II

(Niet-wetgevingshandelingen)

VERORDENINGEN

VERORDENING (EU) Nr. 175/2010 VAN DE COMMISSIE

van 2 maart 2010

ter uitvoering van Richtlijn 2006/88/EG van de Raad wat betreft maatregelen ter bestrijding van de verhoogde mortaliteit bij oesters van de soort *Crassostrea gigas* in samenhang met de detectie van het Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Voor de EER relevante tekst)

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gelet op het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gelet op Richtlijn 2006/88/EG van de Raad van 24 oktober 2006 betreffende veterinairrechtelijke voorschriften voor aquacultuurdieren en de producten daarvan en betreffende de preventie en bestrijding van bepaalde ziekten bij waterdieren [1], en met name op artikel 41, lid 3, en artikel 61, lid 3,

Overwegende hetgeen volgt:

(1) Richtlijn 2006/88/EG stelt de veterinairrechtelijke voorschriften vast voor het in de handel brengen van aquacultuurdieren en producten daarvan. Bovendien stelt zij minimale preventiemaatregelen vast die bij een verdenking of uitbraak van bepaalde ziekten bij waterdieren moeten worden toegepast.

(2) Artikel 41 van die richtlijn bepaalt dat de lidstaten passende maatregelen moeten nemen om een nieuwe ziekte onder controle te krijgen en om de verspreiding ervan te voorkomen. Indien zich een nieuwe ziekte voordoet, stelt de betrokken lidstaat de Commissie, de lidstaten en de EVA-lidstaten onverwijld hiervan in kennis, indien de bevindingen voor een andere lidstaat uit epizoötiologisch oogpunt van belang zijn.

(3) Een verhoogde mortaliteit bij oesters van de soort *Crassostrea gigas* („*Crassostrea gigas*-oesters") is tijdens het late voorjaar en de zomer van 2008 in verscheidene gebieden van Frankrijk en Ierland geconstateerd. Zij werd toegeschreven aan een combinatie van nadelige milieufactoren tezamen met de aanwezigheid van een bacterie van het geslacht Vibrio en de aanwezigheid van het Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), inclusief een nieuw beschreven genotype van dat virus, genaamd OsHV-1 µvar.

(4) De Franse autoriteiten hebben de Commissie, de lidstaten en de EVA-lidstaten in augustus 2008 in kennis gesteld van de situatie en de genomen maatregelen en de kwestie is in september 2008 voorgelegd aan het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid.

(5) In het voorjaar van 2009 is in Frankrijk, Ierland en de Kanaaleilanden opnieuw een aan dezelfde combinatie van factoren toegeschreven verhoogde mortaliteit geconstateerd. Hoewel de oorzaken van de sterfte nog onzeker blijven, duiden de in 2009 in Ierland en het Verenigd Koninkrijk uitgevoerde epizoötiologische onderzoeken erop dat OsHV-1 µvar een belangrijke rol bij de sterfte speelt.

(6) De bevoegde autoriteiten van die lidstaten en van de Kanaaleilanden hebben de Commissie in kennis gesteld van de situatie en de genomen maatregelen en de kwestie is verscheidene keren voorgelegd aan het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid.

(7) De door de bevoegde autoriteiten in die lidstaten en de Kanaaleilanden genomen inperkingsmaatregelen ter bestrijding van de nieuwe ziekte waren hoofdzakelijk gebaseerd op de beperking van het verkeer van *Crassostrea gigas*-oesters buiten de door de verhoogde mortaliteit getroffen gebieden.

(8) Gelet op het opnieuw uitbreken van de nieuwe ziekte in 2009 en de mogelijke herhaling daarvan en het risico van verdere verspreiding in het voorjaar en de zomer van 2010, en op grond van de opgedane ervaring, is het dienstig en nodig dat de reeds door de getroffen lidstaten genomen maatregelen worden uitgebreid.

(9) Om te zorgen voor uniforme voorwaarden voor de uitvoering van de voorschriften van Richtlijn 2006/88/EG betreffende nieuwe ziekten en om ervoor te zorgen dat de genomen maatregelen voldoende bescherming bieden tegen een verdere verspreiding, zonder dat daarbij evenwel onnodige beperkingen op het verkeer van *Crassostrea gigas*-oesters worden opgelegd, is het nodig dat de maatregelen betreffende deze nieuwe ziekte op het niveau van de Europese Unie worden gecoördineerd.

[1] PB L 328 van 24.11.2006, blz. 14.

(10) Wanneer de bevoegde autoriteiten ervan in kennis worden gesteld dat een verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters is geconstateerd, moeten monsters worden genomen en tests uitgevoerd om de aanwezigheid van OsHV-1 µvar op te sporen of uit te sluiten.

(11) Wanneer de aanwezigheid van het virusgenotype OsHV-1 µvar is bevestigd, moeten door de lidstaten ziektebestrijdingsmaatregelen worden genomen, waaronder de instelling van een beperkingsgebied. Bij de bepaling van het beperkingsgebied moet rekening worden gehouden met bepaalde in deze verordening vastgestelde factoren. Die ziektebestrijdingsmaatregelen moeten duren totdat uit inspecties is gebleken dat de verhoogde mortaliteit niet meer bestaat.

(12) Er moeten beperkingen op het verkeer van *Crassostrea gigas*-oesters buiten de beperkingsgebieden worden vastgesteld om het risico van verspreiding van de ziekte te verkleinen. Er moet echter worden voorzien in bepaalde afwijkingen ingeval het risico van verpreiding van de ziekte is verminderd. Die afwijkingen betreffen het verkeer van bepaalde *Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek- en heruitzettingsgebieden in een ander beperkingsgebied of bestemd voor menselijke consumptie. Om te zorgen voor de traceerbaarheid van zendingen *Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek- of heruitzettingsgebieden, moeten zij vergezeld gaan van een diergezondheidscertificaat. Bij de opstelling van het certificaat moet rekening worden gehouden met de toelichtingen in bijlage V bij Verordening (EG) nr. 1251/2008 van de Commissie van 12 december 2008 ter uitvoering van Richtlijn 2006/88/EG van de Raad wat betreft de voorwaarden en certificeringsvoorschriften voor het in de handel brengen en de invoer in de Gemeenschap van aquacultuurdieren en producten daarvan en tot vaststelling van een lijst van vectorsoorten ([1]).

(13) Om verdere kennis op te doen over de status van deze nieuwe ziekte in de Unie en met name in de nog niet getroffen lidstaten en compartimenten daarvan en om te zorgen voor een vroegtijdige opsporing van de aanwezigheid van OsHV-1 µvar, kunnen de lidstaten programma's vaststellen met doelgerichte bemonstering en uitvoering van tests voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar. *Crassostrea gigas*-oesters van oorsprong uit gebieden, onderworpen aan inperkingsmaatregelen in 2009 overeenkomstig nationale maatregelen of in 2010 overeenkomstig deze verordening, moeten aan bijkomende diergezondheidsvoorschriften voldoen als zij voor kweek- of heruitzettingsdoelstellingen worden binnengebracht in lidstaten of compartimenten waarvoor een dergelijk programma geldt, zolang OsHV-1 µvar in die lidstaat of dat compartiment niet wordt gedetecteerd.

(14) Om ervoor te zorgen dat de in verschillende lidstaten in de context van programma's met doelgerichte bemonstering en uitvoering van tests voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar verzamelde gegevens vergelijkbaar zijn, moeten bepaalde voorschriften in verband met de inhoud van dergelijke programma's worden vastgesteld.

(15) De beschikbaarheid van precieze en actuele informatie over de situatie in verband met de detectie van OsHV-1 µvar in de lidstaten is een sleutelelement voor de effectieve bestrijding van de nieuwe ziekte. Daarom moeten de lidstaten de Commissie en de andere lidstaten onverwijld in kennis stellen van de eerste bevestigde aanwezigheid van het OsHV-1 µvar-virus op hun grondgebied in 2010.

(16) Bovendien moet gebruik worden gemaakt van de informatiepagina's op internet, opgesteld overeenkomstig artikel 10 van Beschikking 2009/177/EG van de Commissie van 31 oktober 2008 houdende uitvoeringsbepalingen van Richtlijn 2006/88/EG van de Raad wat betreft bewakings- en uitroeiingsprogramma's en de ziektevrije status van lidstaten, gebieden en compartimenten ([2]).

(17) Om te zorgen voor de nodige transparantie en de tijdige toegang tot de relevante informatie over de nieuwe ziekte, moeten de lidstaten aan de Europese Commissie en de andere lidstaten informatie verstrekken over de beperkingsgebieden en de gebieden die eerder onderworpen waren aan inperkingsmaatregelen maar waar de afwezigheid van OsHV-1 µvar is aangetoond en programma's voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar zijn opgesteld.

(18) Aangezien er nog grote onzekerheid over de nieuwe ziekte bestaat, moeten de in deze verordening vastgestelde maatregelen van toepassing zijn tot eind december 2010.

(19) De in deze verordening vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Definitie

Voor de uitvoering van deze verordening wordt onder OsHV-1 µvar verstaan: een genotype van het Ostreid-herpesvirus-1 (OsHV-1) dat wordt bepaald op grond van partiële-sequentiegegevens die een systematische deletie laten zien van 12 basisparen in ORF 4 van het genoom in vergelijking met OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artikel 2

Bemonstering, uitvoering van tests en instelling van beperkingsgebieden

1. Wanneer een verhoogde mortaliteit bij oesters van de soort *Crassostrea gigas* („*Crassostrea gigas*-oesters") wordt geconstateerd, moet de bevoegde autoriteit:

a) monsters nemen overeenkomstig deel A van bijlage I;

b) tests op de aanwezigheid van OsHV-1 µvar uitvoeren overeenkomstig de diagnosemethoden, vastgesteld in deel B van bijlage I.

([1]) PB L 337 van 16.12.2008, blz. 41.

([2]) PB L 63 van 7.3.2009, blz. 15.

2. Wanneer de resultaten van de in lid 1, onder b), bedoelde tests wijzen op de aanwezigheid van OsHV-1 µvar, stelt de bevoegde autoriteit een beperkingsgebied in. Dat gebied wordt bepaald op grond van een voor elk geval afzonderlijke analyse, rekening houdend met de factoren die van invloed zijn op het risico van de verspreiding van de ziekte, vastgesteld in deel C van bijlage I.

3. De lidstaten stellen de Commissie en de andere lidstaten onverwijld in kennis van het eerste beperkingsgebied dat in 2010 op hun grondgebied is ingesteld.

Artikel 3

Voorschriften voor het in de handel brengen van *Crassostrea gigas*-oesters afkomstig uit een in lid 2 bedoeld beperkingsgebied

1. *Crassostrea gigas*-oesters afkomstig uit overeenkomstig artikel 2, lid 2, ingestelde beperkingsgebieden mogen niet uit dat gebied worden verplaatst.

2. In afwijking van lid 1 mogen zendingen *Crassostrea gigas*-oesters uit het beperkingsgebied worden gebracht, wanneer:

a) zij bestemd zijn voor een ander beperkingsgebied, ingesteld overeenkomstig artikel 2, lid 2;

b) zij afkomstig zijn uit een deel van het beperkingsgebied, inclusief broederijen, dat niet door de verhoogde mortaliteit is getroffen en de zending is onderworpen aan:

   i) een bemonstering overeenkomstig deel A van bijlage I, en

   ii) tests op de aanwezigheid van OsHV-1 µvar overeenkomstig de diagnosemethoden, vastgesteld in deel B van bijlage I, waarvan alle resultaten negatief zijn;

c) zij vóór menselijke consumptie bestemd zijn voor verdere verwerking in zuiveringscentra, verzendcentra of verwerkingsinrichtingen die zijn uitgerust met een door de bevoegde autoriteit gevalideerd afvalwaterbehandelingssysteem dat:

   i) geënveloppeerde virussen inactiveert, of

   ii) het risico van overdracht van ziekten op natuurlijke wateren tot een aanvaardbaar niveau vermindert;

d) zij bestemd zijn voor menselijke consumptie en daartoe zijn verpakt en geëtiketteerd overeenkomstig Verordening (EG) nr. 853/2004 van het Europees Parlement en de Raad ([1]), en:

   i) niet langer in staat zijn te overleven als levende dieren indien zij worden teruggebracht naar de omgeving waaruit zij afkomstig zijn, of

   ii) bestemd zijn voor verdere verwerking zonder tijdelijke opslag op de plaats van verwerking;

e) de zendingen of producten daarvan bestemd zijn voor menselijke consumptie zonder verdere verwerking, mits zij zijn verpakt in detailverpakkingen die aan de bepalingen voor dergelijke verpakkingen van Verordening (EG) nr. 853/2004 voldoen.

3. De zendingen, bedoeld in lid 2, onder a) en b), en bestemd voor kweek- of heruitzettingsgebieden, gaan vergezeld van een diergezondheidscertificaat, opgesteld overeenkomstig het model van bijlage II bij deze verordening en de toelichtingen in bijlage V bij Verordening (EG) nr. 1251/2008 van de Commissie.

Artikel 4

Opheffing van de in de artikelen 2 en 3 vastgestelde maatregelen

De bevoegde autoriteit kan de bestrijdingsmaatregelen in verband met de overeenkomstig artikel 2, lid 2, ingestelde beperkingsgebieden en de in artikel 3 vastgestelde beperkingen voor het in de handel brengen opheffen, nadat zij twee achtereenvolgende inspecties met een tussenpoos van 15 dagen heeft uitgevoerd, waaruit blijkt dat er geen verhoogde mortaliteit meer bestaat.

Artikel 5

Voorschriften voor het in de handel brengen van *Crassostrea gigas*-oesters afkomstig uit een compartiment waarvoor eerder bestrijdingsmaatregelen golden als gevolg van de verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters in samenhang met OsHV-1 µvar

1. *Crassostrea gigas*-oesters die in de handel worden gebracht en afkomstig zijn uit een compartiment waarvoor in 2009 of 2010 inperkingsmaatregelen golden wegens de verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters in samenhang met OsHV-1 µvar moeten:

a) vergezeld gaan van een diergezondheidscertificaat, opgesteld overeenkomstig het model van bijlage II bij deze verordening en de toelichtingen in bijlage V bij Verordening (EG) nr. 1251/2008, als de dieren:

   i) bestemd zijn voor lidstaten of compartimenten die een programma voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar hebben opgesteld en waarin OsHV-1 µvar niet is geconstateerd, en

   ii) bestemd zijn voor kweek- of heruitzettingsgebieden;

b) afkomstig zijn uit een compartiment waar de afwezigheid van OsHV-1 µvar is aangetoond door bemonstering en uitvoering van tests overeenkomstig deel A van bijlage I, en

c) voldoen aan de diergezondheidsvoorschriften die zijn vastgesteld in het modelcertificaat, bedoeld onder a).

2. Een programma voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar, als bedoeld in lid 1, onder a), punt i), moet aan de volgende eisen voldoen:

a) er moet een verklaring betreffende het programma bij het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid worden ingediend;

([1]) PB L 139 van 30.4.2004, blz. 55.

b) een dergelijke verklaring wordt opgesteld overeenkomstig punt 1, de punten 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 en 5.9 en de punten 6 en 7 van het modelformulier in bijlage II bij Beschikking 2009/177/EG;

c) het programma moet omvatten:

i) een bemonstering overeenkomstig deel A van bijlage I;

ii) de uitvoering van tests op de aanwezigheid van OsHV-1 µvar overeenkomstig de diagnosemethoden, vastgesteld in deel B van bijlage I.

3. Lid 1 is van toepassing één week na de datum van de vergadering van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid waarop de verklaring betreffende het in lid 1, onder a), punt i), bedoelde programma is ingediend.

Artikel 6

Informatiepagina's op internet

1. De lidstaten stellen de Commissie en de andere lidstaten de volgende stukken ter beschikking:

a) een lijst van de beperkingsgebieden en de factoren waarmee rekening is gehouden bij de bepaling van die gebieden, inclusief een beschrijving van de geografische grenzen van het desbetreffende gebied, ingesteld overeenkomstig artikel 2, lid 2;

b) een lijst van de compartimenten, inclusief een beschrijving van de geografische grenzen van het desbetreffende gebied:

i) die in 2009 wegens de verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters in samenhang met OsHV-1 µvar aan inperkingsmaatregelen zijn onderworpen;

ii) waar de aanwezigheid van OsHV-1 µvar is aangetoond door overeenkomstig de delen A en B van bijlage I uitgevoerde tests op in het beperkingsgebied genomen monsters;

c) verklaringen betreffende de programma's, als bedoeld in artikel 5, lid 2, inclusief een beschrijving van de geografische grenzen van het desbetreffende gebied.

2. De in lid 1 bedoelde informatie wordt bijgewerkt en ter beschikking gesteld via de informatiepagina's op internet, opgesteld overeenkomstig artikel 10 van Beschikking 2009/177/EG.

Artikel 7

Rapportage

Uiterlijk 1 oktober 2010 leggen de lidstaten aan de Commissie een verslag voor over de overeenkomstig artikel 5, lid 2, ingediende verklaringen betreffende de programma's.

Het verslag wordt opgesteld overeenkomstig het modelformulier in bijlage VI bij Beschikking 2009/177/EG.

Artikel 8

Inwerkingtreding en toepassing

Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Zij is van toepassing van 15 maart 2010 tot en met 31 december 2010.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 2 maart 2010.

Voor de Commissie
De voorzitter
José Manuel BARROSO

BIJLAGE I

DEEL A

Bemonstering

1. *Bemonstering voor de uitvoering van artikel 2*

De monsters, als bedoeld in artikel 2, bestaan uit ten minste 12 individuen van *Crassostrea gigas*-oesters. Bij de selectie van die dieren worden zwakke, openstaande of pas gestorven (niet in staat van ontbinding verkerende) individuen bemonsterd en zij worden verzameld uit het compartiment waar de sterfte is geconstateerd.

2. *Monsterneming voor de uitvoering van artikel 3, lid 2, onder b), artikel 5, lid 1, onder b) en artikel 5, lid 2*

a) De monsters voor de uitvoering van artikel 3, lid 2, onder b), bestaan uit:

i) in geval van larven, vijf pools van ten minste 50 mg van hele dieren, verzameld tussen 4 en 8 dagen na de bevruchting, inclusief schelp, per zending;

ii) in geval van zaad kleiner dan 6 mm, 30 pools van 300 mg van hele dieren, inclusief schelp, per zending;

iii) in geval van oesters groter dan 6 mm, 150 individuen per zending.

Bij de selectie van die dieren moeten alle delen van de zending evenredig in het monster zijn vertegenwoordigd. Als zwakke, openstaande of pas gestorven (niet in staat van ontbinding verkerende) dieren aanwezig zijn, worden in de eerste plaats die dieren geselecteerd.

b) De monsters voor de uitvoering van artikel 5, lid 2, bestaan uit ten minste 150 individuen van *Crassostrea gigas* per bemonsteringspunt. Alle bedrijven en kweekgebieden van weekdieren in de lidstaat of het compartiment waarop het programma betrekking heeft, worden bemonsterd.

De monsters voor de uitvoering van artikel 5, lid 1, onder b), bestaan uit ten minste 150 individuen van *Crassostrea gigas*-oesters per compartiment.

Bij de selectie van die dieren wordt rekening gehouden met de volgende criteria:

— als zwakke, openstaande of pas gestorven (niet in staat van ontbinding verkerende) dieren aanwezig zijn, worden in de eerste plaats die dieren geselecteerd. Als dergelijke dieren niet aanwezig zijn, omvatten de geselecteerde dieren gezonde weekdieren die minder dan 12 maanden oud zijn;

— bij de bemonstering op bedrijven waar meer dan één waterbron voor de productie wordt gebruikt, moeten dieren die alle waterbronnen vertegenwoordigen in het monster worden opgenomen, zodat alle delen van het bedrijf evenredig in het monster vertegenwoordigd zijn;

— bij bemonstering in kweekgebieden van weekdieren moeten dieren uit een voldoende aantal bemonsteringspunten (ten minste drie bemonsteringspunten) in het monster worden opgenomen, zodat alle delen van het kweekgebied evenredig in het monster zijn vertegenwoordigd, inclusief in het kweekgebied aanwezige natuurlijke gronden. De voornaamste factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij de selectie van deze bemonsteringspunten zijn: eerdere detectie van OsHV-1 µvar in het gebied, dichtheid van de bestanden, waterstromen, diepte en beheerspraktijken.

c) De in artikel 5, lid 2, bedoelde bemonstering wordt uitgevoerd in de periode van het jaar waarvan bekend is dat de prevalentie van OsHV-1 µvar dan in de lidstaat of het compartiment maximaal is. Wanneer dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn, wordt de bemonstering uitgevoerd onmiddellijk na de periode waarin de watertemperatuur meer dan 16 °C bedraagt of op het tijdstip van het jaar wanneer de temperatuur normaliter haar jaarlijkse maximum bereikt.

d) De in artikel 5, lid 1, onder b), bedoelde bemonstering wordt bij voorkeur uitgevoerd in de periode van het jaar, als beschreven in punt c). Als monsters buiten die periode van het jaar worden verzameld, moeten de bemonsterde oesters onder gelijkwaardige omstandigheden als beschreven in punt c) worden gehouden gedurende een passende periode voor de detectie van OsHV-1 µvar, voordat zij worden getest.

DEEL B

Diagnosemethoden voor de detectie van OsHV-1 µvar

1. *Toepassingsgebied*

Deze procedure beschrijft een standaarddiagnosemethode voor de detectie en de identificatie van OsHV-1 µvar door middel van een polymerasekettingreactie (PCR). Zij maakt ook een onderscheid tussen OsHV-1 en OsHV-1 µvar mogelijk.

Om de reactieomstandigheden te optimaliseren en om de methode aan de apparatuur en de omstandigheden in hun eigen laboratorium aan te passen, mogen de laboratoria zo nodig wijzigingen in de in deze bijlage beschreven methode aanbrengen, mits een gelijke gevoeligheid en specificiteit kan worden aangetoond.

2. *Definitie*

OsHV-1 µvar wordt omschreven in artikel 1 van deze verordening.

3. *Apparatuur en omgevingsomstandigheden*

De voor de detectie en identificatie van OsHV-1 µvar door middel van PCR te gebruiken diagnosetest vereist de volgende uitrusting en omgevingsomstandigheden die klassiek voor PCR-tests worden gebruikt:

— Een gesloten zuurkast, uitgerust met een uv-producerend systeem om mogelijke verontreinigingen bij de bereiding van de PCR-mix uit te sluiten.

— Twee volledige stellen pipetten (2 µl; 20 µl; 200 µl en 1 000 µl), het eerste voor DNA-extractie en het tweede voor de bereiding van de PCR-mix.

— Drie verschillende pipetten: een pipet (2 µl) om de monsters in de PCR-mix te dispenseren, een pipet (20 µl) voor EB-bemonstering en een derde pipet (20 µl) om de PCR-producten op agarose gels te laden.

— Filterpipettips (2 µl; 20 µl; 200 µl en 1 000 µl) voor DNA-extractie, bereiding van PCR-mix en monsterdispensing.

— Pipettips (20 µl) voor het verzamelen van EB en het laden van amplificatieproducten op agarose gel.

— Een PCR-apparaat voor de uitvoering van amplificaties.

— Een horizontaal elektroforesesysteem voor de elektroforese van PCR-producten.

— Een uv-tafel voor het observeren van de PCR-producten na agarose-gel-elektroforese.

— Een systeem voor het verkrijgen van beelden van de gels.

De uitvoerder van de test moet tijdens alle hieronder beschreven stappen een laboratoriumjas en handschoenen dragen. De laboratoriumjas en de handschoenen moeten bij voorkeur na elke belangrijke stap worden veranderd: DNA-extractie, bereiding van PCR-mix, monsterdispensing, amplificatie en gel-lading.

Er wordt aanbevolen om deze verschillende stappen in verschillende ruimten uit te voeren. Met name de amplificatie en de gel-lading/elektroforese moeten plaatsvinden in een andere ruimte dan die voor DNA-extractie, bereiding van PCR-mix en DNA-dispensing.

4. *Procedure*

4.1. Voorbereiding van het monster

Levende of pas gestorven (niet in staat van ontbinding verkerende) oesters, die vooraf kunnen worden ingevroren, worden verwerkt voor DNA-extractie.

De monsters worden op verschillende wijze verwerkt naargelang de grootte daarvan:

a) Voor larven worden pools van 50 mg van de hele dieren (inclusief de schelp), aangevuld met 200 µl gedistilleerd water, geplet en gecentrifugeerd bij 1 000 g gedurende 1 minuut.

b) Voor zaad van 6 mm of kleiner worden pools van 300 mg van de hele dieren (inclusief de schelp), aangevuld met 1 200 µl gedistilleerd water, geplet en gecentrifugeerd bij 1 000 g gedurende 1 minuut.

c) Voor zaad tussen 6 en 15 mm worden alle zachte weefsels van elk dier individueel geplet.

d) Voor dieren groter dan 15 mm worden delen van de kieuwen en de mantel geïsoleerd.

De DNA-extractie wordt uitgevoerd onder gebruikmaking van de QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) en volgens de instructies voor het weefseltestprotocol.

De verdere monsterbereiding wordt uitgevoerd in de onderstaande volgorde:

1. Doe 100 µl supernatant voor monsters, als bedoeld in de punten a) en b), of 10 tot 50 mg weefsels voor monsters, als bedoeld in de punten c) en d), in een 1,5 ml-microcentrifugebuis en voeg 180 µl ATL-buffer toe.

2. Voeg 20 µl proteïnase K toe, vortex en incubeer bij 56 °C totdat het weefsel volledig is gelyseerd (één nacht). Vortex af en toe tijdens de incubatie om het monster te dispergeren. Centrifugeer korte tijd de 1,5 ml-microcentrifugebuis om de druppels van het deksel te verwijderen.

3. Voeg 200 µl AL-buffer aan het monster toe, meng met pulse-vortexmixer gedurende 15 s en incubeer op 70 °C gedurende 10 minuten. Centrifugeer korte tijd de 1,5 ml-microcentrifugebuis om de druppels van het deksel te verwijderen.

4. Voeg 200 µl ethanol (96-100 %) aan het monster toe en meng met pulse-vortexmixer gedurende 15 s. Centrifugeer korte tijd de 1,5 ml- microcentrifugebuis om de druppels van het deksel te verwijderen.

5. Breng het mengsel van stap 4 zorgvuldig aan in de QIAamp Spin Column (in een 2 ml-verzamelbuis) zonder de rand nat te maken. Sluit het deksel en centrifugeer bij 10 000 omw./min. gedurende 1 min. Plaats de QIAamp Spin Column in een schone 2 ml-verzamelbuis (verstrekt in de kit) en gooi de buis met het filtraat weg.

6. Open voorzichtig de QIAamp Spin Column en voeg 500 µl AW1-buffer toe zonder de rand nat te maken. Sluit het deksel en centrifugeer bij 10 000 omw./min. gedurende 1 min. Plaats de QIAamp Spin Column in een schone 2 ml-verzamelbuis (verstrekt in de kit) en gooi de verzamelbuis met het filtraat weg.

7. Open voorzichtig de QIAamp Spin Column en voeg 500 µl AW2-buffer toe zonder de rand nat te maken. Sluit het deksel en centrifugeer op volle snelheid (14 000 omw./min.) gedurende 3 min.

8. (Optioneel) Plaats de QIAamp Spin Column in een nieuwe 2 ml-verzamelbuis (niet verstrekt in de kit) en gooi de verzamelbuis met het filtraat weg. Centrifugeer op volle snelheid (14 000 omw./min.) gedurende 1 min.

9. Plaats de QIAamp Spin Column in een schone 1,5 ml-microcentrifugebuis (niet verstrekt in de kit) en gooi de verzamelbuis met het filtraat weg. Open zorgvuldig de QIAamp Spin Column en voeg 100 µl gedistilleerd water toe. Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur en centrifugeer bij 10 000 omw./min. gedurende 1 min.

10. Controleer de kwaliteit en de doeltreffendheid van de extractie (bijvoorbeeld door het meten van OD (260 nm) onder spectrofotometer of na elektroforese in agarose gel).

11. Bereid een verdunning van uw monsters om een definitieve DNA-concentratie van 50-100 ng/µl te hebben.

12. De DNA-oplossingen worden op 4 °C bewaard totdat de PCR-analyses worden uitgevoerd.

Voor de DNA-extracties mogen andere in de handel verkrijgbare kits worden gebruikt, mits is aangetoond dat zij soortgelijke resultaten opleveren.

4.2. *Polymerasekettingreactie (PCR)*

4.2.1. Reagentia

— 10 X-buffer (verstrekt met de Taq DNA-polymerase)

— $MgCl_2$ (verstrekt met de DNA-polymerase) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) moet vóór gebruik 10 maal worden verdund (tot 2 mM)

— d H_2O (gedistilleerd H_2O vrij van DNA en RNA)

4.2.2. Primers

De volgende primers ([1]) moeten worden gebruikt:

CF (10 µM)

CR (10 µM)

4.2.3. PCR-mix

De PCR-mix voor elke buis is als volgt:

	Volume per buis	Definitieve concentratie
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
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq polymérase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl van deze PCR-mix wordt in elke PCR-buis gedispenseerd

— 1 µl geëxtraheerd DNA (50-100 ng/µl) wordt aan elke buis toegevoegd

4.2.4. Controles

Er zijn twee soorten controles:

— Negatieve controles bestaan uit dH_2O (1 µl voor 49 µl PCR-mix). Zij zijn bedoeld om een potentiële reactieve verontreiniging of werkomgeving op te sporen. Een negatieve controle moet elke tien monsters of na elke batch monsters worden opgenomen.

([1]) Deze primers of beschrijvingen daarvan zijn verkrijgbaar bij het communautaire referentielaboratorium voor ziekten bij weekdieren (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France).

— Positieve controles bestaan uit plasmide-DNA dat de OsHV-1-doelgenoomregio CF-CR bevat. Zij zijn bedoeld om de doeltreffendheid van de PCR-reactie te controleren. Een positieve controle moet voor elke PCR-analyse worden opgenomen. Positieve controles zijn verkrijgbaar bij het communautaire referentielaboratorium.

4.2.5. Amplificatie

Amplificatiecycli worden uitgevoerd in een PCR-apparaat (thermocycler).

— Initiële denaturatie: 2 min bij 94 °C

— Amplificatie: 35 cycli (1 min bij 94 °C, 1 min bij 50 °C en 1 min bij 72 °C)

— Eindelongatie: 5 min bij 72 °C

4.3. *Elektroforese*

4.3.1. Reagentia

— 50 X TAE (kan gebruiksklaar worden gekocht):

Tris-base (40 mM) 242 g

IJsazijn (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O voor 1 liter

Breng de pH op 8

— Agarose gel 2,5 % in 1X TAE

Ethidiumbromide (0,5 µg/ml) toegevoegd na koeling van de gel.

— Laden blauwe kleurstof:

Broomfenolblauw 0,25 %

Cyanolxyleen FF 0,25 %

Sucrose 40 %

Bewaar bij 4 °C.

Gebruik zes keer verdund (2 µl lading blauwe buffer voor 10 µl PCR- producten).

— Molecuulgewichtmerker:

SmartLadder SF (Eurogentec): een gebruiksklare molecuulgewichtmerker met 9 banden met regelmatige afstanden van 100 tot 1 000 bp.

4.3.2. Agarosegelbereiding

1. Weeg 2,5 g agarose, voeg 100 ml 1X TAE toe en verwarm totdat het mengsel is gesmolten.

2. Na koeling van de oplossing wordt ethidiumbromide toegevoegd (5 µl voor 100 ml agarosegel) en de oplossing wordt uitgegoten in een specifieke mal, uitgerust met kammen (om kuiltjes te maken).

3. Wanneer de gel is gepolymeriseerd, worden de kammen verwijderd en wordt de gel in een horizontaal elektroforesesysteem geplaatst dat voldoende 1X TAE bevat om de agarosegel te bedekken

4. 10 µl PCR-producten worden gemengd met 2 µl blauwe kleurstof (6X) en in de kuiltjes aangebracht

5. Een gat wordt bestemd voor de molecuulgewichtmerker (5 µl)

6. Er wordt een spanning van 50 tot 150 volt aangelegd gedurende 30 min tot 1 uur afhankelijk van de grootte en de dikte van de gel

7. De gel wordt onder uv geobserveerd.

4.4. *Interpretatie*

De aanwezigheid van OsHV-1 µVar in een monster blijkt uit de aanwezigheid van een band van de juiste grootte (157 bp in plaats van 173 bp voor OsHV-1) op een 2,5 % agarosegel, waarbij alle negatieve controles negatief en alle positieve controles positief zijn.

DEEL C

Bepaling van het beperkingsgebied

De volgende factoren die van invloed zijn op de risico's van de verspreiding van de ziekte, worden in aanmerking genomen bij de bepaling van het beperkingsgebied overeenkomstig artikel 2, lid 2:

a) aantal, percentage en verdeling van de weekdieren op het besmette bedrijf of kweekgebied van weekdieren;

b) afstand en dichtheid van naburige bedrijven of kweekgebieden van weekdieren;

c) nabijheid van verwerkingsinrichtingen, contactbedrijven of contactkweekgebieden van weekdieren;

d) in de bedrijven of kweekgebieden van weekdieren aanwezige soorten;

e) in de door de ziekte getroffen en de naburige bedrijven of kweekgebieden van weekdieren toegepaste kweekpraktijken, en

f) hydrodynamische omstandigheden en andere uit epizoötiologisch oogpunt significante factoren.

BIJLAGE II

Model van diergezondheidscertificaat voor het in de handel brengen van *Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek- en heruitzettingsgebieden

EUROPESE UNIE **Certificaat voor de intracommunautaire handel**

Deel I: Informatie betreffende de aangeboden zendin

I.1. Verzender Naam Adres Postcode	I.2. Referentienummer certificaat / I.2.a. Lokaal referentienummmer I.3. Bevoegde centrale autoriteit I.4. Bevoegde lokale autoriteit
I.5. Geadresseerd Naam Adres Postcode	I.6. I.7.
I.8. Land van oorsprong ISO-code / I.9.	I.10. Land van bestemming ISO-code / I.11.
I.12. Plaats van oorsprong / Plaats van de vangst Erkend aquacultuurbedrijf ☐ Overige ☐ Naam Erkenningsnummer Adres Postcode	I.13. Plaats van bestemming Erkend aquacultuurbedrijf ☐ Overige ☐ Naam Erkenningsnummer Adres Postcode
I.14. Plaats van lading Postcode	I.15. Datum en uur van vertrek
I.16. Vervoermiddelen Vliegtuig ☐ Vaartuig ☐ Treinwagon ☐ Wegvoertuig ☐ Andere ☐ Identificatie:	I.17. Vervoerder Naam Erkenningsnummer Adres Postcode Lidstaat
I.18. Diersoort / Product	I.19. Productcode (GN-code) **03.07** I.20. Aantal / Hoeveelheid
I.21.	I.22. Aantal verpakkingen
I.23. Nr. zegel en nr. container	I.24. Aard van de verpakking
I.25. Dieren / Producten gecertificeerd voor Fokken ☐ Heruitzetting ☐	
I.26. Doorvoer door een derde land ☐ Derde land ISO-code Punt van uitgang Code Punt van binnenkomst Nr. BIP	I.27. Doorvoer door de lidstaten ☐ Lidstaat ISO-code Lidstaat ISO-code Lidstaat ISO-code
I.28. Uitvoer ☐ Derde land ISO-code Punt van uitgang Code	I.29.
I.30.	
I.31. Identificatie van de dieren Soort (Wetenschappelijke benaming) Hoeveelheid	

EUROPESE UNIE

Voor het in de handel brengen van *Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek- en heruitzettingsgebieden

Deel II: Certificering

II. **Informatie over de gezondheid**	II.a. Referentienummer certificaat	II.b.

([1])([2])[II.1 **Voorschriften voor Crassostrea gigas-oesters afkomstig uit een beperkingsgebied, ingesteld overeenkomstig artikel 2 van Verordening (EU) nr. 175/2010**

Ondergetekende, officieel inspecteur, verklaart dat de *Crassostrea gigas*-oesters, bedoeld in deel I van dit certificaat:

II.1.1 afkomstig zijn uit een gebied dat onderworpen is aan ziektebestrijdingsmaatregelen in verband met de verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters in samenhang met OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 in de handel mogen worden gebracht overeenkomstig artikel 3, lid 2, onder a), van Verordening (EU) nr. 175/2010;]

([1])[II.1.2 afkomstig zijn uit een deel van het beperkingsgebied dat niet door de verhoogde mortaliteit is getroffen en dat de zending is onderworpen aan een bemonstering en de uitvoering van tests overeenkomstig bijlage I bij Verordening (EU) nr. 175/2010 bij *Crassostrea gigas*-oesters met negatief resultaat.]]

([1])([3])[II.2 **Voorschriften voor *Crassostrea gigas*-oesters die afkomstig zijn uit een lidstaat of een compartiment die/dat eerder is onderworpen aan inperkingsmaatregelen in verband met de verhoogde mortaliteit bij *Crassostrea gigas*-oesters in samenhang met OsHV-1 µvar, en die bestemd zijn voor lidstaten of compartimenten waarvoor een programma voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar geldt**

Ondergetekende, officieel inspecteur, verklaart dat de *Crassostrea gigas*-oesters, bedoeld in deel I van dit certificaat:

II.2.1 afkomstig zijn van een bedrijf of een kweekgebied van weekdieren waar volgens de gegevens van het bedrijf of het kweekgebied van weekdieren geen aanwijzingen voor een verhoogde mortaliteit bestaan;

II.2.2 afkomstig zijn uit een compartiment, waar de afwezigheid van OsHV-1 µvar is aangetoond door een bemonstering en uitvoering van tests overeenkomstig bijlage I bij Verordening (EU) nr. 175/2010 bij *Crassostrea gigas*-oesters.]

II.3 **Vervoer- en etiketteringsvoorschriften**

Ondergetekende, officieel inspecteur, verklaart dat::

II.3.1 de in deel I van dit certificaat bedoelde *Crassostrea gigas*-oesters worden gehouden onder omstandigheden, met inbegrip van de waterkwaliteit, die geen gevolgen voor hun gezondheidsstatus hebben;

II.3.2 de vervoercontainer vóór het laden schoon en ontsmet of niet eerder gebruikt is;

II.3.3 de zending voorzien is van een leesbaar etiket aan de buitenkant van de container of, wanneer vervoerd met een schip met leeftank, op het scheepsmanifest, met de relevante informatie, als bedoeld in de vakken I.8 tot en met I.13 van deel I van dit certificaat, en de volgende vermelding:

hetzij ([1])[„*Crassostrea gigas* -oesters bestemd voor kweek/heruitzetting in een gebied waarvoor een programma voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar geldt"]

of (1)[„*Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek/heruitzetting in een gebied dat is onderworpen aan ziektebestrijdingsmaatregelen, en afkomstig uit een gebied dat is onderworpen aan ziektebestrijdingsmaatregelen"].

Opmerkingen

Deel I:

— Vak I.12: Gebruik, indien van toepassing, het vergunningsnummer van het bedrijf of het kweekgebied in kwestie.

— Vak I.13: Gebruik, indien van toepassing, het vergunningsnummer van het bedrijf of het kweekgebied in kwestie.

— Vakken I.20 en I.31: Vermeld het totale aantal.

— Vak I.25: Gebruik de optie „kweek" indien bestemd voor kweek, „heruitzetting" indien bestemd voor heruitzetting.

EUROPESE UNIE

Voor het in de handel brengen van *Crassostrea gigas*-oesters, bestemd voor kweek- en heruitzettingsgebieden

II. **Informatie over de gezondheid**	II.a. Referentienummer certificaat	II.b.

Deel II:

(1) Doorhalen wat niet van toepassing is

(2) Deel II.1 van dit certificaat is van toepassing op zendingen *Crassostrea gigas*-oesters die afkomstig zijn uit een beperkingsgebied, ingesteld overeenkomstig artikel 2, lid 2, van Verordening (EU) nr. 175/2010, en die overeenkomstig artikel 3, lid 2, onder a) of b), van die verordening dat gebied mogen verlaten.

(3) Deel II.2 van dit certificaat is van toepassing op zendingen *Crassostrea gigas*-oesters, bedoeld in artikel 5, lid 1, van Verordening (EU) nr. 175/2010, die zijn bestemd voor lidstaten of compartimenten waarvoor een programma voor de vroegtijdige detectie van OsHV-1 µvar geldt en die afkomstig zijn uit een gebied dat eerder was onderworpen aan inperkingsmaatregelen in verband met de verhoogde mortaliteit bij Crassostrea gigas-oesters.

Officiële dierenarts of officiële inspecteur

Naam (in hoofdletters): Hoedanigheid en titel:

Lokale veterinaire eenheid: LVE-nr.:

Datum: Handtekening:

Stempel: