II

(Nem jogalkotási aktusok)

RENDELETEK

A BIZOTTSÁG 175/2010/EU RENDELETE

(2010. március 2.)

az Ostreid herpeszvírus 1 µvar (OsHV-1 µvar) észlelésével kapcsolatban a *Crassostrea gigas* fajba tartozó osztrigák megnövekedett arányú elhullása elleni védekezésre irányuló intézkedések tekintetében a 2006/88/EK tanácsi irányelv végrehajtásáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a tenyésztett víziállatokra és az azokból származó termékekre vonatkozó állat-egészségügyi követelményekről és a víziállatokban előforduló egyes betegségek megelőzéséről és az azok elleni védekezésről szóló, 2006. október 24-i 2006/88/EK tanácsi irányelvre [1] és különösen annak 41. cikke (3) bekezdésére és 61. cikke (3) bekezdésére,

mivel:

(1) A 2006/88/EK irányelv meghatározza a tenyésztett víziállatok és az azokból származó termékek forgalomba hozatalára alkalmazandó állat-egészségügyi követelményeket. Az irányelv meghatározza továbbá a víziállatok egyes betegségeinek gyanúja vagy kitörése esetén a megelőzésre vonatkozóan alkalmazandó minimumintézkedéseket.

(2) Az említett irányelv 41. cikke úgy rendelkezik, hogy a tagállamoknak megfelelő intézkedéseket kell tenniük egy új betegséggel kapcsolatos helyzet elleni védekezés és a betegség elterjedésének elkerülése érdekében. Új betegséggel kapcsolatos helyzet esetén az érintett tagállam haladéktalanul tájékoztatja a tagállamokat, a Bizottságot és az EFTA-tagállamokat, amennyiben a ténymegállapítások egy másik tagállam számára járványügyi jelentőségűek.

(3) A *Crassostrea gigas* fajba tartozó osztrigák (*Crassostrea gigas* osztrigák) megnövekedett arányú elhullását 2008 késő tavaszán és nyarán több területen észlelték Franciaországban és Írországban. A jelenséget a kedvezőtlen környezeti tényezők, a *Vibrio* nembe tartozó baktériumok és az Ostreid herpeszvírus-1 (OsHV-1) együttesének tulajdonították, ideértve a vírus egy újonnan felfedezett genotípusát is, amely az OsHV-1 µvar elnevezést kapta.

(4) A francia hatóságok 2008 augusztusában értesítették a Bizottságot, a tagállamokat és az EFTA-tagállamokat a helyzetről és a hozott intézkedésekről, és az ügyre 2008 szeptemberében felhívták az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság figyelmét.

(5) 2009 tavaszán ismételten észleltek ugyanezen tényezők kombinációjának tulajdonított megnövekedett arányú elhullást Franciaországban, Írországban és a Csatorna-szigeteknél. Bár az elhullás okai továbbra is bizonytalanok, az Írországban és az Egyesült Királyságban 2009-ben végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy az OsHV-1 µvar jelentős szerepet játszik az elhullásban.

(6) E tagállamok és a Csatorna-szigetek illetékes hatósága értesítették a Bizottságot a helyzetről és a hozott intézkedésekről, és az ügyre több alkalommal felhívták az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság figyelmét.

(7) Az e tagállamokban és a Csatorna-szigeteken az illetékes hatóságok által az új betegséggel kapcsolatos helyzet elleni védekezés érdekében tett elszigetelési intézkedések elsősorban a *Crassostrea gigas* osztrigáknak a megnövekedett arányú elhullással érintett területekről történő elszállításának korlátozásán alapultak.

(8) Az új betegséggel kapcsolatos helyzet 2009-es újrakialakulása, a 2010 tavaszi és nyári ismétlődés lehetőségének és a továbbterjedés kockázatának fényében, valamint az összegyűjtött tapasztalatok alapján helyénvaló és szükséges az érintett tagállamok által már megtett intézkedéseket kiterjeszteni.

(9) Az új betegséggel kapcsolatos helyzet tekintetében az intézkedéseket európai uniós szinten szükséges koordinálni a 2006/88/EK irányelvnek az új betegségek tekintetében támasztott követelményei egységes végrehajtási feltételei, valamint annak biztosítása érdekében, hogy a hozott intézkedések a *Crassostrea gigas* osztrigák szállításának szükségtelen korlátozása nélkül elégséges védelmet nyújtsanak a továbbterjedés ellen.

[1] HL L 328., 2006.11.24., 14. o.

(10) Amennyiben az illetékes hatóságokat arról értesítik, hogy a *Crassostrea gigas* osztrigák megnövekedett arányú elhullását észlelték, mintavételt és vizsgálatot kell végezni az OsHV-1 µvar jelenlétének kimutatása vagy kizárása érdekében.

(11) Amennyiben a OsHV-1 µvar vírusgenotípus jelenléte megerősítést nyer, a tagállamok járványvédelmi intézkedéseket hoznak, ideértve elszigetelési terület létrehozását. Az elszigetelési terület meghatározása a jelen rendeletben meghatározott egyes tényezőkre tekintettel történik. A járványvédelmi intézkedések addig tartanak, amíg a vizsgálatok a megnövekedett arányú elhullás megszűnését nem jelzik.

(12) A *Crassostrea gigas* osztrigák elszigetelési területeken kívülre történő szállítását korlátozni kell a betegség terjedése kockázatának korlátozása érdekében. Azokban az esetekben azonban, amelyekben a betegség terjedésének kockázata alacsonyabb, biztosítani kell a korlátozástól való eltérések lehetőségét. Ezek az eltérések az egyes, emberi fogyasztásra vagy más elszigetelési területen levő tenyésztési- vagy átmosó övezetekbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigák szállítását érintik. A tenyésztési vagy átmosó övezetekbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigaszállítmányok követhetőségének biztosítása érdekében állat-egészségügyi bizonyítvánnyal kell ellátni őket. A bizonyítvány kitöltésekor a 2006/88/EK tanácsi irányelvnek a tenyésztett víziállatok és az azokból származó termékek forgalomba hozatalára és közösségi behozatalára vonatkozó feltételek és bizonyítványkiállítási követelmények tekintetében történő végrehajtásáról és a kórokozó-átvivő fajok jegyzékének meghatározásáról szóló, 2008. december 12-i 1251/2008/EK bizottsági rendelet ([1]) V. mellékletében feltüntetett magyarázó megjegyzéseket figyelembe kell venni.

(13) Az Unióban, illetve különösen a még nem érintett tagállamokban és területi egységeken az új betegséggel kapcsolatos helyzet felmérése, valamint az OsHV-1 µvar bármely felbukkanásának korai észlelése céljából a tagállamok létrehozhatnak az OsHV-1 µvar korai észlelésére irányuló célzott mintavételi és vizsgálati programokat. A 2009-es nemzeti intézkedésekkel vagy 2010-ben a jelen rendelettel összhangban lévő elszigetelési intézkedések által érintett területekről származó *Crassostrea gigas* osztrigák tekintetében további állat-egészségügyi követelményeket kell bevezetni, ha tenyésztési vagy átmosási célokból ilyen programmal érintett tagállamba vagy területi egységre telepítik őket, ameddig az OsHV-1 µvart abban a tagállamban vagy területi egységen nem észlelik.

(14) A különböző tagállamokban az OsHV-1 µvar korai felderítésére irányuló célzott mintavételi és vizsgálati programokból származó adatok összehasonlíthatóságának biztosítása érdekében ezen programokkal kapcsolatban egyes követelményeket meg kell határozni.

(15) Az OsHV-1 µvar tagállamokban történő észlelése tekintetében az időszerű és pontos információ kulcselem az új betegséggel kapcsolatos helyzet elleni hatékony védekezés biztosítása szempontjából. E célból a tagállamok indokolatlan késedelem nélkül értesítik a Bizottságot és a többi tagállamot az OsHV-1 µvar 2010-ben a területükön történő első megerősített előfordulásáról.

(16) Ki kell használni továbbá a 2006/88/EK tanácsi irányelvnek a felügyeleti és felszámolási programok, valamint a tagállamok, övezetek és területi egységek betegségtől mentes minősítése tekintetében történő végrehajtásáról szóló, 2008. október 31-i 2009/177/EK bizottsági határozat ([2]) 10. cikkével összhangban készített internetalapú információs oldalak előnyeit.

(17) Az új betegséggel kapcsolatos helyzethez kapcsolódó lényeges információk időszerű elérése és az átláthatóság biztosítása érdekében a tagállamoknak elérhetővé kell tenniük az Európai Bizottság és más tagállamok számára azokat az információkat, amelyek az elszigetelési területekhez, az elszigetelési intézkedések által korábban érintett, de az OsHV-1 µvar jelenlététől bizonyítottan mentes területekhez, illetve az OsHV-1 µvar korai észlelése céljából létrehozott programokhoz kapcsolódnak.

(18) Mivel az új betegséggel kapcsolatos helyzet tekintetében még mindig nagy a bizonytalanság, a jelen rendeletben előírt intézkedések 2010. december végéig hatályosak.

(19) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

Fogalommeghatározás

E rendelet alkalmazásában az OsHV-1 µvar az Ostreid herpeszvírus-1 (OsHV-1) azon genotípusát jelenti, amelyben a részleges szekvenciaadatok alapján az OsHV-1-gyel összehasonlítva a genom 4-es nyitott leolvasó keretében 12 bázispár szisztematikus hiánya mutatkozik (GenBank # AY509253).

2. cikk

Mintavétel, vizsgálat és elszigetelési területek létrehozása

(1) Amennyiben a *Crassostrea gigas* fajba tartozó osztrigák („*Crassostrea gigas* osztrigák") megnövekedett arányú elhullását észlelik, az illetékes hatóságok:

a) az I. melléklet A. részével összhangban mintákat vesznek;

b) az I. melléklet B. részében megállapított diagnosztikai módszerekkel összhangban vizsgálják az OsHV-1 µvar jelenlétét.

([1]) HL L 337., 2008.12.16., 41. o.

([2]) HL L 63., 2009.3.7., 15. o.

(2) Amennyiben az (1) bekezdés b) pontjában említett vizsgálatok kimutatják az OsHV-1 µvar jelenlétét, az illetékes hatóság elszigetelési területet hoz létre. E terület meghatározása eseti vizsgálat alapján történik, figyelemmel az I. melléklet C. részében meghatározott, a betegség terjedési kockázatát befolyásoló tényezőkre.

(3) A tagállamok szükségtelen késedelem nélkül értesítik a Bizottságot és a többi tagállamot az első, 2010-ben a területükön létrehozott elszigetelési területről.

3. cikk

Forgalombahozatali követelmények a 2. cikkben említett elszigetelési területekről származó *Crassostrea gigas* osztrigákkal kapcsolatban

(1) A 2. cikk (2) bekezdésével összhangban létrehozott elszigetelési területekről származó *Crassostrea gigas* osztrigák nem szállíthatók el az érintett területről.

(2) Az (1) bekezdéstől eltérően a *Crassostrea gigas* osztrigaszállítmányok elszállíthatók az elszigetelési területről, amennyiben:

a) egy másik, a 2. cikk (2) bekezdésével összhangban létrehozott elszigetelési területre szánják őket;

b) az elszigetelési területnek – ideértve a keltetőket is – a megnövekedett arányú elhullással nem érintett részéről származnak, és

   i. a szállítmányból az I. melléklet A. részével összhangban mintát vettek; valamint

   ii. a szállítmányban az I. melléklet B. részében megállapított diagnosztikai módszerekkel összhangban vizsgálták az OsHV-1 µvar jelenlétét, és minden eredmény negatívnak bizonyult;

c) emberi fogyasztás előtt további feldolgozásra, tisztító- vagy elosztóközpontokba vagy feldolgozólétesítményekbe szánják őket, amelyek fel vannak szerelve az illetékes hatóság által hitelesített szennyvízkezelő rendszerrel, amely

   i. hatástalanítja a körbezárt vírusokat; vagy

   ii. elfogadható szintre csökkenti a természetes vizek megfertőzésének kockázatát;

d) emberi fogyasztásra szánják őket és a 853/2004/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet ([1]) előírásainak megfelelően csomagoltak és címkézettek, és

   i. a származási helyük szerinti környezetbe visszakerülve nem lennének képesek a túlélésre; vagy

   ii. a feldolgozás helyén időszakos tárolás nélküli továbbfeldolgozásra szánták őket;

e) a szállítmányokat vagy az azokból származó termékeket további feldolgozás nélküli, emberi fogyasztás céljából történő forgalomba hozatalra szánják, továbbá kiskereskedelmi kiszerelésben vannak, és csomagolásuk megfelel a 853/2004/EK rendelet csomagolásra vonatkozó rendelkezéseinek.

(3) A (2) bekezdés a) és b) pontjában említett, tenyésztési vagy átmosási területekre szánt szállítmányokat állatorvosi bizonyítványnak kell kísérnie, amelyet a jelen rendelet II. mellékletében megállapított mintával és az 1251/2008/EK rendelet V. mellékletében megállapított magyarázó megjegyzésekkel összhangban állítottak ki.

4. cikk

A 2. és 3. cikkben előírt intézkedések feloldása

Az illetékes hatóság feloldhatja a 2. cikk (2) bekezdésével összhangban létrehozott elszigetelési területtel és a 3. cikkben megállapított forgalombahozatali korlátozásokkal kapcsolatban megállapított védekezési intézkedéseket, amennyiben 15 nap különbséggel elvégzett két egymást követő vizsgálatot, melyek a nagyarányú elhullás megszűnését mutatják.

5. cikk

Forgalombahozatali követelmények a *Crassostrea gigas* osztrigáknak az OsHV-1 µvarral összefüggésben megnövekedett arányú elhullása miatt védekezési intézkedéseknek alávetett szállítmányokból származó *Crassostrea gigas* osztrigák tekintetében

(1) A *Crassostrea gigas* osztrigáknak az OsHV-1 µvarral összefüggésben megnövekedett arányú elhullása miatt 2009-ben vagy 2010-ben elszigetelési intézkedésnek alávetett szállítmányból származó *Crassostrea gigas* osztrigák/osztrigákat:

a) a jelen rendelet II. mellékletében megállapított mintával és az 1251/2008/EK rendelet V. mellékletében megállapított magyarázó megjegyzésekkel összhangban kiállított állatorvosi bizonyítványnak kell kísérnie, ha az állatok:

   i. rendeltetési helye olyan tagállam vagy területi egységek, amelyekben létrehoztak az OsHV-1 µvar korai észlelését célzó programot, és ahol az OsHV-1 µvart nem észlelték; továbbá

   ii. az állatokat tenyésztési vagy átmosó területekre szánják;

b) olyan szállítmányból származnak, amelyben az OsHV-1 µvar jelenlétének hiányát az I. melléklet A. részével összhangban elvégzett mintavétel és vizsgálat bizonyítja; valamint

c) megfelelnek az a) pontban előírt bizonyítványmintában meghatározott állat-egészségügyi követelményeknek.

(2) Az (1) bekezdés a) pontjának i. alpontja szerinti, az OsHV-1 µvar korai észlelésére irányuló program megfelel az alábbi követelményeknek:

a) a programot benyújtják az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottságnak;

([1]) HL L 139., 2004.4.30., 55. o.

b) a benyújtás a 2009/177/EK határozat II. mellékletében meghatározott minta formanyomtatvány 1., 5.1., 5.2., 5.3., 5.5., 5.9., 6. és 7. pontjával összhangban történik;

c) a programnak a következőket kell tartalmaznia:

i. mintavétel az I. melléklet A. részével összhangban,

ii. az OsHV-1 µvar jelenlétének vizsgálata az I. melléklet B. részében megállapított diagnosztikai módszerekkel összhangban.

(3) Az (1) bekezdést az Élelmiszerlánc- és Állat-egészségügyi Állandó Bizottság azon ülését követő egy hét elteltével kell alkalmazni, amelyen az (1) bekezdés a) pontjának i. alpontjában említett programot benyújtották.

6. cikk

Internetalapú információs oldal

(1) A tagállamok elérhetővé teszik a Bizottság és a többi tagállam számára:

a) az elszigetelési területek és azon tényezők listáját, amelyeket e területek meghatározásánál figyelembe vettek, ideértve a 2. cikk (2) bekezdése szerint létesített terület földrajzi határainak leírását is;

b) azon területi egységek listáját, ideértve az érintett terület földrajzi határainak leírását is:

i. amelyeken 2009-ben a *Crassostrea gigas* osztrigák OsHV-1 µvarral összefüggő megnövekedett arányú elhullása miatt elszigetelési intézkedéseket vezettek be;

ii. amelyeknél az OsHV-1 µvar hiányát az I. melléklet A. és B. része szerint az elszigetelési területen gyűjtött mintákon elvégzett vizsgálat bizonyítja;

c) az 5. cikk (2) bekezdése szerint benyújtott programokat, ideértve az érintett terület földrajzi határainak leírását is.

(2) Az (1) bekezdés értelmében nyújtott információt naprakészen kell tartani, és elérhetővé kell tenni a 2009/177/EK határozat 10. cikkével összhangban létrehozott internetalapú információs oldalakon.

7. cikk

Jelentéstétel

Legkésőbb 2010. október 1-jéig a tagállamok jelentést nyújtanak be a Bizottságnak az 5. cikk (2) bekezdésével összhangban bejelentett programokról.

A jelentéshez a 2009/177/EK határozat VI. mellékletében található minta formanyomtatványt kell használni.

8. cikk

Hatálybalépés és alkalmazás

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő napon lép hatályba.

Ezt a rendeletet 2010. március 15-től 2010. december 31-ig kell alkalmazni.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2010. március 2-án.

a Bizottság részéről

az elnök

José Manuel BARROSO

I. MELLÉKLET

A. RÉSZ

Mintavétel

1. *Mintavétel a 2. cikk alkalmazásában*

A 2. cikk szerinti mintáknak legalább tizenkét *Crassostrea gigas* osztriga példányból kell állniuk. A mintavétel céljára gyenge, nyitott vagy frissen elhullott (nem bomló) példányokat kell begyűjteni abból a területi egységből, ahol az elhullást megfigyelték.

2. *Mintavétel a 3. cikk (2) bekezdésének b) pontja, az 5. cikk (1) bekezdésének b) pontja és az 5. cikk (2) bekezdésének alkalmazásában*

a) A 3. cikk (2) bekezdésének b) pontja céljából történő mintavétel az alábbiakból áll:

i. lárvák esetében szállítmányonként legalább öt 50 mg-os készlet, amelyek a megtermékenyítést követő negyedik és nyolcadik nap között begyűjtött egész állatokat tartalmaznak, beleértve a héjat is;

ii. 6 mm-esnél rövidebb ikrák esetében szállítmányonként harminc 300 mg-os készlet, amelyek egész állatokat tartalmaznak, beleértve a héjat is;

iii. 6 mm-esnél nagyobb osztrigák esetében szállítmányonként 150 példány.

Az állatok kiválasztásánál a mintának a szállítmány minden részét arányosan képviselni kell. Ha gyenge, tátogó vagy frissen elhullott (bomlásnak még nem indult) állatok is előfordulnak, akkor elsősorban azokat kell kiválasztani.

b) A mintavétel az 5. cikk (2) bekezdés alkalmazásában mintavételi pontonként legalább százötven *Crassostrea gigas* példányt jelent. A tagállamban vagy a területi egységen lévő minden, a programban érintett gazdaságból vagy puhatestű-tenyésztési területről mintát kell venni.

A mintavétel az 5. cikk (1) bekezdése b) pontjának alkalmazásában területi egységenként legalább százötven *Crassostrea gigas* osztrigát jelent.

Az állatok kiválasztásánál az alábbi követelményeket kell figyelembe venni:

— Ha gyenge, tátogó vagy frissen elhullott (bomlásnak még nem indult) állatok is előfordulnak, akkor elsősorban azokat kell kiválasztani. Ha ilyenek nincsenek, akkor 12 hónaposnál fiatalabb, egészséges puhatestűeket is ki kell választani.

— Olyan gazdaságokban történő mintavétel esetében, ahol egynél több vízforrást használnak a tenyésztéshez, a mintában szerepelnie kell minden vízforrásból származó állatnak oly módon, hogy a gazdaság minden része arányosan legyen képviselve.

— Puhatestű-tenyésztési területeken történő mintavétel esetében megfelelő számú, de legalább három mintavételi pontról származó állatoknak kell szerepelniük a mintavételben oly módon, hogy a puhatestű-tenyésztési terület minden része arányosan legyen képviselve, ideértve a jelenlevő természetes szaporodási területeket is. A mintavételi pontok kiválasztásánál az alábbi fő szempontokat kell figyelembe venni: Az OsHV-1 µvar korábbi észlelése a területen, vízáramlások, állománysűrűség, batimetria és a terület irányítási gyakorlata.

c) Az 5. cikk (2) bekezdése szerinti mintavételt az évnek abban a szakában kell végrehajtani, amikor az ismeretek szerint az OsHV-1 µvar a leginkább elterjedt az adott tagállamban vagy a területi egységen. Amennyiben erről nem áll rendelkezésre adat, a mintavételt közvetlenül azután az időszak után kell végrehajtani, amikor a vízhőmérséklet eléri a 16 °C fokot, vagy az év azon szakában, amikor a vízhőmérséklet általában eléri az éves legmagasabb szintet.

d) Az 5. cikk (1) bekezdésének b) pontja szerinti mintavételt lehetőleg a c) pontban meghatározott időszakban kell kivitelezni. Amennyiben a mintavételre máskor kerül sor, a mintavétel céljából begyűjtött osztrigákat a c) pontban meghatározottakkal azonos körülmények között kell tartani a vizsgálat előtt az OsHV-1 µvar észleléséhez megfelelően hosszú ideig.

B. RÉSZ

Az OsHV-1 µvar észlelésének diagnosztikai módszerei

1. *Alkalmazási kör*

A jelen eljárás az OsHV-1 µvar jelenlétének észlelésére és azonosítására használt polimeráz láncreakción (a továbbiakban: PCR) alapuló standard diagnosztikai módszereket magyarázza meg. Az eljárás lehetővé teszi az OsHV-1 és az OsHV-1 µvar közötti különbségtételt.

Ha a reakció feltételeinek optimalizálása, illetve saját felszerelésük és a feltételek sajátosságai miatt szükséges, a laboratóriumok módosításokat eszközölhetnek a jelen mellékletben leírt módszereken, feltéve, hogy bizonyíthatóan ugyanakkora marad azok érzékenysége és a specificitása.

2. *Fogalommeghatározás*

Az OsHV-1 µvar fogalmát a jelen rendelet 1. cikke határozza meg.

3. *Felszerelés és környezetei feltételek*

Az OsHV-1 µvar észlelésére és azonosítására használt PCR-hez az alábbi, a PCR-vizsgálatokhoz klasszikusan használt felszerelésekre és feltételekre van szükség:

— egy zárt, a PCR-keverék elkészítésekor a potenciális szennyezéseket elpusztító, UV sugárzó rendszerrel felszerelt fülkére,

— két teljes pipettakészletre (2 µl; 20 µl; 200 µl és 1 000 µl), amelyekből az első a DNS-extrakciójára, a második a PCR-keverék elkészítésére szolgál,

— három különböző pipettára: egy pipettára (2 µl) a PCR-keverékben a minták elválasztásához, egy pipettára (20 µl) a EB mintavételhez és egy pipettára (20 µl) a PCR-végtermékek agarózgélekbe vezetéséhez,

— szűrőpipettacsúcsokra (2 µl; 20 µl; 200 µl and 1 000 µl) a DNS extrakciójához, a PCR-keverék elkészítéséhez és a minta szétválasztásához,

— pipettacsúcsokra (20 µl) a EB begyűjtéséhez és az amplifikáció végtermékeinek az agarózgélbe töltéséhez,

— egy PCR-készülékre az amplifikáláshoz,

— horizontális elektroforézis rendszerre a PCR-termékek elektroforéziséhez,

— UV-asztalra a PCR-termékek megfigyeléséhez az agarózgélben történő elektroforézist követően,

— a gélekről képeket készítő rendszerre.

A laboránsnak az alább leírt valamennyi lépés során laborköpenyt és valamilyen kesztyűt kell viselnie. A köpenyt és a kesztyűket lehetőleg minden fő lépés után cserélni kell, melyek a következőek: DNS-extrakció, a PRC keverék elkészítése, a minta szétválasztása, amplifikáció, gélbe töltés.

Ajánlott ezeket a lépéseket különböző helyiségekben elvégezni. Különösképpen fontos az amplifikációt és a gélbe töltést/elektroforézist külön helyiségben végezni, mint a DNS-extrakciót, a PCR-keverék elkészítését és a DNS-szétválasztást.

4. *Az eljárás*

4.1. A minta előkészítése

A DNS-extrakció céljára élő vagy frissen kimúlt (nem bomló) osztrigákat használunk, amelyeket előzetesen le lehet fagyasztani.

A minták méretüktől függően különbözőképpen kerülnek feldolgozásra:

a) lárvák esetében az egész állatokat (héjjal együtt) tartalmazó 50 mg-os készletekhez hozzá kell adni 200 µl desztillált vizet, össze kell törni őket, majd 1 000 g-n centrifugálni 1 percig;

b) 6 mm-es vagy annál kisebb fiatal példányok esetében az egész állatokat (héjjal együtt) tartalmazó 300 mg-os készletekhez hozzá kell adni 1 200 µl desztillált vizet, össze kell törni őket, majd 1 000 g-n centrifugálni 1 percig;

c) a 6 mm és 15 mm közötti állatok esetében minden példány lágy szöveteit egyedileg kell összetörni;

d) a 15 mm-esnél hosszabb állatok esetében le kell választani a kopoltyúk és a köpeny darabjait.

DNS-extrakció az QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) használatával, a szövetteszt protokoll-előírásai szerint történik.

A minta további előkészítése az alábbi sorrendben történik:

1. Helyezzük az a) vagy b) pont szerinti, a víz felszínén maradó mintából 100 µl-t, vagy a c) és d) pont szerinti mintaszövetekből 10–50 mg-ot egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe, és adjunk hozzá 180 µl ATL puffert.

2. Adjunk hozzá 20 µl K proteinázt, vortexeljük, majd inkubáljuk 56 °C-on, amíg a szövet teljesen feloldódik (egy éjszaka alatt). A minta szétoszlatása érdekében az inkubálás alatt időnként vortexeljük. Röviden centrifugáljuk az 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövet annak érdekében, hogy eltávolítsuk a fedőről a cseppeket.

3. Adjunk a mintához 200 µl AL puffert, keverjük össze pulzáló vortexeléssel 15 másodpercig, majd inkubáljuk 70 °C-on 10 percig. Röviden centrifugáljuk az 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövet annak érdekében, hogy eltávolítsuk a fedőről a cseppeket.

4. Adjunk a mintához 200 µl (96–100 %-os) etanolt, majd 15 másodpercig pulzálva vortexeljük. Röviden centrifugáljuk az 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövet annak érdekében, hogy eltávolítsuk a fedőről a cseppeket.

5. A negyedik lépésben elkészített keveréket óvatosan helyezzük bele a QIAamp Spin Column-ba (a 2 ml-es gyűjtőcsőben) a szegély megnedvesítése nélkül. Zárjuk le a fedelet, és centrifugáljunk 10 000 rpm-en 1 percig. Tegyük a QIAamp Spin Column-ot egy tiszta 2 ml-es gyűjtőcsőbe (a készlet tartalmazza), és tegyük félre a filtrátumot tartalmazó csövet.

6. Óvatosan nyissuk ki a QIAamp Spin Column-ot, és adjunk hozzá 500 µl AW1 puffert a szegély megnedvesítése nélkül. Zárjuk le a fedelet, és centrifugáljunk 10 000 rpm-en 1 percig. Tegyük a QIAamp Spin Column egy tiszta 2 ml-es gyűjtőcsőbe (a készlet tartalmazza), majd tegyük félre a gyűjtőcsövet a filtrátummal.

7. Óvatosan nyissuk ki a QIAamp Spin Column-ot, és adjunk hozzá 500 µl AW2 puffert a szegély megnedvesítése nélkül. Zárjuk le a fedelet, és centrifugáljunk teljes sebességen (14 000 rpm) három percig.

8. (Választás szerint) Helyezzük a QIAamp Spin Column-ot egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe (a készlet nem tartalmazza), és tegyük félre a filtrátumot tartalmazó gyűjtőcsövet. Centrifugáljunk teljes sebességen (14 000 rpm) egy percig.

9. Helyezzük a QIAamp Spin Column-ot egy tiszta 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe (a készlet nem tartalmazza), és tegyük félre a filtrátumot tartalmazó gyűjtőcsövet. Óvatosan nyissuk ki a QIAamp Spin Column-ot, és adjunk hozzá 100 µl desztillált vizet. Inkubáljuk szobahőmérsékleten 5 percig, majd centrifugáljuk 10 000 rpm-en egy percig.

10. Ellenőrizzük a DNS-extrakció minőségét és hatékonyságát (például a OD [260 nm] spektrofotométeres vagy az elektroforézis utáni agarózgélben történő mérésével).

11. Készítsünk híg oldatot a mintából annak érdekében, hogy a végső DNS-koncentráció 50–100 ng/µl legyen.

12. A DNS-oldatokat 4 °C-on kell tartani a PCR-elemzés elvégzéséig.

Más kereskedelmi forgalomban használható készletek is használhatók a DNS-extrakcióhoz, feltéve, hogy bizonyítottan hasonló eredményekhez vezetnek.

4.2. *Polimeráz láncreakció (PCR)*

4.2.1. Reagensek

— 10 X puffer (Taq DNS polimerázzal együtt)

— $MgCl_2$ (DNS polimerázzal együtt) (25 mM)

— Taq DNS polimeráz (Goldstar, Eurogentec) 5 U/µl

— A dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix-et (20 mM) tízszeresen hígítani kell (2 mM-re) használat előtt

— d H_2O (DNS- és RNS-mentes desztillált H_2O)

4.2.2. Primerek

A következő primereket ([1]) kell használni:

CF (10 µM)

CR (10 µM)

4.2.3. PCR-keverék

A PCR-keverék minden csőben:

	Csövenkénti mennyiség	Végső koncentráció
Puffer (10 X)	5 µl	1 X
$MgCl_2$ (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 polimeráz (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— A PCR-keverékből adagoljunk 49 µl-t minden PCR-csőbe

— Adjunk hozzá 1 µl extraktált DNS-t (50–100 ng/µl) minden csőhöz

4.2.4. Tesztek

Kétfajta tesztet használunk:

— A negatív tesztek dH_2O-t tartalmaznak (1 µl 49 µl-nyi PCR-keverék után). A potenciális reaktív szennyeződés vagy munkakörnyezet észlelésére irányulnak. Minden 10 mintához, vagy minden mintaköteghez egy negatív tesztet kell mellékelni.

([1]) Az említett primerek, illetve azok leírásai beszerezhetőek a puhatestűek betegségeivel foglalkozó közösségi referencialaboratóriumtól (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Franciaország).

— A pozitív tesztek az OsHV-1 CF-CR célgenom részét tartalmazó plazmikus DNS-t tartalmaznak. A PCR-reakció hatékonyságának ellenőrzésére irányulnak. Minden PCR-elemzéshez egy pozitív tesztet kell mellékelni. A pozitív tesztek a közösségi referencialaboratóriumból szerezhetők be.

4.2.5. Amplifikáció

Az amplifikációs ciklusokat PCR-készülékben végezzük.

— Kezdeti denaturáció: 2 perc 94 °C-on

— Amplifikáció: 35 ciklus (1 perc 94 °C-on, 1 perc 50 °C-on és 1 perc 72 °C-on)

— Végső elongáció: 2 perc 72 °C-on

4.3. *Elektroforézis*

4.3.1. Reagensek

— 50 X TAE (megvásárolható közvetlenül felhasználásra készen):

Trisz bázis (40 mM) 242 g

Jégecet (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O 1 literhez

Állítsuk be az oldat pH-ját 8-asra

— 2,5 % agarózgél a 1 X TAE-ban

Adjunk hozzá etídium-bromidot (0,5 μg/ml) a gél lehűtése után.

— Kék töltőfesték:

0,25 % kék bromofenol

Cyanol xylene FF 0,25 %

40 % szacharóz

Tartsuk 4 °C-on.

Használjunk hatszoros hígítást (2 μl kék töltőpuffer 10 μl PCR-termékhez).

— Molekulasúly-indikátor:

SmartLadder SF (Eurogentec): közvetlenül felhasználható molekulasúly-indikátor, amely 9 szabályosan elhelyezkedő sávot tartalmaz 100 és 1 000 bp között.

4.3.2. Az agarózgél elkészítése

1. Mérjünk ki 2,5 g agarózt, adjunk hozzá 100 ml 1 X TAE-t, és melegítsük a keveréket addig, amíg megolvad.

2. Az oldat kihűtése után adjunk hozzá etídium-bromidot (5 μl-t 100 ml agarózgélhez), töltsük az oldatot az öntőformába, és helyezzük bele a fésűt a zsebek előállításához.

3. Miután a gél polimerizálódik, távolítsuk el a fésűket, és helyezzük a gélt olyan vízszintes elektroforézis rendszerbe, amely elegendő 1X TAE-t tartalmaz ahhoz, hogy lefedje az agarózgélt.

4. 10 μl PCR-terméket vegyítsünk el 2 μl kék festékkel (6X), majd helyezzük be a zsebekbe.

5. Az egyik zsebbe a molekulasúly-indikátort (5 μl) helyezzük.

6. A gél méretétől és vastagságától függően 50–150 volt feszültséget vezetünk bele 30 perc és 1 óra közötti időtartamra.

7. Vizsgáljuk meg a gélt UV fényben.

4.4. *Értelmezés*

Az OsHV-1 μvar jelenlétét a mintában egy megfelelő méretű (OsHV-1 esetében a szokásos 173 bp helyett 157 bp) sáv mutatja a 2,5 %-os agarózgélen. Minden negatív tesztnek negatívnak, és minden pozitív tesztnek pozitívnak kell bizonyulnia.

C. RÉSZ

Az elszigetelési terület meghatározása

Az elszigetelési terület 2. cikk (2) bekezdése szerinti meghatározásánál a betegség terjedésének kockázatát befolyásoló alábbi tényezőket kell figyelembe venni:

a) a fertőzött puhatestű-tenyésztési területen vagy gazdaságban a puhatestűek száma, aránya és eloszlása;

b) a szomszédos puhatestű-tenyésztési területek vagy gazdaságok távolsága és sűrűsége;

c) a feldolgozólétesítményektől való távolság, a kapcsolatban lévő gazdaságok vagy puhatestű-tenyésztési területek;

d) a gazdaságokban vagy puhatestű-tenyésztési területeken fellelhető fajok;

e) az érintett és a szomszédos gazdaságokban és puhatestű-tenyésztési területeken alkalmazott gazdálkodási módszerek; valamint

f) hidrodinamikai feltételek és más azonosított, járványügyi jelentőségű tényezők.

II. MELLÉKLET

Állat-egészségügyi bizonyítványminta a gazdaságokba vagy átmosási övezetekbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigák forgalomba hozatalához

EURÓPAI UNIÓ — **Bizonyítvány a Közösségen belüli kereskedelemhez**

I. rész: A bemutatott szállítmány adatai

I.1. Feladó
Név
Cím
Irányítószám

I.2. A bizonyítvány hivatkozási száma

I.2.a. Helyi hivatkozási szám

I.3. Központi illetékes hatóság

I.4. Helyi illetékes hatóság

I.5. Címzett
Név
Cím
Irányítószám

I.6.

I.7.

I.8. Származási ország ISO-kód

I.9.

I.10. Rendeltetési ország ISO-kód

I.11.

I.12. Származási hely/Begyűjtés helye
Engedélyezett akvakultúra-gazdaság ☐
Egyéb ☐
Név Engedélyszám
Cím
Irányítószám

I.13. Rendeltetési hely
Engedélyezett akvakultúra-gazdaság ☐
Egyéb ☐
Név Engedélyszám
Cím
Irányítószám

I.14. Berakodás helye
Irányítószám

I.15. Indulás dátuma és ideje

I.16. Szállítóeszköz
Repülőgép ☐ Hajó ☐ Vasúti vagon ☐
Gépjármű ☐ Egyéb ☐
Azonosítás:

I.17. Szállító
Név Engedélyszám
Cím
Irányítószám Tagállam

I.18. Állatfaj/Termék

I.19. Árukód (KN-kód)
03.07

I.20. Szám/Mennyiség

I.21.

I.22. Csomagok száma

I.23. A konténer azonosítója/Plombaszám

I.24. Csomagolás típusa

I.25. Az állatok/termékek felhasználási célja
Tenyésztés ☐ Vízbe helyezés ☐

I.26. Átszállítás harmadik országon keresztül ☐
Harmadik ország ISO-kód
Kilépési pont Kód
Belépési pont ÁEH egység száma:

I.27. Átszállítás tagállamokon ☐
Tagállam ISO-kód
Tagállam ISO-kód
Tagállam ISO-kód

I.28. Kivitel ☐
Harmadik ország ISO-kód
Kilépési pont Kód

I.29.

I.30.

I.31. Az állatok azonosítása
Faj (Tudományos megnevezés) Mennyiség

EURÓPAI UNIÓ

A gazdaságokba vagy átmosási övezetekbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigák forgalomba hozatalához

II. rész: Igazolás

II. **Egészségügyi információ**	II.a. A bizonyítvány hivatkozási száma	II.b.

([1])([2])[II.1. **A 175/2010/EU rendelet 2. cikke alapján létrehozott elszigetelési területről származó *Crassostrea gigas* osztrigákkal kapcsolatos követelmények**

Alulírott hatósági ellenőr igazolom, hogy a bizonyítvány I. részében említett *Crassostrea gigas* osztrigák:

II.1.1. olyan területről származnak, ahol a *Crassostrea gigas* osztrigáknak az OsHV-1 µvarral összefüggésben megnövekedett elhullására tekintettel járványvédelmi intézkedéseket vezettek be;

([1])[II.1.2. forgalomba helyezése engedélyezett a 175/2010/EU rendelet 3. cikkének (2) bekezdése alapján;]

([1])[II.1.2. az elszigetelési területnek a megnövekedett arányú elhullással nem érintett részéről származnak, és a szállítmánynak a 175/2010/EU rendelet I. melléklete szerinti mintavételezése és vizsgálata negatív eredménnyel zárult;]]

([1])([3])[II.2. **Korábban a *Crassostrea gigas* osztrigáknak az OsHV-1 µvarral összefüggésben megnövekedett elhullására tekintettel járványvédelmi intézkedések által érintett tagállamból vagy területi egységről származó, az OsHV-1 µvar korai felderítésére irányuló programban részt vevő tagállamba vagy területi egységbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigákkal kapcsolatos követelmények**

Alulírott hatósági ellenőr igazolom, hogy a bizonyítvány I. részében említett *Crassostrea gigas* osztrigák:

II.2.1. olyan gazdaságból vagy puhatestű-tenyésztési területről származnak, ahol a gazdaság, illetve a puhatestű-tenyésztési terület nyilvántartásában nem szerepelnek a megnövekedett arányú elhullásra utaló jelek;

II.2.2. olyan szállítmányból származnak, amelyben az OsHV-1 µvar jelenlétének hiányát a 175/2010/EU rendelet I. melléklete szerinti negatív eredménnyel zárult mintavételezés és vizsgálat bizonyítja.]

II.3. **Szállítási és címkézési előírások**

Alulírott hatósági ellenőr igazolom, hogy:

II.3.1. a jelen bizonyítvány I. részében említett *Crassostrea gigas* osztrigákat olyan körülmények között (a vízminőséget is beleértve) tartják, amelyek egészségügyi állapotukon nem változtatnak;

II.3.2. a szállítótartály a rakodás előtt tiszta és fertőtlenített, vagy azt előzőleg nem használták;

II.3.3. a szállítmányt a tartály külsején elhelyezett olvasható címkével azonosították, illetve élőhaltartályos hajóval történő szállítás esetén a hajó rakományjegyzékében feltüntették; és mind a címke, mind a rakományjegyzékbe felvett bejegyzés tartalmazza az ezen bizonyítvány I. részének I.8–I.13. rovatában hivatkozott információkat és az alábbi állítást:

vagy ([1])[„Tenyésztési/átmosási célból az OsHV-1 µvar korai észlelésére irányuló programban érintett területre szánt *Crassostrea gigas* osztrigák"]

vagy (1)[„Tenyésztési/átmosási célból járványvédelmi intézkedések által érintett területről származó és járványvédelmi intézkedések által érintett területre szánt *Crassostrea gigas* osztrigák"].

Megjegyzések

I. rész:

— I.12. rovat: Adott esetben használja a gazdaság vagy az adott puhatestű-tenyésztési terület engedélyszámát.

— I.13. rovat: Adott esetben használja a gazdaság vagy az adott puhatestű-tenyésztési terület engedélyszámát.

— I.20 és I.31. rovat: A mennyiségnél az összmennyiséget adja meg.

— I.25. rovat: Gazdálkodási cél esetében „tenyésztés", átmosási cél esetében az „átmosás" opciót alkalmazza.

EURÓPAI UNIÓ

A gazdaságokba vagy átmosási övezetekbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigák forgalomba hozatalához

II. **Egészségügyi információ**	II.a. A bizonyítvány hivatkozási száma	II.b.

II. rész:

([1]) A nem kívánt rész törlendő.
([2]) A jelen igazolás II.1. része a 175/2010/EU rendelet 2. cikkének (2) bekezdése szerint létrehozott elszigetelési területről származó *Crassostrea gigas* osztriga szállítmányokra vonatkozik, melyek ezen rendelet 3. cikke (2) bekezdésének a) vagy b) pontja értelmében elszállíthatók az említett területről.
([3]) A jelen igazolás II.2. része a 175/2010/EU rendelet 5. cikkének (1) bekezdése szerinti, az OsHV-1 µvar korai felderítésére irányuló programban részt vevő tagállamba vagy területi egységbe szánt *Crassostrea gigas* osztrigaszállítmányokra vonatkozik, amelyek olyan területről származnak, ahol korábban a *Crassostrea gigas* osztrigák megnövekedett elhullására tekintettel járványvédelmi intézkedéseket vezettek be.

Hatósági állatorvos vagy hatósági ellenőr

Név (nyomtatott nagybetűkkel): Képesítés és beosztás:

Helyi állatorvosi egység: Helyi állatorvosi egység száma:

Dátum: Aláírás:

Bélyegző: