**Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions**

►**B** **RÈGLEMENT (UE) Nº 175/2010 DE LA COMMISSION**

**du 2 mars 2010**

**portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne des mesures de lutte contre la surmortalité des huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* associée à la détection de l'herpès virus de l'huître 1 µvar (OsHV-1 µvar)**

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

(JO L 52 du 3.3.2010, p. 1)

Modifié par:

| | | Journal officiel | | |
|---|---|---|---|---|
| | | n° | page | date |
| ►**M1** | Règlement (UE) nº 1153/2010 de la Commission du 8 décembre 2010 | L 324 | 39 | 9.12.2010 |

▼B

# RÈGLEMENT (UE) Nº 175/2010 DE LA COMMISSION

**du 2 mars 2010**

**portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne des mesures de lutte contre la surmortalité des huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* associée à la détection de l'herpès virus de l'huître 1 µvar (OsHV-1 µvar)**

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

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu la directive 2006/88/CE du Conseil du 24 octobre 2006 relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et relative à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies ([1]), et notamment son article 41, paragraphe 3, et son article 61, paragraphe 3,

considérant ce qui suit:

(1) La directive 2006/88/CE établit les exigences de police sanitaire applicables à la mise sur le marché des animaux d'aquaculture et des produits qui en sont issus. Elle établit en outre les mesures préventives minimales à mettre en œuvre en cas de présence suspectée ou avérée d'un foyer de certaines maladies des animaux aquatiques.

(2) L'article 41 de cette directive dispose que les États membres prennent des mesures appropriées pour lutter contre tout foyer de maladie émergente et empêcher la propagation de cette maladie. Dans le cas d'un foyer de maladie émergente, l'État membre concerné en informe sans délai la Commission, les autres États membres et les États membres de l'AELE si les constatations effectuées révèlent une situation épizootique de nature à affecter un autre État membre.

(3) Une surmortalité des huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* (ci-après «les huîtres *Crassostrea gigas*») a été détectée dans plusieurs zones en France et en Irlande à la fin du printemps et pendant l'été 2008. Elle a été attribuée à une combinaison de facteurs environnementaux défavorables, associée à la présence de bactéries du genre *Vibrio* et de l'herpès virus de l'huître (OsHV-1), dont un génotype récemment identifié de ce virus, dénommé OsHV-1 µvar.

(4) Les autorités françaises ont informé la Commission, les autres États membres et les États membres de l'AELE de la situation et des mesures prises en août 2008; la situation a été portée à l'attention du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale en septembre 2008.

(5) Au printemps 2009, un accroissement de la mortalité lié à la même combinaison de facteurs a été de nouveau détecté en France, en Irlande et dans les îles anglo-normandes. Bien que les causes de cette surmortalité demeurent incertaines, les enquêtes épidémiologiques menées par l'Irlande et le Royaume-Uni en 2009 semblent indiquer que l'OsHV-1 µvar y joue un rôle majeur.

([1]) JO L 328 du 24.11.2006, p. 14.

▼B

(6) Les autorités compétentes de ces États membres et des îles anglo-normandes ont informé la Commission de la situation et des mesures prises, qui ont été portées à l'attention du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale à plusieurs reprises.

(7) Les mesures de confinement prises par les autorités compétentes de ces États membres et des îles anglo-normandes pour lutter contre le foyer de maladie émergente s'appuient principalement sur une restriction des mouvements d'huîtres *Crassostrea gigas* vers l'extérieur des zones touchées.

(8) Compte tenu de la réapparition du foyer de maladie émergente en 2009 ainsi que du risque de récurrence et de propagation pendant le printemps et l'été 2010, il convient, eu égard à l'expérience acquise, d'étendre les mesures déjà prises par les États membres concernés.

(9) Pour garantir l'uniformité des conditions d'application des exigences établies par la directive 2006/88/CE concernant les maladies émergentes et pour veiller à ce que les mesures prises assurent une protection suffisante contre la propagation de la maladie sans restreindre indûment les mouvements d'huîtres *Crassostrea gigas*, il convient de coordonner les mesures concernant ces foyers de maladie émergente au niveau de l'Union européenne.

(10) Lorsque les autorités compétentes sont informées d'une surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas*, des échantillons sont prélevés et analysés pour détecter ou exclure la présence du virus OsHV-1 µvar.

(11) Lorsque la présence du génotype OsHV-1 µvar du virus a été confirmée, des mesures de lutte contre la maladie, dont la mise en place d'une zone de confinement, doivent être prises par les États membres concernés. Pour définir cette zone de confinement, certains facteurs exposés dans le présent règlement doivent être pris en compte. Ces mesures de lutte contre la maladie sont maintenues jusqu'à ce que des inspections aient permis d'établir que l'épisode de surmortalité a cessé.

(12) Les mouvements des huîtres *Crassostrea gigas* vers l'extérieur de ces zones de confinement doivent être restreints pour limiter le risque de propagation de la maladie. Cela étant, il convient de prévoir des dérogations pour les cas où le risque de contamination est faible. Ces dérogations concernent les mouvements de certaines huîtres *Crassostrea gigas* destinées à des zones d'élevage ou de reparcage situées dans une autre zone de confinement ou destinées à la consommation humaine. Pour garantir la traçabilité des lots d'huîtres *Crassostrea gigas* destinées à des zones d'élevage ou de reparcage, ceux-ci doivent être accompagnés d'un certificat zoosanitaire. Pour compléter ce certificat, il convient de tenir compte des notes explicatives figurant à l'annexe V du règlement (CE) nº 1251/2008 de la Commission du 12 décembre 2008 portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne les conditions et les exigences de certification applicables à la mise sur le marché et à l'importation dans la Communauté d'animaux d'aquaculture et de produits issus de ces animaux et établissant une liste des espèces vectrices [1].

[1] JO L 337 du 16.12.2008, p. 41.

▼B

(13) Pour une meilleure connaissance de la situation à l'égard de cette maladie émergente dans l'Union et, en particulier, dans les États membres et les compartiments qui ne sont pas encore touchés, ainsi que pour garantir la détection rapide de toute occurrence du virus OsHV-1 µvar, il se peut que les États membres souhaitent établir des programmes d'échantillonnage et d'analyse ciblés pour le dépistage précoce de ce virus. Les huîtres *Crassostrea gigas* provenant de zones ayant fait l'objet de mesures de confinement en 2009 conformément à la législation nationale, ou en 2010 en application du présent règlement, doivent être soumises à des exigences zoosanitaires supplémentaires lorsqu'elles sont introduites à des fins d'élevage ou de reparcage dans des États membres ou des compartiments couverts par un tel programme tant que le virus OsHV-1 µvar n'y a pas été détecté.

(14) Pour garantir la comparabilité des données collectées dans les différents États membres dans le contexte de programmes d'échantillonnage et d'analyse ciblées pour le dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar, il convient de définir certains critères applicables au contenu de ces programmes.

(15) Il est essentiel de pouvoir disposer, en temps utile, de données précises sur la situation concernant la détection du virus OsHV-1 µvar dans les États membres afin de lutter efficacement contre le foyer de maladie émergente. À cet effet, les États membres doivent informer la Commission et les autres États membres sans délai du premier cas confirmé d'OsHV-1 µvar détecté sur leur territoire en 2010.

(16) Par ailleurs, il convient de tirer parti des pages web d'information mises en place conformément à l'article 10 de la décision 2009/177/CE de la Commission du 31 octobre 2008 portant application de la directive 2006/88/CE du Conseil en ce qui concerne les programmes de surveillance et d'éradication et le statut indemne de la maladie des États membres, des zones et des compartiments ([1]).

(17) Pour garantir la transparence des informations, leur pertinence et leur accessibilité en temps opportun, les États membres communiquent à la Commission européenne et aux autres États membres des informations sur les zones de confinement, sur les zones précédemment soumises à des mesures de confinement mais où l'absence du virus OsHV-1 µvar a été démontrée, et sur les programmes de dépistage précoce de ce virus.

(18) Compte tenu des nombreuses incertitudes concernant le foyer de maladie émergente, les mesures prévues par le présent règlement s'appliquent jusqu'à la fin de décembre 2010.

(19) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

([1]) JO L 63 du 7.3.2009, p. 15.

▼B

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

*Article premier*

**Définition**

Aux fins du présent règlement, on entend par OsHV-1 µvar un génotype de l'herpès virus de l'huître (OsHV-1), qui est défini sur la base de données de séquences partielles qui montrent la délétion systématique de 12 paires de bases dans l'ORF 4 du génome par rapport au virus OsHV-1 (nº GenBank AY509253).

*Article 2*

**Échantillonnage, analyses et établissement de zones de confinement**

1. En cas de détection d'une surmortalité des huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* (ci-après «les huîtres *Crassostrea gigas*»), l'autorité compétente:

a) prélève des échantillons conformément à la partie A de l'annexe I;

b) réalise des analyses pour le dépistage du virus OsHV-1 µvar, conformément aux méthodes de diagnostic établies dans la partie B de l'annexe I.

2. Lorsque les résultats des analyses visées au paragraphe 1, point b), révèlent la présence du virus OsHV-1 µvar, l'autorité compétente met en place une zone de confinement. Cette zone est définie sur la base d'une analyse au cas par cas tenant compte des facteurs qui déterminent le risque de propagation de la maladie, tels qu'établis dans la partie C de l'annexe I.

3. Les États membres informent sans délai la Commission et les autres États membres de la première zone de confinement mise en place sur leur territoire en 2010.

*Article 3*

**Exigences applicables à la mise sur le marché d'huîtres *Crassostrea gigas* provenant d'une zone de confinement visée à l'article 2**

1. Les huîtres *Crassostrea gigas* provenant de zones de confinement établies conformément à l'article 2, paragraphe 2, ne doivent pas quitter ces zones.

2. Par dérogation au paragraphe 1, les lots d'huîtres *Crassostrea gigas* peuvent quitter la zone de confinement:

a) lorsqu'ils sont destinés à une autre zone de confinement établie conformément à l'article 2, paragraphe 2;

b) lorsqu'ils proviennent d'une partie de la zone de confinement, écloseries incluses, qui n'est pas touchée par la surmortalité et que ces lots ont fait l'objet:

i) d'un échantillonnage, conformément à la partie A de l'annexe I, et

ii) d'un dépistage du virus OsHV-1 µvar conformément aux méthodes de diagnostic établies dans la partie B de l'annexe I, et que tous les résultats sont négatifs;

▼B

c) lorsqu'ils sont destinés à la transformation ou à un centre de purification, un centre d'expédition ou un établissement de transformation avant consommation humaine équipé d'un système de traitement des effluents agréé par l'autorité compétente qui:

   i) inactive les virus à enveloppe,

   ii) ou réduit le risque de contamination des eaux naturelles par des maladies à un niveau acceptable;

d) lorsqu'ils sont destinés à la consommation humaine, qu'ils sont emballés et étiquetés à cet effet conformément au règlement (CE) nº 853/2004 du Parlement européen et du Conseil ([1]), et:

   i) que les huîtres ont perdu la faculté d'exister en tant qu'animaux vivants si on les replace dans leur environnement d'origine, ou

   ii) qu'elles sont destinées à être transformées sans entreposage temporaire sur le lieu de transformation;

e) lorsque les huîtres ou les produits qui en sont issus sont destinés à la consommation humaine sans transformation supplémentaire, à condition qu'ils soient conditionnés dans un emballage de vente au détail conforme aux dispositions y afférentes du règlement (CE) nº 853/2004.

3. Les lots visés au paragraphe 2, points a) et b), qui sont destinés à des zones d'élevage ou de reparcage sont accompagnés d'un certificat zoosanitaire complété conformément au modèle figurant à l'annexe II du présent règlement et aux notes explicatives figurant à l'annexe V du règlement (CE) nº 1251/2008.

*Article 4*

**Levée des mesures prévues aux articles 2 et 3**

L'autorité compétente peut lever les mesures de contrôle concernant les zones de confinement établies conformément à l'article 2, paragraphe 2, et les restrictions concernant la mise sur le marché prévues à l'article 3, après avoir réalisé deux inspections consécutives à quinze jours d'intervalle montrant que l'épisode de surmortalité a cessé.

*Article 5*

**Exigences applicables à la mise sur le marché des huîtres *Crassostrea gigas* provenant d'un compartiment précédemment soumis à des mesures de contrôle en raison d'une surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas* associée au virus OsHV-1 µvar**

1. Lorsqu'elles sont mises sur le marché, les huîtres *Crassostrea gigas* qui proviennent d'un compartiment précédemment soumis à des mesures de contrôle en 2009 ou en 2010 en raison d'une surmortalité de cette espèce d'huîtres associée au virus OsHV-1 µvar:

a) sont accompagnées d'un certificat zoosanitaire complété conformément au modèle figurant à l'annexe II du présent règlement et aux notes explicatives figurant à l'annexe V du règlement (CE) nº 1251/2008, si ces huîtres:

   i) sont destinées à des États membres ou des compartiments qui ont mis en place un programme de dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar, et dans lesquels ce virus n'a pas été détecté, et

([1]) JO L 139 du 30.4.2004, p. 55.

▼B

ii) sont destinées à des zones d'élevage ou de reparcage;

b) proviennent d'un compartiment où l'absence du virus OsHV-1 µvar a été démontrée par des prélèvements d'échantillons et des analyses réalisés conformément à la partie A de l'annexe I; et

c) satisfont aux conditions de police sanitaire fixées dans le modèle de certificat visé au point a).

2. Le programme de dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar visé au paragraphe 1, point a) i) satisfait aux exigences suivantes:

a) le programme doit être déclaré auprès du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale;

b) cette déclaration doit comporter les informations visées aux points 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 et 7 du modèle figurant à l'annexe II de la décision 2009/177/CE;

c) le programme doit prévoir:

i) un échantillonnage, conformément à la partie A de l'annexe I,

ii) des analyses pour le dépistage du virus OsHV-1 µvar, conformément aux méthodes de diagnostic établies dans la partie B de l'annexe I.

3. Le paragraphe 1 s'applique au bout d'une semaine à compter de la date de la réunion du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale au cours de laquelle le programme visé au paragraphe 1, point a) i), a été déclaré.

*Article 6*

**Page d'information basée sur l'internet**

1. Les États membres mettent à la disposition de la Commission et des autres États membres:

a) une liste des zones de confinement et des facteurs pris en compte pour définir ces zones établies conformément à l'article 2, paragraphe 2, ainsi que la description de leurs limites géographiques;

b) une liste, complétée par la description des limites géographiques de la zone concernée, des compartiments:

i) qui ont fait l'objet de mesures de confinement en 2009 en raison d'une surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas* associée au virus OsHV-1 µvar,

ii) où l'absence du virus OsHV-1 µvar a été démontrée par des analyses réalisées conformément aux parties A et B de l'annexe I sur des échantillons prélevés dans la zone de confinement;

c) les déclarations relatives aux programmes visés à l'article 5, paragraphe 2, accompagnées de la description des limites géographiques des zones concernées.

2. Les informations visées au paragraphe 1 sont maintenues à jour et mises à disposition au moyen des pages web d'information établies conformément à l'article 10 de la décision 2009/177/CE.

▼B

*Article 7*

**Rapports**

Le 1er octobre 2010 au plus tard, les États membres présentent à la Commission un rapport sur les programmes déclarés conformément à l'article 5, paragraphe 2.

Ce rapport est établi conformément au modèle figurant à l'annexe VI de la décision 2009/177/CE.

*Article 8*

**Entrée en vigueur et application**

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique du 15 mars 2010 au ►M1 30 avril 2011 ◄.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

▼B

*ANNEXE I*

PARTIE A

**Échantillonnage**

1. *Échantillonnage aux fins de l'application de l'article 2*

Les échantillons visés à l'article 2 sont composés d'au moins 12 individus de l'espèce *Crassostrea gigas*. Ces individus sont choisis parmi des huîtres affaiblies, bâillantes ou qui viennent de mourir (non encore décomposées) et sont prélevés dans le compartiment où la surmortalité a été observée.

2. *Échantillonnage aux fins de l'application de l'article 3, paragraphe 2, point b), de l'article 5, paragraphe 1, point b) et de l'article 5, paragraphe 2*

a) L'échantillonnage aux fins de l'application de l'article 3, paragraphe 2, point b), satisfait aux critères suivants:

i) pour les larves, cinq pools d'au moins 50 mg d'animaux entiers, coquille comprise, sont collectés par lot, entre quatre et huit jours après la fécondation;

ii) pour les naissains de moins de 6 mm, l'échantillon est constitué de 30 pools d'au moins 300 mg d'animaux entiers, coquille comprise, par lot;

iii) pour les huîtres de plus de 6 mm, 150 individus entiers sont prélevés par lot.

Lors de la sélection des animaux, toutes les parties du lot doivent être proportionnellement représentées dans l'échantillon. Si le lot comporte des huîtres affaiblies, bâillantes ou qui viennent de mourir (non encore décomposées), ces animaux seront sélectionnés en priorité.

b) Les échantillons prélevés aux fins de l'application de l'article 5, paragraphe 2), sont composés d'au moins 150 individus de l'espèce *Crassostrea gigas* par point d'échantillonnage. Toutes les exploitations ou zones conchylicoles des États membres ou compartiments couverts par le programme doivent faire l'objet d'un échantillonnage.

Les échantillons prélevés aux fins de l'application de l'article 5, paragraphe 1), point b), sont composés d'au moins 150 individus de l'espèce *Crassostrea gigas* par compartiment.

Lors de la sélection de ces individus, les critères suivants sont pris en compte:

— si le lot comporte des huîtres affaiblies, bâillantes ou qui viennent de mourir (non encore décomposées), ces animaux sont sélectionnés en priorité. Si ce n'est pas le cas, les animaux sont sélectionnés parmi des huîtres âgées de moins de douze mois,

— lorsque des échantillons sont prélevés dans des exploitations ostréicoles qui utilisent pour leur production de l'eau provenant de plus d'une source, des animaux représentant toutes les sources d'eau doivent être inclus dans l'échantillon de sorte que toutes les parties de l'exploitation y soient proportionnellement représentées,

— lorsque des échantillons sont prélevés dans des zones conchylicoles, il convient de prélever des animaux d'un nombre suffisant de points d'échantillonnage (trois au minimum), de sorte que toutes les parties de la zone, y compris les éventuels bancs naturels, soient proportionnellement représentées dans l'échantillon. Les principaux facteurs à prendre en compte pour la sélection de ces points d'échantillonnage sont les suivants: la détection antérieure du virus OsHV-1 µvar dans la zone, la densité d'élevage, les courants, la bathymétrie et les pratiques d'élevage.

▼B

c) L'échantillonnage visé à l'article 5, paragraphe 2), est réalisé dans la période de l'année où la prévalence du virus OsHV-1 µvar dans l'État membre ou le compartiment est connue pour être la plus forte. En l'absence de telles données, il est réalisé juste après la période où la température de l'eau excède 16 °C ou au moment de l'année où la température de l'eau atteint normalement son maximum annuel.

d) L'échantillonnage prévu à l'article 5, paragraphe 1, point b), est réalisé de préférence pendant la période de l'année visée au point c). Si des échantillons sont prélevés en dehors de cette période de l'année, les huîtres prélevées doivent, avant d'être analysées, être maintenues dans des conditions équivalentes à celles décrites au point c) pendant une période appropriée pour le dépistage du virus OsHV-1 µvar.

PARTIE B

**Méthodes de diagnostic pour le dépistage du virus OsHV-1 µvar**

1. *Champ d'application*

La présente procédure décrit une méthode de diagnostic standard à utiliser pour la détection et l'identification du virus OsHV-1 µvar par réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, ci-après «PCR»). Elle permet de distinguer le virus OsHV-1 du OsHV-1 µvar.

Pour optimiser les conditions de réaction et tenir compte des équipements et des caractéristiques du laboratoire concerné, les laboratoires peuvent, s'il y a lieu, modifier la méthode décrite dans la présente annexe, à condition que l'équivalence de la sensibilité et la spécificité puisse être démontrée.

2. *Définition*

Le virus OsHV-1 µvar est défini à l'article 1er du présent règlement.

3. *Matériel et conditions d'ambiance*

Le test de diagnostic utilisé pour le dépistage du virus OsHV-1 µvar et son identification par PCR nécessite le matériel et les conditions d'ambiance habituellement requis pour les tests PCR, à savoir:

— une hotte fermée munie d'un dispositif d'émission d'UV pour prévenir toute contamination lors de la préparation du mélange PCR,

— deux jeux complets de pipettes (2 µl; 20 µl; 200 µl et 1 000 µl), le premier pour l'extraction d'ADN et le second pour la préparation du mélange PCR,

— un jeu de trois pipettes différentes: une pipette (2 µl) pour la distribution d'échantillons dans le mélange PCR, une pipette (20 µl) pour le prélèvement du BET et une pipette (20 µl) pour le chargement des produits PCR sur les gels d'agarose,

— des pointes à filtre pour pipette (2 µl; 20 µl; 200 µl et 1 000 µl) pour l'extraction d'ADN, la préparation du mélange PCR et la distribution des échantillons,

— des embouts de pipette (20 µl) pour le prélèvement de BET et le chargement des produits d'amplification sur le gel d'agarose,

— un thermocycleur, pour les amplifications,

— un dispositif d'électrophorèse horizontale pour l'électrophorèse des produits PCR,

— un transilluminateur à UV pour l'observation des produits PCR après l'électrophorèse sur gel d'agarose,

— un système de prise de vue des gels.

▼B

Le manipulateur doit porter une blouse de laboratoire et des gants pendant la réalisation de toutes les étapes décrites ci-après. La blouse et les gants doivent être changés de préférence après chacune des principales étapes: l'extraction d'ADN, la préparation du mélange PCR, la distribution des échantillons, l'amplification et le chargement du gel.

Il est recommandé d'effectuer ces différentes étapes dans des pièces distinctes. Plus particulièrement, l'amplification et le chargement du gel/l'électrophorèse ne devraient pas être réalisés dans la même pièce que l'extraction d'ADN, la préparation du mélange PCR et la distribution d'ADN.

4. *Procédure*

4.1. Préparation des échantillons

Préparation pour l'extraction d'ADN d'huîtres vivantes ou venant de mourir (non encore décomposées), qui peuvent avoir été préalablement congelées.

Les échantillons sont traités différemment selon leur taille:

a) pour les larves, des pools de 50 mg des animaux entiers (coquille comprise) sont complétés avec 200 µl d'eau distillée, broyés et centrifugés à 1 000 g pendant 1 minute;

b) pour les naissains d'une taille inférieure ou égale à 6 mm, des pools de 300 mg des animaux entiers (coquille comprise) sont complétés avec 1 200 µl d'eau distillée, broyés et centrifugés à 1 000 g pendant 1 minute;

c) pour les naissains dont la taille est comprise entre 6 et 15 mm, tous les tissus mous de chaque animal sont broyés séparément;

d) pour les huîtres dont la taille est supérieure à 15 mm, des morceaux des branchies et du manteau sont isolés.

L'extraction d'ADN est réalisée au moyen du QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) et conformément aux instructions du «protocole pour tissus».

Les étapes ultérieures de la préparation des échantillons sont décrites ci-après:

1) mettre 100 µl du surnageant, pour les échantillons visés aux points a) et b), ou 10 à 50 mg de tissus, pour les échantillons visés aux points c) et d), dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml et ajouter 180 µl de solution tampon ATL;

2) ajouter 20 µl de protéinase K, mélanger au vortex et incuber à 56 °C jusqu'à ce que tout le tissu soit complètement lysé (une nuit). Mélanger occasionnellement au vortex pendant l'incubation pour disperser l'échantillon. Centrifuger brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon;

3) ajouter 200 µl de tampon AL, mélanger au vortex pendant 15 secondes et incuber 10 minutes à 70 °C. Centrifuger brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon;

4) ajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %) à l'échantillon et mélanger au vortex pendant 15 secondes. Centrifuger brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon;

5) déposer avec précaution le mélange obtenu à l'étape 4 dans la colonne QIAamp (placée dans un tube collecteur de 2 ml) sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne QIAamp dans un tube collecteur propre de 2 ml (fourni avec le kit) et jeter le tube contenant l'effluent;

▼B

6) ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et ajouter 500 µl de tampon AW1 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 minute. Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (fourni avec le kit) et jeter le tube contenant l'effluent;

7) ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et ajouter 500 µl de tampon AW2 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale (14 000 rpm) pendant 3 minutes;

8) (facultatif) transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (non fourni avec le kit) et jeter le tube contenant l'effluent. Centrifuger à vitesse maximale (14 000 rpm) pendant 1 minute;

9) transférer la colonne QIAamp dans un tube de microcentrifugation propre de 1,5 ml (non fourni avec le kit) et jeter le tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et ajouter 100 µl d'eau distillée. Incuber 5 minutes à température ambiante puis centrifuger 1 minute à 10 000 rpm;

10) contrôler la qualité et l'efficacité de l'extraction [par exemple, par la mesure de la DO (260 nm) au spectrophotomètre ou après électrophorèse sur gel d'agarose];

11) diluer les échantillons pour obtenir une concentration finale en ADN de l'ordre de 50-100 ng/µl;

12) les solutions d'ADN sont maintenues à 4 °C jusqu'à la réalisation des analyses PCR.

D'autres kits disponibles dans le commerce peuvent être utilisés pour l'extraction d'ADN à condition qu'il ait été démontré qu'ils permettent d'obtenir des résultats similaires.

4.2. *Réaction en chaîne par polymérase (PCR)*

4.2.1. Réactifs

— Tampon 10 X (fourni avec l'ADN polymérase Taq)

— $MgCl_2$ (fourni avec l'ADN polymérase) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) à diluer 10 fois (à 2 mM) avant utilisation

— d $H_2O$ ($H_2O$ distillée exempte d'ADN et d'ARN)

4.2.2. Amorces

Les amorces [1] à utiliser sont les suivantes:

CF (10 µM)

CF (10 µM)

[1] Ces amorces ou une description de ces amorces peuvent être obtenues auprès du laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques (LGP-Ifremer, av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, FRANCE).

▼B

4.2.3. Mélange PCR

Le mélange PCR pour chacun des tubes est le suivant:

| | Volume par tube | Concentration finale |
|---|---|---|
| Tampon (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 |
| CF (10 µM) | 1 µl | 0,2 µM |
| Polymérase Taq (5 U/µl) | 0,5 µl | 2,5 U |
| $dH_2O$ | 31,5 µl | |

— Placer 49 µl de ce mélange PCR dans chaque tube PCR

— Ajouter 1 µl de l'ADN extrait (50-100 ng/µl) dans chaque tube

4.2.4. Témoins

Deux types de témoin sont utilisés:

— les témoins négatifs sont constitués de $dH_2O$ (1 µl pour 49 µl de mélange PCR). Ils servent à détecter une éventuelle contamination de l'environnement de travail. Il convient d'inclure un témoin négatif tous les dix échantillons ou après chaque lot d'échantillons,

— Les témoins positifs sont constitués d'ADN plasmidique contenant le fragment génomique cible du virus OsHV-1 (CF-CR). Ils servent à vérifier l'efficacité de la réaction PCR. Il convient de prévoir un témoin positif par analyse PCR. Des témoins positifs sont disponibles auprès du laboratoire communautaire de référence.

4.2.5. Amplification

Les cycles d'amplification sont réalisés dans un thermocycleur.

— Dénaturation initiale: 2 minutes à 94 °C

— Amplification: 35 cycles (1 minute à 94 °C, 1 minute à 50 °C et 1 minute à 72 °C)

— Élongation finale: 5 minutes à 72 °C

4.3. *L'électrophorèse*

4.3.1. Réactifs

— 50 X TAE (peut être acheté prêt à l'emploi):

Tris base (40 mM) 242 g

Acide acétique glacial (40 mM) 57,1 ml

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

$dH_2O$ pour 1 litre

Ajuster à pH 8

▼B

— Gel d'agarose à 2,5 % dans 1X TAE

Bromide d'éthidium (0,5 µg/ml), à ajouter après refroidissement du gel.

— Colorant de chargement bleu:

Bleu de bromophénol 0,25 %

Xylène cyanol FF 0,25 %

Saccharose 40 %

Maintenir à 4 °C.

Utiliser dilué 6 fois (2 µl de tampon de chargement bleu pour 10 µl de produits PCR).

— Marqueur de poids moléculaire:

SmartLadder SF (Eurogentec): marqueur de poids moléculaire prêt à l'emploi comportant 9 bandes régulièrement espacées de 100 à 1 000 bp.

4.3.2. Préparation du gel d'agarose

1. Peser 2,5 g d'agarose, ajouter 100 ml de 1X TAE et chauffer jusqu'à dissolution totale.

2. Après refroidissement, ajouter du bromide d'éthidium (5 µl pour 100 ml de gel d'agarose) et disposer la solution dans un moule spécial équipé de peignes (afin de former des puits).

3. Lorsque le gel est polymérisé, les peignes sont enlevés et le gel est placé dans un dispositif d'électrophorèse horizontale contenant suffisamment de 1X TAE pour couvrir le gel.

4. 10 µl de produits PCR sont mélangés avec 2 µl de colorant bleu (6X) et distribués dans les puits.

5. Un puits est réservé au marqueur de poids moléculaire (5 µl).

6. Un courant d'une tension de 50 à 150 volts est appliqué pendant 30 minutes à 1 heure, en fonction de la taille et de l'épaisseur du gel.

7. Observation du gel sous UV.

4.4. *Interprétation*

La présence du virus OsHV-1 µvar dans un échantillon est indiquée par la présence d'une bande de la taille appropriée (157 bp au lieu de 173 bp pour le virus OsHV-1) sur le gel d'agarose à 2,5 %, tous les témoins négatifs étant négatifs et tous les témoins positifs étant positifs par ailleurs.

PARTIE C

**Définition de la zone de confinement**

Les facteurs suivants influençant les risques de propagation de la maladie sont pris en compte dans la définition de la zone de confinement conformément à l'article 2, paragraphe 2:

a) le nombre, le taux et la distribution des cas de mortalité dans l'exploitation ou la zone conchylicole contaminée;

b) l'éloignement et la densité des exploitations ou zones conchylicoles avoisinantes;

c) l'éloignement des établissements de transformation et des exploitations ou zones conchylicoles contiguës;

d) les espèces présentes sur l'exploitation ou les zones conchylicoles;

▼B

e) les pratiques d'élevage appliquées dans les exploitations ou zones conchylicoles contaminées et avoisinantes; et

f) les conditions hydrodynamiques et les autres facteurs pertinents d'un point de vue épizootique.

▼B

*ANNEXE II*

**Modèle de certificat zoosanitaire pour la mise sur le marché d'huîtres *Crassostrea gigas* destinées à des zones d'élevage ou de reparcage**

**UNION EUROPÉENNE** — **Certificat intracommunautaire**

**Partie I: Détails concernant le lot présenté**

| | |
|---|---|
| I.1. Expéditeur<br>Nom<br>Adresse<br>Code postal | I.2. N° de référence du certificat — I.2.a. N° de référence locale:<br>I.3. Autorité centrale compétente<br>I.4. Autorité locale compétente |
| I.5. Destinataire<br>Nom<br>Adresse<br>Code postal | I.6.<br>I.7. |
| I.8. Pays d'origine — Code ISO — I.9. | I.10. Pays de destination — Code ISO — I.11. |
| I.12. Lieu d'origine/Lieu de pêche<br>Exploitation agréée aquaculture ☐ Autres ☐<br>Nom — Numéro d'agrément<br>Adresse<br>Code postal | I.13. Lieu de destination<br>Exploitation agréée aquaculture ☐ Autres ☐<br>Nom — Numéro d'agrément<br>Adresse<br>Code postal |
| I.14. Lieu de chargement<br>Code postal | I.15. Date et heure du départ |
| I.16. Moyens de transport<br>Avion ☐ Navire ☐ Wagon ☐<br>Véhicule routier ☐ Autres ☐<br>Identification: | I.17. Transporteur<br>Nom — Numéro d'agrément<br>Adresse<br>Code postal — État membre |
| I.18. Espèce animale/Produits | I.19. Code produit (code NC)<br>**03.07**<br>I.20. Nombre/Quantité |
| I.21. | I.22. Nombre de conditionnement |
| I.23. N° du scellé et n° du conteneur | I.24. Type de conditionnement |
| I.25. Animaux certifiés aux fins de/Produits certifiés pour<br>Elevage ☐ Reparquage ☐ | |
| I.26. Transit par un pays tiers ☐<br>Pays tiers — Code ISO<br>Point de sortie — Code<br>Point d'entrée — N° du PIF | I.27. Transit par les États Membres ☐<br>État membre — Code ISO<br>État membre — Code ISO<br>État membre — Code ISO |
| I.28. Export ☐<br>Pays tiers — Code ISO<br>Point de sortie — Code | I.29. |
| I.30. | |
| I.31. Identification des animaux / des produits<br>Espèce (Nom scientifique) — Quantité | |

▼B

**UNION EUROPÉENNE**

**Pour la mise sur le marché d'huîtres *Crassostrea gigas* destinées à des zones d'élevage ou de reparcage**

**Partie II Certification**

| II. | **Renseignements sanitaires** | II.a. Numéro de référence du certificat | II.b. |
|---|---|---|---|

([1])([2])[II.1 **Exigences relatives aux huîtres Crassostrea gigas provenant d'une zone de confinement établie conformément à l'article 2 du règlement (UE) nº 175/2010**

Je soussigné, inspecteur officiel, certifie que les huîtres *Crassostrea gigas* visées à la partie I du présent certificat:

II.1.1 proviennent d'une zone qui fait l'objet de mesures de lutte contre la maladie concernant la surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas* associée au virus OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 peuvent être mises sur le marché conformément à l'article 3, paragraphe 2, point a), du règlement (UE) nº 175/2010;]

([1])[II.1.2 proviennent d'une partie de la zone de confinement qui n'est pas affectée par la surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas*, que le lot a fait l'objet d'un échantillonnage et d'analyses conformément à l'annexe I du règlement (UE) nº 175/2010 et que les résultats de ces analyses sont négatifs;]]

([1])([3])[II.2 **Exigences concernant les huîtres *Crassostrea gigas* provenant d'un État membre ou d'un compartiment ayant précédemment fait l'objet de mesures de confinement du fait d'une surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas* associée au virus OsHV-1 µvar, et destinées à des États membres ou des compartiments qui font l'objet d'un programme pour le dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar**

Je soussigné, inspecteur officiel, certifie que les huîtres *Crassostrea gigas* visées à la partie I du présent certificat:

II.2.1 proviennent d'une exploitation ou d'une zone conchylicole dont les registres ne font pas état d'une surmortalité;

II.2.2 proviennent d'un compartiment où l'absence du virus OsHV-1 µvar a été démontrée par des prélèvements d'échantillons d'huîtres *Crassostrea gigas* et des analyses réalisés conformément à l'annexe I du règlement (UE) nº 175/2010).]

II.3 **Exigences en matière de transport et d'étiquetage**

Je soussigné, inspecteur officiel, certifie:

II.3.1 que les huîtres *Crassostrea gigas* visées à la partie I du présent certificat sont placées dans des conditions (y compris en ce qui concerne la qualité de l'eau) qui n'ont aucune incidence sur leur statut sanitaire;

II.3.2 que, préalablement au chargement, le conteneur de transport est propre et a été désinfecté ou était inutilisé;

II.3.3 que le lot est identifié par une étiquette lisible placée sur la face extérieure du conteneur ou, en cas de transport par bateau vivier, dans le manifeste, portant les renseignements utiles visés à la partie I, cases I.8 à I.13, du présent certificat, ainsi que la mention suivante:

soit ([1])[«Huîtres *Crassostrea gigas* destinées à l'élevage/au reparcage dans une zone faisant l'objet d'un programme pour le dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar»]

soit (1)[«Huîtres *Crassostrea gigas* destinées à l'élevage/au reparcage dans une zone faisant l'objet de mesures de lutte contre la maladie et provenant d'une zone faisant l'objet de mesures de lutte contre la maladie»].

**Notes**

**Partie I**

— Case I.12: s'il y a lieu, indiquer le numéro d'agrément de l'exploitation ou de la zone conchylicole en question.

— Case I.13: s'il y a lieu, indiquer le numéro d'agrément de l'exploitation ou de la zone conchylicole en question.

— Cases I.20 et I.31: en ce qui concerne la «quantité», indiquer le nombre total.

— Case I.25 cochez «Élevage» si les huîtres sont destinées à l'élevage, «Reparcage» si elles sont destinées au reparcage.

▼B

**UNION EUROPÉENNE**

**Pour la mise sur le marché d'huîtres *Crassostrea gigas* destinées à des zones d'élevage ou de reparcage**

| II. **Renseignements sanitaires** | II.a. Numéro de référence du certificat | II.b. |
|---|---|---|

**Partie II**

([1]) Biffer les mentions inutiles.

([2]) La partie II.1 du présent certificat s'applique aux lots d'huîtres *Crassostrea gigas* provenant d'une zone de confinement établie conformément à l'article 2, paragraphe 2, du règlement (UE) nº 175/2010 et qui, en vertu de l'article 3, paragraphe 2, point a) ou b), sont autorisés à quitter cette zone.

([3]) La partie II.2 du présent certificat s'applique aux lots d'huîtres *Crassostrea gigas* visées à l'article 5, paragraphe 1, du règlement (UE) nº 175/2010, destinés à des États membres ou des compartiments faisant l'objet d'un programme de dépistage précoce du virus OsHV-1 µvar et provenant d'une zone ayant précédemment fait l'objet de mesures de confinement en raison d'une surmortalité des huîtres *Crassostrea gigas*.

Vétérinaire officiel ou inspecteur officiel

| | |
|---|---|
| Nom (en lettres capitales): | Titre et qualité: |
| Unité vétérinaire locale: | Nº UVL: |
| Date: | Signature: |
| Cachet: | |