II

(Nelegislatívne akty)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 175/2010

z 2. marca 2010,

ktorým sa vykonáva smernica Rady 2006/88/ES, pokiaľ ide o opatrenia na kontrolu zvýšenej mortality ustríc druhu *Crassostrea gigas* v súvislosti so zistením herpetického vírusu ustríc (*Ostreid herpesvirus*) 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text s významom pre EHP)

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na smernicu Rady 2006/88/ES z 24. októbra 2006 o zdravotných požiadavkách na živočíchy a produkty akvakultúry a o prevencii a kontrole niektorých chorôb vodných živočíchov [1], a najmä na jej článok 41 ods. 3 a článok 61 ods. 3,

keďže:

(1) V smernici 2006/88/ES sa stanovujú zdravotné požiadavky, ktoré sa majú uplatňovať pri uvádzaní živočíchov a produktov akvakultúry na trh. Okrem toho sa v nej stanovujú minimálne preventívne opatrenia, ktoré sa majú uplatňovať v prípade podozrenia na určité choroby vodných živočíchov alebo výskytu ich ohniska.

(2) V článku 41 uvedenej smernice sa stanovuje, že členské štáty musia prijať vhodné opatrenia na kontrolu situácie v prípade novej choroby a zabránenie jej šíreniu. V prípade výskytu novej choroby o tom dotknutý členský štát okamžite informuje Komisiu, členské štáty a členské štáty EZVO, ak majú tieto zistenia epidemiologický význam pre iný členský štát.

(3) Zvýšená mortalita ustríc druhu *Crassostrea gigas* (ďalej len „ustrice *Crassostrea gigas*“) bola zistená vo viacerých oblastiach vo Francúzsku a v Írsku počas minulej neskorej jari a v lete 2008. Pripisuje sa kombinácii nepriaznivých faktorov životného prostredia spolu s prítomnosťou baktérie rodu *Vibrio* a s prítomnosťou herpetického vírusu ustríc 1 (OsHV-1) vrátane novopopísaného genotypu uvedeného vírusu nazvaného OsHV-1 µvar.

(4) Francúzske orgány informovali o situácii a opatreniach prijatých v auguste 2008 Komisiu, členské štáty a členské štáty EZVO a na záležitosť bol v septembri 2008 upozornený Stály výbor pre potravinový reťazec a zdravie zvierat.

(5) Na jar 2009 sa opätovne zistila zvýšená mortalita pripisovaná tej istej kombinácii činiteľov vo Francúzsku, Írsku a na Normanských ostrovoch. Hoci príčiny úhynov zostávajú neisté, epidemiologický prieskum v Írsku a v Spojenom kráľovstve v roku 2009 naznačuje, že hlavnú úlohu pri úhynoch zohráva OsHV-1 µvar.

(6) Príslušné orgány uvedených členských štátov a Normanských ostrovov informovali Komisiu o situácii a prijatých opatreniach a na záležitosť bol niekoľkokrát upozornený Stály výbor pre potravinový reťazec a zdravie zvierat.

(7) Opatrenia na zabránenie šíreniu, ktoré prijali príslušné orgány v uvedených členských štátoch a na Normanských ostrovoch v záujme kontroly situácie v súvislosti s novou nákazou, boli založené predovšetkým na obmedzení presunov ustríc *Crassostrea gigas* z oblastí postihnutých zvýšenou mortalitou.

(8) Vzhľadom na opätovný výskyt novej nákazy v roku 2009 a jej možné opakovanie a riziko ďalšieho šírenia na jar a v lete 2010 a na základe získaných skúseností je vhodné a nevyhnutné, aby sa platnosť opatrení, ktoré už postihnuté členské štáty prijali, predĺžila.

(9) S cieľom zabezpečiť jednotné podmienky vykonávania požiadaviek smernice 2006/88/ES vzhľadom na nové nákazy a v záujme zabezpečenia toho, aby prijaté opatrenia poskytovali dostatočnú ochranu proti ďalšiemu šíreniu pri súčasnom zamedzení uvalenia zbytočných obmedzení na presuny ustríc *Crassostrea gigas*, je potrebná koordinácia opatrení na úrovni Európskej únie, pokiaľ ide o situáciu v súvislosti s touto novou nákazou.

[1] Ú. v. EÚ L 328, 24.11.2006, s. 14.

(10) Keď príslušné úrady dostanú informáciu o zistení zvýšenej mortality ustríc *Crassostrea gigas*, mal by sa vykonať odber vzoriek a testy na zistenie alebo vylúčenie prítomnosti OsHV-1 µvar.

(11) Ak sa prítomnosť vírusu genotypu OsHV-1 µvar potvrdí, členské štáty by mali vykonať opatrenia na kontrolu nákazy vrátane zriadenia uzavretej oblasti. Pri vymedzení uzavretej oblasti by sa mali zohľadniť určité faktory uvedené v tomto nariadení. Uvedené opatrenia na kontrolu nákazy by sa mali uplatňovať dovtedy, kým sa na základe inšpekcií nepreukáže, že zvýšený úhyn poklesol.

(12) S cieľom znížiť riziko šírenia príslušnej nákazy by sa malo stanoviť obmedzenie presunov ustríc *Crassostrea gigas* z uzavretých oblastí. Mali by sa však stanoviť určité výnimky pre prípady, keď sa riziko šírenia príslušnej nákazy zníži. Tieto výnimky sa týkajú presunov určitých ustríc *Crassostrea gigas* určených pre chovné oblasti alebo sádky v inej uzavretej oblasti alebo určených na ľudskú spotrebu. Aby sa zabezpečila vysledovateľnosť zásielok ustríc *Crassostrea gigas* určených pre chovné oblasti alebo sádky, mal by sa k nim priložiť zdravotný certifikát. Pri vypĺňaní certifikátu by sa mali zohľadňovať vysvetlivky uvedené v prílohe V k nariadeniu Komisie (ES) č. 1251/2008 z 12. decembra 2008, ktorým sa vykonáva smernica Rady 2006/88/ES, pokiaľ ide o podmienky a požiadavky na certifikáciu na uvádzanie živočíchov a produktov akvakultúry na trh a ich dovoz do Spoločenstva, a ktorým sa stanovuje zoznam druhov prenášačov ([1]).

(13) S cieľom získať ďalšie poznatky o stave situácie v Únii, a predovšetkým v dosiaľ nepostihnutých členských štátoch a oblastiach, pokiaľ ide o túto novú nákazu, a v záujme skorého zistenia každého výskytu OsHV-1 µvar členské štáty môžu mať záujem vypracovať programy cieleného odoberania vzoriek a testovania na zisťovanie OsHV-1 µvar. Ustrice *Crassostrea gigas* pochádzajúce z oblastí, na ktoré sa vzťahovali opatrenia na zabránenie šíreniu z roka 2009 v súlade s vnútroštátnymi opatreniami alebo z roka 2010 v súlade s týmto nariadením, by mali podliehať dodatočným veterinárnym požiadavkám v prípade, keď boli do členských štátov alebo oblastí, na ktoré sa vzťahuje takýto program, uvedené na účely chovných oblastí alebo sádok, a to pod podmienkou, že v uvedenom členskom štáte alebo oblasti sa OsHV-1 µvar nezistil.

(14) Aby sa zabezpečila porovnateľnosť údajov zozbieraných v rozličných členských štátoch v súvislosti s programami cieleného odberu vzoriek a testovania na včasné zistenie OsHV-1 µvar, mali by sa stanoviť určité požiadavky na obsah takýchto programov.

(15) Dostupnosť presných a včasných informácií o situácii, pokiaľ ide o zistenie OsHV-1 µvar v členských štátoch, je kľúčovým prvkom zabezpečenia primeranej kontroly situácie v súvislosti s novou nákazou. Na tento účel by v roku 2010 mali členské štáty bezodkladne informovať Komisiu a ostatné členské štáty o prvej potvrdenej prítomnosti vírusu OsHV-1 µvar na ich územiach.

(16) Využiť by sa mali okrem toho internetové informačné stránky vytvorené v súlade s článkom 10 rozhodnutia Komisie 2009/177/ES z 31. októbra 2008, ktorým sa vykonáva smernica Rady 2006/88/ES, pokiaľ ide o programy dohľadu a eradikácie a o štatút členských štátov, zón a priestorov bez výskytu chorôb ([2]).

(17) Aby sa zabezpečila transparentnosť a včasný prístup k príslušným informáciám o situácii v súvislosti s novou nákazou, členské štáty by mali sprístupniť Európskej komisii a ostatným členským štátom informácie týkajúce sa uzavretých oblastí, oblastí, ktoré predtým podliehali opatreniam na zabránenie šíreniu, ale v ktorých sa preukázala neprítomnosť OsHV-1 µvar, a zaviedli programy na včasné zistenie OsHV-1 µvar.

(18) Keďže stále existuje veľká neistota, pokiaľ ide o situáciu v súvislosti s novou nákazou, opatrenia stanovené v tomto nariadení by sa mali uplatňovať do konca decembra 2010.

(19) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Vymedzenie pojmu

Na účely tohto nariadenia OsHV-1 µvar znamená genotyp herpetického vírusu ustríc 1 (OsHV-1), ktorý je definovaný na základe údajov čiastočnej sekvencie vykazujúcej systematické zmazávanie 12 základných párov v ORF 4 genómu v porovnaní s OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Článok 2

Odber vzoriek, testovanie a zriadenie uzavretých oblastí

1. Ak sa zistí zvýšená mortalita druhu *Crassostrea gigas* (ďalej len „ustrice *Crassostrea gigas*“), príslušný orgán:

a) odoberá vzorky v súlade s časťou A prílohy I;

b) vykonáva skúšky na prítomnosť OsHV-1 µvar v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v časti B prílohy I.

([1]) Ú. v. EÚ L 337, 16.12.2008, s. 41.

([2]) Ú. v. EÚ L 63, 7.3.2009, s. 15.

2. Ak výsledky skúšok uvedených v odseku 1 písm. b) odhalia prítomnosť OsHV-1 µvar, príslušný úrad zriadi uzavretú oblasť. Uvedená oblasť sa vymedzí na základe individuálnej analýzy, berúc do úvahy činitele ovplyvňujúce riziko šírenia nákazy uvedené v časti C prílohy I.

3. Členské štáty bezodkladne informujú Komisiu a ostatné členské štáty o prvej uzavretej oblasti zriadenej na ich území v roku 2010.

Článok 3

Požiadavky týkajúce sa uvádzania ustríc *Crassostrea gigas* pochádzajúcich z uzavretej oblasti uvedenej v článku 2 na trh

1. Ustrice *Crassostrea gigas* pochádzajúce z uzavretých oblastí zriadených v súlade s článkom 2 ods. 2 sa z uvedenej oblasti nepresúvajú.

2. Odchylne od odseku 1 možno zásielky ustríc *Crassostrea gigas* presúvať z uzavretej oblasti v prípade, že:

a) sú určené pre inú uzavretú oblasť zriadenú v súlade s článkom 2 ods. 2;

b) pochádzajú z časti uzavretej oblasti (vrátane liahní), ktorá nie je postihnutá zvýšenou mortalitou, a zásielka sa podrobila:

i) odberu vzoriek v súlade s časťou A prílohy I a

ii) skúškam na prítomnosť OsHV-1 µvar v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v časti B prílohy I, ktorých všetky výsledky boli negatívne;

c) sú pred ľudskou spotrebou určené na ďalšie spracovanie, do purifikačných stredísk, distribučných centier alebo spracovateľských zariadení vybavených systémom čistenia odpadových vôd, ktorý schváli príslušný orgán a ktorý:

i) inaktivuje obalené vírusy alebo

ii) znižuje riziko prenosu nákaz do prírodných vôd na prijateľnú úroveň;

d) sú určené na ľudskú spotrebu a zabalené a označené na uvedený účel v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ([1]) a sú:

i) neschopné prežiť v prípade návratu do životného prostredia, z ktorého pochádzajú, alebo

ii) určené na ďalšie spracovanie bez dočasného skladovania v mieste spracovania;

e) zásielky a produkty z nich sú určené na ľudskú spotrebu bez ďalšieho spracovania za predpokladu, že sa balia ako maloobchodný tovar v súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 853/2004 pre takéto balenie.

3. K zásielkam uvedeným v odseku 2 písm. a) a b) a určeným pre chovné oblasti alebo sádky sa prikladá zdravotný certifikát vyplnený v súlade so vzorom stanoveným v prílohe II k tomuto nariadeniu a s vysvetlivkami uvedenými v prílohe V k nariadeniu (ES) č. 1251/2008.

Článok 4

Zrušenie opatrení stanovených v článkoch 2 a 3

Príslušný úrad môže zrušiť kontrolné opatrenia týkajúce sa uzavretých oblastí zriadených v súlade s článkom 2 ods. 2 a obmedzenia uvádzania na trh stanovené v článku 3 po tom, ako vykoná dve po sebe nasledujúce inšpekcie v rozpätí 15 dní, na základe ktorých sa preukáže, že zvýšený úhyn je na ústupe.

Článok 5

Požiadavky týkajúce sa uvádzania ustríc *Crassostrea gigas* pochádzajúcich z oblastí v minulosti podliehajúcich kontrolným opatreniam z dôvodu zvýšených úhynov ustríc *Crassostrea gigas* v súvislosti s OsHV-1 µvar na trh

1. Ustrice *Crassostrea gigas*, ktoré sa uvádzajú na trh a ktoré pochádzajú z oblasti, ktorá v roku 2009 alebo 2010 z dôvodu zvýšených úhynov ustríc *Crassostrea gigas* v súvislosti s OsHV-1 µvar podliehala opatreniam na zabránenie šírenia:

a) sprevádza zdravotný certifikát vyplnený v súlade so vzorom stanoveným v prílohe II k tomuto nariadeniu a s vysvetlivkami uvedenými v prílohe V k nariadeniu (ES) č. 1251/2008, ak sú tieto živočíchy:

i) určené do členských štátov alebo oblastí, ktoré zriadili program pre včasné zistenie OsHV-1 µvar a v ktorých sa OsHV-1 µvar nezistil, a

ii) určené pre chovné oblasti alebo sádky;

b) pochádzajú z oblasti, v ktorej sa prostredníctvom odberu vzoriek a skúšok vykonaných v súlade s časťou A prílohy I preukázala neprítomnosť OsHV-1 µvar, a

c) spĺňajú zdravotné požiadavky stanovené vo vzore certifikátu uvedeného pod písmenom a).

2. Program pre včasné zistenie OsHV-1 µvar uvedený v odseku 1 písm. a) bode i) spĺňa tieto požiadavky:

a) program sa oznamuje Stálemu výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat;

([1]) Ú. v. EÚ L 139, 30.4.2004, s. 55.

b) takéto oznámenie musí byť v súlade s bodom 1, bodmi 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 a 5.9 a bodmi 6 a 7 vzorového formulára stanoveného v prílohe II k rozhodnutiu 2009/177/ES;

c) súčasťou programu musí byť:

i) odber vzoriek v súlade s časťou A prílohy I;

ii) testovanie na prítomnosť OsHV-1 µvar v súlade s diagnostickými metódami uvedenými v časti B prílohy I.

3. Odsek 1 sa uplatňuje jeden týždeň odo dňa zasadnutia Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat, na ktorom sa program uvedený v odseku 1 písm. a) bode i) oznámil.

Článok 6

Internetová informačná stránka

1. Členské štáty sprístupňujú Komisii a ostatným členským štátom:

a) zoznam uzavretých oblastí a činiteľov, ktoré sa zohľadnili pri vymedzovaní takýchto oblastí, vrátane popisu zemepisného ohraničenia príslušnej oblasti zriadenej v súlade s článkom 2 ods. 2;

b) zoznam oblastí vrátane popisu zemepisného ohraničenia príslušnej oblasti:

i) ktorá v roku 2009 podliehala opatreniam na zabránenie šíreniu z dôvodu zvýšeného úhynu ustríc *Crassostrea gigas* v súvislosti s OsHV-1 µvar;

ii) v ktorej sa testmi vykonanými v súlade s časťami A a B prílohy I na vzorkách odobratých v uzavretej oblasti preukázala neprítomnosť OsHV-1 µvar;

c) oznámenia o programoch uvedených v článku 5 ods. 2 vrátane popisu zemepisného ohraničenia príslušnej oblasti.

2. Informácie uvedené v odseku 1 sa aktualizujú a sprístupňujú prostredníctvom internetových informačných stránok zriadených v súlade s článkom 10 rozhodnutia 2009/177/ES.

Článok 7

Podávanie správ

Členské štáty predkladajú Komisii najneskôr 1. októbra 2010 správu o programoch oznámených v súlade s článkom 5 ods. 2.

Správa je v súlade so vzorovým formulárom stanoveným v prílohe VI k rozhodnutiu 2009/177/ES.

Článok 8

Nadobudnutie účinnosti a uplatňovanie

Toto nariadenie nadobúda účinnosť tretím dňom nasledujúcim po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Uplatňuje sa od 15. marca 2010 do 31. decembra 2010.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 2. marca 2010

Za Komisiu

predseda

José Manuel BARROSO

PRÍLOHA I

ČASŤ A

Odber vzoriek

1. *Odber vzoriek na účely článku 2*

Vzorky stanovené v článku 2 obsahujú minimálne 12 jedincov ustríc *Crassostrea gigas*. Pri výbere uvedených živočíchov sa odoberajú vzorky slabých, roztvárajúcich sa alebo čerstvo uhynutých (nerozložených) jedincov, a to z oblasti, v ktorej sa zaznamenal úhyn.

2. *Odber vzoriek na účely článku 3 ods. 2 písm. b), článku 5 ods. 1 písm. b) a ods. 2*

a) Odber vzoriek na účely článku 3 ods. 2 písm. b) spočíva:

i) v prípade lariev v odbere piatich súhrnných vzoriek s hmotnosťou minimálne 50 mg celých živočíchov na každú zásielku odobratých v rozpätí 4 až 8 dní po oplodnení vrátane lastúry;

ii) v prípade mladých ustríc menších ako 6 mm v odbere 30 súhrnných vzoriek s hmotnosťou 300 mg celých živočíchov na každú zásielku vrátane lastúry;

iii) v prípade ustríc väčších než 6 mm v odbere 150 jedincov na každú zásielku.

Pri výbere uvedených živočíchov musia byť vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti zásielky. Ak sú prítomné slabé, roztvárajúce sa alebo čerstvo uhynuté (nerozložené) živočíchy, treba predovšetkým vybrať takéto živočíchy.

b) Odber vzoriek na účely článku 5 ods. 2 zahŕňa minimálne 150 jedincov druhu *Crassostrea gigas* na každé miesto odberu. Odber vzoriek sa vykonáva vo všetkých hospodárstvach alebo oblastiach chovu mäkkýšov v členskom štáte alebo oblasti, na ktoré sa vzťahuje príslušný program.

Odber vzoriek na účely článku 5 ods. 1 písm. b) zahŕňa minimálne 150 jedincov ustríc *Crassostrea gigas* na každú oblasť.

Pri výbere uvedených živočíchov sa zohľadňujú tieto kritériá:

— Ak sú prítomné slabé, roztvárajúce sa alebo čerstvo uhynuté (nerozložené) živočíchy, treba predovšetkým vybrať takéto živočíchy. Ak takéto živočíchy nie sú prítomné, vybrané živočíchy zahŕňajú zdravé mäkkýše, ktoré nie sú staršie ako 12 mesiacov.

— Pri odbere vzoriek v hospodárstvach, v ktorých sa na produkciu využíva viac než jeden vodný zdroj, sa do odberu musia zahrnúť živočíchy predstavujúce všetky vodné zdroje, tak aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti hospodárstva.

— Pri odbere vzoriek z oblastí chovu mäkkýšov sa do vzorky zahŕňajú živočíchy z dostatočného počtu miest odberu, minimálne z troch, a to tak, aby vo vzorke boli pomerne zastúpené všetky časti oblasti chovu mäkkýšov vrátane miest prirodzeného výskytu, ktoré sú súčasťou oblasti chovu mäkkýšov. Pri výbere týchto miest odberu vzoriek je nutné zohľadniť tieto určujúce činitele: predošlé zistenie OsHV-1 µvar v oblasti, hustotu chovu, vodné toky, hĺbku vody a riadiace postupy.

c) Odber vzoriek stanovený v článku 5 ods. 2 sa vykonáva v tom období roka, v ktorom je prevalencia OsHV-1 µvar v členskom štáte alebo oblasti preukázateľne najvyššia. Ak nie je takýto údaj dostupný, odber vzoriek sa vykonáva bezprostredne po období, keď teplota vody presiahne 16 °C, alebo v takom období roka, v ktorom teplota bežne dosahuje svoje ročné maximum.

d) Odber vzoriek stanovený v článku 5 ods. 1 písm. b) sa pokiaľ možno vykonáva v období roka opísanom pod písmenom c). Ak sa vzorky ustríc odoberajú mimo uvedeného obdobia v roku, musia sa pred testovaním počas obdobia vhodného na zisťovanie OsHV-1 µvar uchovávať v podmienkach rovnocenných podmienkam opísaným pod písmenom c).

ČASŤ B

Diagnostické metódy zisťovania OsHV-1 µvar

1. *Rozsah pôsobnosti*

Ďalej je opísaná štandardná diagnostická metóda, ktorá sa má používať na zisťovanie a identifikáciu OsHV-1 µvar prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (ďalej len „PCR“). Jej prostredníctvom možno odlíšiť OsHV-1 a OsHV-1 µvar.

Ak je to vhodné, laboratóriá môžu v záujme optimalizácie reakčných podmienok a prispôsobenia sa svojmu vybaveniu a podmienkam upraviť metódy opísané v tejto prílohe za predpokladu, že možno preukázať rovnakú citlivosť a špecifickosť.

2. *Vymedzenie pojmu*

OsHV-1 µvar je vymedzený v článku 1 tohto nariadenia.

3. *Vybavenie a podmienky okolitého prostredia*

Na diagnostickú skúšku použitú na zistenie a identifikáciu OsHV-1 µvar prostredníctvom PCR je potrebné také vybavenie a také podmienky okolitého prostredia, aké sa klasicky využívajú pre skúšky PCR:

— digestórium so systémom produkcie UV žiarenia v záujme eliminácie potenciálnej kontaminácie počas prípravy zmesi PCR,

— dva úplné sety pipiet (2 µl, 20 µl, 200 µl a 1 000 µl), prvý na extrakciu DNA, druhý na prípravu zmesi PCR,

— tri rozličné pipety: jedna pipeta (2 µl) na rozdeľovanie vzoriek do zmesi PCR, jedna pipeta (20 µl) na odber vzoriek EB (etídium-bromid) a ďalšia pipeta (20 µl) na nanášanie produktov PCR na agarózové gély,

— špičky pipiet s filtrom (2 µl, 20 µl, 200 µl a 1 000 µl) na extrakciu DNA, prípravu zmesi PCR a rozdeľovanie vzoriek,

— špičky pipiet (20 µl) na odber EB a nanášanie produktov amplifikácie na agarózové gély,

— termocyklér na amplifikáciu,

— horizontálna elektroforéza na elektroforézu produktov PCR,

— UV tabuľka na pozorovanie produktov PCR po elektroforéze na agarózovom géli,

— systém na získanie snímok gélov.

Manipulujúca osoba musí mať vo všetkých nižšie opísaných fázach na sebe laboratórny plášť a rukavice. Laboratórny plášť a rukavice sa musia pokiaľ možno meniť po každom z týchto hlavných krokov: extrakcia DNA, príprava zmesi PCR, rozdeľovanie vzorky, amplifikácia a nanášanie na gél.

Odporúča sa vykonávať tieto rozličné kroky v rozličných miestnostiach. Konkrétnejšie, amplifikácia a nanášanie na gél/elektroforéza by sa mali vykonávať v miestnosti oddelenej od miestnosti na extrakciu DNA, prípravu zmesi PCR a rozdeľovanie DNA.

4. *Postup*

4.1. Príprava vzorky

Živé alebo čerstvo uhynuté (nerozložené) ustrice, ktoré sa môžu vopred zamraziť, sa spracujú na účely extrakcie DNA.

Vzorky sa spracúvajú rozlične v závislosti od ich veľkosti:

a) Pokiaľ ide o larvy, súhrnné vzorky s hmotnosťou 50 mg celých živočíchov (vrátane lastúry), doplnené o 200 µl destilovanej vody, sa rozdrvia a odstredia pri 1 000 g počas 1 minúty.

b) Pokiaľ ide o mladé ustrice menšie než 6 mm, súhrnné vzorky s hmotnosťou 300 mg celých živočíchov (vrátane lastúry), doplnené o 1 200 µl destilovanej vody, sa rozdrvia a odstredia pri 1 000 g počas 1 minúty.

c) Pokiaľ ide o mladé ustrice s veľkosťou 6 až 15 mm, všetky mäkké tkanivá každého živočícha sa rozdrvia samostatne.

d) Pokiaľ ide o živočíchy väčšie než 15 mm, izolujú sa časti žiaber a plášťa.

Extrakcia DNA sa vykonáva pri použití súpravy QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) a podľa pokynov protokolu o skúškach tkanív.

Ďalšia príprava vzoriek sa vykonáva v tomto poradí:

1. Do skúmavky mikroodstredivky s objemom 1,5 ml sa v prípade vzoriek uvedených pod písmenami a) a b) pridá 100 µl supernatantu a v prípade vzoriek uvedených pod písmenami c) a d) 50 mg tkanív a pridá sa 180 µl pufru ATL.

2. Pridá sa 20 µl proteinázy K, premieša sa na miešadle vortex a nechá sa inkubovať pri teplote 56 °C, pokiaľ sa tkanivo úplne nerozloží (v noci). Počas inkubácie sa niekoľkokrát premieša na miešadle vortex, aby sa vzorka rozptýlila. Skúmavka mikroodstredivky s objemom 1,5 ml sa krátko odstredí, aby sa z uzáveru odstránili kvapky.

3. K vzorke sa pridá 200 µl pufru AL, mieša sa na pulznom miešadle 15 s a nechá sa inkubovať pri teplote 70 °C počas 10 minút. Skúmavka mikroodstredivky s objemom 1,5 ml sa krátko odstredí, aby sa z uzáveru odstránili kvapky.

4. K vzorke sa pridá 200 µl etanolu (96 % – 100 %) a mieša sa na pulznom miešadle 15 s. Skúmavka mikroodstredivky s objemom 1,5 ml sa krátko odstredí, aby sa z uzáveru odstránili kvapky.

5. Zmes vytvorená podľa kroku 4 sa opatrne umiestni do kolóny QIAamp Spin (v skúmavke s objemom 2 ml) bez toho, aby sa zvlhčil okraj. Uzavrie sa a odstreďuje pri 10 000 ot./min. 1 minútu. Kolóna QIAamp Spin sa umiestni do čistej skúmavky s objemom 2 ml (ktorá je obsahom súpravy) a skúmavka obsahujúca filtrát sa odstráni.

6. Kolóna QIAamp Spin sa opatrne otvorí a pridá sa 500 µl pufru AW1 bez toho, aby sa zvlhčil okraj. Uzavrie sa a odstreďuje pri 10 000 ot./min. 1 minútu. Kolóna QIAamp Spin sa umiestni do čistej skúmavky s objemom 2 ml (ktorá je obsahom súpravy) a skúmavka obsahujúca filtrát sa odstráni.

7. Kolóna QIAamp Spin sa opatrne otvorí a pridá sa 500 µl pufru AW2 bez toho, aby sa zvlhčil okraj. Uzavrie sa a odstreďuje pri plnej rýchlosti (14 000 ot./min.) 3 minúty.

8. (Nepovinné) Kolóna QIAamp Spin sa umiestni do nepoužitej skúmavky s objemom 2 ml (ktorá nie je obsahom súpravy) a skúmavka obsahujúca filtrát sa odstráni. Odstreďuje sa pri plnej rýchlosti (14 000 ot./min.) 1 minútu.

9. Kolóna QIAamp Spin sa umiestni do čistej skúmavky mikroodstredivky s objemom 1,5 ml (ktorá nie je obsahom súpravy) a skúmavka obsahujúca filtrát sa odstráni. Kolóna QIAamp Spin sa opatrne otvorí a pridá sa 100 µl destilovanej vody. Nechá sa 5 minút inkubovať pri laboratórnej teplote a odstreďuje sa pri 10 000 ot./min. 1 minútu.

10. Kvalita a účinnosť extrakcie sa sleduje pomocou spektrofotometru alebo po elektroforéze na agarózovom géli [napríklad meraním optickej hustoty (260 nm)].

11. Vzorky sa riedia tak, aby konečná koncentrácia DNA predstavovala 50 – 100 ng/µl.

12. Roztoky DNA sa až do vykonania analýzy PCR uchovávajú pri teplote 4 °C.

Na extrakciu DNA možno použiť aj iné na trhu dostupné súpravy za predpokladu, že preukázateľne poskytujú podobné výsledky.

4.2. *Polymerázová reťazová reakcia (PCR)*

4.2.1. Reakčné činidlá

— pufer 10 X (s polymerázou Taq DNA),

— $MgCl_2$ (s polymerázou DNA) (25 mM),

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM), pred použitím zriedený desaťkrát (na 2 mM),

— d H_2O (destilovaná H_2O bez DNA a RNA).

4.2.2. Primery

Musia sa používať tieto primery ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM).

4.2.3. Zmes PCR

Zmes PCR pre každú skúmavku je:

	Objem na skúmavku	Konečná koncentrácia
Pufer (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
polymeráza Taq (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl tejto zmesi PCR sa rozdelí do každej skúmavky PCR,

— do každej skúmavky sa pridá 1 µl extrahovanej DNA (50 – 100 ng/µl).

4.2.4. Kontroly

Používajú sa dva typy kontrol:

— negatívne kontroly sa skladajú z dH_2O (1 µl na 49 µl zmesi PCR). Cieľom je zistiť možnú reaktívnu kontamináciu alebo reaktívne pracovné prostredie. Mala by sa vykonať jedna negatívna kontrola na každých 10 vzoriek alebo na každú sériu vzoriek,

([1]) Tieto primery alebo ich opis možno získať od referenčného laboratória Spoločenstva pre nákazy mäkkýšov (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francúzsko).

— pozitívne kontroly sa skladajú z plazmidickej DNA obsahujúcej región CF-CR cieľového genómu OsHV-1. Cieľom je kontrola účinnosti reakcie PCR. Mala by sa vykonať jedna pozitívna kontrola na každú analýzu PCR. Pozitívne kontroly sú k dispozícii v referenčnom laboratóriu Spoločenstva.

4.2.5. Amplifikácia

Amplifikačné cykly sa vykonávajú v termocykléri.

— Počiatočná denaturácia: 2 min. pri 94 °C.

— Amplifikácia: 35 cyklov (1 min. pri 94 °C, 1 min. pri 50 °C a 1 min. pri 72 °C).

— Konečná elongácia: 5 min. pri 72 °C.

4.3. *Elektroforéza*

4.3.1. Reakčné činidlá

— 50 X TAE (možno zakúpiť ako pripravený na použitie):

báza tris (40 mM) 242 g,

ľadová kyselina octová (40 mM) 57,1 ml,

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

dH_2O na 1 liter,

upraví sa na pH 8,

— agarózový gél 2,5 % v IX TAE:

etídium-bromid (0,5 μg/ml) pridaný po vychladnutí gélu,

— nanášanie modrého farbiva:

brómfenolová modrá 0,25 %,

xylén kyanol FF 0,25 %,

sacharóza 40 %,

uchováva sa pri teplote 4 °C.

Použije sa 6-krát zriedené (2 μl nanášacieho modrého pufra na 10 μl produktov PCR),

— markér molekulovej hmotnosti:

SmartLadder SF (Eurogentec): markér molekulovej hmotnosti pripravený na použitie vrátane 9 rovnomerne delených pruhov od 100 do 1 000 bp.

4.3.2. Príprava agarózového gélu

1. Naváži sa 2,5 g agarózy, pridá sa 100 ml IX TAE a zahrieva sa, pokiaľ sa zmes nerozpustí.

2. Po vychladnutí roztoku sa pridá etídium-bromid (5 µl na 100 ml agarózového gélu) a roztok sa umiestni do zvláštnej formy vybavenej hrebeňmi (aby sa vytvorili štrbiny).

3. Po tom, ako sa gél polymerizuje, hrebene sa odstránia a umiestnia do horizontálnej elektroforézy, ktorá obsahuje dostatočné množstvo IX TAE na to, aby bol agarózový gél úplne pokrytý.

4. 10 µl produktov PCR sa zmieša s 2 µl modrého farbiva (6X) a umiestni sa do štrbín.

5. Jedna priehlbina je určená pre markér molekulovej hmotnosti (5 µl).

6. Použije sa napätie v rozsahu 50 – 150 voltov počas 30 minút až 1 hodiny v závislosti od množstva a hrúbky gélu.

7. Gél sa pozoruje pod UV žiarením.

4.4. *Výklad*

Ak je vo vzorke prítomný OsHV-1 µvar, na 2,5 % agarózovom géli sa vytvorí pruh zodpovedajúcej veľkosti (157 bp namiesto 173 bp v prípade OsHV-1), pričom všetky negatívne kontroly sú negatívne a všetky pozitívne kontroly sú pozitívne.

ČASŤ C

Vymedzenie uzavretej oblasti

Pri vymedzení uzavretej oblasti v súlade s článkom 2 ods. 2 sa zohľadňujú tieto činitele, ktoré majú vplyv na šírenie nákazy:

a) počet a rozloženie mäkkýšov v infikovanom hospodárstve alebo v infikovanej oblasti chovu mäkkýšov;

b) vzdialenosť a hustota susediacich hospodárstiev alebo oblastí chovu mäkkýšov;

c) blízkosť k spracovateľským zariadeniam, kontaktným hospodárstvam alebo oblastiam chovu mäkkýšov;

d) druhy prítomné v hospodárstvach alebo v oblastiach chovu mäkkýšov;

e) chovné postupy používané v postihnutých a susediacich hospodárstvach alebo oblastiach chovu mäkkýšov a

f) zistené hydrodynamické podmienky a ostatné činitele epizootologického významu.

PRÍLOHA II

Vzor zdravotného certifikátu pre uvedenie ustríc *Crassostrea gigas* určených pre chovné oblasti alebo sádky na trh

EURÓPSKA ÚNIA **Certifikát pre obchod v rámci Spoločenstva**

Časť I: Podrobné údaje o zásilke

I.1. Odosielateľ Meno Adresa PSČ	I.2. Referenčné číslo certifikátu / I.2.a. Miestne referenčné číslo I.3. Príslušný ústredný orgán I.4. Príslušný miestny orgán
I.5. Príjemca Meno Adresa PSČ	I.6. I.7.
I.8. Krajina pôvodu / Kód ISO / I.9.	I.10. Krajina určenia / Kód ISO / I.11.
I.12. Miesto pôvodu/Miesto zberu Schválené vodné hospodárstvo ☐ Iné ☐ Meno / Schvaľovacie číslo Adresa PSČ	I.13. Miesto určenia Schválené vodné hospodárstvo ☐ Iné ☐ Meno / Schvaľovacie číslo Adresa PSČ
I.14. Miesto naloženia PSČ	I.15. Dátum a čas odjazdu
I.16. Dopravný prostriedok Lietadlo ☐ Loď ☐ Železničný vagón ☐ Auto ☐ Iné ☐ Identifikácia	I.17. Prepravca Meno / Schvaľovacie číslo Adresa PSČ / Členský štát
I.18. Druh zvierat/Produkty	I.19. Kód tovaru (kód KN) **03.07** I.20. Počet/Množstvo
I.21.	I.22. Počet balení
I.23. Číslo plomby/Číslo contajnera	I.24. Druh balenia
I.25. Zvietratá asvedčéné na/Produkty asvedčéné na: Chov ☐ Kone na šport ☐	
I.26. Tranzit cez tretie krajiny ☐ Tretia krajina / Kód ISO Výstupný priechod / Kód Vstupný priechod / Číslo HIS	I.27. Tranzit cez členské štáty ☐ Členský štát / Kód ISO Členský štát / Kód ISO Členský štát / Kód ISO
I.28. Vývoz ☐ Tretia krajina / Kód ISO Výstupný priechod / Kód	I.29.
I.30.	
I.31. Identifikácia zvierat Druh (vedecký názov) / Množstvo	

EURÓPSKA ÚNIA

pre uvedenie ustríc *Crassostrea gigas* určených pre chovné oblasti alebo sádky na trh

Časť II: Osvedčovanie

II. **Informácie o zdravotnom stave**	II.a. Referenčné číslo certifikátu	II.b.

([1])([2])[II.1. **Požiadavky týkajúce sa ustríc *Crassostrea gigas* pochádzajúcich z uzavretej oblasti zriadenej v súlade s článkom 2 nariadenia (EÚ) č. 175/2010**

Ja dolupodpísaný úradný inšpektor týmto osvedčujem, že ustrice *Crassostrea gigas* uvedené v časti I tohto certifikátu:

II.1.1. pochádzajú z oblasti, na ktorú sa vzťahujú opatrenia na kontrolu nákazy týkajúce sa zvýšeného úhynu ustríc *Crassostrea gigas* v súvislosti s OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2. sa podľa článku 3 ods. 2 písm. a) nariadenia (EÚ) č. 175/2010 môžu uviesť na trh;]

([1])[II.1.2. pochádzajú z časti uzavretej oblasti, ktorá nie je postihnutá zvýšeným úhynom, a zásielka sa podrobila odberu vzoriek a skúškam ustríc *Crassostrea gigas* v súlade s prílohou I k nariadeniu (EÚ) č. 175/2010 s negatívnym výsledkom;]

([1])([3])[II.2. **Požiadavky týkajúce sa ustríc *Crassostrea gigas* pochádzajúcich z členského štátu alebo oblasti, ktoré predtým vzhľadom na zvýšený úhyn ustríc *Crassostrea gigas* v súvislosti s OsHV-1 µvar podliehali opatreniam na zabránenie šíreniu, a určených do členských štátov alebo oblastí, na ktoré sa vzťahuje program pre včasné zistenie OsHV-1 µvar**

Ja dolupodpísaný úradný inšpektor týmto osvedčujem, že ustrice *Crassostrea gigas* uvedené v časti I tohto certifikátu:

II.2.1. pochádzajú z hospodárstva alebo oblasti chovu mäkkýšov, v ktorých sa podľa záznamov hospodárstva alebo oblasti chovu mäkkýšov nevyskytujú žiadne náznaky zvýšeného úhynu;

II.2.2. pochádzajú z oblasti, v ktorej sa prostredníctvom odberu vzoriek ustríc *Crassostrea gigas* a skúšok vykonaných v súlade s prílohou I k nariadeniu (EÚ) č. 175/2010 preukázala neprítomnosť OsHV-1 µvar.]

II.3. **Požiadavky na prepravu a označovanie**

Ja dolupodpísaný úradný inšpektor týmto osvedčujem, že:

II.3.1. ustrice *Crassostrea gigas* uvedené v časti I tohto certifikátu sa držia v podmienkach (vrátane kvality vody), ktoré nemenia ich zdravotný stav;

II.3.2. prepravný kontajner bol pred naložením vyčistený a vydezinfikovaný alebo sa ešte nepoužil;

II.3.3. zásielka je označená čitateľným označením na vonkajšej strane kontajnera alebo v prípade prepravy plavidlom v zozname lodného nákladu, pričom obsahuje príslušné informácie uvedené v kolónkach I.8 až I.13 časti I tohto certifikátu a toto vyhlásenie:

buď ([1])[„ustrice *Crassostrea gigas* určené na chov/sádkovanie v oblasti, na ktorú sa vzťahuje program pre včasné zistenie OsHV-1 µvar“]

alebo (1)[„ustrice *Crassostrea gigas* určené na chov/sádkovanie v oblasti, na ktorú sa vzťahujú opatrenia na kontrolu nákazy, a pochádzajúce z oblasti podliehajúcej opatreniam na zabránenie šírenia“].

Poznámky

Časť I:

— Kolónka I.12: V prípade potreby uveďte číslo oprávnenia príslušného hospodárstva alebo oblasti chovu mäkkýšov.

— Kolónka I.13: V prípade potreby uveďte číslo oprávnenia príslušného hospodárstva alebo oblasti chovu mäkkýšov.

— Kolónka I.20 a I.31: Pri množstve napíšte celkový počet.

— Kolónka I.25: Použite možnosť „chov“, ak sú určené na chov, a možnosť „sádkovanie“, ak sú určené na sádkovanie.

EURÓPSKA ÚNIA **pre uvedenie ustríc *Crassostrea gigas* určených pre chovné oblasti alebo sádky na trh**

II. **Informácie o zdravotnom stave**	II.a. Referenčné číslo certifikátu	II.b.

Časť II:

([1]) Nehodiace sa prečiarknite.

([2]) Časť II.1 tohto certifikátu platí pre zásielky ustríc *Crassostrea gigas*pochádzajúcich z uzavretej oblasti zriadenej v súlade s článkom 2 ods. 2 nariadenia (EÚ) č. 175/2010, ktoré môžu podľa článku 3 ods. 2 písm. a) a b) uvedeného nariadenia uvedenú oblasť opustiť.

([3]) Časť II.2 tohto certifikátu platí pre zásielky ustríc *Crassostrea gigas* uvedené v článku 5 ods. 1 nariadenia (EÚ) č. 175/2010, ktoré sú určené do členských štátov alebo oblastí, na ktoré sa vzťahuje program pre včasné zistenie OsHV-1 µvar, a ktoré pochádzajú z oblasti, na ktorú sa predtým vzťahovali opatrenia na zabránenie šíreniu týkajúce sa zvýšeného úhynu ustríc *Crassostrea gigas*.

Úradný veterinárny lekár alebo úradný inšpektor

Meno (s veľkými písmenami): Kvalifikácia a titul:

Miestna veterinárna jednotka: Číslo MVJ:

Dátum: Podpis:

Pečiatka: