Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►**B** **REGULAMENTO (UE) N.º 175/2010 DA COMISSÃO**

de 2 de Março de 2010

que dá execução à Directiva 2006/88/CE no que se refere a medidas de controlo do aumento da mortalidade em ostras da espécie *Crassostrea gigas* na sequência da detecção do vírus *Ostreid herpesvirus* 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(JO L 52 de 3.3.2010, p. 1)

Alterado por:

		Jornal Oficial		
		n.°	página	data
►**M1**	Regulamento (UE) n.º 1153/2010 da Comissão de 8 de Dezembro de 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

REGULAMENTO (UE) N.º 175/2010 DA COMISSÃO

de 2 de Março de 2010

que dá execução à Directiva 2006/88/CE no que se refere a medidas de controlo do aumento da mortalidade em ostras da espécie *Crassostrea gigas* na sequência da detecção do vírus *Ostreid herpesvirus* 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta a Directiva 2006/88/CE do Conselho, de 24 de Outubro de 2006, relativa aos requisitos zoossanitários aplicáveis aos animais de aquicultura e produtos derivados, assim como à prevenção e à luta contra certas doenças dos animais aquáticos [1], e, nomeadamente, o seu artigo 41.º, n.º 3, e o seu artigo 61.º, n.º 3,

Considerando o seguinte:

(1) A Directiva 2006/88/CE estabelece os requisitos zoossanitários aplicáveis à colocação no mercado de animais de aquicultura e produtos derivados. Define ainda medidas preventivas mínimas aplicáveis em caso de suspeita ou surto de certas doenças dos animais aquáticos.

(2) O artigo 41.º da referida directiva determina que os Estados-Membros devem tomar as medidas adequadas para lutarem contra uma doença emergente e impedirem a propagação dessa doença. No caso de doença emergente, o Estado-Membro em causa informa imediatamente da situação os demais Estados-Membros, a Comissão e os Estados membros da EFTA se os dados forem de importância epidemiológica para outro Estado-Membro.

(3) Na Primavera e Verão de 2008, verificou-se, em diversas zonas de França e da Irlanda, um aumento da mortalidade nas ostras da espécie *Crassostrea gigas* (adiante designadas «ostras *Crassostrea gigas*»). Esta circunstância foi atribuída a uma combinação de factores ambientais adversos, em conjunto com a presença de bactérias do género *Vibrio* assim como do vírus denominado *Ostreid herpesvirus*-1 (OsHV-1), incluindo um novo genótipo descrito desse vírus designado «OsHV-1 µvar».

(4) Em Agosto de 2008, as autoridades francesas informaram a Comissão, os demais Estados-Membros e os Estados membros da EFTA acerca da situação e das medidas tomadas, tendo o assunto sido levado ao conhecimento do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal em Setembro de 2008.

(5) Na Primavera de 2009, foi novamente detectado em França, na Irlanda e nas Ilhas Anglo-Normandas o referido aumento de mortalidade atribuído à mesma combinação de factores. Embora as causas da mortalidade permaneçam incertas, as investigações epidemiológicas realizadas na Irlanda e no Reino Unido em 2009 sugerem que o OsHV-1 µvar desempenha um papel primordial nessa mortalidade.

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

▼B

(6) As autoridades competentes dos referidos Estados-Membros e das Ilhas Anglo-Normandas informaram a Comissão da situação e das medidas tomadas, tendo o assunto sido levado ao conhecimento do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal por diversas vezes.

(7) As medidas de confinamento tomadas pelas autoridades competentes dos referidos Estados-Membros e das Ilhas Anglo-Normandas para controlar a situação de doença emergente basearam-se essencialmente na limitação das deslocações das ostras *Crassostrea gigas* para fora das zonas afectadas pelo aumento da mortalidade.

(8) Atendendo ao ressurgimento da situação de doença emergente em 2009 e à sua possível reaparição e riscos de propagação na Primavera e no Verão de 2010, e com base na experiência adquirida, afigura-se adequado e necessário aprofundar as medidas já tomadas pelos Estados-Membros afectados.

(9) A fim de garantir a existência de condições uniformes para a aplicação dos requisitos da Directiva 2006/88/CE no que se refere a doenças emergentes, e para assegurar que as medidas tomadas conferem uma protecção suficiente contra o aumento da propagação, não impondo porém restrições desnecessárias às deslocações de ostras *Crassostrea gigas*, as medidas relativas a esta situação de doença emergente devem ser coordenadas ao nível da União Europeia.

(10) Sempre que as autoridades competentes forem informadas de um aumento da mortalidade das ostras *Crassostrea gigas*, deve realizar-se a colheita de amostras e respectiva análise a fim de pesquisar a presença do vírus OsHV-1 μvar.

(11) Quando da confirmação da presença do vírus OsHV-1 μvar, os Estados-Membros devem aplicar medidas de luta contra a doença, incluindo o estabelecimento de uma zona de confinamento. Ao definir a zona de confinamento, deve atender-se a determinados factores estabelecidos no presente regulamento. As referidas medidas de luta contra a doença devem manter-se até ser demonstrado, mediante inspecções, que o aumento da mortalidade cessou.

(12) Deve estabelecer-se uma restrição às deslocações de ostras *Crassostrea gigas* para fora das zonas de confinamento, a fim de limitar o risco de propagação da doença. Todavia, devem prever-se algumas derrogações para os casos em que o risco de propagação da doença for reduzido. Essas derrogações dizem respeito às deslocações de determinadas ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação em exploração ou reparcagem noutra zona de confinamento ou destinadas a consumo humano. A fim de assegurar a rastreabilidade das remessas de ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação em exploração ou reparcagem, estas devem ser acompanhadas de um certificado sanitário. Ao preencher o certificado, deve atender-se às notas explicativas constantes do anexo V do Regulamento (CE) n.º 1251/2008 da Comissão, de 12 de Dezembro de 2008, que aplica a Directiva 2006/88/CE do Conselho no que se refere às condições e aos requisitos de certificação para a colocação no mercado e importação para a Comunidade de animais de aquicultura e produtos derivados e estabelece uma lista de espécies vectoras ([1]).

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

▼B

(13) A fim de adquirir mais conhecimentos sobre o estatuto desta situação de doença emergente na União e, em especial, nos Estados-Membros e nos compartimentos ainda não afectados, e para assegurar a detecção precoce de todas as ocorrências de OsHV-1 μvar, os Estados-Membros podem optar por estabelecer programas específicos de colheita de amostras e análises para a detecção precoce daquele vírus. Quando introduzidas em Estados-Membros ou compartimentos abrangidos por esses programas para efeitos de criação em exploração ou reparcagem, as ostras *Crassostrea gigas* originárias de zonas sujeitas a medidas de confinamento em 2009, nos termos de normas nacionais, ou em 2010, nos termos do presente regulamento, devem ser submetidas a requisitos zoossanitários adicionais, desde que nesse Estado-Membro ou compartimento não tenha sido detectada a presença do vírus OsHV-1 μvar.

(14) Para garantir a comparabilidade dos dados recolhidos nos diferentes Estados-Membros no âmbito dos programas específicos de colheita de amostras e análises para a detecção precoce do vírus OsHV-1 μvar, devem estabelecer-se determinados requisitos quanto ao conteúdo desses programas.

(15) A disponibilidade de informações rigorosas e atempadas quanto à situação em termos de detecção do vírus nos Estados-Membros é um elemento essencial para garantir o controlo adequado da situação de doença emergente. Para o efeito, os Estados-Membros devem informar a Comissão e os demais Estados-Membros, sem atrasos desnecessários, do primeiro caso confirmado em 2010 do vírus OsHV-1 μvar no seu território.

(16) Adicionalmente, deve tirar-se partido das páginas de informação na Internet elaboradas em conformidade com o disposto no artigo 10.º da Decisão 2009/177/CE da Comissão, de 31 de Outubro de 2008, que aplica a Directiva 2006/88/CE do Conselho no que diz respeito aos programas de vigilância e erradicação e ao estatuto de indemnidade de Estados-Membros, zonas e compartimentos ([1]).

(17) Com o objectivo de assegurar a transparência e o acesso rápido a informações pertinentes sobre a situação de doença emergente, os Estados-Membros devem colocar à disposição da Comissão Europeia e dos restantes Estados-Membros as informações relativas às zonas de confinamento, às zonas que já estiveram submetidas a medidas de confinamento mas onde se demonstrou a ausência de OsHV-1 μvar, bem como aos programas estabelecidos para a detecção precoce daquele vírus.

(18) Uma vez que subsistem incertezas quanto à situação de doença emergente, as medidas previstas no presente regulamento devem ser aplicáveis até ao final de Dezembro de 2010.

(19) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

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

▼B

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

Definição

Para efeitos do presente regulamento, por «OsHV-1 µvar» entende-se um genótipo do vírus *Ostreid herpesvirus*-1 (OsHV-1) definido com base em dados de sequenciação parcial do genoma exibindo uma supressão sistemática de 12 pares de bases no gene ORF 4 em comparação com o vírus OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artigo 2.º

Colheita de amostras, análises e estabelecimento de zonas de confinamento

1. Sempre que se detectar um aumento da mortalidade nas ostras da espécie *Crassostrea gigas* («ostras *Crassostrea gigas*»), a autoridade competente deve:

a) Colher amostras em conformidade com o disposto na parte A do anexo I;

b) Efectuar análises de pesquisa da presença do vírus OsHV-1 µvar em conformidade com os métodos de diagnóstico estabelecidos na parte B do anexo I.

2. Quando os resultados das análises referidas no n.º 1, alínea b), revelarem a presença de OsHV-1 µvar, a autoridade competente deve estabelecer uma zona de confinamento. Essa zona deve ser definida com base numa análise caso-a-caso, tendo em conta os factores que influenciam o risco de propagação da doença constantes da parte C do anexo I.

3. Os Estados-Membros devem informar sem demora a Comissão e os demais Estados-Membros da primeira zona de confinamento que estabelecerem no seu território em 2010.

Artigo 3.º

Requisitos aplicáveis à colocação no mercado de ostras *Crassostrea gigas* originárias das zonas de confinamento referidas no artigo 2.º

1. As ostras *Crassostrea gigas* originárias das zonas de confinamento estabelecidas em conformidade com o disposto no artigo 2.º, n.º 2, não devem abandonar essas zonas.

2. Em derrogação do disposto no n.º 1, as remessas de ostras *Crassostrea gigas* podem ser transportadas para fora da zona de confinamento sempre que:

a) O seu destino for outra zona de confinamento estabelecida em conformidade com o disposto no artigo 2.º, n.º 2;

b) Forem originárias de uma parte da zona de confinamento, incluindo as incubadoras, não afectada pelo aumento da mortalidade e a remessa tiver sido submetida a:

   i) uma colheita de amostras em conformidade com o disposto na parte A do anexo I, e

   ii) uma análise de pesquisa da presença do vírus OsHV-1 µvar em conformidade com os métodos de diagnóstico estabelecidos na parte B do anexo I, com todos os resultados negativos;

▼B

c) Se destinarem, antes do seu consumo humano, a uma transformação posterior, a um centro de depuração, um centro de expedição ou um estabelecimento de transformação equipados com um sistema de tratamento de efluentes validado pela autoridade competente que:

i) inactive vírus com envelope, ou

ii) reduza para um nível aceitável o risco de transmissão de doenças para as águas naturais;

d) Se destinarem ao consumo humano e estiverem embaladas e rotuladas para esse efeito em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho ([1]) e:

i) já não puderem sobreviver como animais vivos se regressarem ao ambiente de onde provêm, ou

ii) se destinem a transformação posterior sem armazenagem temporária no local de transformação;

e) As remessas ou os produtos que as compõem se destinarem ao consumo humano sem transformação posterior, desde que estejam embaladas em embalagens para venda a retalho que cumpram o disposto no Regulamento (CE) n.º 853/2004.

3. As remessas referidas nas alíneas a) e b) do n.º 2 que se destinem a criação em exploração ou a zonas de reparcagem devem ser acompanhadas de um certificado sanitário preenchido de acordo com o modelo constante do anexo II e atendendo às notas explicativas do anexo V do Regulamento (CE) n.º 1251/2008.

Artigo 4.º

Suspensão das medidas previstas nos artigos 2.º e 3.º

A autoridade competente pode suspender as medidas de controlo no que se refere às zonas de confinamento estabelecidas em conformidade com o artigo 2.º, n.º 2, bem como as restrições relativas à colocação no mercado previstas no artigo 3.º, depois de ter realizado duas inspecções consecutivas, com um intervalo de 15 dias, que demonstrem a cessação do aumento da mortalidade.

Artigo 5.º

Requisitos aplicáveis à colocação no mercado de ostras *Crassostrea gigas* originárias de um compartimento previamente sujeito a medidas de controlo em virtude de um aumento da mortalidade dessas ostras relacionado com a presença do vírus OsHV-1 µvar

1. As ostras *Crassostrea gigas* originárias de um compartimento previamente sujeito a medidas de confinamento em 2009 ou 2010 em virtude de um aumento da mortalidade dessas ostras relacionado com a presença do vírus OsHV-1 µvar e que são colocadas no mercado devem:

a) Ser acompanhadas de um certificado sanitário preenchido em conformidade com o modelo estabelecido no anexo II e com as notas explicativas constantes do anexo V do Regulamento (CE) n.º 1251/2008, se os animais:

i) se destinarem a Estados-Membros ou a compartimentos que tenham estabelecido um programa para a detecção precoce do vírus OsHV-1 µvar e onde esse vírus não tiver sido detectado, e

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

▼B

ii) se destinarem a criação em exploração ou a zonas de reparcagem;

b) Ser originárias de um compartimento onde a ausência de OsHV-1 µvar estiver demonstrada por colheita de amostras e análises efectuadas em conformidade com a parte A do anexo I; e

c) Cumprir os requisitos zoossanitários estabelecidos no certificado referido na alínea a).

2. O programa para a detecção precoce de OsHV-1 µvar referido no n.º 1, alínea a), subalínea i), deve respeitar os requisitos seguintes:

a) O programa deve ser declarado ao Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal;

b) Essa declaração deve estar em conformidade com os pontos 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 e 7 do modelo de formulário estabelecido no anexo II da Decisão 2009/177/CE;

c) O programa deve incluir:

i) a colheita de amostras em conformidade com o disposto na parte A do anexo I,

ii) análises de pesquisa da presença do vírus OsHV-1 µvar em conformidade com os métodos de diagnóstico estabelecidos na parte B do anexo I.

3. O n.º 1 é aplicável uma semana após a data da reunião do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal em que o programa referido no n.º 1, alínea a), subalínea i), tiver sido declarado.

Artigo 6.º

Página de informação na internet

1. Os Estados-Membros devem colocar ao dispor da Comissão e dos outros Estados-Membros:

a) Uma lista de zonas de confinamento e os factores subjacentes à sua definição, incluindo a descrição dos limites geográficos dessas zonas, estabelecidas em conformidade com o artigo 2.º, n.º 2;

b) Uma lista de compartimentos, incluindo uma descrição dos limites geográficos da zona em causa:

i) que foram sujeitos a medidas de confinamento em 2009 devido ao aumento da mortalidade das ostras *Crassostrea gigas* relacionado com o vírus OsHV-1 µvar,

ii) onde a ausência de OsHV-1 µvar tiver sido demonstrada mediante análises efectuadas em conformidade com as partes A e B do anexo I em amostras colhidas na zona de confinamento;

c) As declarações dos programas referidos no artigo 5.º, n.º 2, incluindo uma descrição dos limites geográficos da zona em causa.

2. As informações previstas no n.º 1 devem manter-se actualizadas e ser disponibilizadas nas páginas de informação na Internet previstas no artigo 10.º da Decisão 2009/177/CE.

▼B

Artigo 7.º

Relatórios

Até 1 de Outubro de 2010, o mais tardar, os Estados-Membros devem apresentar à Comissão um relatório sobre os programas declarados em conformidade com o artigo 5.º, n.º 2.

O relatório deve estar em conformidade com o modelo de formulário estabelecido no anexo VI da decisão 2009/177/CE.

Artigo 8.º

Entrada em vigor e aplicação

O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

É aplicável entre 15 de Março e ►**M1** 30 de Abril de 2011 ◄.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-Membros.

▼B

ANEXO I

PARTE A

Colheita de amostras

1. *Colheita de amostras para efeitos do artigo 2.º*

As amostras previstas no artigo 2.º devem ser compostas por, no mínimo, 12 exemplares de ostras *Crassotrea gigas*. Na selecção dos animais, devem colher-se exemplares fracos, mortos recentemente (mas não em decomposição) ou conchas abertas, devendo ser colhidos no compartimento onde se observa a mortalidade.

2. *Colheita de amostras para efeitos do artigo 3.º, n.º 2, alínea b), do artigo 5.º, n.º 1, alínea b) e do artigo 5.º, n.º 2*

a) A colheita de amostras para efeitos do artigo 3.º, n.º 2, alínea b), deve consistir em:

i) no caso das larvas, cinco conjuntos de, pelo menos, 50 mg de animais inteiros recolhidos entre 4 a 8 dias após fecundação, incluindo a concha, por remessa,

ii) no caso das ovas com menos de 6 mm, 30 conjuntos de 300 mg de animais inteiros, incluindo a concha, por remessa,

iii) no caso das ostras com mais de 6 mm, 150 exemplares por remessa.

Ao seleccionar os animais, todas as partes da remessa devem estar proporcionalmente representadas na amostra. Se estiverem presentes animais fracos, mortos recentemente (mas não em decomposição) ou conchas abertas, devem ser seleccionados prioritariamente.

b) A colheita de amostras para efeitos do artigo 5.º, n.º 2, deve consistir em, pelo menos, 150 exemplares de ostras *Crassotrea gigas* por ponto de amostragem. Devem colher-se amostras em todas as explorações ou zonas de exploração de moluscos do Estado-Membro ou do compartimento coberto pelo programa.

A colheita de amostras para efeitos do artigo 5.º, n.º 1, alínea b), deve consistir em, pelo menos, 150 exemplares de ostras *Crassotrea gigas* por compartimento.

Ao seleccionar esses animais, deve atender-se aos seguintes critérios:

— se estiverem presentes animais fracos, mortos recentemente (mas não em decomposição) ou conchas abertas, devem ser seleccionados prioritariamente. Se não estiverem presentes animais com essas características, entre os animais colhidos devem encontrar-se moluscos saudáveis com menos de 12 meses de idade,

— ao efectuar a colheita de amostras em explorações em que são usadas várias fontes de água na produção, a amostra deve incluir animais representativos de todas as águas utilizadas, de tal forma que todas as partes da exploração estejam proporcionalmente representadas na amostra,

— ao efectuar a colheita de amostras em zonas de exploração de moluscos, a amostra deve incluir animais provenientes de um número suficiente de pontos de amostragem, num mínimo de três, de tal forma que todas as partes da zona de exploração de moluscos estejam proporcionalmente representadas na amostra, incluindo os bancos naturais contidos nessa zona de exploração. Os principais factores a considerar na selecção destes pontos de amostragem são: detecção anterior do vírus OsHV-1 µvar nessa zona, densidade de povoamento, correntes de água, batimetria e práticas de gestão.

▼B

c) A colheita de amostras para efeitos do artigo 5.º, n.º 2, deve ser realizada na época do ano em que se sabe ser máxima a prevalência de OsHV-1 µvar no Estado-Membro ou compartimento. Se essa informação não estiver disponível, a colheita das amostras deve ser realizada logo após o período em que a temperatura da água excede os 16 °C ou na época do ano em que a temperatura atinge normalmente o seu máximo anual.

d) A colheita de amostras para efeitos do artigo 5.º, n.º 1, alínea b), deve realizar-se, de preferência, no período do ano descrito na alínea c). Se as amostras forem colhidas fora dessa época do ano, as ostras que compõem a amostra devem ser mantidas, antes da respectiva análise, em condições equivalentes às descritas na alínea c) por um período adequado para a detecção do vírus OsHV-1 µvar.

PARTE B

Métodos de diagnóstico para a detecção de OsHV-1 µvar

1. *Âmbito*

O presente procedimento apresenta um método de diagnóstico padrão a usar na detecção e identificação do vírus OsHV-1 µvar por Reacção em Cadeia da Polimerase (adiante designada «PCR»). O método permite fazer a distinção entre os vírus OsHV-1 e OsHV-1 µvar.

Sempre que tal se afigurar adequado, a fim de optimizar as condições da reacção e de se adequarem ao equipamento e às suas próprias condições, os laboratórios podem modificar os métodos descritos no presente anexo, desde que se possa demonstrar a manutenção da sensibilidade e da especificidade.

2. *Definição*

O vírus OsHV-1 µvar encontra-se definido no artigo 1.º do presente regulamento.

3. *Equipamento e condições ambientais*

O teste de diagnóstico usado na detecção e identificação de OsHV-1 µvar por PCR necessita dos seguintes equipamentos e condições ambientais, que são típicos dos ensaios PCR:

— Uma *hotte* fechada equipada com um sistema de produção de UV a fim de eliminar uma potencial contaminação na preparação da mistura de PCR.

— Dois conjuntos completos de pipetas (2 µl; 20 µl; 200 µl e 1 000 µl) um para a extracção do ADN e outro para a preparação da mistura de PCR.

— Três pipetas diferentes: uma pipeta (2 µl) para injectar as amostras na mistura de PCR, outra (20 µl) para a amostragem de BET e a terceira (20 µl) para carregar os produtos da PCR no gel de agarose.

— Pontas de pipeta com filtro (2 µl; 20 µl; 200 µl e 1 000 µl) para a extracção do ADN, preparação da mistura de PCR e a injecção de amostras.

— Pontas de pipeta (20 µl) para a recolha de BET e o carregamento dos produtos de amplificação no gel de agarose.

— Um termociclador para a realização das amplificações.

— Um sistema horizontal de electroforese para a electroforese dos produtos da PCR.

— Uma mesa de UV para observar os produtos da PCR após a electroforese em gel de agarose.

— Um sistema para fotografar os géis.

▼B

O operador deve usar bata e luvas ao longo de todas as etapas descritas infra. De preferência, deve mudar de bata e de luvas após cada uma das etapas principais: extracção do ADN, preparação da mistura de PCR, injecção de amostras, amplificação e carregamento do gel.

Recomenda-se que estas diferentes etapas sejam realizadas em salas diferentes. Em particular, a amplificação e o carregamento do gel/electroforese deveriam efectuar-se numa sala diferente do espaço onde se realiza a extracção do ADN, a preparação da mistura de PCR e a injecção do ADN.

4. *Procedimento*

4.1. Preparação da amostra

Preparam-se as ostras vivas ou mortas recentemente (mas não em decomposição), que podem ter sido congeladas, para a extracção do ADN.

O tratamento a dar às amostras é diferente consoante o seu tamanho:

a) Para as larvas, os conjuntos de 50 mg de animais inteiros (incluindo a concha) completados com 200 µl de água destilada são triturados e centrifugados a 1 000 g durante 1 minuto.

b) Para as ovas com menos de 6 mm, os conjuntos de 300 mg de animais inteiros (incluindo a concha) completados com 1 200 µl de água destilada são triturados e centrifugados a 1 000 g durante 1 minuto.

c) Para as ovas de 6 a 15 mm, os tecidos moles de cada animal são triturados individualmente.

d) Para os animais com mais de 15 mm, isolam-se pedaços de guelras e de manto.

A extracção do ADN é efectuada com o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) e seguindo as instruções do protocolo para a análise de tecidos (*Tissue Test Protocol*).

A preparação posterior da amostra realiza-se pela seguinte ordem:

1. Colocar 100 µl do sobrenadante das amostras referidas nas alíneas a) e b) ou 10 a 50 mg de tecidos para as amostras referidas nas alíneas c) e d) num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e adicionar 180 µl de tampão ATL.

2. Adicionar 20 µl de proteinase K, agitar em vórtex e incubar a 56 °C até o tecido estar completamente lisado (de um dia para o outro). Durante a incubação, agitar no vórtex de vez em quando para dispersar a amostra. Centrifugar brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover gotas da tampa.

3. Adicionar 200 µl de tampão AL à amostra, agitar em vórtex pulsado durante 15 s e incubar a 70 °C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover gotas da tampa.

4. Adicionar 200 µl de etanol (96-100 %) à amostra, agitar em vórtex pulsado durante 15 s. Centrifugar brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover gotas da tampa.

5. Injectar cuidadosamente a mistura da etapa 4 na coluna QIAamp Spin (num tubo de recolha de 2 ml) sem molhar o anel de encaixe. Colocar a tampa e centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto. Colocar a coluna QIAamp Spin num tubo de recolha de 2 ml limpo (fornecido com o *kit*) e rejeitar o tubo que contém o filtrado.

▼B

6. Abrir cuidadosamente a coluna QIAamp Spin e adicionar 500 µl de tampão AW1 sem molhar o anel de encaixe. Colocar a tampa e centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto. Colocar a coluna QIAamp Spin num tubo de recolha de 2 ml limpo (fornecido com o *kit*) e rejeitar o tubo de recolha que contém o filtrado.

7. Abrir cuidadosamente a coluna QIAamp Spin e adicionar 500 µl de tampão AW2 sem molhar o anel de encaixe. Colocar a tampa e centrifugar à velocidade máxima (14 000 rpm) durante 3 minutos.

8. (Opcional) Colocar a coluna QIAamp Spin num novo tubo de recolha de 2 ml limpo (não fornecido com o *kit*) e rejeitar o tubo de recolha que contém o filtrado. Centrifugar à velocidade máxima (14 000 rpm) durante 1 minuto.

9. Colocar a coluna QIAamp Spin num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo (não fornecido com o *kit*) e rejeitar o tubo de recolha que contém o filtrado. Abrir cuidadosamente a coluna QIAamp Spin e adicionar 100 µl de água destilada. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.

10. Controlar a qualidade e a eficácia da extracção (por exemplo através da medição da DO a 260 nm em espectrofotómetro ou após electroforese em gel de agarose).

11. Preparar diluições das amostras de modo a obter uma concentração final de ADN de 50-100 ng/µl.

12. As soluções de ADN são mantidas a 4 °C até à realização das análises por PCR.

Na extracção do ADN podem usar-se outros *kits* disponíveis comercialmente desde que esteja demonstrado que dão resultados semelhantes.

4.2. *Reacção em cadeia da polimerase (PCR)*

4.2.1. Reagentes

— Tampão 10 X (fornecido com a Taq ADN polimerase)

— $MgCl_2$ (fornecido com a ADN polimerase) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20mM) diluído a 1:10 (para 2 mM) antes da utilização

— d H_2O (água destilada isenta de ADN e de ARN)

4.2.2. Iniciadores

Devem usar-se os seguintes iniciadores (ou *primers*) ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Os iniciadores ou as respectivas descrições podem ser obtidos junto do Laboratório Comunitário de Referência para as doenças dos moluscos (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, França).

▼B

4.2.3. Mistura de PCR

A mistura de PCR para cada tubo é:

	Volume por tubo	Concentração final
Tampão (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 polimerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— em cada tubo de PCR colocam-se 49 µl desta mistura

— adiciona-se a cada tubo 1 µl de ADN extraído (50-100 ng/µl)

4.2.4. Controlos

Usam-se dois tipos de controlos:

— Os controlos negativos consistem em dH_2O (1 µl para 49 µl de mistura de PCR). Têm por objectivo detectar uma potencial contaminação dos reagentes no ambiente de trabalho. Deve incluir-se um controlo negativo por cada 10 amostras ou após cada lote de amostras.

— Os controlos positivos consistem em ADN plasmídico contendo a região-alvo do genoma CF-CR do OsHV-1. O seu objectivo é verificar a eficácia da reacção PCR. Para cada análise de PCR deve incluir-se um controlo positivo. Os controlos positivos podem obter-se junto do Laboratório Comunitário de Referência.

4.2.5. Amplificação

Os ciclos de amplificação realizam-se num termociclador.

— Desnaturação inicial: 2 minutos a 94 °C

— Amplificação: 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C)

— Elongação final: 5 minutos a 72 °C

4.3. *Electroforese*

4.3.1. Reagentes

— TAE 50 X (pode ser comprado pronto a 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 a pH 8.

▼B

— Gel de agarose 2,5 % em TAE 1X

Brometo de etídio (0,5 μg/ml) adicionado após arrefecimento do gel.

— Corante azul de carregamento:

Azul de bromofenol 0,25 %

Xileno cianol FF 0,25 %

Sacarose 40 %

Conservar a 4 °C.

Utilizar diluído 6 vezes (2 μl de tampão azul de carregamento para 10 μl de produtos da PCR).

— Marcador de pesos moleculares:

SmartLadder SF (Eurogentec): marcador de pesos moleculares pronto a usar, inclui 9 bandas regularmente espaçadas entre 100 e 1 000 pb.

4.3.2. Preparação do gel de agarose

1. Pesar 2,5 g de agarose, adicionar 100 ml de TAE 1X e aquecer até homogeneização.

2. Após arrefecimento da solução, adicionar brometo de etídio (5 μl para 100 ml de gel de agarose) e colocar a solução num molde especial dotado de pentes (para formar os poços).

3. Quando o gel polimeriza, removem-se os pentes e coloca-se o gel num sistema horizontal para electroforese contendo tampão TAE 1X suficiente para cobrir o gel de agarose.

4. Misturam-se 10 μl de produtos da PCR com 2 μl de tampão azul (6X), que se colocam nos poços.

5. Um dos poços está reservado para o marcador de pesos moleculares (5 μl).

6. Aplica-se uma diferença de potencial entre 50 e 150 Volts por 30 minutos a uma hora, em função do tamanho e da espessura do gel.

7. O gel é observado por meio de radiação UV.

4.4. *Interpretação*

A presença do vírus OsHV-1 μvar numa amostra é indicada pela observação de uma banda do tamanho adequado (157 pb em vez de 173 pb para o OsHV-1) num gel de agarose a 2,5 % com resultados negativos em todos os controlos negativos e resultados positivos em todos os controlos positivos.

PARTE C

Definição da zona de confinamento

Ao definir uma zona de confinamento em conformidade com o disposto no n.º 2 do artigo 2.º, deve atender-se aos seguintes factores, determinantes do risco de propagação da doença:

a) Número, taxa e distribuição dos moluscos na exploração ou zona de exploração de moluscos infectada;

b) Distância e densidade de explorações ou zonas de exploração de moluscos vizinhas;

c) Proximidade de estabelecimentos de transformação; explorações ou zonas de exploração de moluscos limítrofes;

d) Espécies presentes nas explorações ou zonas de exploração de moluscos;

▼B

e) Práticas de criação aplicadas na exploração ou zona de exploração de moluscos afectada e nas explorações ou zonas de exploração de moluscos vizinhas; e

f) Condições hidrodinâmicas e outros factores identificados com significância a nível epizootiológico.

▼B

ANEXO II

Modelo de certificado sanitário para a colocação no mercado de ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação e a zonas de reparcagem

UNIÃO EUROPEIA **Certificado intracomunitário**

Parte I: Detalhes relativos à remessa apresentada

I.1. Expedidor
Nome
Endereço
Código postal

I.2. N.º de referência do certificado | I.2.a. N.º de referência local

I.3. Autoridade central competente

I.4. Autoridade local competente

I.5. Destinatário
Nome
Endereço
Código postal

I.6.

I.7.

I.8. País de origem | Código ISO | I.9.

I.10. País de destino | Código ISO | I.11.

I.12. Local de origem/Local de pesca
Exploração aquicultura aprovada ☐
Outro ☐
Nome | Número de aprovação
Endereço
Código postal

I.13. Local de destino
Exploração aquicultura aprovada ☐
Outro ☐
Nome | Número de aprovação
Endereço
Código postal

I.14. Local de carregamento
Código postal

I.15. Data e hora da partida

I.16. Meios de transporte
Avião ☐ Navio ☐ Vagão ferroviário ☐
Veículo rodoviário ☐ Outro ☐
Identificação:

I.17. Transportador
Nome | Número de aprovação
Endereço
Código postal | Estado-Membro

I.18. Espécie animal/Produtos

I.19. Código do produto (Código NC)
03.07

I.20. Número/Quantidade

I.21.

I.22. Número de embalagens

I.23. N.º do selo e n.º do contentor

I.24. Tipo de acondicionamento

I.25. Animais/Produtos certificados para
Reprodução ☐ Afinação ☐

I.26. Trânsito por país terceiro ☐
País terceiro | Código ISO
Ponto de saída | Código
Ponto de entrada | N.º do PIF

I.27. Transit through Member States ☐
Estado-Membro | Código ISO
Estado-Membro | Código ISO
Estado-Membro | Código ISO

I.28. Exportação ☐
País terceiro | Código ISO
Ponto de saída | Código

I.29.

I.30.

I.31. Identificação dos animais/produtos

Espécie (Designação científica) | Quantidade

▼B

UNIÃO EUROPEIA

Colocação no mercado de ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação e a zonas de reparcagem

Parte II: Certificação

II.	**Informações sanitárias**	II.a. Número de referência do certificado	II.b.

([1])([2])[II.1 **Requisitos aplicáveis às ostras *Crassostrea gigas* originárias de zonas de confinamento estabelecidas em conformidade com o disposto no artigo 2.º do Regulamento (UE) n.º 175/2010**

O abaixo assinado, inspector oficial, certifica que as ostras *Crassostrea gigas* referidas na parte I do presente certificado:

II.1.1 São originárias de uma zona sujeita a medidas de controlo de doenças associadas ao aumento da mortalidade das ostras *Crassostrea gigas* relacionado com o vírus OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 Podem ser colocadas no mercado nos termos do disposto no artigo 3.º, n.º 2, alínea a), do Regulamento (UE) n.º 175/2010;]

([1])[II.1.2 São originárias de uma parte da zona de confinamento não afectada pelo aumento da mortalidade e a remessa foi sujeita a uma colheita de amostras e análise em conformidade com o anexo I do Regulamento (UE) n.º 175/2010 em ostras *Crassostrea gigas* com resultado negativo;]]

([1])([3])[II.2 **Requisitos aplicáveis às ostras *Crassostrea gigas* originárias de um Estado-Membro ou de um compartimento previamente sujeito a medidas de confinamento em virtude de um aumento da mortalidade dessas ostras relacionado com a presença do vírus OsHV-1 µvar e destinadas a Estados-Membros ou compartimentos sujeitos a um programa de detecção precoce de OsHV-1 µvar**

O abaixo assinado, inspector oficial, certifica que as ostras *Crassostrea gigas* referidas na parte I do presente certificado:

II.2.1 São provenientes de uma exploração ou zona de exploração de moluscos onde, de acordo com os registos da exploração ou da zona de exploração de moluscos, não há indícios de aumento da mortalidade;

II.2.2 São originárias de um compartimento onde a ausência de OsHV-1 µvar está demonstrada por colheita de amostras e análises efectuadas em conformidade com o anexo I do Regulamento (UE) n.º 175/2010 em ostras *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Requisitos relativos ao transporte e à rotulagem**

O abaixo assinado, inspector oficial, certifica que:

II.3.1 As ostras *Crassostrea gigas* referidas na parte I do presente certificado são mantidas em condições, incluindo no que se refere à qualidade da água, que não alteram o seu estatuto sanitário;

II.3.2 Antes do carregamento, o contentor de transporte está limpo e desinfectado ou nunca foi utilizado;

II.3.3 A remessa é identificada por um rótulo legível aposto no exterior do contentor ou, quando transportada por navio-tanque, no manifesto do navio, contendo a informação pertinente referida nas casas I.8 a I.13 da parte I do presente certificado e a seguinte declaração:

quer ([1])[«Ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação/reparcagem numa zona sujeita a um programa de detecção precoce de OsHV-1 µvar»]

quer (1)[«Ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação/reparcagem numa zona sujeita a medidas de controlo de doenças e originárias de uma zona sujeita a medidas de controlo de doenças»].

Notas

Parte I:

— Casa I.12: Se adequado, indicar o número de autorização da exploração ou zona de exploração de moluscos em causa.

— Casa I.13: Se adequado, indicar o número de autorização da exploração ou zona de exploração de moluscos em causa.

— Casa I.20 e I.31: No que diz respeito à quantidade, indicar o número total.

— Casa I.25: Usar a opção «Reprodução» se se destinarem a criação e «Afinação» se se destinarem a reparcagem.

▼B

UNIÃO EUROPEIA

Colocação no mercado de ostras *Crassostrea gigas* destinadas a criação e a zonas de reparcagem

II. **Informações sanitárias**	II.a. Número de referência do certificado	II.b.

Parte II:

([1]) Riscar o que não interessa.

([2]) A parte II.1 do presente certificado aplica-se a remessas de ostras *Crassostrea gigas* originárias de zonas de confinamento estabelecidas em conformidade com o disposto no artigo 2.º, n.º 2, do Regulamento (UE) n.º 175/2010 e que, nos temos do artigo 3.º, n.º 2, alínea a) ou b), estão autorizadas a abandonar essas zonas.

([3]) A parte II.2 do presente certificado aplica-se a remessas de ostras *Crassostrea gigas* referidas no artigo 5.º, n.º 1, do Regulamento (UE) n.º 175/2010 destinadas a Estados-Membros ou compartimentos sujeitos a um programa de detecção precoce de OsHV-1 µvar e originárias de uma zona previamente sujeita a medidas de confinamento associadas ao aumento da mortalidade das ostras *Crassostrea gigas*.

Veterinário oficial ou inspector oficial

Nome (em maiúsculas):

Qualificações e cargo:

Unidade veterinária local:

UVL N.º:

Data:

Assinatura:

Carimbo: