II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 175/2010

z dne 2. marca 2010

o izvajanju Direktive Sveta 2006/88/ES glede ukrepov za nadzor povečanega pogina ostrig vrste *Crassostrea gigas* v povezavi z odkrivanjem ostreidnega herpesvirusa 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Direktive Sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2006 o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz ribogojstva ter o preprečevanju in nadzoru nekaterih bolezni pri vodnih živalih [1] ter zlasti člena 41(3) in člena 61(3) Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Direktiva 2006/88/ES določa zahteve v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, ki jih je treba uporabljati pri dajanju živali in proizvodov iz ribogojstva na trg. Poleg tega določa minimalne nadzorne ukrepe, ki se uporabljajo pri sumu ali izbruhu nekaterih bolezni pri vodnih živali.

(2) Člen 41 navedene direktive določa, da države članice sprejmejo ustrezne ukrepe za nadzor stanja v primeru porajajoče se bolezni in preprečitev širjenja navedene bolezni. V primeru stanja porajajoče se bolezni mora zadevna država članica takoj obvestiti Komisijo, države članice in države članice EFTE, če imajo rezultati preiskave za drugo državo članico epidemiološki pomen.

(3) Na več območjih v Franciji in na Irskem je bil v pozni pomladi in poletju leta 2008 ugotovljen povečan pogin ostrig vrste *Crassostrea gigas* („ostrige *Crassostrea gigas*“). Pogin je bil pripisan spletu neugodnih vremenskih dejavnikov ter navzočnosti bakterije iz rodu *Vibrio* in ostreidnega herpesvirusa-1 (OsHV-1), vključno z na novo opisanim genotipom navedenega virusa z imenom OsHV-1 µvar.

(4) Francoski organi so obvestili Komisijo, države članice in države članice EFTA o stanju ter ukrepih, sprejetih avgusta 2008, zadeva pa je bila septembra 2008 posredovana Stalnemu odboru za prehranjevalno verigo in zdravje živali.

(5) Pomladi leta 2009 je bil povečan pogin, pripisan istemu spletu dejavnikov, spet ugotovljen v Franciji, na Irskem in Kanalskih otokih. Čeprav vzroki pogina še vedno niso določeni, epidemiološke preiskave, ki sta jih opravili Irska in Združeno kraljestvo leta 2009, kažejo, da ima OsHV-1 µvar večjo vlogo pri njem.

(6) Pristojni organi navedenih držav članic in Kanalskih otokov so obvestili Komisijo o stanju in sprejetih ukrepih, zadeva pa je bila večkrat posredovana Stalnemu odboru za prehranjevalno verigo in zdravje živali.

(7) Zadrževalni ukrepi, ki so jih sprejeli pristojni organi v navedenih državah članicah in Kanalskih otokih za nadzor stanja pri porajajoči se bolezni, so večinoma sloneli na omejitvi premikov ostrig *Crassostrea gigas* zunaj območij, ki jih je prizadel povečani pogin.

(8) Zaradi ponovnega pojava stanja porajajoče se bolezni leta 2009 ter mogoče ponovitve in nevarnosti za nadaljnje širjenje pomladi in poleti leta 2010 ter na podlagi pridobljenih izkušenj je primerno in potrebno razširiti ukrepe, ki so jih že sprejele prizadete države članice.

(9) Da bi zagotovili enotne pogoje za izvajanje zahtev Direktive 2006/88/ES glede porajajočih se bolezni in da bi zagotovili, da sprejeti ukrepi omogočajo zadostno zaščito pred nadaljnjim širjenjem in hkrati ne nalagajo nepotrebnih omejitev premikov ostrig *Crassostrea gigas*, je treba uskladiti ukrepe glede tega stanja porajajoče se bolezni na ravni Evropske unije.

[1] UL L 328, 24.11.2006, str. 14.

(10) Ko pristojni organi dobijo obvestilo, da je bila ugotovljen povečani pogin ostrig *Crassostrea gigas*, je treba opraviti ustrezno vzorčenje in preskušanje, da se ugotovi ali izključi navzočnost OsHV-1 µvar.

(11) Ko se potrdi navzočnost virusa genotipa OsHV-1 µvar, morajo države članice izvajati ukrepe za nadzor bolezni, vključno z vzpostavitvijo zaprtega sistema. Pri opredelitvi zaprtega sistema je treba upoštevati nekatere dejavnike, ki jih določa ta uredba. Navedene ukrepe za nadzor bolezni je treba izvajati, dokler inšpekcijski pregledi ne ugotovijo, da je povečani pogin prenehal.

(12) Za omejitev nevarnosti širjenja bolezni je treba omejiti premike ostrig *Crassostrea gigas* iz zaprtega sistema. Vendar je treba določiti nekatera odstopanja, kadar je nevarnost širjenja bolezni manjša. Ta odstopanja veljajo za premike nekaterih ostrig *Crassostrea gigas*, ki so namenjene za območja gojenja ali za ponovno nasaditev v drugem zaprtem sistemu ali za prehrano ljudi. Da bi zagotovili sledljivost pošiljk ostrig *Crassostrea gigas*, namenjenih za območja gojenja ali za ponovno nasaditev, jim je treba priložiti veterinarsko spričevalo. Pri izpolnjevanju spričevala je treba upoštevati pojasnjevalne opombe iz Priloge V k Uredbi Komisije (ES) št. 1251/2008 z dne 12. decembra 2008 o izvajanju Direktive Sveta 2006/88/ES glede pogojev in zahtev v zvezi z izdajanjem spričeval za dajanje živali in proizvodov iz ribogojstva na trg in za njihov uvoz v Skupnost ter o določitvi seznama vektorskih vrst ([1]).

(13) Da bi države članice vedele več o statusu tega stanja porajajoče se bolezni v Evropski uniji ter zlasti državah članicah in še neprizadetih kompartmentih ter da bi zagotovile zgodnje odkrivanje kakršnih koli pojavov OsHV-1 µvar, si morda želijo vzpostaviti programe s ciljnim vzorčenjem in preskušanjem za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar. Za ostrige *Crassostrea gigas*, ki prihajajo z območij, na katerih so se izvajali ukrepi zadrževanja leta 2009 v skladu z nacionalnimi ukrepi ali leta 2010 v skladu s to uredbo, je treba določiti dodatne zahteve za zdravstveno varstvo živali, če se za gojenje ali ponovno nasaditev vnašajo v države članice ali kompartmente, ki jih zajema tak program, dokler OsHV-1 µvar ni odkrit v navedeni državi članici ali kompartmentu.

(14) Da bi zagotovili primerljivost podatkov, zbranih v različnih državah članicah v programih s ciljnim vzorčenjem in preskušanjem za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar, je treba določiti nekatere zahteve za vsebino takih programov.

(15) Razpoložljivost natančnih in pravočasnih podatkov o stanju pri odkrivanju OsHV-1 µvar v državah članicah je ključna za zagotovitev ustreznega nadzora stanja porajajoče se bolezni. Za ta namen morajo države članice takoj obvestiti Komisijo in druge države članice o prvem potrjenem primeru virusa OsHV-1 µvar na svojem ozemlju leta 2010.

(16) Poleg tega je treba izkoristiti informacijske spletne strani, postavljene v skladu s členom 10 Odločbe Komisije 2009/177/EC z dne 31. oktobra 2008 o izvajanju Direktive Sveta 2006/88/ES v zvezi s programi za nadziranje in izkoreninjenje ter statusom brez bolezni držav članic, območij in kompartmentov ([2]).

(17) Da bi države članice zagotovile preglednost in pravočasni dostop do pomembnih informacij o stanju porajajoče se bolezni, morajo Evropski komisiji in drugim državam članicam omogočiti dostop do informacij o zaprtih sistemih, območjih, na katerih so se sicer izvajali zadrževalni ukrepi, vendar je bilo nato dokazano, da na njih ni OsHV-1 µvar, in programih, vzpostavljenih za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar.

(18) Ker je še vedno veliko negotovosti glede stanja porajajoče se bolezni, je treba ukrepe iz te uredbe uporabljati do konca decembra 2010.

(19) Ukrepi, predvideni v tej uredbi, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Opredelitev pojmov

V tej uredbi OsHV-1 µvar pomeni genotip virusa ostreidnega herpesvirusa-1 (OsHV-1), ki je določen na podlagi delnega zaporedja podatkov, ki kaže sistematični izbris 12 baznih parov v odprtem bralnem okviru ORF 4 genoma v primerjavi z OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Člen 2

Vzorčenje, preskušanje in vzpostavljanje zaprtih sistemov

1. Ko se odkrije povečani pogin pri ostrigah vrste *Crassostrea gigas* („ostrige *Crassostrea gigas*“), pristojni organ opravi:

(a) vzorčenje v skladu z delom A Priloge I;

(b) preskušanje na OsHV-1 µvar z diagnostičnimi metodami iz dela B Priloge I.

([1]) UL L 337, 16.12.2008, str. 41.

([2]) UL L 63, 7.3.2009, str. 15.

2. Ko rezultati preskušanja iz odstavka 1(b) pokažejo navzočnost OsHV-1 µvar, pristojni organ vzpostavi zaprti sistem. Ta zaprti sistem se opredeli na podlagi analize vsakega primera posebej ob upoštevanju dejavnikov, ki vplivajo na nevarnost širjenja bolezni iz dela C Priloge I.

3. Države članice takoj obvestijo Komisijo in druge države članice o prvem zaprtem sistemu, vzpostavljenem na njihovem ozemlju leta 2010.

Člen 3

Zahteve za dajanje na trg ostrig *Crassostrea gigas* iz zaprtega sistema iz člena 2

1. Ostrige *Crassostrea gigas*, ki izvirajo iz zaprtega sistema, ki je bil vzpostavljen v skladu s členom 2(2), se ne smejo premikati z navedenega območja.

2. Z odstopanjem od odstavka 1 se pošiljke ostrig *Crassostrea gigas* smejo premikati iz zaprtega sistema, kadar:

(a) so namenjene v drug zaprti sistem, ki je bil vzpostavljen v skladu s členom 2(2);

(b) izvirajo iz dela zaprtega sistema, vključno z drstišči, ki jih ni prizadel povečani pogin, na pošiljki pa je bilo opravljeno:

(i) vzorčenje v skladu z delom A Priloge I in

(ii) preskušanje na OsHV-1 µvar z diagnostičnimi metodami iz dela B Priloge I, rezultati pa so bili negativni;

(c) so namenjene za nadaljnjo predelavo, obrate za prečiščevanje, odpremne centre ali obrate za predelavo pred uporabo za prehrano ljudi, opremljene s sistemom za čiščenje odpadnih voda, ki ga je potrdil pristojni organ in ki:

(i) inaktivira viruse z ovojnico ali

(ii) zmanjša nevarnost prenosa bolezni v naravne vode na sprejemljivo raven;

(d) so namenjene za prehrano ljudi ter so v ta namen pakirane in označene v skladu z Uredbo (ES) št. 853/2004 Evropskega parlamenta in Sveta ([1]) ter:

(i) niso več zmožne preživeti kot žive živali, če so vrnjene v okolje, iz katerega izvirajo, ali

(ii) so namenjene za nadaljnjo predelavo brez začasnega skladiščenja na kraju predelave;

(e) so pošiljke ali proizvodi iz njih namenjeni za prehrano ljudi brez nadaljnje predelave, če so v embalaži za prodajo na drobno, ki je v skladu z določbami za tako embalažo iz Uredbe (ES) št. 853/2004.

3. Pošiljkam iz odstavka 2(a) in (b), ki so namenjene za območja gojenja ali za ponovno nasaditev, je treba priložiti veterinarsko spričevalo, izpolnjeno po vzorcu iz Priloge II k tej uredbi in pojasnjevalnih opombah iz Priloge V k Uredbi (ES) št. 1251/2008.

Člen 4

Odprava ukrepov iz členov 2 in 3

Pristojni organ lahko odpravi nadzorne ukrepe pri zaprtih sistemih, vzpostavljenih v skladu s členom 2(2), in omejitve pri dajanju na trg iz člena 3, potem ko je opravil dva zaporedna pregleda s 15-dnevnim presledkom, ki kažeta, da je povečani pogin prenehal.

Člen 5

Zahteve za dajanje na trg ostrig *Crassostrea gigas* iz kompartmenta, v katerem so se prej izvajali nadzorni ukrepi zaradi povečanega pogina ostrig *Crassostrea gigas* v zvezi z OsHV-1 µvar

1. Ostrige *Crassostrea gigas*, ki se dajejo na trg in izvirajo iz kompartmenta, v katerem so se prej izvajali zadrževalni ukrepi leta 2009 ali leta 2010 zaradi povečanega pogina ostrig *Crassostrea gigas* v zvezi z OsHV-1 µvar:

(a) spremlja veterinarsko spričevalo, izpolnjeno po vzorcu iz Priloge II k tej uredbi in pojasnjevalnih opombah iz Priloge V k Uredbi (ES) št. 1251/2008, če so živali:

(i) namenjene v države članice ali kompartmente, v katerih so vzpostavili program za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar in OsHV-1 µvar ni bil odkrit, ter

(ii) so namenjene za območja gojenja ali za ponovno nasaditev;

(b) izvirajo iz kompartmenta, za katerega je bilo z vzorčenjem in preskušanjem v skladu z delom A Priloge I dokazano, da je prost OsHV-1 µvar; in

(c) izpolnjujejo zahteve za zdravstveno varstvo živali iz vzorca spričevala iz točke (a).

2. Program za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar iz odstavka 1(a)(i) izpolnjuje naslednje zahteve:

(a) program je treba priglasiti Stalnemu odboru za prehranjevalno verigo in zdravje živali;

([1]) UL L 139, 30.4.2004, str. 55.

(b) priglasitev mora biti v skladu s točko 1, točkami 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 in 5.9 ter točkama 6 in 7 vzorca iz Priloge II k Odločbi 2009/177/ES;

(c) program mora vključevati:

(i) vzorčenje v skladu z delom A Priloge I;

(ii) preskušanje na OsHV-1 µvar z diagnostičnimi metodami iz dela B Priloge I.

3. Odstavek 1 se uporablja en teden po dnevu srečanja Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali, na katerem je bil priglašen program iz odstavka 1(a)(i).

Člen 6

Informacijska spletna stran

1. Države članice Komisiji in drugim državam članicam omogočijo dostop do:

(a) seznama zaprtih sistemov in dejavnikov, ki so bili upoštevani pri opredelitvi takih sistemov, vključno z opisom zemljepisnih mej zadevnega območja, ki je bilo vzpostavljeno v skladu s členom 2(2);

(b) seznama kompartmentov, vključno z opisom zemljepisnih mej zadevnega območja:

(i) v katerih so se izvajali zadrževalni ukrepi leta 2009 zaradi povečanega pogina ostrig *Crassostrea gigas* v zvezi z OsHV-1 µvar;

(ii) za katere je bilo s preskušanjem v skladu z deloma A in B Priloge I v vzorcih, odvzetih v zaprtem sistemu, dokazano, da so prosti OsHV-1 µvar;

(c) priglasitev programov iz člena 5(2), vključno z opisom zemljepisnih mej zadevnega območja.

2. Informacije iz odstavka 1 se posodabljajo in so dostopne na informacijskih spletnih straneh, vzpostavljenih v skladu s členom 10 Odločbe 2009/177/ES.

Člen 7

Poročanje

Najpozneje do 1. oktobra 2010 države članice predložijo Komisiji poročilo o programih, priglašenih v skladu s členom 5(2).

Poročilo je v skladu z vzorčnim obrazcem iz Priloge VI k Odločbi 2009/177/ES.

Člen 8

Začetek veljavnosti in uporaba

Ta uredba začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Uporablja se od 15. marca 2010 do 31. decembra 2010.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 2. marca 2010

Za Komisijo

Predsednik

José Manuel BARROSO

PRILOGA I

DEL A

Vzorčenje

1. *Vzorčenje za namene člena 2*

Vzorci iz člena 2 sestojijo iz najmanj 12 osebkov ostrig *Crassotrea gigas*. Pri izboru navedenih živali je treba vzorčiti slabotne, zevajoče ali pred kratkim poginule (nerazpadle) osebke, nabrane v kompartmentu, v katerem je bil opažen pogin.

2. *Vzorčenje za namene člena 3(2)(b) ter člena 5(1)(b) in 5(2)*

(a) Vzorčenje iz člena 3(2)(b) sestoji:

(i) pri ličinkah: iz petih zbirov na pošiljko po najmanj 50 mg celih živali, nabranih med 4 in 8 dnevi po oploditvi, vključno z lupino;

(ii) pri mladicah, manjših od 6 mm: iz 30 zbirov na pošiljko po 300 mg celih živali, vključno z lupino;

(iii) pri ostrigah, večjih od 6 mm: iz 150 osebkov na pošiljko.

Pri izboru navedenih živali je treba v vzorcu sorazmerno upoštevati vse dele pošiljke. Če so navzoče slabotne, zevajoče ali pred kratkim poginule (nerazpadle) živali, se najprej izberejo take živali.

(b) Vzorčenje iz člena 5(2) sestoji iz najmanj 150 osebkov ostrige *Crassotrea gigas* na točko odvzema vzorcev. Vzorčijo se vse ribogojnice ali območja gojenja mehkužcev v državah članicah ali kompartmentih, ki jih zajema program.

Vzorčenje iz člena 5(1)(b) sestoji iz najmanj 150 osebkov ostrige *Crassotrea gigas* na kompartment.

Pri izboru navedenih živali je treba upoštevati naslednja merila:

— če so navzoče slabotne, zevajoče ali pred kratkim poginule (nerazpadle) živali, se najprej izberejo take živali. Če takih živali ni, izbrane živali vključujejo zdrave mehkužce, mlajše od 12 mesecev;

— pri vzorčenju v ribogojnicah, v katerih se za proizvodnjo uporablja več kot en vodni vir, je treba živali, ki predstavljajo vse vodne vire, vključiti za vzorčenje tako, da so vsi deli ribogojnice sorazmerno upoštevani v vzorcu;

— pri vzorčenju na območjih gojenja mehkužcev je treba živali iz zadostnega števila (najmanj treh) točk odvzema vključiti v vzorec tako, da so vsi deli območja gojenja mehkužcev sorazmerno upoštevani v vzorcu, vključno z naravnimi školjčišči na območju gojenja mehkužcev. Glavni dejavniki, ki jih je treba upoštevati za izbor teh točk odvzema, so: predhodno odkritje OsHV-1 µvar na območju, gostota živali, vodni tokovi, batimetrija in upravljavskih praks.

(c) Vzorčenje iz člena 5(2) je treba opravi v obdobju leta, za katerega je znano, da je razširjenost OsHV-1 µvar v državi članici ali kompartmentu največja. Ko tak podatek ni na voljo, se vzorčenje opravi tik po obdobju, ko temperatura vode preseže 16 °C, ali v obdobju leta, ko temperatura običajno doseže letni višek.

(d) Vzorčenje iz člena 5(1)(b) se najraje opravi v obdobju leta iz točke (c). Če se vzorci nabirajo zunaj navedenega obdobja leta, je treba vzorčene ostrige pred preskušanjem vzdrževati pod pogoji, enakovrednim pogojem iz točke (c), in sicer za čas, ki je primeren za odkritje OsHV-1 µ var.

DEL B

Diagnostične metode za odkrivanje OsHV-1 µ var

1. *Področje uporabe*

Ta postopek razlaga standardno diagnostično metodo, ki se uporablja za odkrivanje OsHV-1 µ var in identifikacijo z verižno reakcijo s polimerazo (v nadaljnjem besedilu: PCR). Metoda omogoča razločevanje OsHV-1 od OsHV-1 µ var.

Po potrebi lahko laboratoriji spremenijo metode iz te priloge za optimizacijo pogojev za reakcijo ter prilagajanje laboratorijski opremi in razmeram, če je mogoče dokazati enako občutljivost in specifičnost.

2. *Opredelitev pojmov*

OsHV-1 µ var je opredeljen v členu 1 te uredbe.

3. *Oprema in razmere okolja*

Diagnostični preskus, ki se uporablja za odkrivanje OsHV-1 µ var in identifikacijo s PCR, zahteva, da so oprema in razmere okolja, ki se klasično uporabljajo za teste PCR, naslednje:

— zaprt pokrov, opremljen s sistemom za UV sevanje za preprečitev morebitne kontaminacije pri pripravi mešanice za PCR,

— dve popolni seriji pipet (2 µl; 20 µl; 200 µl in 1 000 µl), prva za ekstrakcijo DNK, druga za pripravo mešanice za PCR,

— tri različne pipete: ena pipeta (2 µl) za pipetiranje vzorcev v mešanico za PCR, ena pipeta (20 µl) za vzorčenje EB in druga pipeta (20 µl) za nanašanje produktov PCR v agarozne gele,

— pipetne konice s filtrom (2 µl; 20 µl; 200 µl in 1 000 µl) za ekstrakcijo DNK, pripravo mešanice za PCR in pipetiranje vzorcev,

— pipetne konice (20 µl) za zbiranje EB in nanašanje pomnoževalnih produktov v agarozni gel,

— ciklični termostat za izvajanje pomnoževanja,

— vodoravni elektroforezni sistem za elektroforezo produktov PCR,

— UV transiluminator za opazovanje produktov PCR po agarozni gelski elektroforezi,

— sistem za slikanje gelov.

Izvajalec mora nositi zaščitno haljo in rokavice pri vseh različnih korakih, ki so opisani v nadaljevanju. Po možnosti je treba zamenjati zaščitno haljo in rokavice po vsakem večjem koraku: ekstrakciji DNK, pripravi mešanice za PCR, pipetiranju vzorcev, pomnoževanju in nanašanju v gel.

Priporoča se, da se ti različni koraki opravijo v različnih prostorih. Natančneje, pomnoževanje in nanašanje v gel/elektroforeza morata potekati v prostoru, ki je ločen od ekstrakcije DNK, priprave mešanice za PCR in dodajanja DNK.

4. *Postopek*

4.1 Priprava vzorca

Žive ali pred kratkim poginule (nerazpadle) ostrige, ki jih je mogoče prej zamrzniti, se pripravijo za ekstrakcijo DNK.

Vzorci se glede na velikost pripravijo različno:

(a) za ličinke: se zbiri po 50 mg celih živali (vključno z lupino), ki se jim doda 200 µl destilirane vode, strejo in 1 minuto centrifugirajo pri 1 000 g;

(b) za mladice, manjše od 6 mm: se zbiri po 300 mg celih živali (vključno z lupino), ki se jim doda 1 200 µl destilirane vode, strejo in 1 minuto centrifugirajo pri 1 000 g;

(c) za mladice, velike med 6 in 15 mm: se vsa mehka tkiva vsake živali strejo posamezno;

(d) za živali, večje od 15 mm: se izolirajo deli škrg in plašča.

Ekstrakcija DNK se opravi z uporabo QIAamp® DNA Mini Kita (QIAGEN) in upoštevanjem navodil iz postopka za preskušanje tkiva.

Nadaljnja priprava vzorca poteka v naslednjem vrstem redu:

1. Položimo 100 µl supernatanta za vzorce iz točk (a) in (b) ali 10 do 50 mg tkiv za vzorce iz točk (c) in (d) v 1,5-mililitrsko epruvetko za mikrocentrifugiranje ter dodamo 180 µl pufra ATL.

2. Dodamo 20 µl proteinaze K, zmešamo z vrtinčenjem in inkubiramo pri 56 °C, dokler tkivo ni popolnoma lizirano (čez noč). Občasno vrtinčimo med inkubacijo, da se vzorec razprši. Na kratko centrifugiramo 1,5-mililitrsko epruvetko za mikrocentrifugiranje, da odstranimo kapljice s pokrovčka.

3. Vzorcu dodamo 200 µl pufra AL, mešamo 15 sekund s pulznim vrtinčenjem in 10 minut inkubiramo pri 70 °C. Na kratko centrifugiramo 1,5-mililitrsko epruvetko za mikrocentrifugiranje, da odstranimo kapljice s pokrovčka.

4. Vzorcu dodamo 200 µl etanola (96–100 %) in mešamo 15 sekund s pulznim vrtinčenjem. Na kratko centrifugiramo 1,5-mililitrsko epruvetko za mikrocentrifugiranje, da odstranimo kapljice s pokrovčka.

5. Previdno prelijemo mešanico iz koraka 4 v kolono QIAamp Spin Column (v 2-mililitrsko zbiralno epruvetko), ne da bi zmočili rob. Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto pri 10 000 obratih na minuto. Položimo kolono QIAamp Spin Column v čisto 2-mililitrsko zbiralno epruvetko (priloženo v kitu) in zavržemo epruvetko, ki vsebuje filtrat.

6. Previdno odpremo kolono QIAamp Spin Column in dodamo 500 µl pufra AW1, ne da bi zmočili rob. Zapremo pokrovček in centrifugiramo 1 minuto pri 10 000 obratih na minuto. Položimo kolono QIAamp Spin Column v čisto 2-mililitrsko zbiralno epruvetko (priloženo v kitu) in zavržemo zbiralno epruvetko, ki vsebuje filtrat.

7. Previdno odpremo kolono QIAamp Spin Column in dodamo 500 µl pufra AW2, ne da bi zmočili rob. Zapremo pokrovček in centrifugiramo 3 minute pri polni hitrosti (14 000 obratov na minuto).

8. (Neobvezno) položimo kolono QIAamp Spin Column v novo 2-mililitrsko zbiralno epruvetko (ki ni priložena v kitu) in zavržemo zbiralno epruvetko, ki vsebuje filtrat. Centrifugiramo 1 minuto pri polni hitrosti (14 000 obratov na minuto).

9. Položimo kolono QIAamp Spin Column v čisto 1,5-mililitrsko epruvetko za mikrocentrifugiranje (ki ni priložena v kitu) in zavržemo zbiralno epruvetko, ki vsebuje filtrat. Previdno odpremo kolono QIAamp Spin Column in dodamo 100 µl destilirane vode. Inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi in centrifugiramo 1 minuto pri 10 000 obratih na minuto.

10. Pregledamo kakovost in učinkovitost ekstrakcije (na primer z merjenjem vsebnosti raztopljenega kisika (260 nm) pod spektrofotometrom ali po agarozni gelski elektroforezi).

11. Pripravimo razredčino vzorcev, da je končna koncentracija DNK 50–100 ng/µl.

12. Raztopine DNK se hranijo pri 4 °C do opravljene analize PCR.

Za ekstrakcijo DNK se lahko uporabljajo drugi komercialni kiti, če je dokazano, da dajo podobne rezultate.

4.2 *Verižna reakcija s polimerazo (PCR)*

4.2.1 Reagenti

— 10 X pufer (priložen s Taq DNA polimerazo)

— $MgCl_2$ (priložen z DNA polimerazo) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM), pred uporabo je treba 10-kratno razredčiti (pri 2 mM)

— d H_2O (destilirana H_2O brez DNK in RNK)

4.2.2 Temeljni premazi

Uporabiti je treba naslednje temeljne premaze ([1]):

CF (10 µM),

CR (10 µM).

4.2.3 Mešanica za PCR

Mešanica za PCR za vsako epruvetko je:

	Prostornina epruvete	Končna koncentracija
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
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl te mešanice za PCR se da v vsako epruvetko za PCR,

— 1 µl ekstrahirane DNK (50–100 ng/µl) se doda v vsako epruvetko.

4.2.4 Kontrole

Uporabljata se dve vrsti kontrole:

— negativne kontrole sestojijo iz dH_2O (1 µl na 49 µl mešanice za PCR). Namenjene so odkrivanju morebitne reaktivne kontaminacije ali delovnega okolja. Po eno negativno kontrolo je treba vključiti vsakih 10 vzorcev ali po vsaki seriji vzorcev,

([1]) Te temeljne premaze ali njihove opise je mogoče dobiti pri referenčnem laboratoriju Skupnosti za bolezni mehkužcev (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francija).

— pozitivne kontrole sestojijo iz plazmidne DNK, ki vsebuje ciljno regijo CF-CR genoma OsHV-1. Namenjene so preverjanju učinkovitosti reakcije PCR. Po eno pozitivno kontrolo je treba vključiti v vsako analizo PCR. Pozitivne kontrole je mogoče dobiti pri referenčnem laboratoriju Skupnosti.

4.2.5. Pomnoževanje

Cikli pomnoževanja potekajo v cikličnem termostatu:

— začetna denaturacija: 2 minuti pri 94 °C,

— pomnoževanje: 35 ciklov (1 minuto pri 94 °C, 1 minuto pri 50 °C in 1 minuto pri 72 °C),

— končno podaljševanje: 5 minut pri 72 °C.

4.3 *Elektroforeza*

4.3.1 Reagenti

— 50 X TAE (lahko se kupi že pripravljen za uporabo):

Tris base (40 mM) 242 g,

ledena ocetna kislina (40 mM) 57,1 ml,

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

dH_2O za 1 liter.

Popravimo na pH 8.

— Agarozni gel 2,5 % v 1X TAE:

etidijev bromid (0,5 µg/ml), ki se doda po ohladitvi gela.

— Modro barvilo za nanašanje:

bromfenol modro 0,25 %,

ksilen cianol FF 0,25 %,

saharoza 40 %.

Hranimo pri 4 °C.

Uporabimo 6 krat razredčeno (2 µl modrega puferja za nanašanje na 10 µl produktov PCR).

— Označevalec molekularne mase:

SmartLadder SF (Eurogentec): označevalec molekularne mase, ki je že pripravljen za uporabo in vključuje 9 enakomerno razporejenih prog od 100 do 1 000 bp.

4.3.2 Priprava agaroznega gela

1. Stehtamo 2,5 g agaroze, dodamo 100 ml 1X TAE in grejemo, dokler se mešanica ne stopi.

2. Po ohladitvi raztopine dodamo etidijev bromid (5 µl za 100 ml agaroznega gela) in prelijemo raztopino v posebni kalup, opremljen z glavnički (za oblikovanje vdolbin).

3. Ko se gel polimerizira, se glavnički odstranijo in postavijo v vodoraven elektroforezni sistem, ki vsebuje dovolj 1X TAE za prekritje agaroznega gela.

4. 10 µl produktov PCR zmešamo z 2 µl modrega barvila (6X) in prelijemo v vdolbine.

5. Ena vdolbina je namenjena označevalcu molekularne mase (5 µl).

6. Držimo pod napetostjo 50 do 150 voltov od 30 minut do 1 ure, odvisno od velikosti in gostote gela.

7. Opazujemo gel pod UV.

4.4 *Interpretacija*

Navzočnost OsHV-1 µvar v vzorcu se pokaže s pojavom proge ustrezne velikosti (157 bp namesto 173 bp za OsHV-1) na 2,5-odstotnem agaroznem gelu ob vseh negativnih kontrolah, ki so negativne, in vseh pozitivnih kotrolah, ki so pozitivne.

DEL C

Opredelitev zaprtega sistema

Pri opredelitvi zaprtega sistema v skladu s členom 2(2) je treba upoštevati naslednje dejavnike, ki vplivajo na nevarnost širjenja bolezni:

(a) število, stopnja in porazdelitev mehkužcev v okuženi ribogojnici ali na območju gojenja mehkužcev;

(b) razdalja in gostota sosednjih ribogojnic ali območij gojenja mehkužcev;

(c) bližina obratov za predelavo, ribogojnice ali območja gojenja mehkužcev v stiku;

(d) vrste, ki so navzoče v ribogojnici ali na območju gojenja mehkužcev;

(e) načini gojenja, ki se uporabljajo pri prizadetih in sosednjih ribogojnicah ali območjih gojenja mehkužcev, ter

(f) hidrodinamične razmere in drugi ugotovljeni dejavniki epizootiološkega pomena.

PRILOGA II

Vzorec veterinarskega spričevala za dajanje na trg ostrig *Crassostrea gigas*, namenjenih za območja gojenja in za ponovno nasaditev

EVROPSKA UNIJA — **Spričevalo za trgovino med državami članicami Evropske skupnosti**

Del I: Podatki o predloženi pošiljki

I.1. Pošiljatelj Ime Naslov Poštna koda	I.2. Referenčna številka spričevala	I.2.a. Lokalna referenčna številka:
	I.3. Osrednji pristojni organ	
	I.4. Lokalni pristojni organ	
I.5. Prejemnik Ime Naslov Poštna koda	I.6.	
	I.7.	
I.8. Država izvora ISO koda	I.9.	
I.10. Namembna država ISO koda	I.11.	
I.12. Kraj izvora/Območje nabiranja Dogovorjeno gojišče ☐ Drugo ☐ Ime Številka odobritve Naslov Poštna koda	I.13. Namembni kraj Dogovorjeno gojišče ☐ Drugo ☐ Ime Številka odobritve Naslov Poštna koda	
I.14. Kraj natovarjanja Poštna koda	I.15. Datum in čas pošiljanja	
I.16. Prevozno sredstvo Letalo ☐ Ladja ☐ Železniški vagon ☐ Cestno prevozno sredstvo ☐ Drugo ☐ Identifikacija:	I.17. Prevoznik Ime Številka odobritve Naslov Poštna koda Država članica	
I.18. Živalska vrsta/Proizvod	I.19. Koda blaga (CN koda) **03.07**	
	I.20. Število/količina	
I.21.	I.22. Število pakiranj	
I.23. Identifikacija kontejnerja/Številka zalivke	I.24. Vrsta pakiranja	
I.25. Živali certificirane za/proizvodi certificirani za Vzrejo ☐ Obnova populacije ☐		
I.26. Tranzit prek tretje države ☐ Tretja država ISO koda Izhodna točka Koda Vhodna točka BIP unit no.:	I.27. Tranzit prek držav članic ☐ Država članica ISO koda Država članica ISO koda Država članica ISO koda	
I.28. Izvoz ☐ Tretja država ISO koda Izhodna točka Koda	I.29.	
I.30.		
I.31. Identifikacija živali Vrsta (Znanstveno ime) Količina		

EVROPSKA UNIJA

Vzorec veterinarskega spričevala za dajanje na trg ostrig *Crassostrea gigas*, namenjenih za območja gojenja in za ponovno nasaditev

Del II: Certificiranje

II. **Podatki o zdravstvenem stanju**	II.a. Referenčna številka spričevala	II.b.

(1)(2)**[II.1 Zahteve za ostrige *Crassostrea gigas*, ki izvirajo iz zaprtega sistema, vzpostavljenega v skladu s členom 2 Uredbe (EU) št. 175/2010**

Spodaj podpisani uradni inšpektor potrjujem, da ostrige *Crassostrea gigas* iz dela I tega spričevala:

II.1.1 izvirajo z območja, na katerem se izvajajo ukrepi za nadzor bolezni zaradi povečanega pogina ostrig *Crassostrea gigas* v povezavi z OsHV-1 µvar;

(1)[II.1.2 se smejo dajati na trg v skladu s členom 3(2)(a) Uredbe (EU) št. 175/2010;]

(1)[II.1.2 izvirajo iz dela zaprtega sistema, ki ga povečani pogin ni prizadel, pošiljka pa je bila za ostrige *Crassostrea gigas* vzorčena in preskušena v skladu s Prilogo I k Uredbi (EU) št. 175/2010 z negativnim rezultatom;]]

(1)(3)**[II.2 Zahteve za ostrige *Crassostrea gigas*, ki izvirajo iz države članice ali kompartmenta, v katerih so se izvajali zadrževalni ukrepi zaradi povečanega pogina ostrig *Crassostrea gigas* v povezavi z OsHV-1 µvar, in so namenjene v države članice ali kompartmente, v katerih se izvaja program za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar**

Spodaj podpisani uradni inšpektor potrjujem, da ostrige *Crassostrea gigas* iz dela I tega spričevala:

II.2.1 prihajajo iz ribogojnice ali z območja gojenja mehkužcev, pri katerih po evidencah ribogojnice ali območja gojenja mehkužcev ni znakov povečanega pogina;

II.2.2 izvirajo iz kompartmenta, za katerega je bilo dokazano, da je glede ostrig *Crassostrea gigas* prost OsHV-1 µvar, z vzorčenjem in preskušanjem v skladu s Prilogo I k Uredbi (EU) št. 175/2010.]

II.3 Zahteve za prevoz in označevanje

Spodaj podpisani uradni inšpektor potrjujem, da:

II.3.1 ostrige *Crassostrea gigas* iz dela I tega spričevala izpolnjujejo pogoje, vključno s kakovostjo vode, ki ne spreminjajo njihovega zdravstvenega stanja;

II.3.2 je zabojnik čist in razkužen ali še neuporabljen;

II.3.3 je pošiljka opremljena s čitljivo oznako na zunanji strani zabojnika ali na ladijskem tovornem listu, kadar se prevaža s čolnom s posodami za prevažanje živali, z ustreznimi informacijami, navedenimi v rubrikah I.8 do I.13 dela I tega spričevala, in naslednjo izjavo:

ali (1)[„Ostrige *Crassostrea gigas*, ki so namenjene za gojenje/ponovno nasaditev na območju, na katerem se izvaja program za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar“]

ali (1)[„Ostrige *Crassostrea gigas*, ki so namenjene za gojenje/ponovno nasaditev na območju, na katerem se izvajajo ukrepi za nadzor bolezni, in ki izvirajo z območja, na katerem se izvajajo ukrepi za nadzor bolezni“].

Opombe

Del I:

— Rubrika I.12: Če je primerno, uporabite številko pooblastila za zadevno ribogojnico ali območje gojenja mehkužcev.

— Rubrika I.13: Če je primerno, uporabite številko pooblastila za zadevno ribogojnico ali območje gojenja mehkužcev.

— Rubriki I.20 in 1.31: Pri količini navedite celotno število.

— Rubrika I.25: Uporabite možnost „reja“, če so živali namenjene za gojenje, „ponovna nasaditev“, če so namenjene za ponovno nasaditev.

EVROPSKA UNIJA

Vzorec veterinarskega spričevala za dajanje na trg ostrig *Crassostrea gigas*, namenjenih za območja gojenja in za ponovno nasaditev

II. **Podatki o zdravstvenem stanju**	II.a. Referenčna številka spričevala	II.b.

Part II:

([1]) Neustrezno črtati.

([2]) Del II.1 tega spričevala se uporablja za pošiljke ostrig *Crassostrea gigas*, ki izvirajo iz zaprtega sistema, vzpostavljenega v skladu s členom 2(2) Uredbe (EU) št. 175/2010, in ki smejo v skladu s členom 3(2)(a) ali (b) navedene uredbe zapustiti navedeno območje.

([3]) Del II.2 tega spričevala se uporablja za pošiljke ostrig *Crassostrea gigas* iz člena 5(1) Uredbe (EU) št. 175/2010, ki so namenjene v države članice ali kompartmente, v katerih se izvaja program za zgodnje odkrivanje OsHV-1 µvar, in ki izvirajo z območja, na katerem so se prej izvajali zadrževalni ukrepi zaradi povečanega pogina pri ostrigah *Crassostrea gigas*.

Uradni veterinar ali uradni inšpektor

Ime (z velikimi tiskanimi črkami): Izobrazba in naziv:

Lokalna veterinarska enota: LVE št.:

Datum: Podpis:

Žig: