Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

►**B** **РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 175/2010 НА КОМИСИЯТА**

от 2 март 2010 година

за прилагане на Директива 2006/88/ЕО на Съвета по отношение на мерките за борба с повишената смъртност при стридите от вида *Crassostrea gigas* във връзка с откриването на Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(текст от значение за ЕИП)

(ОВ L 52, 3.3.2010 г., стр. 1)

Изменен със:

		Официален вестник		
		№	страница	дата
►**M1**	Регламент (ЕС) № 1153/2010 на Комисията от 8 декември 2010 година	L 324	39	9.12.2010 г.

▼B

РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 175/2010 НА КОМИСИЯТА

от 2 март 2010 година

за прилагане на Директива 2006/88/ЕО на Съвета по отношение на мерките за борба с повишената смъртност при стридите от вида *Crassostrea gigas* във връзка с откриването на Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Директива 2006/88/ЕО на Съвета от 24 октомври 2006 г. относно ветеринарномедицинските изисквания за аквакултури и продукти от тях и за предотвратяване и борба с някои болести по водните животни ([1]), и по-специално член 41, параграф 3 и член 61, параграф 3 от нея,

като има предвид, че:

(1) Директива 2006/88/ЕО определя ветеринарномедицинските изисквания, които трябва да се прилагат за пускането на пазара на аквакултури и продукти от тях. Освен това тя определя минималните предпазни мерки, които се прилагат в случай на съмнение или огнище на някои болести по водните животни.

(2) Член 41 от посочената директива предвижда държавите-членки да предприемат необходими мерки за борба при възникване на болест и предпазване от разпространение на тези болести. В случай на ситуация с възникване на болест засегнатата държава-членка информира Комисията, държавите-членки и държавите-членки на ЕАСТ незабавно, когато резултатите са от епидемиологично значение за друга държава-членка.

(3) Повишена смъртност при стриди от вида *Crassostrea gigas* (тихоокеански стриди) е установена в няколко района във Франция и в Ирландия в края на пролетта и през лятото на 2008 година. Това беше отдадено на съчетанието от неблагоприятни екологични фактори заедно с наличието на бактерии от рода вибрион (Vibrio) и наличието на Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), включително неотдавна описан генотип на този вирус, наречен OsHV-1 µvar.

(4) Френските органи информираха Комисията, държавите-членки и държавите-членки на ЕАСТ за ситуацията и за предприетите мерки през август 2008 година, като въпросът беше отнесен до вниманието на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните през септември 2008 г.

(5) През пролетта на 2009 г. отново беше установена повишена смъртност във Франция, Ирландия и Нормандските острови, която беше отдадена на същото съчетание от фактори. Въпреки че причините за смъртността все още не са установени, предвид предприетите епидемиологични изследвания в Ирландия и Обединеното кралство през 2009 г. се предполага, че OsHV-1 µvar е основен фактор за смъртността.

([1]) ОВ L 328, 24.11.2006 г., стр. 14.

▼B

(6) Компетентните органи на посочените държави-членки и на Нормандските острови информираха Комисията за ситуацията и за взетите мерки, като въпросът беше отнасян многократно до вниманието на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните.

(7) Ограничителните мерки, предприети от компетентните органи на посочените държави-членки и на Нормандските острови за борба в ситуация на възникваща болест, бяха основани предимно на ограничаване движението на стриди от вида *Crassostrea gigas* извън районите, засегнати от повишена смъртност.

(8) Предвид повторната поява на ситуацията с възникваща болест през 2009 г. и нейното възможно повторение и риска от по-нататъшно разпространение през пролетта и лятото на 2010 г., както и въз основа на натрупания опит, е целесъобразно и необходимо да се разширят вече взетите от засегнатите държави-членки мерки.

(9) Необходимо е мерките по отношение на тази ситуация на възникваща болест да се координират на равнище Европейски съюз, за да се осигурят еднакви условия за прилагането на изискванията на Директива 2006/88/ЕО по отношение на възникващи болести и да се гарантира, че предприетите мерки осигуряват достатъчна защита срещу по-нататъшно разпространение, без да налагат ненужни ограничения на движението на стридите от вида *Crassostrea gigas*.

(10) Когато компетентните органи бъдат информирани, че е установена повишена смъртност при стриди от вида *Crassostrea gigas*, следва да се вземат проби и да се направят изследвания, за да се установи или изключи наличието на OsHV-1 μvar.

(11) Когато наличието на вирус от генотип OsHV-1 μvar бъде потвърдено, държавите-членки следва да приложат мерки за борба с болестта, включително създаване на ограничителна зона. Когато се определя ограничителната зона, следва да се вземат предвид някои фактори, изложени в настоящия регламент. Тези мерки за борба с болестта трябва да продължат, докато проверките покажат, че повишената смъртност е овладяна.

(12) С оглед намаляване на риска от разпространение на болестта следва да се въведе ограничение на движенията извън ограничителната зона на стриди от вида *Crassostrea gigas*. Следва обаче да се предвидят определени дерогации за случаите, в които рискът от разпространение на болестта е по-малък. Тези дерогации засягат движението на някои стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за райони за отглеждане или повторно полагане в друга ограничителна зона или предназначени за консумация от човека. С оглед гарантирането на проследяемост на пратките със стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за район за отглеждане или повторно полагане, те следва да се придружават от ветеринарномедицински сертификат. Когато се попълва сертификатът, следва да се вземат предвид обяснителните бележки, посочени в приложение V към Регламент (ЕО) № 1251/2008 на Комисията от 12 декември 2008 г. за прилагане на Директива 2006/88/ЕО на Съвета по отношение на условията и изискванията за сертифициране при пускането на пазара и вноса в Общността на аквакултури и продукти от тях и за установяване на списък с векторни видове ([1]).

([1]) ОВ L 337, 16.12.2008 г., стр. 41.

▼B

(13) Държавите-членки могат да пожелаят да въведат програми за целенасочено вземане на проби и изследване за ранното откриване на OsHV-1 µvar с цел придобиване на повече познания за положението на тази ситуация на възникваща болест в Съюза и особено в държави-членки и отделни части, които все още не са засегнати, както и да гарантират ранно откриване на всяка поява на OsHV-1 µvar. За стриди от вида *Crassostrea gigas*, произхождащи от зони, които са били приложени ограничителни мерки през 2009 г. в съответствие с национални мерки или през 2010 г. в съответствие с настоящия регламент, следва да се въведат допълнителни ветеринарномедицински изисквания, ако се внасят с цел отглеждане или повторно полагане в държави-членки или отделни части, обхванати от подобна програма, при условие че в посочената държава-членка или отделна част не е открит OsHV-1 µvar.

(14) С оглед гарантиране съпоставимостта на събираните данни в различните държави-членки в контекста на програмите за целенасочено вземане на проби и изследване за ранно откриване на OsHV-1 µvar, следва да се определят някои изисквания към съдържанието на тези програми.

(15) Наличието на точна и навременна информация за ситуацията по отношение на откриването на OsHV-1 µvar в държавите-членки е ключов елемент за осигуряването на правилна борба в ситуация на възникваща болест. За тази цел държавите-членки следва да информират Комисията и другите държави-членки без неоснователно забавяне за първото потвърдено наличие на вируса OsHV-1 µvar на техните територии през 2010 г.

(16) В допълнение би следвало да се използват информационните страници в интернет, създадени в съответствие с член 10 от Решение 2009/177/ЕО на Комисията от 31 октомври 2008 г. за прилагане на Директива 2006/88/ЕО на Съвета по отношение на програмите за надзор и ликвидиране и статута на свободни от заболяване държави-членки, зони и отделни части ([1]).

(17) С оглед гарантирането на прозрачност и навременен достъп до съответната информация за ситуацията на възникваща болест държавите-членки следва да предоставят на Европейската комисия и на другите държави-членки информация относно ограничителните зони, районите, които преди са били обект на ограничителни мерки, но в които е доказана липсата на OsHV-1 µvar, създадените програми за ранно откриване на OsHV-1 µvar.

(18) Предвидените мерки в настоящия регламент следва да се прилагат до края на декември 2010 г., тъй като все още има голяма несигурност по отношение на ситуацията на възникваща болест.

(19) Предвидените мерки в настоящия регламент са в съответствие със становището на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните,

([1]) ОВ L 63, 7.3.2009 г., стр. 15.

▼B

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Определение

За целите на настоящия регламент OsHV-1 µvar означава генотип на вируса *Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1)*, който е определен на базата на частични данни за последователността, показващи системна делеция на 12 базови двойки в ORF 4 на генома в сравнение с OsHV-1 (GenBank № AY509253).

Член 2

Вземане на проби, изследване и създаване на ограничителни зони

1. При откриване на повишена смъртност при стриди от вида *Crassostrea gigas* компетентният орган:

а) взема проби в съответствие с част А на приложение I;

б) прави изследване за наличие на OsHV-1 µvar в съответствие с диагностичните методи, посочени в част Б на приложение I.

2. Когато резултатите от изследванията, посочени в параграф 1, буква б), показват наличието на OsHV-1 µvar, компетентният орган създава ограничителна зона. Тази зона се определя на базата на анализ на всеки отделен случай, като се вземат предвид факторите, които влияят на риска от разпространяване на болестта, посочена в част В на приложение I.

3. Държавите-членки информират Комисията и другите държави-членки без неоснователно забавяне за първата създадена ограничителна зона на тяхната територия през 2010 г.

Член 3

Изисквания за пускане на пазара на стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от ограничителна зона, посочена в член 2

1. Стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от ограничителни зони, създадени в съответствие с член 2, параграф 2, не следва да се местят от тази зона.

2. Чрез дерогация от параграф 1 пратки стриди от вида *Crassostrea gigas* могат да се местят от ограничителната зона, когато:

а) са предназначени за друга ограничителна зона, създадена в съответствие с член 2, параграф 2;

б) са с произход от част от ограничителната зона, включително развъдници, която не е засегната от повишената смъртност и пратката е била обект на:

i) вземане на проби в съответствие с част А на приложение I; и

ii) изследване за наличие на OsHV-1 µvar в съответствие с диагностичните методи, посочени в част Б на приложение I, и всички резултати са отрицателни;

▼B

в) преди консумация от човека са предназначени за по-нататъшна преработка, пречиствателни центрове, центрове за изпращане или преработвателни предприятия, които са оборудвани с одобрена от компетентния орган система за обработка на отпадните води, която:

i) инактивира вирусите с обвивка или

ii) намалява риска от предаване на болести към природните води до приемливо ниво;

г) са предназначени за консумация от човека и са опаковани и етикетирани за тази цел в съответствие с Регламент (ЕО) № 853/2004 на Европейския парламент и на Съвета ([1]) и:

i) вече не са в състояние да оцелеят като живи животни, ако бъдат върнати в средата, от която произхождат; или

ii) са предназначени за по-нататъшна преработка без временно съхраняване на мястото на преработка;

д) пратките или продуктите от тях са предназначени за консумация от човека без по-нататъшна преработка, при условие че те са пакетирани в опаковки за търговия на дребно, които отговарят на разпоредбите за такива опаковки от Регламент (ЕО) № 853/2004.

3. Посочените в параграф 2, букви а) и б) пратки, които са предназначени за райони за отглеждане или повторно полагане, се придружават от ветеринарномедицински сертификат, попълнен в съответствие с образеца, посочен в приложение II към настоящия регламент, и обяснителните бележки, посочени в приложение V към Регламент (ЕО) № 1251/2008.

Член 4

Вдигане на мерките, предвидени в членове 2 и 3

Компетентният орган може да вдигне мерките за борба по отношение на ограничителните зони, създадени в съответствие с член 2, параграф 2, както и на ограниченията за пускане на пазара, предвидени в член 3, след като е направил две последователни проверки през интервал от 15 дни, които показват, че повишената смъртност е овладяна.

Член 5

Изисквания за пускане на пазара на стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от отделна част, за която преди това са били приложени мерки за борба поради повишена смъртност при стриди от вида *Crassostrea gigas* във връзка с OsHV-1 µvar

1. Стридите от вида *Crassostrea gigas*, които се пускат на пазара и са с произход от отделна част, за която са били приложени ограничителни мерки през 2009 г. или през 2010 г. поради повишена смъртност при стриди от вида *Crassostrea gigas* във връзка с OsHV-1 µvar:

а) се придружават от ветеринарномедицински сертификат, попълнен в съответствие с образеца, посочен в приложение II към настоящия регламент, и обяснителните бележки, посочени в приложение V към Регламент (ЕО) № 1251/2008, ако животните:

i) са предназначени за държави-членки или отделни части, които са създали програма за ранно откриване на OsHV-1 µvar и в които OsHV-1 µvar не е открит, и

([1]) ОВ L 139, 30.4.2004 г., стр. 55.

▼B

ii) са предназначени за райони за отглеждане или повторно полагане;

б) са с произход от отделна част, в която е доказана липсата на OsHV-1 µVar чрез вземане на проби и изследвания, проведени в съответствие с част А на приложение I; и

в) отговарят на ветеринарномедицинските изисквания, изложени в образеца на сертификата, посочен в буква а).

2. Програмата за ранно откриване на OsHV-1 µvar, посочена в параграф 1, буква а), подточка i), отговаря на следните изисквания:

а) програмата трябва да бъде декларирана пред Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните;

б) тази декларация трябва да бъде в съответствие с точки 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 и 7 от образеца, посочен в приложение II към Решение 2009/177/ЕО;

в) програмата трябва да включва:

i) вземане на проби в съответствие с част А на приложение I;

ii) изследване за наличие на OsHV-1 µvar в съответствие с диагностичните методи, посочени в част Б на приложение I.

3. Параграф 1 се прилага една седмица след датата на заседанието на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните, на което е декларирана програмата, посочена в параграф 1, буква а), подточка i).

Член 6

Информационна страница в интернет

1. Държавите-членки предоставят на Комисията и на другите държави-членки:

а) списък на ограничителните зони и взетите под внимание фактори при определянето на такива зони, включително описание на географските граници на съответната зона, създадена в съответствие с член 2, параграф 2;

б) списък на отделните части, включително описание на географските граници на съответната зона:

i) за които са прилагани ограничителни мерки през 2009 г. поради повишена смъртност на стриди от вида *Crassostrea gigas* във връзка с OsHV-1 µvar;

ii) когато липсата на OsHV-1 µvar е била доказана чрез изследвания на проби, взети от ограничителната зона, проведени в съответствие с части А и Б на приложение I;

в) декларации за програми, посочени в член 5, параграф 2, включително описание на географските граници на съответната зона.

2. Предвидената в параграф 1 информация се поддържа актуална и е на разположение чрез информационните страници в интернет, създадени в съответствие с член 10 от Решение 2009/177/ЕО.

▼B

Член 7

Доклади

Не по-късно от 1 октомври 2010 г. държавите-членки представят на Комисията доклад относно програмите, които са декларирани в съответствие с член 5, параграф 2.

Докладът е в съответствие с образеца, изложен в приложение VI към Решение 2009/177/ЕО.

Член 8

Влизане в сила и прилагане

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Той се прилага от 15 март 2010 г. до ►M1 30 април 2011 г. ◄

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ I

ЧАСТ А

Вземане на проби

1. *Вземане на проби за целите на член 2*

Предвидените в член 2 проби се състоят от най-малко 12 екземпляра стриди от вида *Crassostrea gigas*. Когато се подбират тези животни, се взема проба от слаби, отворени или току-що умрели екземпляри (неразложени), като екземплярите се събират от отделната част, където се наблюдава смъртността.

2. *Вземане на проби за целите на член 3, параграф 2, буква б), член 5, параграф 1, буква б) и член 5, параграф 2*

а) Вземането на проби за целите на член 3, параграф 2, буква б) се състои от:

i) за ларви — по пет пула по най-малко 50 mg от цели животни, взети в периода между 4 и 8 дни след фертилизацията, включително черупка, на пратка;

ii) за хайвер, по-малък от 6 mm — по 30 пула по 300 mg от цели животни, включително черупка, на пратка;

iii) за стриди, по-големи от 6 mm — по 150 екземпляра на пратка.

Когато се подбират тези животни, всички части на пратката са представени пропорционално в пробата. Ако има слаби, отворени или току-що умрели (неразложени) животни, подбират се предимно такива животни.

б) Вземането на проби за целите на член 5, параграф 2 се състои от най-малко 150 екземпляра от *Crassotrea gigas* от точката на вземане на пробата. Проби се вземат от всички стопанства или райони за отглеждане на мекотели в държавата-членка или отделната част, която е обхваната от програмата.

Вземането на проби за целите на член 5, параграф 1, буква б) се състои от поне 150 екземпляра стриди от вида *Crassotrea gigas* на отделна част.

Когато се подбират тези животни, се вземат под внимание следните критерии:

— ако има налични слаби, отворени или току-що умрели (неразложени) животни, подбират се предимно такива животни. Ако няма такива животни, подбраните животни включват здрави мекотели на възраст под 12 месеца,

— когато се вземат проби от стопанства, в които за производство се използва повече от един водоизточник, животни от всички водоизточници трябва да се включат за вземане на проба по такъв начин, че всички части от стопанството да бъдат представени пропорционално в пробата,

— когато се вземат проби от райони за отглеждане на мекотели, се вземат животни от достатъчен брой точки за вземане на проба, най-малко три точки, като се включват в пробата по такъв начин, че всички части на района за отглеждане на мекотели да бъдат представени пропорционално в пробата, включително наличните естествени струпвания от мекотели в района. Основните фактори, които се отчитат при подбирането на тези точки за вземане на проби, са: откриване в миналото на OsHV-1 µvar в района, гъстота на зарибяване, водни течения, батиметрични характеристики на басейна и управленски практики;

▼B

в) вземането на проби, предвидено в член 5, параграф 2, се извършва в периода на годината, когато е известно, че разпространението на OsHV-1 µvar в държавата-членка или в отделната част е най-голямо. Когато такива данни не са налични, вземането на проби се извършва непосредствено след периода, когато температурата на водата надвиши 16 °C, или по това време от годината, когато температурата обикновено достига своя годишен максимум;

г) вземането на проби, предвидено в член 5, параграф 1, буква б), се извършва за предпочитане в периода на годината, описан в буква в). Ако пробите се вземат извън този период на годината, преди да бъдат изследвани стридите, взети за проба, трябва да се поддържат при условия, еквивалентни на описаните в буква в), за срок, който е подходящ за откриване на OsHV-1 µvar.

ЧАСТ Б

Диагностични методи за откриване на OsHV-1 µvar

1. *Обхват*

Настоящата процедура обяснява стандартен диагностичен метод, използван за откриване и идентификация на OsHV-1 µvar чрез полимеразна верижна реакция (наричана по-нататък „PCR“). Той позволява да се прави разлика между OsHV-1 и OsHV-1 µvar.

Когато е целесъобразно и с цел оптимизиране на условията за реакцията, както и за да се приспособят към оборудването и условията в тяхната собствена лаборатория, лабораториите могат да прилагат модификации на методите, описани в настоящото приложение, при условие че е възможно да се докажат същата чувствителност и специфичност.

2. *Определение*

OsHV-1 µvar е определен в член 1 от настоящия регламент.

3. *Оборудване и условия на средата*

Използваният диагностичен тест за откриване и идентифициране на OsHV-1 µvar чрез PCR изисква оборудване и условия на средата, обичайно използвани за PCR анализ, както следва:

— затворена лабораторна камина, оборудвана със система за производство на UV за елиминиране на потенциални замърсявания при приготвяне на сместа за PCR,

— два пълни комплекта пипети (2 µl, 20 µl, 200 µl и 1 000 µl), първият — за извличане на ДНК, а вторият — за приготвяне на сместа за PCR,

— три различни пипети: една пипета (2 µl) за разпределяне на пробите в сместа за PCR, друга (20 µl) пипета за вземане на проби с етидиев бромид и трета (20 µl) пипета за нанасяне на продуктите на PCR в агарозни гелове,

— накрайници за пипети с филтър (2 µl, 20 µl, 200 µl и 1 000 µl) за извличане на ДНК, приготвяне на сместа за PCR и разпределяне на пробата,

— накрайници за пипети (20 µl) за събиране на етидиев бромид и за нанасяне на амплификационни продукти върху агарозен гел,

— термоциклер за извършване на амплификации,

— система за хоризонтална електрофореза — за електрофореза на продукти на PCR,

— UV плот за изследване на продукти на PCR след електрофореза в агарозен гел,

— система за получаване на снимки на геловете.

▼B

Операторът трябва да носи лабораторно облекло и ръкавици по време на всички описани по-долу стъпки. Лабораторното облекло и ръкавиците трябва да се сменят за предпочитане след всяка основна стъпка: извличане на ДНК, приготвяне на сместа за PCR, разпределяне на пробата, амплификация и нанасяне върху гела.

Препоръчително е различните стъпки да се извършват в различни помещения. По-специално амплификацията и нанасянето върху гела/електрофорезата следва да се извършват в помещение, което е отделено от това за извличане на ДНК, приготвяне на сместа за PCR и разпределянето на ДНК.

4. *Процедура*

4.1. Подготовка на пробата

Живите или току-що умрели (неразложени) стриди, които предварително може да са били замразени, се обработват за извличане на ДНК.

Пробите се обработват по различен начин в зависимост от техния размер:

а) за ларви: пулове по 50 mg от целите животни (включително черупката), към които са добавени 200 µl дестилирана вода, се смачкват и се центрофугират на 1 000 g за 1 минута;

б) за хайвер с размер по-малък или равен на 6 mm: пулове по 300 mg от целите животни (включително черупката), към които са добавени 1 200 µl дестилирана вода, се смачкват и се центрофугират на 1 000 g за 1 минута;

в) за хайвер с размер между 6 и 15 mm: всички меки тъкани на всяко животно се смачкват поотделно;

г) за животни, по-големи от 15 mm: частите от хрилете и мантията се изолират.

Извличането на ДНК се извършва, като се използва QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) и се следват инструкциите на Протокола за изследване на тъкани.

По-нататъшната подготовка на пробата се извършва в следния ред:

1. Поставят се 100 µl от супернатанта — за проби, посочени в букви а) и б), или от 10 до 50 mg от тъканите — за проби, посочени в букви в) и г), в микроцентрофужна епруветка от 1,5 ml и се добавят 180 µl буфер ATL.

2. Добавят се 20 µl протеиназа К, смесва се с помощта на лабораторен вортекс и се инкубира при 56 °C, докато тъканта се разтвори напълно (една нощ). При инкубирането от време на време се разбърква с вортекс, за да се дисперсира пробата. Микроцентрофужната епруветка от 1,5 ml се центрофугира за кратко, за да се отстранят капките от запушалката.

3. Към пробата се добавят 200 µl буфер AL, смесват с помощта на лабораторен вортекс на режим pulse за 15 s и се инкубира при 70 °C за 10 минути. Микроцентрофужната епруветка от 1,5 ml се центрофугира за кратко, за да се отстранят капките от запушалката.

4. Към пробата се добавят 200 µl етанол (96—100 %) и се смесват с помощта на лабораторен вортекс на режим pulse за 15 s. Микроцентрофужната епруветка от 1,5 ml се центрофугира за кратко, за да се отстранят капките от запушалката.

5. Сместа от стъпка 4 се поставя внимателно върху центрофужна колонка QIAamp (в 2 ml събирателна епруветка), без да се мокри ръбът. Капачката се затваря и се центрофугира при 10 000 rpm за 1 min. Центрофужната колонка QIAamp се поставя в чиста 2 ml събирателна епруветка (предоставена в комплекта), а епруветката, съдържаща филтрата, се изхвърля.

▼B

6. QIAamp спин колонката се отваря внимателно и се добавят 500 µl буфер AW1, без да се мокри ръбът. Капачката се затваря и се центрофугира при 10 000 rpm за 1 min. Центрофужната колонка QIAamp се поставя в чиста 2 ml събирателна епруветка (предоставена в комплекта), а епруветката, съдържаща филтрата, се изхвърля.

7. Центрофужната колонка QIAamp се отваря внимателно и се добавят 500 µl буфер AW2, без да се мокри ръбът. Капачката се затваря и се центрофугира при пълна скорост (14 000 rpm) за 3 min.

8. (По избор) Центрофужната колонка QIAamp се поставя в нова 2 ml събирателна епруветка (не е предоставена в комплекта), а събирателната епруветка, съдържаща филтрата, се изхвърля. Центрофугира се при пълна скорост (14 000 rpm) за 1 min.

9. Центрофужната колонка QIAamp се поставя в чиста микроцентрофужна епруветка от 1,5 ml (не е предоставена в комплекта), а събирателната епруветка, съдържаща филтрата, се изхвърля. Центрофужната колонка QIAamp се отваря внимателно и се добавят 100 µl дестилирана вода. Инкубира се 5 минути при стайна температура и се центрофугира при 10 000 rpm за 1 min.

10. Качеството и ефикасността на извличането се контролират (например чрез измерване на оптичната плътност (260 nm) под спектрофотометър или след електрофорезата в агарозен гел).

11. Подготвя се разреждане на пробите, така че да се получи крайна концентрация на ДНК от 50—100 ng/µl.

12. ДНК разтворите се съхраняват при 4 °C, докато се извършват PCR анализите.

Могат да се използват и други комплекти за извличане на ДНК, които са на разположение в търговската мрежа, при условие че те доказано дават сходни резултати.

4.2. *Полимеразна верижна реакция (PCR)*

4.2.1. Реактиви

— 10 X буфер (предоставен с Taq ДНК полимераза),

— $MgCl_2$ (предоставен с ДНК полимеразата) (25 mM),

— Taq ДНК полимераза (Goldstar, Eurogentec) 5 U/µl,

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Основна смес (20 mM) преди употреба трябва да се разреди 10-кратно (до 2 mM),

— d H_2O (дестилирана H_2O без ДНК и РНК).

4.2.2. Праймери

Трябва да се използват следните праймери ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Тези праймери или техни описания могат да се набавят от Референтната лаборатория на Общността за болести по мекотелите (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Франция).

▼B

4.2.3. Смес за PCR

Сместа за PCR за всяка епруветка е:

	Обем за епруветка	Крайна концентрация
Буфер (10 X)	5 µl	1 X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq полимераза (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl от тази смес за PCR е разпределена във всяка епруветка за PCR,

— 1 µl от извлечената ДНК (50—100 ng/µl) се добавя към всяка епруветка.

4.2.4. Контроли

Използват се два вида контроли:

— Отрицателни контроли — състоят се от dH_2O (1 µl за 49 µl смес за PCR). Те целят откриване на потенциално замърсяване на реактива или на работната среда. На всеки 10 проби или след всяка партида от проби се включва една отрицателна контрола.

— Положителни контроли — състоят се от плазмидни ДНК, съдържащи целевия геномен диапазон CF-CR на OsHV-1. Те целят проверяване на ефикасността на PCR. За всеки PCR анализ се включва една положителна контрола. Положителни контроли има в референтната лаборатория на Общността.

4.2.5. Амплификация

Циклите на амплификация се извършват в термоциклер.

— начална денатурация: 2 минути при 94 °C,

— амплификация: 35 цикъла (1 минута при 94 °C, 1 минута при 50 °C и 1 минута при 72 °C),

— крайна елонгация: 5 минути при 72 °C.

4.3. *Електрофореза*

4.3.1. Реактиви

— 50 X TAE (може да се закупи готов за директна употреба):

Трис база (40 mM) 242 g,

Ледена оцетна киселина (40 mM) 57,1 ml,

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

dH_2O за 1 литър,

Киселинността се коригира на pH 8

▼B

— агарозен гел 2,5 % в 1X TAE,

етидиев бромид (0,5 μg/ml), добавен след охлаждане на гела,

— нанасяне на контрастно вещество (синьо багрило):

бромфенолово синьо 0,25 %,

ксилен цианол FF 0,25 %,

захароза 40 %.

Съхранява се при 4 °C.

Използва се 6-кратно разреден (2 μl от нанесения син буфер за 10 μl от продуктите на PCR).

— Маркер за молекулно тегло:

SmartLadder SF (Eurogentec): готов за употреба маркер за молекулно тегло, включително 9 равномерно разположени пояса от 100 до 1 000 bp.

4.3.2. Приготвяне на агарозния гел

1. Претеглят се 2,5 g агароза, добавят се 100 ml 1X TAE и се загрява, докато сместа се разтопи.

2. След охлаждане на разтвора се добавя етидиев бромид (5 μl за 100 ml агарозен гел) и разтворът се излива в специална форма, оборудвана с гребени (за оформяне на ямки).

3. Когато гелът полимеризира, гребените се отстраняват и той се поставя в система за хоризонтална електрофореза, съдържаща достатъчно 1X TAE, за да покрие агарозния гел.

4. 10 μl от продуктите на PCR се смесват с 2 μl от контрастното вещество (синьото багрило) (6X) и се разпределят в ямките.

5. Една ямка е предназначена за един маркер на молекулно тегло (5 μl).

6. Прилага се напрежение от 50 до 150 волта за 30 минути до 1 час в зависимост от количеството и дебелината на гела.

7. Гелът се изследва с UV.

4.4. *Интерпретиране*

Наличието на OsHV-1 μVar в пробата се показва чрез наличието на пояс със съответния размер (157 bp вместо 173 bp — за OsHV-1) върху 2,5 % агарозен гел с отрицателни резултати от всички отрицателни контроли и положителни — от всички положителни контроли.

ЧАСТ B

Определяне на ограничителната зона

При определяне на ограничителната зона в съответствие с член 2, параграф 2 се вземат предвид следните фактори, които оказват влияние върху рисковете от разпространение на болестта:

а) броят, делът и разпространението на мекотели в заразеното стопанство или район за отглеждане на мекотели;

б) разстоянието до съседни стопанства или райони за отглеждане на мекотели и тяхната гъстота;

в) близост до преработвателни предприятия, контактни стопанства или контактни райони за отглеждане на мекотели;

г) налични видове в стопанствата или районите за отглеждане на мекотели;

▼B

д) прилагани развъдни практики в засегнатите и в съседните стопанства или райони за отглеждане на мекотели; и

е) хидродинамични условия и други установени фактори от епизоотиологично значение.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Образец на ветеринарномедицински сертификат за пускане на пазара на стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за райони за отглеждане или повторно полагане

ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ **Сертификат за вътрешна търговия**

Част: Данни за представената практика

I.1. Изпращач
Име
Адрес
Пощенски код

I.2. Референтен номер на сертификата | I.2.a. Местен номер за справка:

I.3. Централна компетентна власт

I.4. Местна компетентна власт

I.5. Получател
Име
Адрес
Пощенски код

I.6.

I.7.

I.8. Страна на произход ISO код | I.9.

I.10. Държава - дестинация ISO код | I.11.

I.12. Място на произхода/място на прибиране
Одобрена ферма за аквакултури ☐
Друго ☐
Име Номер на одобрението
Адрес
Пощенски код

I.13. Място на дестинацията
Одобрена ферма за аквакултури ☐
Друго ☐
Име Номер на одобрението
Адрес
Пощенски код

I.14. Място на товарене
Пощенски код

I.15. Дата и време на отпътуването

I.16. Транспортно средство
Самолет ☐ Кораб ☐ Ж.П. вагон ☐
Пътно МПС ☐ Друго ☐
Идентификация:

I.17. Превозвач
Име Номер на одобрението
Адрес
Пощенски код Държава-членка

I.18. Животински вид/продукт

I.19. Код на стоката (CN код)
03.07

I.20. Брой/количество

I.21.

I.22. Брой опаковки

I.23. Идентификация на контейнера/Пломба номер

I.24. Вид опаковка

I.25. Животни сертифицирани като/продукти със сертификат за:
Разплод ☐ Препредаване ☐

I.26. Транзит през 3-та страна ☐
3-та страна ISO код
Изходящ пункт Код
Входящ пункт ГИВП No.:

I.27. Транзит през държави-членки ☐
Държава-членка ISO код
Държава-членка ISO код
Държава-членка ISO код

I.28. Износ ☐
3-та страна ISO код
Изходящ пункт Код

I.29.

I.30.

I.31. Идентификация на животните
Биологични видове (Научно име) Количество

▼B

ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ

За пускане на пазара на стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за райони за отглеждане и повторно полагане

Част II: Сертифициране

II.	**Здравна информация**	II.a. Референтен номер на сертификата	II.b.

([1])([2])[II.1 **Изисквания за стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от ограничителна зона, създадена в съответствие с член 2 от Регламент (ЕС) № 175/2010**

Аз, долуподписаният официален инспектор, с настоящото удостоверявам, че стридите от вида *Crassostrea gigas*, посочени в част I от настоящия сертификат:

II.1.1 са с произход от зона, за която се прилагат мерки за борба с болестта по отношение на повишената смъртност на стриди от вида *Crassostrea gigas* във връзка с OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 е разрешено да бъдат пуснати на пазара съгласно член 3, параграф 2, буква а) от Регламент (ЕС) № 175/2010 ;]

([1])[II.1.2 са с произход от част от ограничителната зона, която не е засегната от повишената смъртност, и пратката е била обект на вземане на проби и изследване в съответствие с приложение I към Регламент (ЕС) № 175/2010 за стриди от вида *Crassostrea gigas* с отрицателни резултати;]]

([1])([3])[II.2 **Изисквания за стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от държава-членка или отделна част, подложена преди това на ограничителни мерки по отношение на повишена смъртност на стриди от вида *Crassostrea gigas* във връзка с OsHV-1 µvar и предназначени за държави-членки или отделни части, за които е въведена програма за ранно откриване на OsHV-1 µvar**

Аз, долуподписаният официален инспектор, с настоящото удостоверявам, че стридите от вида *Crassostrea gigas*, посочени в част I от настоящия сертификат:

II.2.1 идват от стопанство или район за отглеждане на мекотели, където според регистрите на стопанството или района за отглеждане на мекотели няма признаци за повишена смъртност;

II.2.2 са с произход от отделна част, където е доказана липсата на OsHV-1 µvar чрез вземане на проби и изследвания, извършени в съответствие с приложение I към Регламент (ЕС) № 175/2010 за стриди от вида *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Изисквания за транспортиране и етикетиране**

Аз, долуподписаният официален инспектор, с настоящото удостоверявам, че:

II.3.1 стридите от вида *Crassostrea gigas*, посочени в част I от настоящия сертификат, са поставени в такива условия, в това число и качеството на водата, които не променят техния здравен статус;

II.3.2 преди товарене транспортният контейнер е почистен и дезинфекциран или не е използван преди това;

II.3.3 пратката е обозначена с четлив етикет на външната страна на контейнера или, когато се транспортира с кораб с резервоар за жива риба, в корабния манифест със съответната информация, посочена в клетки I.8—I.13 от част I от настоящия сертификат, както и със следното заявление:

или ([1])[„Стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за отглеждане/повторно полагане в район, за който е въведена програма за ранно откриване на OsHV-1 µvar“]

или ([1])[„Стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за отглеждане/повторно полагане в район, за който се прилагат мерки за борба с болестта, и с произход от район, за който се прилагат мерки за борба с болестта“]

Бележки

Част I:

— Клетка I.12: Ако е уместно, да се използва номерът на разрешението на въпросното стопанство или район за отглеждане на мекотели.

— Клетка I.13: Ако е уместно, да се използва номерът на разрешението на въпросното стопанство или район за отглеждане на мекотели.

— Клетка I.20 и 1. 31: За количество се посочва общият брой.

— Клетка I.25: Да се използва „За развъждане“ , ако са предназначени за отглеждане в стопанство, и „Повторно полагане“ , ако са предназначени за райони за повторно полагане.

▼B

ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ

За пускане на пазара на стриди от вида *Crassostrea gigas*, предназначени за райони за отглеждане и повторно полагане

II. **Здравна информация**	II.a. Референтен номер на сертификата	II.b.

Част II:

([1]) Да се остави според случая.

([2]) Част II.1 от настоящия сертификат се прилага за пратки стриди от вида *Crassostrea gigas* с произход от ограничителна зона, създадена в съответствие с член 2, параграф 2 от Регламент (ЕС) № 175/2010 , на които, съгласно член 3, параграф 2, букви а) или б) от посочения Регламент, е разрешено да напуснат тази зона.

([3]) Част II.2 от настоящия сертификат се прилага за пратки стриди от вида *Crassostrea gigas*, посочени в член 5, параграф 1 от Регламент (ЕС) № 175/2010 , предназначени за държави-членки или отделни части, за които е въведена програма за ранно откриване на OsHV-1 µvar, и са с произход от зона, която преди това е била предмет на ограничителни мерки по отношение на повишена смъртност на стриди от вида *Crassostrea gigas*.

Официален ветеринарен лекар или официален инспектор

Име (с главни букви): Квалификация и длъжност:

Местна ветеринарна служба: № МВС:

Дата: Подпис:

Печат: