Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►B

REGOLAMENTO (UE) N. 175/2010 DELLA COMMISSIONE

del 2 marzo 2010

che attua la direttiva 2006/88/CE del Consiglio per quanto riguarda le misure di lotta all'aumento della mortalità delle ostriche della specie *Crassostrea gigas* in relazione al rilevamento dell'Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 52 del 3.3.2010, pag. 1)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►M1	Regolamento (UE) n. 1153/2010 della Commissione dell'8 dicembre 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

REGOLAMENTO (UE) N. 175/2010 DELLA COMMISSIONE

del 2 marzo 2010

che attua la direttiva 2006/88/CE del Consiglio per quanto riguarda le misure di lotta all'aumento della mortalità delle ostriche della specie *Crassostrea gigas* in relazione al rilevamento dell'Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

vista la direttiva 2006/88/CE del Consiglio, del 24 ottobre 2006, relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di talune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro tali malattie ([1]), in particolare l'articolo 41, paragrafo 3, e l'articolo 61, paragrafo 3,

considerando quanto segue:

(1) La direttiva 2006/88/CE stabilisce le norme di polizia sanitaria che disciplinano l'immissione sul mercato degli animali d'acquacoltura e dei relativi prodotti. La direttiva stabilisce inoltre le misure minime di prevenzione da applicarsi in caso di presenza sospetta o conclamata di un focolaio di talune malattie degli animali acquatici.

(2) L'articolo 41 della suddetta direttiva dispone che gli Stati membri siano tenuti ad adottare le misure appropriate per contrastare una malattia emergente ed evitarne la diffusione. In caso di malattia emergente, lo Stato membro interessato informa senza indugio gli Stati membri, la Commissione e gli Stati membri dell'EFTA qualora i risultati rivestano interesse dal punto di vista epidemiologico per un altro Stato membro.

(3) Nella tarda primavera e nell'estate del 2008 è stato rilevato un aumento della mortalità delle ostriche della specie *Crassostrea gigas* in varie zone della Francia e in Irlanda. Il fenomeno è stato attribuito all'interazione di fattori ambientali avversi, unitamente alla presenza del batterio del genere Vibrio e dell'Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), compreso un suo genotipo di recente descrizione denominato OsHV-1 µvar.

(4) Le autorità francesi hanno informato la Commissione, gli Stati membri e gli Stati membri dell'EFTA della situazione e delle misure adottate nell'agosto 2008; la questione è stata presentata al comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali nel settembre 2008.

(5) Nella primavera del 2009 è stato nuovamente rilevato un aumento della mortalità attribuito alla stessa combinazione di fattori in Francia, in Irlanda e nelle Isole della Manica. Benché le cause della mortalità siano tuttora incerte, dalle indagini epidemiologiche svolte in Irlanda e nel Regno Unito nel 2009 risulterebbe che il virus OsHV-1 µvar è uno dei fattori più importanti.

([1]) GU L 328 del 24.11.2006, pag. 14.

▼B

(6) Le autorità competenti dei suddetti Stati membri e delle Isole della Manica hanno informato la Commissione della situazione e delle misure adottate; la questione è stata ripetutamente trasmessa al Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali.

(7) Le misure di contenimento adottate dalle autorità competenti degli Stati membri in questione e delle Isole della Manica per lottare contro l'insorgere della malattia si basavano prevalentemente sulla restrizione dei movimenti di ostriche *Crassostrea gigas* in uscita dalle zone affette dall'aumento di mortalità.

(8) In considerazione del riemergere della malattia nel 2009 e della possibilità che si ripresenti e si diffonda ulteriormente nella primavera e nell'estate del 2010, nonché sulla base delle esperienze acquisite, è opportuno e necessario estendere le misure già adottate dagli Stati membri interessati.

(9) Per garantire condizioni uniformi di attuazione delle prescrizioni della direttiva 2006/88/CE sulle malattie emergenti e per garantire che le misure adottate consentano di tutelarsi in modo sufficiente dall'ulteriore diffusione della malattia, senza imporre restrizioni inutili ai movimenti delle ostriche *Crassostrea gigas*, è necessario coordinare le misure relative a tale malattia emergente a livello dell'Unione europea.

(10) Non appena le autorità competenti vengono informate del rilevamento di un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas*, devono essere effettuati campionamenti e test volti a rilevare o escludere la presenza del virus OsHV-1 µvar.

(11) Qualora venga confermata la presenza del genotipo del virus OsHV-1 µvar gli Stati membri devono attuare misure di lotta alla malattia e istituire una zona di contenimento. Nella definizione della zona di contenimento va tenuto conto di determinati fattori indicati nel presente regolamento. Le misure di lotta alla malattia devono restare in vigore finché risulti dalle ispezioni che l'aumento della mortalità è cessato.

(12) Per limitare il rischio di diffusione della malattia va predisposta la restrizione dei movimenti di ostriche *Crassostrea gigas* in uscita dalle zone di contenimento. Vanno tuttavia previste deroghe per i casi in cui il rischio di diffusione della malattia è ridotto. Tali deroghe riguardano i movimenti di determinate ostriche *Crassostrea gigas* destinate alle zone di allevamento o di stabulazione in un'altra zona di contenimento o destinate al consumo umano. Per garantire la tracciabilità delle partite di ostriche *Crassostrea gigas* destinate alle zone di allevamento o di stabulazione, è necessario che siano accompagnate da un certificato sanitario. Per compilare il certificato ci si attiene al regolamento (CE) n. 1251/2008 della Commissione, del 12 dicembre 2008, recante modalità di esecuzione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le condizioni e le certificazioni necessarie per l'immissione sul mercato e l'importazione nella Comunità di animali d'acquacoltura e i relativi prodotti e che stabilisce un elenco di specie vettrici ([1]).

([1]) GU L 337 del 16.12.2008, pag. 41.

▼B

(13) Per ottenere ulteriori informazioni sulla situazione relativa alla malattia emergente nell'Unione e in particolare negli Stati membri e nelle zone finora non interessate, nonché per garantire un rilevamento tempestivo dell'eventuale presenza del virus OsHV-1 µvar, gli Stati membri hanno la facoltà di istituire programmi di campionamento e test mirati per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar. Le ostriche *Crassostrea gigas* originarie di zone soggette a misure di contenimento nel 2009 in applicazione di provvedimenti nazionali oppure nel 2010 in conformità del presente regolamento devono essere soggette ad ulteriori prescrizioni sanitarie qualora vengano introdotte a fini di allevamento o di stabulazione in Stati membri o zone oggetto dei suddetti programmi, finché il virus OsHV-1 µvar non viene rilevato nei suddetti Stati membri o zone.

(14) Affinché i dati rilevati in vari Stati membri nell'ambito di programmi di campionamento e test mirati per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar siano comparabili, vanno fissati determinati criteri relativi al contenuto di detti programmi.

(15) La disponibilità di informazioni precise e tempestive sulla situazione relativa al rilevamento del virus OsHV-1 µvar negli Stati membri è un elemento fondamentale della strategia di lotta all'emergere della malattia. A tal fine gli Stati membri devono informare senza inutili ritardi la Commissione e gli altri Stati membri della prima presenza confermata del virus OsHV-1 µvar nei loro territori nel 2010.

(16) Inoltre si rinvia alle pagine d'informazione su Internet elaborate in applicazione dell'articolo 10 della decisione 2009/177/CE della Commissione, del 31 ottobre 2008, che attua la direttiva 2006/88/CE del Consiglio per quanto riguarda i programmi di sorveglianza e di eradicazione e lo status di «indenne da malattia» di Stati membri, zone e compartimenti [1].

(17) Per garantire trasparenza ed un accesso rapido alle informazioni pertinenti sulla malattia emergente, gli Stati membri devono mettere a disposizione della Commissione europea e degli altri Stati membri informazioni riguardanti le zone di contenimento, le zone precedentemente oggetto di misure di contenimento, nelle quali però è stata dimostrata l'assenza del virus OsHV-1 µvar, e i programmi per il rilevamento tempestivo del virus OsH-1 µvar.

(18) Poiché sussistono grandi incertezze sulla situazione relativa alla malattia emergente, le misure di cui al presente regolamento restano applicabili fino alla fine del dicembre 2010.

(19) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

[1] GU L 63 del 7.3.2009, pag. 15.

▼B

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Definizioni

Ai fini del presente regolamento, OsHV-1 µvar indica un genotipo del virus dell'herpes Ostreid -1 (OsHV-1), definito sulla base di dati di sequenza parziali dai quali risulta la cancellazione sistematica di 12 coppie di base nell'ORF 4 del genoma rispetto all'OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Articolo 2

Campionamento, test e istituzione di zone di contenimento

1. Non appena si rileva un aumento della mortalità nelle ostriche della specie *Crassostrea gigas*, l'autorità competente deve:

a) prelevare campioni in conformità dell'allegato I, parte A;

b) effettuare test volti a rilevare la presenza del virus OsHV-1 µvar secondo i metodi di diagnosi di cui all'allegato I, parte B.

2. Se i risultati dei test di cui al paragrafo 1, lettera b) indicano la presenza del virus OsHV-1 µvar, l'autorità competente istituisce una zona di contenimento. Tale zona va definita sulla base di un'analisi caso per caso, tenendo conto dei fattori che determinano i rischi di diffusione della malattia di cui all'allegato I, parte C.

3. Gli Stati membri informano la Commissione e gli altri Stati membri senza inutili ritardi dell'istituzione della prima zona di contenimento nel loro territorio nel 2010.

Articolo 3

Prescrizioni relative all'immissione sul mercato delle ostriche *Crassostrea gigas* originarie di una zona di contenimento di cui all'articolo 2

1. Le ostriche *Crassostrea gigas* originarie di zone di contenimento istituite in conformità dell'articolo 2, paragrafo 2, non possono uscire da dette zone.

2. In deroga al paragrafo 1, le partite di ostriche *Crassostrea gigas* possono uscire dalle zone di contenimento nei casi seguenti:

a) se sono destinate ad un'altra zona di contenimento istituita in conformità dell'articolo 2, paragrafo 2;

b) se sono originarie di una parte della zona di contenimento, inclusi i vivai, non interessata dall'aumento di mortalità e se la partita è stata oggetto di:

   i) campionamento in conformità dell'allegato I, parte A; nonché

   ii) test volti a rilevare la presenza del virus OsHV-1 µvar secondo i metodi di diagnosi di cui all'allegato I, parte B, e detti test hanno avuto esito negativo;

▼B

c) se sono destinate alla trasformazione, a centri di spedizione o ad impianti di trasformazione prima del consumo umano che siano dotati di un sistema di trattamento delle acque reflue approvato dall'autorità competente, il quale:

i) rende inattivi i virus con involucro; oppure

ii) riduce il rischio di trasmissione della malattia nel sistema idrico naturale ad un livello accettabile;

d) se sono destinate al consumo umano, confezionate ed etichettate a tale fine in conformità del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio ([1]) e sono:

i) incapaci di sopravvivere se reintegrate nell'ambiente dal quale provengono; oppure

ii) destinate alla trasformazione senza uno stoccaggio temporaneo nel luogo di trasformazione;

e) se le partite di ostriche o i prodotti di ostriche sono destinati al consumo umano senza ulteriori trasformazioni, purché essi siano confezionati in imballaggi atti alla vendita al dettaglio conformi alle disposizioni previste dal regolamento (CE) n. 853/2004.

3. Le partite di cui al paragrafo 2, lettera a) e lettera b) destinate a zone di allevamento o di stabulazione devono essere accompagnate da un certificato sanitario compilato secondo il modello di cui all'allegato II del presente regolamento e secondo le note esplicative di cui all'allegato V del regolamento (CE) n. 1251/2008.

Articolo 4

Revoca delle misure di cui agli articoli 2 e 3

L'autorità competente può revocare le misure di controllo relative alle zone di contenimento istituite in conformità dell'articolo 2, paragrafo 2, e le restrizioni all'immissione sul mercato di cui all'articolo 3 dopo aver svolto due ispezioni consecutive a 15 giorni di distanza l'una dall'altra, che dimostrino che l'aumento della mortalità è cessato.

Articolo 5

Prescrizioni relative all'immissione sul mercato di ostriche *Crassostrea gigas* originarie di compartimenti in precedenza soggetti a misure di controllo dovute ad un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas* connesso alla presenza del virus OsHV-1 µvar

1. Le ostriche *Crassostrea gigas* immesse sul mercato e originarie di compartimenti che sono stati soggetti a misure di contenimento nel 2009 o nel 2010, dovute ad un aumento della mortalità delle stesse, connesso alla presenza del virus OsHV-1 µvar devono:

a) essere accompagnate da un certificato sanitario compilato secondo il modello di cui all'allegato II del presente regolamento e secondo le note esplicative di cui all'allegato V del regolamento (CE) n. 1251/2008 se gli animali:

i) sono destinati a Stati membri o compartimenti nei quali è stato istituito un programma per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar e nei quali detto virus non è stato rilevato; e

([1]) GU L 139 del 30.4.2004, pag. 55.

▼B

ii) sono destinati a zone di allevamento o di stabulazione;

b) essere originarie di un compartimento in cui l'assenza del virus OsHV-1 µvar è stata dimostrata da campionamenti e test svolti secondo le prescrizioni dell'allegato I, parte A; nonché

c) rispettare le prescrizioni di polizia sanitaria indicate nel certificato modello di cui alla lettera a).

2. I programmi per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar di cui al paragrafo 1, lettera a), punto i), devono rispettare le seguenti prescrizioni:

a) i programmi devono essere dichiarati al Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali;

b) la dichiarazione va effettuata in conformità del punto 1, dei punti 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 e 5.9, nonché dei punti 6 e 7 del modello di cui all'allegato II della decisione 2009/177/CE;

c) i programmi devono comprendere:

i) campionamento in conformità dell'allegato I, parte A;

ii) test volti a rilevare la presenza del virus OsHV-1 µvar, effettuati applicando i metodi di diagnosi di cui all'allegato I, parte B.

3. Il paragrafo 1 si applica una settimana dopo la riunione del Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali durante la quale è stato dichiarato il programma di cui al paragrafo 1, lettera a), punto i).

Articolo 6

Pagine d'informazione su Internet

1. Gli Stati membri mettono a disposizione della Commissione e degli altri Stati membri:

a) un elenco delle zone di contenimento e dei fattori presi in considerazione per definirle, compresa una descrizione dei limiti geografici della zona in questione, istituita in conformità dell'articolo 2, paragrafo 2;

b) un elenco dei compartimenti, compresa una descrizione dei limiti geografici della zona in questione:

i) che sono stati oggetto di misure di contenimento nel 2009, dovute ad un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas* connesso al virus OsHV-1 µvar;

ii) in cui l'assenza del virus OsHV-1 µvar è stata dimostrata da test svolti secondo le prescrizioni dell'allegato I, parti A e B, su campioni prelevati nella zona di contenimento;

c) le dichiarazioni di programmi di cui all'articolo 5, paragrafo 2, inclusa una descrizione dei limiti geografici della zona in questione.

2. Le informazioni di cui al paragrafo 1 vanno tenute aggiornate e disponibili pubblicandole sulla pagine d'informazione su Internet elaborate in conformità dell'articolo 10 della decisione 2009/177/CE.

▼B

Articolo 7

Relazioni

Entro il 1º ottobre 2010 gli Stati membri presentano alla Commissione una relazione sui programmi dichiarati in conformità dell'articolo 5, paragrafo 2.

La relazione è redatta in conformità del modello di formulario figurante nell'allegato VI della decisione 2009/177/CE.

Articolo 8

Entrata in vigore e applicazione

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla sua pubblicazione sulla *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 15 marzo 2010 fino al ►**M1** 30 aprile 2011 ◄.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

▼B

ALLEGATO I

PARTE A

Campionamento

1. *Campionamento in applicazione dell'articolo 2*

I campioni di cui all'articolo 2 devono essere costituiti da almeno 12 esemplari di ostriche *Crassostrea gigas*. Vanno selezionati gli animali deboli, a conchiglia aperta o appena morti (non decomposti) e vanno prelevati dal compartimento in cui è stata osservata la mortalità.

2. *Campionamento in applicazione dell'articolo 3, paragrafo 2, lettera b), dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) e dell'articolo 5, paragrafo 2*

a) Il campionamento in applicazione dell'articolo 3, paragrafo 2, lettera b) consiste:

i) per le larve, in cinque prelievi di almeno 50 mg di animali interi per partita, raccolti tra 4 e 8 giorni dopo la fecondazione, compresa la conchiglia;

ii) per le ostriche giovani, di dimensioni inferiori a 6 mm, in 30 prelievi di 300 mg di animali interi per partita, compresa la conchiglia;

iii) per le ostriche di dimensioni superiori a 6 mm, in 150 esemplari per partita.

Selezionando gli animali per il campione si devono rappresentare, in modo proporzionale, tutte le parti della partita. Il prelievo deve innanzitutto comprendere i soggetti deboli, a conchiglia aperta, o appena morti (non in stato di decomposizione);

b) il campionamento in applicazione dell'articolo 5, paragrafo 2 consiste in almeno 150 esemplari di *Crassostrea gigas* per punto di campionamento. Tutte le aziende o zone di allevamento di molluschi dello Stato membro o del compartimento oggetto del programma vanno sottoposte a campionamento.

Il campionamento in applicazione dell'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) consiste in almeno 150 esemplari di ostriche *Crassostrea gigas* per compartimento.

Per la selezione degli animali da includere nel campione va tenuto conto dei criteri seguenti:

— il prelievo deve innanzitutto comprendere i soggetti deboli, a conchiglia aperta, o appena morti (non in stato di decomposizione); se non sono disponibili animali nelle suddette situazioni, la selezione deve comprendere molluschi sani di età inferiore a 12 mesi,

— per i campionamenti da effettuare presso aziende che, per la produzione, ricorrono a più di una fonte idrica, vanno selezionati animali che rappresentino tutte le fonti idriche, in modo che tutte le parti dell'azienda siano rappresentate in modo proporzionale nel campione,

— per i campioni prelevati in zone di allevamento dei molluschi, il campione deve comprendere animali prelevati da un numero sufficiente di punti di campionamento, almeno tre, affinché il campione rappresenti in modo proporzionale tutte le parti della zona di allevamento dei molluschi, compresi i banchi naturali eventualmente presenti; i principali fattori da tenere in considerazione per la selezione dei punti di campionamento sono: precedenti rilevamenti del virus OsHV-1 µvar nella zona, coefficiente di densità, flussi idrici, batimetria e prassi di gestione;

▼B

c) il campionamento di cui all'articolo 5, paragrafo 2 va effettuato nel periodo dell'anno in cui, secondo le informazioni, si registra la massima prevalenza del virus OsHV-1 µvar nello Stato membro o nel compartimento. Se tali informazioni non sono disponibili, il campionamento va effettuato immediatamente dopo il periodo in cui la temperatura dell'acqua supera i 16 °C oppure nel periodo dell'anno in cui la temperatura raggiunge solitamente i massimi livelli;

d) il campionamento di cui all'articolo 5, paragrafo 1, lettera b) va preferibilmente effettuato nel periodo dell'anno indicato al punto c). Se i campioni vengono prelevati in un altro periodo dell'anno, le ostriche ivi contenute devono essere conservate in condizioni equivalenti a quelle descritte al punto c) per un periodo adatto al rilevamento del virus OsHV-1 µvar, prima di essere sottoposte a test.

PARTE B

Metodi di diagnosi per il rilevamento del virus OsHV-1 µvar

1. *Campo d'applicazione*

La presente procedura illustra un metodo di diagnosi standard da impiegare per il rilevamento e l'identificazione del virus OsHV-1 µvar tramite PCR (reazione a catena della polimerasi). La PCR consente di distinguere tra OsHV-1 e OsHV-1 µvar.

Se opportuno, al fine di ottimizzare le condizioni di reazione e di adeguarle all'attrezzatura e alle condizioni presenti nel loro laboratorio, i laboratori possono apportare modifiche ai metodi descritti dal presente allegato, a condizione di poter dimostrare pari sensibilità e specificità.

2. *Definizioni*

Il virus OsHV-1 µvar è definito all'articolo 1 del presente regolamento.

3. *Attrezzature e condizioni ambientali*

Il test di diagnosi che si effettua per rilevare e identificare il virus OsHV-1 µvar attraverso la PCR necessita delle attrezzature e delle condizioni ambientali solitamente impiegate per le prove di PCR, ovvero:

— una cappa chiusa, con sistema di produzione di raggi UV per l'eliminazione di eventuali contaminazioni durante la preparazione della miscela PCR,

— due serie complete di pipette (2 µl; 20 µl; 200 µl e 1 000 µl), la prima per l'estrazione del DNA e la seconda per la preparazione della miscela PCR,

— tre pipette diverse: una (2 µl) per distribuire i campioni nella miscela PCR, una (20 µl) per prelevare EB ed un'altra (20 µl) per inoculare i prodotti della PCR nei gel di agarosio,

— puntali per pipette con filtro (2 µl; 20 µl; 200 µl e 1 000 µl) per l'estrazione del DNA, per la preparazione della miscela PCR e per la distribuzione dei campioni,

— puntali per pipette (20 µl) per prelevare EB e inoculare i prodotti di amplificazione nel gel di agarosio,

— un thermocycler per effettuare le amplificazioni,

— un apparecchio per elettroforesi orizzontale per l'elettroforesi dei prodotti della PCR,

— un tavolo UV per osservare i prodotti della PCR dopo l'elettroforesi su gel di agarosio,

— un dispositivo atto ad ottenere immagini dei gel.

▼B

Il tecnico di laboratorio deve indossare camice e guanti durante tutte le varie fasi descritte qui di seguito. Il camice e i guanti vanno sostituiti, di preferenza, dopo ogni fase principale: estrazione del DNA, preparazione della miscela PCR, distribuzione dei campioni, amplificazione e carico nel gel.

Si raccomanda di eseguire le varie fasi in locali diversi. In particolare, l'amplificazione ed il carico nel gel/l'elettroforesi devono essere effettuati in un locale separato da quello in cui vengono effettuate l'estrazione del DNA, la preparazione della miscela PCR e la distribuzione del DNA.

4. *Procedura*

4.1. Preparazione del campione

Le ostriche vive o appena morte (non decomposte), che possono essere state congelate, vengono trattate per estrarre il DNA.

I campioni vengono trattati in modo diverso a seconda delle loro dimensioni:

a) per le larve, i prelievi di 50 mg di animali interi (compresa la conchiglia) vengono frantumati e centrifugati a 1 000 g per un minuto, unitamente a 200 µl di acqua distillata;

b) per le ostriche giovani di dimensioni inferiori a 6 mm, i prelievi di 300 mg di animali interi (compresa la conchiglia) vengono frantumati e centrifugati a 1 000 g per un minuto, unitamente a 1 200 µl di acqua distillata;

c) per le ostriche giovani di dimensioni comprese tra 6 e 15 mm, tutti i tessuti molli di ogni animale vanno frantumati separatamente;

d) per gli animali di dimensioni superiori a 15 mm, vanno isolati pezzi di branchie e mantello.

L'estrazione del DNA viene effettuata con il QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), seguendo le istruzioni del protocollo per il test sui tessuti.

Le altre operazioni di preparazione del campione vanno svolte nel seguente ordine:

1. Mettere 100 µl di surnatante [per i campioni di cui alle lettere a) e b)] oppure da 10 a 50 mg di tessuti [per i campioni di cui alle lettere c) e d)] in un tubo per microcentrifuga e aggiungere 180 µl di Buffer ATL.

2. Aggiungere 20 µl di Proteinase K, miscelare con il vortex e incubare a 56 °C finché il tessuto non è completamente lisato (una notte). Durante l'incubazione, miscelare occasionalmente con il vortex per disperdere il campione. Centrifugare brevemente il tubo per microcentrifuga da 1,5 ml per rimuovere le gocce dal tappo.

3. Aggiungere al campione 200 µl di Buffer AL, miscelare con il vortex a pulsazione per 15 s ed incubare a 70 °C per 10 minuti. Centrifugare brevemente il tubo per microcentrifuga da 1,5 ml per rimuovere le gocce dal tappo.

4. Aggiungere al campione 200 µl di etanolo (96-100 %) e miscelare con il vortex a pulsazione per 15 s. Centrifugare brevemente il tubo per microcentrifuga da 1,5 ml per rimuovere le gocce dal tappo.

5. Applicare con cautela la miscela ottenuta al termine della fase 4 alla colonnina QIAamp (in un tubo di raccolta da 2 ml) senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a 10 000 rpm per un minuto. Mettere la colonnina QIAamp in un tubo di raccolta da 2 ml pulito (presente nel kit) e gettare il tubo contenente il filtrato.

▼B

6. Aprire con cautela la colonnina QIAamp e aggiungere 500 µl di Buffer AW1 senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a 10 000 rpm per un minuto. Mettere la colonnina QIAamp in un tubo di raccolta da 2 ml pulito (presente nel kit) e gettare il tubo contenente il filtrato.

7. Aprire con cautela la colonnina QIAamp e aggiungere 500 µl di Buffer AW2 senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a massima velocità (14 000 rpm) per tre minuti.

8. (Facoltativo) Mettere la colonnina QIAamp in un nuovo tubo di raccolta da 2 ml (non presente nel kit) e gettare il tubo contenente il filtrato. Centrifugare a massima velocità (14 000 rpm) per un minuto.

9. Mettere la colonnina QIAamp in un tubo per microcentrifuga pulito da 1,5 ml (non presente nel kit) e gettare il tubo contenente il filtrato. Aprire con cautela la colonnina QIAamp e aggiungere 100 µl di acqua distillata. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 10 000 rpm per un minuto.

10. Controllare la qualità e l'efficacia dell'estrazione (ad esempio misurando la OD (260 nm) sotto spettrofotometro o dopo l'elettroforesi nel gel di agarosio).

11. Diluire i campioni in modo da avere una concentrazione finale di DNA pari a 50-100 ng/µl.

12. Le soluzioni di DNA vanno conservate a 4 °C fino all'esecuzione delle analisi della PCR.

Per estrarre il DNA possono essere utilizzati anche altri kit commerciali, a condizione che forniscano risultati analoghi.

4.2. *Reazione a catena della polimerasi (PCR)*

4.2.1. Reagenti

— 10 X Buffer (fornito con la Taq DNA polimerasi)

— $MgCl_2$ (fornito con la DNA polimerasi) (25 mM)

— Taq DNA Polimerasi (Goldstar, Eurogentec) 5 U/µl

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) da diluire 10 volte (a 2mM) prima dell'uso

— d H_2O (H_2O distillata, priva di DNA e di RNA)

4.2.2. Primer

Vanno impiegati i primer [1] seguenti:

CF (10 µM)

CF (10 µM)

[1] I primer o le relative descrizioni possono essere ottenuti dal Laboratorio comunitario di riferimento per le malattie dei molluschi (LGP-Ifremer, av. De Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francia).

▼B

4.2.3. Miscela PCR

La miscela PCR per ogni tubo:

	Volume per tubo	Concentrazione finale
Buffer (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
Taq polimerasi (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— In ogni tubo per PCR vanno versati 49 µl di tale miscela PCR

— In ogni tubo va aggiunto 1 µl di DNA estratto (50-100 ng/µl)

4.2.4. Controlli

Sono previsti due tipi di controllo:

— i controlli negativi consistono in dH_2O (1 µl per 49 µl di miscela PCR). Essi sono intesi ad individuare eventuali contaminazioni o ambienti di lavoro reattivi. Ogni 10 campioni o dopo ogni serie di campioni va inserito un controllo negativo,

— i controlli positivi consistono in DNA plasmidico contenente la regione genomica bersaglio CF-CR dell'OsHV-1. Il loro obiettivo è verificare l'efficacia della reazione PCR. Va incluso un controllo positivo per ogni analisi PCR. I controlli positivi sono messi a disposizione dal Laboratorio comunitario di riferimento.

4.2.5. Amplificazione

I cicli di amplificazione vengono realizzati in un thermocycler.

— Denaturazione iniziale: 2 minuti a 94 °C

— Amplificazione: 35 cicli (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C)

— Allungamento finale: 5 minuti a 72 °C

4.3. *Elettroforesi*

4.3.1. Reagenti

— 50 X TAE (si può acquistare pronto per l'uso):

Tris base (40 mM) 242 g

Acido acetico glaciale (40 mM) 57,1 ml

$Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ (1 mM) 18,61 g

d H_2O per 1 litro

Aggiustare a pH 8

▼B

— Gel di agarosio 2,5 % in 1X TAE

Aggiungere bromuro d'etidio (0,5 µg/ml) dopo il raffreddamento del gel.

— Colorante loading blue dye:

Blu di bromofenolo 0,25 %

Xilene cianolo FF 0,25 %

Saccarosio 40 %

Conservare a 4 °C

Utilizzare diluito 6 volte (2 µl di loading blue buffer per 10 µl di prodotti della PCR)

— marcatore di peso molecolare:

SmartLadder SF (Eurogentec): Marcatore di peso molecolare pronto per l'uso, comprendente 9 bande a spaziatura regolare, da 100 a 1 000 bp.

4.3.2. Preparazione del gel di agarosio

1. Pesare 2,5 g di agarosio, aggiungere 100 ml di 1X TAE e riscaldare fino a far sciogliere la miscela.

2. Dopo aver raffreddato la soluzione, aggiungere il bromuro d'etidio (5 µl per 100 ml di gel di agarosio) e versare la soluzione nell'apposito stampo dotato di pettini (per formare i pozzetti).

3. Quando il gel è polimerizzato si tolgono i pettini e si inserisce il gel in un apparecchio per elettroforesi orizzontale contenente 1X TAE in quantità sufficiente da coprire il gel di agarosio.

4. Nei pozzetti si dispongono 10 µl di prodotti della PCR mescolati a 2 µl di blue dye (6X).

5. Un pozzetto è riservato al marcatore di peso molecolare (5 µl)

6. Si applica corrente elettrica a 50-150 volt per un periodo compreso tra 30 minuti e un'ora, a seconda dello spessore e della dimensione del gel.

7. Si osserva il gel sotto raggi UV.

4.4. *Interpretazione*

La presenza di OsHV-1 µVar in un campione è indicata dalla presenza di una banda della dimensione adeguata (157 bp anziché 173 bp per l'OsHV-1) su gel di agarosio al 2,5 % con tutti i controlli negativi negativi e tutti i controlli positivi positivi.

PARTE C

Definizione della zona di contenimento

Quando si definisce una zona di contenimento in applicazione dell'articolo 2, paragrafo 2, va tenuto conto dei fattori seguenti che determinano i rischi di diffusione della malattia:

a) il numero, il tasso e la distribuzione di molluschi nell'azienda o nella zona di allevamento infette;

b) la distanza e la densità di aziende o zone di allevamento limitrofe;

c) la prossimità a stabilimenti di trasformazione, aziende o zone di allevamento di contatto;

d) specie presenti nell'azienda o nella zona di allevamento;

▼B

e) prassi di allevamento applicate nell'azienda o zona infetta e nelle aziende o zone di allevamento limitrofe; nonché

f) condizioni idrodinamiche ed altri fattori significativi dal punto di vista delle epizoozie identificati.

▼B

ALLEGATO II

Modello di certificato sanitario per l'immissione sul mercato di ostriche *Crassostrea gigas* destinate a zone di allevamento e di stabulazione

UNIONE EUROPEA — **Certificato per gli scambi intracomunitari**

Parte I: Informazioni relative alla partita presentata

I.1. Speditore Nome Indirizzo Codice postale	I.2. Numero di riferimento del certifica / I.2.a. Numero di riferimento locale I.3. Autorità centrale competente I.4. Autorità locale competente
I.5. Destinatario Nome Indirizzo Codice postale	I.6. I.7.
I.8. Paese di origine — Codice ISO — I.9.	I.10. Paese di destinazione — Codice ISO — I.11.
I.12. Luogo di origine/Luogo di pesca Azienda riconosciuta acquacoltura ☐ Altro ☐ Nome — Numero di riconoscimento Indirizzo Codice postale	I.13. Luogo di destinazione Azienda riconosciuta acquacoltura ☐ Altro ☐ Nome — Numero di riconoscimento Indirizzo Codice postale
I.14. Luogo di carico Codice postale	I.15. Data e ora della partenza
I.16. Mezzo di trasporto Aereo ☐ Nave ☐ Vagone ☐ Autocarro ☐ Altro ☐ Identificazione	I.17. Trasportatore Nome — Numero di riconoscimento Indirizzo Codice postale — Stato membro
I.18. Specie animale/ Prodotto	I.19. Codice del prodotto (codice NC) **03.07** I.20. Numero di animali/ Peso lordo
I.21.	I.22. Numero di colli
I.23. Numero del sigillo e numero del container	I.24. Tipo di imballaggio
I.25. Animali certificati per /prodotti certificati per Allevamento ☐ Stabulazione in acqua ☐	
I.26. Transito in un paese terzo ☐ Paese terzo — Codice ISO Punto di uscita — Codice Punto di entrata — Numero del PIF	I.27. Transito negli Stati membri ☐ Stato membro — Codice ISO Stato membro — Codice ISO Stato membro — Codice ISO
I.28. Esportazione ☐ Paese terzo — Codice ISO Punto di uscita — Codice	I.29.
I.30.	
I.31. Identificazione degli animali Specie (Nome scientifico) — Quantità	

▼B

UNIONE EUROPEA

Per l'immissione sul mercato di ostriche *Crassostrea gigas* destinate a zone di allevamento e di stabulazione

Parte II: Certificazione

II.	**Informazioni sanitarie**	II.a. Numero di riferimento del certificato	II.b.

([1])([2])[II.1 **Prescrizioni applicabili alle ostriche *Crassostrea gigas originarie* di una zona di contenimento istituita in applicazione dell'articolo 2 del regolamento (UE) n. 175/2010**

Il sottoscritto ispettore ufficiale certifica che le ostriche *Crassostrea gigas* di cui alla parte I del presente certificato:

II.1.1 sono originarie di una zona soggetta a misure di lotta alla malattia a causa di un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas* connesso alla presenza del virus OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 possono essere immesse sul mercato in conformità dell'articolo 3, paragrafo 2, lettera a) del regolamento (UE) n. 175/2010;]

([1])[II.1.2 sono originarie di una parte della zona di contenimento non colpita dall'aumento di mortalità e la partita è stata sottoposta a campionamento e test secondo le istruzioni dell'allegato I del regolamento (UE) n. 175/2010, eseguiti su ostriche *Crassostrea gigas* con esito negativo;]]

([1])([3])[II.2 **Prescrizioni applicabili alle ostriche *Crassostrea gigas* originarie di Stati membri o compartimenti precedentemente soggetti a misure di contenimento a causa di un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas* connesso alla presenza del virus OsHV-1 µvar e destinate a Stati membri o compartimenti oggetto di programmi per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar**

Il sottoscritto ispettore ufficiale certifica che le ostriche *Crassostrea gigas* di cui alla parte I del presente certificato:

II.2.1 provengono da un'azienda o da una zona di allevamento in cui, secondo la documentazione dell'azienda o della zona di allevamento, non vi sono segnali di aumento della mortalità;

II.2.2 sono originarie di un compartimento in cui l'assenza del virus OsHV-1 µvar è stata dimostrata da campionamento e test effettuati secondo le prescrizioni dell'allegato I del regolamento (UE) n. 175/2010 su ostriche *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Prescrizioni in materia di trasporto e di etichettatura**

Il sottoscritto, ispettore ufficiale, certifica che:

II.3.1 le ostriche *Crassostrea gigas* di cui alla parte I del presente certificato sono trasportate in condizioni, inclusa la qualità dell'acqua, che non siano tali da alterare il loro stato sanitario;

II.3.2 il container di trasporto è stato pulito e disinfettato prima del carico oppure non è stato utilizzato precedentemente;

II.3.3 la partita è identificata da un'etichetta leggibile sull'esterno del container, e nel caso di trasporto mediante barca vivaio nel manifesto della nave, che riporta le informazioni pertinenti di cui ai punti da I.8 a I.13 della parte I del presente certificato e la seguente dichiarazione:

a seconda dei casi: ([1])[«Ostriche *Crassostrea gigas* destinate all'allevamento/alla stabulazione in una zona oggetto di un programma per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar»]

oppure (1)[«Ostriche *Crassostrea gigas* destinate all'allevamento/alla stabulazione in una zona soggetta a misure di lotta alla malattia e originarie di una zona soggetta a misure di lotta alla malattia»].

Note

Parte I:

— Casella I.12: Se del caso, indicare il numero di autorizzazione per l'allevamento o l'area di molluschicoltura in questione.

— Casella I.13: Se del caso, indicare il numero di autorizzazione per l'allevamento o l'area di molluschicoltura in questione.

— Caselle I.20 e 1.31: Per quanto riguarda la quantità indicare il numero totale.

— Casella I.25: Indicare l'opzione «allevamento» se destinate all'allevamento e «stabulazione» se destinate alla stabulazione.

▼B

UNIONE EUROPEA

Per l'immissione sul mercato di ostriche *Crassostrea gigas* destinate a zone di allevamento e di stabulazione

II. **Informazioni sanitarie**	II.a. Numero di riferimento de certificato	II.b.

Parte II:

([1]) Barrare la dicitura non pertinente.

([2]) La parte II.1 del presente certificato si applica a partite di ostriche *Crassostrea gigas* originarie di una zona di contenimento istituita in applicazione dell'articolo 2, paragrafo 2 del regolamento (UE) n. 175/2010 e che possono uscire da tale zona in conformità dell'articolo 3, paragrafo 2, lettera a) o b).

([3]) La parte II.2 del presente certificato si applica alle partite di ostriche *Crassostrea gigas* di cui all'articolo 5, paragrafo 1 del regolamento (UE) n. 175/2010, destinate a Stati membri o compartimenti oggetto di programmi per il rilevamento tempestivo del virus OsHV-1 µvar e originarie di una zona precedentemente soggetta a misure di contenimento a causa di un aumento della mortalità delle ostriche *Crassostrea gigas*

Veterinario ufficiale o ispettore ufficiale

Nome (in lettere maiuscole):	Qualifica e titolo:
Unità veterinaria locale:	N° UVL:
Data:	Firma:
Timbro:	