Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

►**B**

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 175/2010

ze dne 2. března 2010,

kterým se provádí směrnice Rady 2006/88/ES, pokud jde o opatření pro omezení zvýšeného úhynu ústřic druhu *Crassostrea gigas* v souvislosti se zjištěním nákazy Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text s významem pro EHP)

(Úř. věst. L 52, 3.3.2010, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►**M1**	Nařízení Komise (EU) č. 1153/2010 ze dne 8. prosince 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 175/2010

ze dne 2. března 2010,

kterým se provádí směrnice Rady 2006/88/ES, pokud jde o opatření pro omezení zvýšeného úhynu ústřic druhu *Crassostrea gigas* v souvislosti se zjištěním nákazy Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na směrnici Rady 2006/88/ES ze dne 24. října 2006 o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a produkty akvakultury a o prevenci a tlumení některých nákaz vodních živočichů ([1]), a zejména na čl. 41 odst. 3 a čl. 61 odst. 3 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Směrnice 2006/88/ES stanoví veterinární požadavky pro uvádění živočichů pocházejících z akvakultury a produktů akvakultury na trh. Kromě toho stanoví minimální preventivní opatření, která mají být použita v případě podezření na ohnisko nebo potvrzení ohniska některých nákaz vodních živočichů.

(2) Článek 41 uvedené směrnice stanoví, že členské státy podniknou přiměřená opatření pro tlumení nově se objevující nákazy a k zabránění jejímu dalšímu šíření. V případě výskytu nově se objevující nákazy informuje dotčený členský stát bez prodlení Komisi, členské státy a členské státy ESVO, pokud mají zjištění epizootologický význam pro jiný členský stát.

(3) V některých oblastech Francie a Irska byl na konci jara a v létě roku 2008 zjištěn zvýšený úhyn ústřic druhu *Crassostrea gigas* (dále jen „ústřice *Crassostrea gigas*“). Tento zvýšený úhyn byl přičítán nepříznivým faktorům souvisejícím se životním prostředím v kombinaci s výskytem bakterie rodu *Vibrio* a s výskytem viru Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), včetně nově popsaného genotypu uvedeného viru nazvaného OsHV-1 µvar.

(4) Francouzské orgány informovaly Komisi, členské státy a členské státy ESVO o této situaci a o opatřeních přijatých v srpnu 2008 a o této věci byl v září 2008 informován Stálý výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat.

(5) Na jaře roku 2009 byl zvýšený úhyn přičítaný téže kombinaci faktorů znovu zjištěn ve Francii, Irsku a na Normanských ostrovech. I když příčiny tohoto úhynu zůstávají nejasné, epizootologická šetření provedená v roce 2009 v Irsku a ve Spojeném království naznačují, že zásadní roli v tomto úhynu hraje virus OsHV-1 µvar.

([1]) Úř. věst. L 328, 24.11.2006, s. 14.

▼B

(6) Příslušné orgány uvedených členských států a Normanských ostrovů informovaly Komisi o situaci a o přijatých opatřeních a o této věci byl několikrát informován Stálý výbor pro potravinový řetězec a zdraví zvířat.

(7) Opatření k zamezení šíření nákazy přijatá odpovědnými orgány v uvedených členských státech a na Normanských ostrovech za účelem tlumení výskytu nově se objevující nákazy spočívala převážně v omezení přesunů ústřic *Crassostrea gigas* mimo oblasti zasažené zvýšeným úhynem.

(8) Vzhledem k opakovanému výskytu nově se objevující nákazy v roce 2009, k možnosti dalšího opakování a k riziku dalšího šíření na jaře a v létě roku 2010 a na základě dosavadních zkušeností je vhodné a nutné prodloužit opatření, která již postižené členské státy přijaly.

(9) Aby byly zajištěny jednotné podmínky při provádění požadavků směrnice 2006/88/ES, pokud jde o nově se objevující nákazy, a aby bylo zajištěno, že přijatá opatření poskytují dostatečnou ochranu proti jejímu dalšímu šíření, a přitom nepředstavují zbytečná omezení přesunů ústřic *Crassostrea gigas*, je nutné tato opatření, pokud jde o výskyt nově se objevující nákazy, koordinovat na úrovni Evropské unie.

(10) Pokud byly příslušné orgány informovány o tom, že byl zjištěn zvýšený úhyn ústřic *Crassostrea gigas*, měl by být proveden odběr vzorků a vyšetření za účelem zjištění nebo vyloučení výskytu viru OsHV-1 μvar.

(11) Pokud byl výskyt genotypu viru OsHV-1 μvar potvrzen, měly by členské státy zavést opatření pro tlumení nákazy, včetně vytvoření uzavřené oblasti. Při určování uzavřené oblasti by se mělo přihlížet k určitým faktorům stanoveným v tomto nařízení. Uvedená opatření pro tlumení nákazy by měla trvat do té doby, než kontroly prokážou, že zvýšený úhyn se zastavil.

(12) Aby se omezilo riziko šíření této nákazy, mělo by se stanovit omezení přesunů ústřic *Crassostrea gigas* z uzavřených oblastí. Je však třeba stanovit určité výjimky pro případy, kdy je riziko šíření této nákazy menší. Tyto výjimky se týkají přesunů určitých ústřic *Crassostrea gigas* určených pro chov nebo sádkovací oblasti v jiné uzavřené oblasti, nebo určených k lidské spotřebě. Za účelem zajištění vysledovatelnosti zásilek ústřic *Crassostrea gigas* určených pro chov nebo sádkovací oblasti by k nim mělo být přiloženo veterinární osvědčení. Při vyplňování tohoto osvědčení by se mělo přihlížet k vysvětlivkám uvedeným v příloze V nařízení Komise (ES) č. 1251/2008 ze dne 12. prosince 2008, kterým se provádí směrnice Rady 2006/88/ES, pokud jde o podmínky a požadavky na osvědčení pro uvádění živočichů pocházejících z akvakultury a produktů akvakultury na trh a pro jejich dovoz do Společenství, a kterým se stanoví seznam druhů přenašečů ([1]).

([1]) Úř. věst. L 337, 16.12.2008, s. 41.

▼B

(13) Za účelem získání dalších informací o statusu výskytu této nově se objevující nákazy v Unii a zejména v členských státech a jednotkách, které jí ještě nebyly postiženy, a aby se zajistilo včasné zjištění jakéhokoli výskytu viru OsHV-1 µvar, mohou členské státy zavést programy s cíleným odběrem vzorků a vyšetřením pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar. Ústřice *Crassostrea gigas* pocházející z oblastí, které byly v roce 2009 v souladu s vnitrostátními opatřeními nebo jsou v roce 2010 v souladu s tímto nařízením předmětem opatření k zamezení šíření nákazy, by měly podléhat doplňkovým veterinárním požadavkům, pokud jsou za účelem chovu nebo sádkování uváděny do členských států nebo jednotek, na které se takový program vztahuje, jestliže v uvedeném členském státě nebo jednotce nebyl virus OsHV-1 µvar zjištěn.

(14) Aby se zajistila srovnatelnost údajů shromážděných v různých členských státech v rámci programů s cíleným odběrem vzorků a vyšetřením pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar, měly by být stanoveny určité požadavky na obsah těchto programů.

(15) Dostupnost přesných a včasných informací o situaci v případě zjištění viru OsHV-1 µvar v členských státech je zásadním předpokladem pro zajištění řádného tlumení výskytu této nově se objevující nákazy. Proto by členské státy měly bez zbytečného prodlení informovat Komisi a ostatní členské státy o prvním potvrzeném výskytu viru OsHV-1 µvar na svém území v roce 2010.

(16) Kromě toho by měly používat informační stránky na internetu vytvořené v souladu s článkem 10 rozhodnutí Komise 2009/177/ES ze dne 31. října 2008, kterým se provádí směrnice Rady 2006/88/ES, pokud jde o programy dozoru a eradikace a status členských států, oblastí a jednotek prostých nákazy [1].

(17) Pro zajištění transparentnosti a včasného přístupu k příslušným informacím o výskytu této nově se objevující nákazy by členské státy měly zpřístupnit Evropské komisi a ostatním členským státům informace týkající se uzavřených oblastí, oblastí, které byly předmětem opatření k zamezení šíření nákazy, ale byla v nich prokázána nepřítomnost viru OsHV-1 µvar, a programů zavedených za účelem včasného zjištění viru OsHV-1 µvar.

(18) Jelikož ohledně výskytu této nově se objevující nákazy stále panuje značná nejistota, měla by se opatření stanovená tímto nařízením používat do konce prosince 2010.

(19) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

[1] Úř. věst. L 63, 7.3.2009, s. 15.

▼B

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Definice

Pro účely tohoto nařízení se virem OsHV-1 µvar rozumí genotyp viru Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) definovaný na základě údajů o dílčí sekvenci, které prokazují systematické vypuštění 12 párů bází v ORF 4 genomu ve srovnání s OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Článek 2

Odběr vzorků, vyšetření a vytvoření uzavřených oblastí

1. V případě zjištění zvýšeného úhynu ústřic druhu *Crassostrea gigas* (dále jen „ústřice *Crassostrea gigas*“) příslušný orgán:

a) odebere vzorky v souladu s částí A přílohy I;

b) vyšetří je na výskyt viru OsHV-1 µvar v souladu s diagnostickými metodami stanovenými v části B přílohy I.

2. Pokud výsledky vyšetření uvedených v odst. 1 písm. b) odhalí výskyt viru OsHV-1 µvar, příslušný orgán vytvoří uzavřenou oblast. Uvedená oblast se určí na základě analýzy jednotlivých případů s přihlédnutím k faktorům, které mají vliv na riziko šíření této nákazy a které jsou uvedeny v části C přílohy I.

3. Členské státy bez zbytečného prodlení informují Komisi a ostatní členské státy o první uzavřené oblasti vytvořené na jejich území v roce 2010.

Článek 3

Požadavky na uvádění ústřic *Crassostrea gigas* pocházejících z uzavřené oblasti uvedené v článku 2 na trh

1. Ústřice *Crassostrea gigas* pocházející z uzavřených oblastí vytvořených v souladu s čl. 2 odst. 2 nesmí být z uvedených oblastí přemísťovány.

2. Odchylně od odstavce 1 mohou být zásilky ústřic *Crassostrea gigas* z uzavřené oblasti přemísťovány, pokud:

a) jsou určeny pro jinou uzavřenou oblast vytvořenou v souladu s čl. 2 odst. 2;

b) pocházejí z části uzavřené oblasti, která není postižena zvýšeným úhynem, včetně líhní, a zásilka byla podrobena:

i) odběru vzorků v souladu s částí A přílohy I a

ii) vyšetření na výskyt viru OsHV-1 µvar v souladu s diagnostickými metodami stanovenými v části B přílohy I, přičemž všechny výsledky byly negativní;

▼B

c) jsou před použitím k lidské spotřebě určeny k dalšímu zpracování, pro střediska pro čištění, střediska pro odesílání nebo zpracovatelská zařízení, která jsou vybavena systémem čištění odpadních vod, který schválil příslušný orgán a který:

i) ničí obalené viry, nebo

ii) snižuje riziko přenosu nákaz do přírodních vod na přijatelnou úroveň;

d) jsou určeny k lidské spotřebě a jsou zabaleny a označeny za tímto účelem v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ([1]) a:

i) již ztratily schopnost přežít jako živé organismy, kdyby byly navráceny do prostředí, z nějž pocházejí, nebo

ii) jsou určeny pro další zpracování bez dočasného skladování v místě zpracování;

e) tyto zásilky nebo produkty v nich obsažené jsou určeny k lidské spotřebě bez dalšího zpracování, pokud jsou zabaleny v obalech pro maloobchodní prodej, které splňují ustanovení pro tyto obaly uvedená v nařízení (ES) č. 853/2004.

3. Zásilky uvedené v odst. 2 písm. a) a b) určené pro chov nebo sádkovací oblasti musí být doprovázeny veterinárním osvědčením vyplněným podle vzoru stanoveného v příloze II tohoto nařízení a vysvětlivek uvedených v příloze V nařízení (ES) č. 1251/2008.

Článek 4

Zrušení opatření stanovených v článcích 2 a 3

Příslušný orgán může zrušit opatření pro tlumení nákaz, pokud jde o uzavřené oblasti vytvořené v souladu s čl. 2 odst. 2, a omezení související s uváděním na trh stanovená v článku 3 poté, co provedl dvě po sobě následující kontroly v rozmezí 15 dnů, jež prokázaly, že zvýšený úhyn se zastavil.

Článek 5

Požadavky na uvádění na trh týkající se ústřic *Crassostrea gigas* pocházejících z jednotky, jež byla z důvodu zvýšeného úhynu ústřic *Crassostrea gigas* předmětem opatření pro tlumení nákaz v souvislosti s virem OsHV-1 µvar

1. Ústřice *Crassostrea gigas* uváděné na trh a pocházející z jednotky, jež byla v roce 2009 nebo 2010 z důvodu zvýšeného úhynu ústřic *Crassostrea gigas* předmětem opatření k zamezení šíření nákazy v souvislosti s virem OsHV-1 µvar:

a) musí být doprovázeny veterinárním osvědčením vyplněným podle vzoru stanoveného v příloze II tohoto nařízení a vysvětlivek uvedených v příloze V nařízení (ES) č. 1251/2008, pokud jsou živočichové:

i) určeni pro členské státy nebo jednotky, které zavedly program pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar a ve kterých nebyl virus OsHV-1 µvar zjištěn, a

([1]) Úř. věst. L 139, 30.4.2004, s. 55.

▼B

ii) určeni pro chov nebo sádkovací oblasti;

b) pocházejí z jednotky, kde byla na základě odběru vzorků a vyšetření provedených v souladu s částí A přílohy I prokázána nepřítomnost viru OsHV-1 µvar, a

c) splňují veterinární požadavky stanovené ve vzoru osvědčení uvedeném v písmeni a).

2. Program pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar uvedený v odst. 1 písm. a) bodu i) musí splňovat tyto požadavky:

a) tento program musí být ohlášen Stálému výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat;

b) toto ohlášení musí být v souladu s bodem 1, body 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, a 5.9 a s body 6 a 7 vzorového formuláře stanoveného v příloze II rozhodnutí 2009/177/ES;

c) součástí programu musí být:

i) odběr vzorků v souladu s částí A přílohy I,

ii) vyšetření na výskyt viru OsHV-1 µvar v souladu s diagnostickými metodami stanovenými v části B přílohy I.

3. Odstavec 1 se použije jeden týden od data zasedání Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat, na kterém byl program uvedený v odst. 1 písm. a) bodu i) ohlášen.

Článek 6

Informační stránky na internetu

1. Členské státy zpřístupní Komisi a ostatním členským státům:

a) seznam uzavřených oblastí vytvořených v souladu s čl. 2 odst. 2 a faktorů, ke kterým se při určování těchto oblastí přihlíželo, včetně popisu geografických hranic příslušné oblasti;

b) seznam jednotek včetně popisu geografických hranic příslušné oblasti:

i) které byly v roce 2009 předmětem opatření k zamezení šíření nákazy z důvodu zvýšeného úhynu ústřic *Crassostrea gigas* v souvislosti s virem OsHV-1 µvar,

ii) kde byla na základě vyšetření vzorků odebraných v uzavřené oblasti, jež bylo provedeno v souladu s částmi A a B přílohy I, prokázána nepřítomnost viru OsHV-1 µvar;

c) ohlášení týkající se programů uvedených v čl. 5 odst. 2 včetně popisu geografických hranic příslušné oblasti.

2. Informace uvedené v odstavci 1 musí být aktualizovány a zpřístupněny na informačních stránkách na internetu vytvořených v souladu s článkem 10 rozhodnutí 2009/177/ES.

▼B

Článek 7

Podávání zpráv

Do dne 1. října 2010 předloží členské státy Komisi zprávu o programech ohlášených v souladu s čl. 5 odst. 2.

Zpráva odpovídá vzorovému formuláři uvedenému v příloze VI rozhodnutí 2009/177/ES.

Článek 8

Vstup v platnost a použitelnost

Toto nařízení vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne 15. března 2010 do dne ►**M1** 30. dubna 2011 ◄.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

▼B

PŘÍLOHA I

ČÁST A

Odběr vzorků

1. *Odběr vzorků pro účely článku 2*

Vzorky stanovené v článku 2 představují alespoň 12 jedinců ústřic *Crassostrea gigas*. Vyberou se z jednotky, kde byl pozorován úhyn, a jedná se o slabé, rozevřené nebo právě uhynulé jedince (kteří se ještě nerozkládají).

2. *Odběr vzorků pro účely čl. 3 odst. 2 písm. b), čl. 5 odst. 1 písm. b) a čl. 5 odst. 2*

a) odběr vzorků pro účely čl. 3 odst. 2 písm. b) představuje:

i) v případě larev z každé zásilky pět směsných vzorků o hmotnosti nejméně 50 mg celých živočichů odebraných mezi 4 a 8 dny po oplodnění, včetně skořápky,

ii) v případě mladých ústřic menších než 6 mm z každé zásilky 30 směsných vzorků o hmotnosti 300 mg celých živočichů včetně skořápky,

iii) v případě ústřic větších než 6 mm z každé zásilky 150 jedinců.

Při výběru těchto živočichů musí být ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části zásilky. Pokud jsou přítomni slabí, rozevření nebo právě uhynulí jedinci (kteří se ještě nerozkládají), vyberou se přednostně tito živočichové;

b) odběr vzorků pro účely čl. 5 odst. 2 představuje alespoň 150 jedinců ústřic *Crassostrea gigas* z každého místa odběru vzorků. Vzorky se odeberou ze všech hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů v členském státě nebo jednotce, na něž se program vztahuje.

Odběr vzorků pro účely čl. 5 odst. 1 písm. b) představuje alespoň 150 jedinců ústřic *Crassostrea gigas* z každé jednotky.

Při výběru těchto živočichů se přihlíží k těmto kritériím:

— pokud jsou přítomni slabí, rozevření nebo právě uhynulí jedinci (kteří se ještě nerozkládají), vyberou se přednostně tito živočichové. Pokud tito živočichové nejsou přítomni, jsou mezi vybranými živočichy zdraví měkkýši mladší 12 měsíců,

— pokud se vzorky odebírají v hospodářstvích, kde se k produkci používá více vodních zdrojů, musí vzorky zahrnovat živočichy ze všech vodních zdrojů tak, aby byly ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části hospodářství,

— pokud se vzorky odebírají v chovných oblastech měkkýšů, obsahují vzorky živočichy z dostatečného počtu míst odběru vzorků (alespoň ze tří) tak, aby byly ve vzorku poměrně zastoupeny všechny části chovné oblasti měkkýšů, včetně míst přirozeného výskytu, která jsou součástí chovné oblasti měkkýšů. Hlavními faktory, ke kterým je třeba při výběru těchto míst odběru vzorků přihlédnout, jsou: předchozí zjištění výskytu viru OsHV-1 µvar v této oblasti, intenzita chovu, vodní toky, hloubka vody a způsob hospodaření;

▼B

c) odběr vzorků stanovený v čl. 5 odst. 2 se provede během ročního období, kdy je prevalence viru OsHV-1 µvar v členském státě nebo jednotce prokazatelně nejvyšší. Pokud takové údaje nejsou k dispozici, odběr vzorků se provede bezprostředně po období, kdy teplota vody přesáhne 16 °C nebo v ročním období, kdy teplota běžně dosahuje svého ročního maxima;

d) odběr vzorků stanovený v čl. 5 odst. 1 písm. b) se pokud možno provede v ročním období popsaném v písmeni c). Pokud se vzorky odebírají v jiném než uvedeném ročním období, musí být odebrané ústřice uchovávány po dobu postačující k zjištění viru OsHV-1 µvar za podmínek, jež jsou rovnocenné podmínkám popsaným v písmeni c), než se provedou vyšetření.

ČÁST B

Diagnostické metody zjišťování viru OsHV-1 µvar

1. *Oblast působnosti*

Tento postup představuje standardní diagnostickou metodu, kterou je třeba použít pro zjištění a identifikaci viru OsHV-1 µvar prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (dále jen „PCR“). Umožňuje rozlišit viry OsHV-1 a OsHV-1 µvar.

Pokud je to vhodné, mohou laboratoře za účelem optimalizace reakčních podmínek a přizpůsobení se svému vybavení a podmínkám upravit metody popsané v této příloze za předpokladu, že lze prokázat stejnou citlivost a specifičnost.

2. *Definice*

Definice viru OsHV-1 µvar je uvedena v článku 1 tohoto nařízení.

3. *Vybavení a podmínky okolního prostředí*

Diagnostický test pro zjištění a identifikaci viru OsHV-1 µvar prostřednictvím PCR vyžaduje takové vybavení a podmínky okolního prostředí, jaké se běžně používají při zkouškách PCR, a sice:

— uzavřenou digestoř vybavenou systémem produkujícím UV záření za účelem odstranění možné kontaminace během přípravy směsi PCR,

— dvě úplné sady pipet (2 µl, 20 µl, 200 µl a 1 000 µl), jednu pro extrakci DNA a druhou pro přípravu směsi PCR,

— tři různé pipety: jednu o objemu 2 µl pro rozdělování vzorků ve směsi PCR, jednu o objemu 20 µl pro odběr vzorků ethidiumbromidu a jednu o objemu 20 µl pro zavádění produktů PCR do agarózového gelu,

— špičky pipet s filtrem (2 µl, 20 µl, 200 µl a 1 000 µl) pro extrakci DNA, přípravu směsi PCR a rozdělování vzorků,

— špičky pipet (20 µl) pro odběr ethidiumbromidu a pro zavádění amplifikačních produktů do agarózového gelu,

— termocykler pro provádění amplifikací,

— horizontální systém pro elektroforézu produktů PCR,

— UV tabulku pro pozorování produktů PCR po elektroforéze v agarózovém gelu,

— systém pro získání snímků gelů.

▼B

Manipulující osoba musí mít během všech níže popsaných kroků na sobě laboratorní plášť a rukavice. Plášť a rukavice se musí měnit, a to nejlépe po každém z těchto hlavních kroků: extrakce DNA, příprava směsi PCR, rozdělování vzorků, amplifikace a zavádění do gelu.

Doporučuje se tyto jednotlivé kroky provádět v různých místnostech. Konkrétně amplifikace a zavádění do gelu/elektroforéza by měly probíhat v jiné místnosti než extrakce DNA, příprava směsi PCR a rozdělování DNA.

4. *Postup*

4.1 Příprava vzorku

Živé nebo právě uhynulé ústřice (které se ještě nerozkládají), které mohou být předem zmraženy, se zpracují pro extrakci DNA.

Vzorky se zpracují odlišným způsobem v závislosti na jejich velikosti:

a) v případě larev se směsné vzorky o hmotnosti 50 mg celých živočichů (včetně skořápky) doplněné o 200 µl destilované vody rozdrtí a odstředí při 1 000 g po dobu 1 minuty;

b) cv případě mladých ústřic menších než 6 mm se směsné vzorky o hmotnosti 300 mg celých živočichů (včetně skořápky) doplněné o 1 200 µl destilované vody rozdrtí a odstředí při 1 000 g po dobu 1 minuty;

c) v případě mladých ústřic o velikosti mezi 6 a 15 mm se všechny měkké tkáně každého živočicha rozdrtí samostatně;

d) v případě živočichů o velikosti nad 15 mm se izolují části žáber a pláště.

Extrakce DNA se provádí s použitím soupravy QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) a podle pokynů protokolu o zkouškách tkání.

Další příprava vzorků se provádí v tomto pořadí:

1. Do zkumavky mikroodstředivky o objemu 1,5 ml se v případě vzorků uvedených v písmenech a) a b) umístí 100 µl supernatantu a v případě vzorků uvedených v písmenech c) a d) 50 mg tkání a přidá se 180 µl pufru ATL.

2. Přidá se 20 µl proteinázy K, promíchá se na třepačce vortex a nechá se inkubovat při teplotě 56 °C, dokud se tkáň zcela nerozloží (přes noc). Během inkubace se několikrát promíchá na třepačce vortex, aby se vzorek rozptýlil. Zkumavka mikroodstředivky o objemu 1,5 ml se krátce odstředí, aby se z uzávěru odstranily kapky.

3. Ke vzorku se přidá 200 µl pufru AL, míchá se na pulzní třepačce po dobu 15 s a nechá se inkubovat při teplotě 70 °C po dobu 10 minut. Zkumavka mikroodstředivky o objemu 1,5 ml se krátce odstředí, aby se z uzávěru odstranily kapky.

4. Ke vzorku se přidá 200 µl ethanolu (96–100 %) a míchá se na pulzní třepačce po dobu 15 s. Zkumavka mikroodstředivky o objemu 1,5 ml se krátce odstředí, aby se z uzávěru odstranily kapky.

5. Směs vytvořená podle kroku 4 se opatrně umístí do kolony QIAamp (do zkumavky o objemu 2 ml), aniž se zvlhčí okraj. Uzavře se a odstřeďuje při 10 000 ot/min po dobu 1 minuty. Kolona QIAamp se umístí do čisté zkumavky o objemu 2 ml (která je obsahem soupravy) a zkumavka obsahující filtrát se odstraní.

▼B

6. Kolona QIAamp se opatrně otevře a přidá se 500 µl pufru AW1, aniž se zvlhčí okraj. Uzavře se a odstřeďuje při 10 000 ot/min po dobu 1 minuty. Kolona QIAamp se umístí do čisté zkumavky o objemu 2 ml (která je obsahem soupravy) a zkumavka obsahující filtrát se odstraní.

7. Kolona QIAamp se opatrně otevře a přidá se 500 µl pufru AW2, aniž se zvlhčí okraj. Uzavře se a odstřeďuje při plné rychlosti (14 000 ot/min) po dobu 3 minut.

8. (Nepovinné) Kolona QIAamp se umístí do nepoužité zkumavky o objemu 2 ml (která není obsahem soupravy) a zkumavka obsahující filtrát se odstraní. Uzavře se a odstřeďuje při plné rychlosti (14 000 ot/min) po dobu 1 minuty.

9. Kolona QIAamp se umístí do čisté zkumavky mikroodstředivky o objemu 1,5 ml (která není obsahem soupravy) a zkumavka obsahující filtrát se odstraní. Kolona QIAamp se opatrně otevře a přidá se 100 µl destilované vody. Nechá se 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě a odstřeďuje se při 10 000 ot/min po dobu 1 minuty.

10. Kvalita a účinnost extrakce se sleduje pomocí spektrofotometru nebo po elektroforéze v agarózovém gelu (například měřením optické hustoty (260 nm)).

11. Vzorky se zředí tak, aby konečná koncentrace DNA činila 50–100 ng/µl.

12. Roztoky DNA se až do provedení analýzy PCR uchovávají při teplotě 4 °C.

Pro extrakci DNA lze použít i jiné komerční soupravy za předpokladu, že průkazně poskytují podobné výsledky.

4.2 *Polymerázová řetězová reakce (PCR)*

4.2.1 Reakční činidla

— pufr 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), před použitím desetinásobně zředěný (na 2 mM),

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

4.2.2 Primery

Musí se použít tyto primery ([1]):

CF (10 µM),

CR (10 µM).

([1]) Tyto primery nebo jejich popis lze získat od referenční laboratoře Společenství pro nákazy mlžů (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francie).

▼B

4.2.3. Směs PCR

Směs PCR pro každou zkumavku je:

	Objem na zkumavku	Konečná koncentrace
Pufr (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 této směsi PCR se umístí do každé zkumavky PCR,

— do každé zkumavky se přidá 1 µl extrahované DNA (50–100 ng/µl).

4.2.4 Kontroly

Použijí se dva typy kontrol:

— negativní kontroly se skládají z dH_2O (1 µl na 49 µl směsi PCR). Cílem je zjistit možnou reaktivní kontaminaci nebo reaktivní pracovní prostředí. Měla by být provedena jedna negativní kontrola na každých 10 vzorků nebo na každou sérii vzorků,

— pozitivní kontroly se skládají z plazmidické DNA obsahující region CF-CR cílového genomu OsHV-1. Cílem je kontrola účinnosti reakce PCR. Měla by být provedena jedna pozitivní kontrola na každou analýzu PCR. Pozitivní kontroly jsou k dispozici v referenční laboratoři Společenství.

4.2.5 Amplifikace

Amplifikační cykly se provádějí v termocykleru:

— počáteční denaturace: 2 min při 94 °C,

— amplifikace: 35 cyklů (1 min při 94 °C, 1 min při 50 °C a 1 min při 72 °C),

— konečná elongace: 5 min při 72 °C.

4.3 *Elektroforéza*

4.3.1 Reakční činidla

— 50 X TAE (lze zakoupit jako připravený k použití):

báze tris (40 mM) 242 g,

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

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

dH_2O na 1 litr,

upraví se na pH 8,

▼B

— agarózový gel 2,5 % v 1X TAE,

ethidiumbromid (0,5 μg/ml) přidaný po zchladnutí gelu,

— zavádění modrého barviva:

bromfenolová modř 0,25 %,

xylen kyanol FF 0,25 %,

sacharóza 40 %,

uchovává se při teplotě 4 °C.

Použije se 6 × zředěné (2 μl zaváděcího modrého pufru na 10 μl produktů PCR),

— marker molekulové hmotnosti:

SmartLadder SF (Eurogentec): marker molekulové hmotnosti připravený k použití včetně 9 rovnoměrně dělených pruhů od 100 do 1 000 bp.

4.3.2 Příprava agarózového gelu

1. Naváží se 2,5 g agarózy, přidá se 100 ml 1X TAE a zahřívá se, dokud se směs nerozpustí.

2. Po vychladnutí roztoku se přidá ethidiumbromid (5 μl na 100 ml agarózového gelu) a roztok se umístí do zvláštní vany vybavené hřebínky (aby se vytvořily jamky).

3. Poté, co se gel polymerizuje, hřebínky se odstraní a gel se umístí do horizontálního systému pro elektroforézu, který obsahuje dostatečné množství 1X TAE pro to, aby byl agarózový gel zcela pokryt.

4. 10 μl produktů PCR se smísí s 2 μl modrého barviva (6X) a umístí do jamek.

5. Jedna jamka je určena pro marker molekulové hmotnosti (5 μl).

6. Použije se napětí v rozsahu 50–150 voltů po dobu 30 minut až 1 hodiny v závislosti na množství a tloušťce gelu.

7. Gel se pozoruje pod UV zářením.

4.4 *Výklad*

Pokud se ve vzorku vyskytuje vir OsHV-1 μvar, na 2,5 % agarózovém gelu se vytvoří pruh odpovídající velikosti (157 bp místo 173 bp u viru OsHV-1), přičemž všechny negativní kontroly jsou negativní a všechny pozitivní kontroly jsou pozitivní.

ČÁST C

Určení uzavřené oblasti

Při určování uzavřené oblasti podle čl. 2 odst. 2 se přihlíží k níže uvedeným faktorům, které mají vliv na riziko šíření této nákazy:

a) počet a rozšíření měkkýšů v nakaženém hospodářství nebo v nakažené chovné oblasti měkkýšů;

b) vzdálenost a hustota sousedních hospodářství nebo chovných oblastí měkkýšů;

c) blízkost ke zpracovatelským zařízením, kontaktním hospodářstvím nebo kontaktním chovným oblastem měkkýšů;

d) druhy přítomné v hospodářstvích nebo chovných oblastech měkkýšů;

▼B

e) chovné postupy používané v postižených a sousedních hospodářstvích nebo chovných oblastech měkkýšů a

f) hydrodynamické podmínky a jiné faktory epizootologického významu.

▼B

PŘÍLOHA II

Vzor veterinárního osvědčení pro uvádění ústřic *Crassostrea gigas* určených pro chov a sádkovací oblasti na trh

EVROPSKÁ UNIE — **Zdravotní osvědčení zvířat pro vnitřní obchod**

Část I: Informace o předkládané zásilce

I.1 Odesílatel
Název
Adresa
PSČ

I.2 Číslo jednací osvědčení | I.2.a Místní číslo jednací

I.3 Příslušný ústřední orgán

I.4 Příslušný místní orgán

I.5 Příjemce
Název
Adresa
PSČ

I.6

I.7

I.8 Země původu | Kód ISO | I.9

I.10 Země určení | Kód ISO | I.11

I.12 Místo původu/Místo ulovení
Schválené hospodářství akvakultury ☐
Ostatní ☐
Název | Číslo schválení
Adresa
PSČ

I.13 Místo určení
Schválené hospodářství akvakultury ☐
Ostatní ☐
Název | Číslo schválení
Adresa
PSČ

I.14 Místo nakládky
PSČ

I.15 Datum a hodina odjezdu

I.16 Dopravní prostředek
Letadlo ☐ Plavidlo ☐ Vagon ☐
Silniční vozidlo ☐ Ostatní ☐
Identifikace:

I.17 Přepravce
Název | Číslo schválení
Adresa
PSČ | Členský stát

I.18 Druh zvířat / Produktů

I.19 Kód komodity (Kód KN)
03.07

I.20 Počet / Množství

I.21

I.22. Počet balení

I.23 Číslo kontejneru/plomby

I.24 Druh obalu

I.25 Zvířata potvrzena jako / Produkty potvrzeny pro
Plemenná ☐ Koně sportovní ☐

I.26 Tranzit přes třetí zemi ☐
Třetí země | Kód ISO
Místo výstupu | Kód
Místo vstupu | Číslo stanoviště hraniční kontroly

I.27 Tranzit přes členské státy ☐
Členský stát | Kód ISO
Členský stát | Kód ISO
Členský stát | Kód ISO

I.28 Vývoz ☐
Třetí země | Kód ISO
Místo výstupu | Kód

I.29

I.30

I.31 Identifikace zvířat
Druhy (Vědecký název) | Množství

▼B

EVROPSKÁ UNIE

Pro uvádění ústřic *Crassostrea gigas* určených pro chov a sádkovací oblasti na trh

Část II: Osvědčení

II.	**Veterinární informace**	II.a. Číslo jednací osvědčení	II.b.

(1)(2)**[II.1 Požadavky na ústřice *Crassostrea gigas* pocházející z uzavřené oblasti vytvořené v souladu s článkem 2 nařízení (ES) č. 175/2010**

Já, níže podepsaný úřední inspektor, potvrzuji, že ústřice *Crassostrea gigas* uvedené v části I tohoto osvědčení:

II.1.1 pocházejí z oblasti podléhající opatřením pro tlumení nákaz, pokud jde o zvýšený úhyn ústřic *Crassostrea gigas* v souvislosti s virem OsHV-1 µvar;

(1)[II.1.2 smějí být uváděny na trh v souladu s čl. 3 odst. 2 písm. a) nařízení (EU) č. 175/2010;]

(1)[II.1.2 pocházejí z části uzavřené oblasti, která není postižena zvýšeným úhynem, a tato zásilka byla podrobena odběru vzorků a vyšetření ústřic *Crassostrea gigas* v souladu s přílohou I nařízení (EU) č. 175/2010 s negativním výsledkem;]]

(1)(3)**[II.2 Požadavky na ústřice *Crassostrea gigas* pocházející z členského státu nebo jednotky, jež byla předmětem opatření pro tlumení nákaz, pokud jde o zvýšený úhyn ústřic *Crassostrea gigas* v souvislosti s virem OsHV-1 µvar, a jsou určeny pro členské státy nebo jednotky, které jsou předmětem programu pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar**

Já, níže podepsaný úřední inspektor, potvrzuji, že ústřice *Crassostrea gigas* uvedené v části I tohoto osvědčení:

II.2.1 pocházejí z hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů, kde se na základě záznamů hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů nevyskytují žádné známky zvýšeného úhynu;

II.2.2 pocházejí z jednotky, kde byla na základě odběru vzorků a vyšetření provedených v souladu s přílohou I nařízení (EU) č. 175/2010 u ústřic *Crassostrea gigas* prokázána nepřítomnost viru OsHV-1 µvar.]

II.3 Požadavky týkající se přepravy a označování

Já, níže podepsaný úřední inspektor, potvrzuji, že:

II.3.1 ústřice *Crassostrea gigas* uvedené v části I tohoto osvědčení se nacházejí v podmínkách, včetně kvality vody, které nemění jejich nákazový status;

II.3.2 přepravní kontejner byl před naložením vyčištěn a vydezinfikován nebo dosud nebyl použit;

II.3.3 zásilka je označena čitelným štítkem na vnější straně kontejneru nebo, v případě přepravy rybářským člunem se sádkou, v lodním manifestu, s příslušnými informacemi, které jsou uvedeny v kolonkách I.8 až I.13 v části I tohoto osvědčení, a tímto prohlášením:

buď (1)[Ústřice „*Crassostrea gigas* určené pro chov/sádkování v oblasti, která je předmětem programu pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar"]

nebo (1)[Ústřice „*Crassostrea gigas* určené pro chov/sádkování v oblasti, která podléhá opatřením pro tlumení nákaz, a pochází z oblasti, která podléhá opatřením pro tlumení nákaz"].

Poznámky

Část I:

— Kolonka I.12: Případně použijte číslo oprávnění daného hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů.

— Kolonka I.13: Případně použijte číslo oprávnění daného hospodářství nebo chovné oblasti měkkýšů.

— Kolonky I.20 a I. 31: U množství uveďte celkový počet.

— Kolonka I.25: Pokud jsou určeny pro účely chovu, zaškrtněte možnost „chov", pokud jsou určeny pro sádkování, zaškrtněte možnost „sádkování".

▼B

EVROPSKÁ UNIE

Pro uvádění ústřic *Crassostrea gigas* určených pro chov a sádkovací oblasti na trh

II. **Veterinární informace**	II.a. Číslo jednací osvědčení	II.b.

Část II:

(1) Uveďte podle potřeby.

(2) Část II.1 tohoto osvědčení se použije na zásilky ústřic *Crassostrea gigas* pocházející z uzavřené oblasti vytvořené v souladu s čl. 2 odst. 2 nařízení (EU) č. 175/2010, které v souladu s čl. 3 odst. 2 písm. a) nebo b) uvedeného nařízení smějí uvedenou oblast opustit.

(3) Část II.2 tohoto osvědčení se použije na zásilky ústřic *Crassostrea gigas* uvedené v čl. 5 odst. 1 nařízení (EU) č. 175/2010 určené pro členské státy nebo jednotky, které jsou předmětem programu pro včasné zjištění viru OsHV-1 µvar, a které pocházejí z oblasti, jež byla předmětem opatření k zamezení šíření nákazy, pokud jde o zvýšený úhyn ústřic *Crassostrea gigas*.

Úřední veterinární lékař nebo úřední inspektor

Jméno (hůlkovým písmem): Kvalifikace a titul:

Místní veterinární jednotka: Číslo MVJ:

Datum: Podpis:

Razítko: