cada tubo de RCP se ponen 49 µl de esta mezcla de RCP.

— A cada tubo se añade 1 µl de ADN extraído (50-100 ng/µl).

4.2.4. Controles

Se utilizan dos tipos de control:

— Los controles negativos consisten en dH_2O (1 µl por 49 µl de mezcla de RCP). Tienen por objeto detectar una posible contaminación reactiva del entorno de trabajo. Debería incluirse un control negativo por cada diez muestras o después de cada lote de muestras.

— Los controles positivos consisten en ADN plasmídico que contiene la región objetivo del genoma CF-CR del OsHV-1. Su objetivo es comprobar la eficacia de la reacción de la RCP. Debería incluirse un control positivo por cada análisis por RCP. El Laboratorio Comunitario de Referencia puede facilitar los controles positivos.

4.2.5. Amplificación

Los ciclos de amplificación se llevan a cabo en el termociclador.

— Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C.

— Amplificación: 35 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C).

— Elongación final: 5 min a 72 °C.

4.3. *Electroforesis*

4.3.1. Reactivos

— 50 X TAE (puede comprarse listo para usar):

Tris base (40 mM) 242 g

Ácido acético glacial (40 mM) 57,1 ml

$Na_2EDTA.2H_2O$ (1 mM) 18,61 g

dH_2O para 1 litro

Ajustar al pH 8

▼B

— Gel de agarosa 2,5 % en 1X TAE

Bromuro de etidio (0,5 μg/ml) añadido después de enfriar el gel.

— Colorante azul para carga:

Azul de bromofenol 0,25 %

Xileno cianol FF 0,25 %

Sacarosa 40 %

Mantener a 4 °C.

Usar diluido seis veces (2 μl de tampón azul de carga para 10 μl de productos de RCP).

— Marcador de peso molecular:

SmartLadder SF (Eurogentec): un marcador de peso molecular listo para usar, con nueve bandas a intervalos regulares de 100 a 1 000 pb.

4.3.2. Preparación del gel de agarosa

1. Pesar 2,5 g de agarosa, añadir 100 ml de 1X TAE y calentar hasta que se funda la mezcla.

2. Tras enfriar la solución, añadir bromuro de etidio (5 μl para 100 ml de gel de agarosa) y poner la solución en un molde específico equipado con peines (para formar ranuras).

3. Cuando el gel se polimeriza, se retiran los peines y el gel se dispone en un sistema de electroforesis horizontal que contiene 1X TAE suficiente para cubrir el gel de agarosa.

4. Mezclar 10 μl de productos de RCP con 2 μl de colorante azul (6X) y disponer en las ranuras.

5. Reservar una ranura para el marcador de peso molecular (5 μl).

6. Aplicar un voltaje de 50 a 150 voltios durante entre 30 min y 1 hora, dependiendo del tamaño y grosor del gel.

7. Observar el gel con UV.

4.4. *Interpretación*

La presencia del OsHV-1 μvar en una muestra queda indicada por la presencia de una banda del tamaño apropiado (157 pb en lugar de 173 pb para el OsHV-1) en un gel de agarosa al 2,5 % con resultado negativo de todos los controles negativos y resultado positivo de todos los controles positivos.

PARTE C

Definición de la zona de confinamiento

A la hora de definir la zona de confinamiento con arreglo al artículo 2, apartado 2, se tendrán en cuenta los siguientes factores que influyen en el riesgo de propagación de la enfermedad:

a) número, porcentaje y distribución de los moluscos en la explotación o zona de cría de moluscos infectada;

b) distancia y densidad de las explotaciones o zonas de cría vecinas;

c) proximidad a centros de transformación; contacto con otras explotaciones o zonas de cría de moluscos;

d) especies presentes en las explotaciones o zonas de crías de moluscos;

▼B

e) prácticas de cría aplicadas en las explotaciones o zonas de cría de moluscos afectadas y vecinas, y

f) condiciones hidrodinámicas y otros factores de importancia epizootiológica.

▼B

ANEXO II

Modelo de certificado zoosanitario para la comercialización de ostiones *Crassostrea gigas* destinados a zonas de cría y de reinstalación

UNIÓN EUROPEA **Certificado intracomunitario**

Parte I: Detalles relativos a la partida presentada

I.1. Expedidor Nombre Dirección Código postal	I.2. Nº de referencia del certificado / I.2.a. Nº de referencia local: I.3. Autoridad central competente I.4. Autoridad local competente
I.5. Destinatario Nombre Dirección Código postal	I.6. I.7.
I.8. País de origen Cód. ISO / I.9.	I.10. País de destino Cód. ISO / I.11.
I.12. Lugar de origen/lugar de captura Explot. autorizada acuicultura ☐ Otros ☐ Nombre Número de autorización Dirección Código postal	I.13. Lugar de destino Explot. autorizada acuicultura ☐ Otros ☐ Nombre Número de autorización Dirección Código postal
I.14. Lugar de carga Código postal	I.15. Fecha y hora de salida
I.16. Medio de transporte Aeronave ☐ Buque ☐ Vagón de ferrocarril ☐ Vehículo de carretera ☐ Otros ☐ Identificación	I.17. Transportista Nombre Número de autorización Dirección Código postal Estado miembro
I.18. Especies animales/Productos	I.19. Código del producto (Código NC) **03.07** I.20. Número/Cantidad
I.21.	I.22. Número de bultos
I.23. Nº del precinto y nº del contenedor	I.24. Tipo de embalaje
I.25. Animales/Productos certificados a efectos de Cría ☐ Reinstalación ☐	
I.26. Tránsito a través de un país tercero ☐ País tercero Cód. ISO Punto de salida Código Punto de entrada Nº de PIF	I.27. Tránsito a través de Estados miembros ☐ Estado miembro Cód. ISO Estado miembro Cód. ISO Estado miembro Cód. ISO
I.28. Exportación ☐ País tercero Cód. ISO Punto de salida Código	I.29.
I.30.	
I.31. Identificación de los animales/de los productos Especie (Nombre científico) Cantidad	

▼B

UNIÓN EUROPEA

Para la comercialización de ostiones *Crassostrea gigas* destinados a zonas de cría y de reinstalación

Parte II: Certificación

II.	**Información sanitaria**	II.a. Número de referencia del certificado	II.b.

([1])([2])[II.1 **Requisitos aplicables a los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de una zona de confinamiento establecida con arreglo al artículo 2 del Reglamento (UE) nº 175/2010**

El inspector oficial abajo firmante certifica que los ostiones *Crassostrea gigas* a los que se hace referencia en la parte I del presente certificado:

II.1.1 son originarios de una zona sujeta a medidas de control de enfermedades por un aumento de la mortalidad de los ostiones *Crassostrea gigas* relacionado con el OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 pueden ser comercializados en virtud del artículo 3, apartado 2, letra a), del Reglamento (UE) nº 175/2010;]

([1])[II.1.2 son originarios de una parte de la zona de confinamiento no afectada por el aumento de la mortalidad, y la partida ha sido sometida a muestreo y ensayos de conformidad con el anexo I del Reglamento (UE) nº 175/2010 en los ostiones *Crassostrea gigas* con resultado negativo;]]

([1])([3])[II.2 **Requisitos aplicables a los ostiones *Crassostrea gigas* originarios de un Estado miembro o un compartimento anteriormente sujetos a medidas de confinamiento por un aumento de la mortalidad de ostiones *Crassostrea gigas* relacionado con el OsHV-1 µvar, y destinados a Estados miembros o compartimentos sujetos a un programa de detección precoz del OsHV-1 µvar**

El inspector oficial abajo firmante certifica que los ostiones *Crassostrea gigas* a los que se hace referencia en la parte I del presente certificado:

II.2.1 proceden de una explotación o una zona de cría de moluscos en la que, según los registros de dicha explotación o zona de cría, no hay indicios de aumento de mortalidad;

II.2.2 son originarios de un compartimento en el que la ausencia del OsHV-1 µvar ha quedado demostrada mediante un muestreo y ensayo efectuados de conformidad con el anexo I del Reglamento (UE) nº 175/2010 en los ostiones *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Requisitos de transporte y etiquetado**

El inspector oficial abajo firmante certifica que:

II.3.1 los ostiones *Crassostrea gigas* indicados en la parte I del presente certificado se han dispuesto en condiciones, incluida la calidad del agua, que no alteran su estatus sanitario;

II.3.2 el contenedor utilizado para el transporte se ha limpiado y desinfectado con anterioridad a la carga o no se ha utilizado previamente;

II.3.3 la partida está identificada mediante una etiqueta legible situada en el exterior del contenedor, o, si se transporta en una embarcación vivero, en el manifiesto del barco, que incluye la información pertinente indicada en las casillas I.8 a I.13 de la parte I del presente certificado, así como la declaración siguiente:

o bien ([1])[«*Crassostrea gigas* destinados a la cría/reinstalación en una zona sujeta a un programa de detección precoz del OsHV-1 µvar»]

o bien (1)[«Ostiones *Crassostrea gigas*destinados a la cría/reinstalación en una zona sujeta a medidas de control de las enfermedades y originarios de una zona sujeta a medidas de control de las enfermedades»].

Notas

Parte I:

— Casilla I.12: Si procede, indicar el número de autorización de la explotación o zona de cría de moluscos de que se trate.

— Casilla I.13: Si procede, indicar el número de autorización de la explotación o zona de cría de moluscos de que se trate.

— Casillas I.20 y I.31: Por lo que respecta a la cantidad, indicar el número total.

— Casilla I.25: Marcar la opción «Cría» si se destinan a la cría; «Reinstalación» si se destinan a la reinstalación.

▼B

UNIÓN EUROPEA

Para la comercialización de ostiones *Crassostrea gigas* destinados a zonas de cría y de reinstalación

II. **Información sanitaria**	II.a. Número de referencia del certificado	II.b.

Parte II:

([1]) Márquese lo que proceda.

([2]) La parte II.1 del presente certificado se aplica a las partidas de ostiones *Crassostrea gigas* originarias de una zona de confinamiento establecida con arreglo al artículo 2, apartado 2, del Reglamento (UE) nº 175/2010 y autorizadas a salir de dicha zona en virtud del artículo 3, apartado 2, letras a) o b) del mismo Reglamento.

([3]) La parte II.2 del presente certificado se aplica a las partidas de ostiones *Crassostrea gigas* contempladas en el artículo 5, apartado 1, del Reglamento (UE) nº 175/2010, destinadas a Estados miembros o compartimentos sujetos a un programa de detección precoz del OsHV-1 µvar y originarias de una zona que anteriormente haya estado sujeta a medidas de confinamiento por un aumento de la mortalidad de los ostiones *Crassostrea gigas*.

Veterinario oficial o inspector oficial

Nombre y apellidos (en mayúsculas):	Cualificación y título:
Unidad Veterinaria Local (UVL):	UVL Nº:
Fecha:	Firma:
Sello:	