Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor

►**B**

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 175/2010

af 2. marts 2010

om gennemførelse af Rådets direktiv 2006/88/EF for så vidt angår foranstaltninger til bekæmpelse af øget dødelighed hos østers af arten *Crassostrea gigas* i tilfælde af påvisning af ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(EØS-relevant tekst)

(EUT L 52 af 3.3.2010, s. 1)

Ændret ved:

		Tidende		
		nr.	side	dato
►**M1**	Kommissionens forordning (EU) nr. 1153/2010 af 8. december 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 175/2010

af 2. marts 2010

om gennemførelse af Rådets direktiv 2006/88/EF for så vidt angår foranstaltninger til bekæmpelse af øget dødelighed hos østers af arten *Crassostrea gigas* i tilfælde af påvisning af ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Rådets direktiv 2006/88/EF af 24. oktober 2006 om dyresundhedsbestemmelser for akvakulturdyr og produkter deraf og om forebyggelse og bekæmpelse af visse sygdomme hos vanddyr ([1]), særlig artikel 41, stk. 3, og artikel 61, stk. 3, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Ved direktiv 2006/88/EF er der fastsat dyresundhedsbestemmelser for markedsføring af akvakulturdyr og produkter deraf. Desuden fastsættes de minimumsforebyggelsesforanstaltninger, der skal anvendes ved mistanke om eller udbrud af visse vanddyrssygdomme.

(2) I direktivets artikel 41 hedder det, at medlemsstater skal træffe relevante foranstaltninger for at få situationer med nye sygdomme under kontrol og hindre sygdommen i at spredes. I tilfælde af en ny sygdomssituation underretter den berørte medlemsstat hurtigst muligt de øvrige medlemsstater, Kommissionen og EFTA-landene herom, hvis oplysningerne har epidemiologisk betydning for en anden medlemsstat.

(3) Øget dødelighed hos østers af arten *Crassostrea gigas* blev påvist i forskellige områder i Frankrig og Irland sidst på foråret og i sommeren 2008. Det blev tilskrevet en kombination af negative miljøfaktorer, forekomst af bakterier af slægten Vibrio og tilstedeværelse af ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), herunder OsHV-1 µvar, som er en nyligt beskrevet genotype af dette virus.

(4) De franske myndigheder underrettede Kommissionen, medlemsstaterne og EFTA-landene om situationen og de foranstaltninger, der blev truffet i august 2008, og i september 2008 blev Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed underrettet om sagen.

(5) I foråret 2009 blev der i Frankrig, Irland og på Kanaløerne påvist øget dødelighed, som kunne henføres til den samme kombination af faktorer. Årsagen til dødeligheden er endnu usikker, men epidemiologiske undersøgelser, der i 2009 blev gennemført i Irland og Det Forenede Kongerige, tyder på, at OsHV-1 µvar spiller en vigtig rolle.

([1]) EUT L 328 af 24.11.2006, s. 14.

▼B

(6) De kompetente myndigheder i disse medlemsstater og på Kanaløerne underrettede Kommissionen om situationen og de trufne foranstaltninger, og Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed blev underrettet om sagen flere gange.

(7) De foranstaltninger mod spredning af sygdom, som de kompetente myndigheder i de pågældende medlemsstater og på Kanaløerne traf for at bringe den nye sygdomssituation under kontrol, gik først og fremmest ud på at begrænse flytning af *Crassostrea gigas* ud af de områder, som var berørt af øget dødelighed.

(8) På baggrund af fornyet forekomst af sygdommen i 2009 med risiko for, at den igen vil optræde og sprede sig yderligere i foråret og sommeren 2010, og i lyset af de hidtidige erfaringer er det hensigtsmæssigt og nødvendigt at udvide de foranstaltninger, som de berørte medlemsstater allerede har truffet.

(9) For at sikre ensartet gennemførelse af kravene i direktiv 2006/88/EF for så vidt angår nye sygdomme og for at sikre, at de trufne foranstaltninger giver tilstrækkelig sikkerhed mod yderligere spredning, samtidig med at der ikke indføres unødvendige restriktioner for flytning af *Crassostrea gigas*, er det nødvendigt at koordinere foranstaltningerne for så vidt angår denne nye sygdomssituation på EU-plan.

(10) Når de kompetente myndigheder modtager underretning om, at der er påvist øget dødelighed hos *Crassostrea gigas*, bør der udtages prøver og gennemføres test for at påvise eller udelukke forekomst af OsHV-1 µvar.

(11) Når forekomst af virusgenotypen OsHV-1 µvar er blevet bekræftet, bør medlemsstaterne iværksætte sygdomsbekæmpelsesforanstaltninger, herunder oprettelse af en afspærringszone. Ved fastlæggelsen af afspærringszonen bør der tages hensyn til visse faktorer, der er fastsat i denne forordning. Sygdomsbekæmpelsesforanstaltningerne bør fortsætte, indtil inspektioner har vist, at den øgede dødelighed er ophørt.

(12) Der bør indføres restriktioner for flytning af *Crassostrea gigas* ud af afspærringszonerne for at begrænse risikoen for, at sygdommen spredes. Der bør imidlertid fastsættes visse undtagelser, hvis der er begrænset risiko for, at sygdommen spredes. Disse undtagelser berører flytning af visse *Crassostrea gigas*, som er bestemt til opdræt eller genudlægningsområder i en anden afspærringszone eller til konsum. For at sikre, at sendinger af *Crassostrea gigas* bestemt til opdræt eller genudlægningsområder kan spores, bør de ledsages af et dyresundhedscertifikat. Certifikatet bør udfærdiges i overensstemmelse med de forklarende bemærkninger i Kommissionens forordning (EF) nr. 1251/2008 af 12. december 2008 om gennemførelse af Rådets direktiv 2006/88/EF for så vidt angår betingelser og udstedelse af certifikat ved omsætning og import til Fællesskabet af akvakulturdyr og produkter deraf og om fastlæggelse af en liste over vektorarter ([1]).

([1]) EUT L 337 af 16.12.2008, s. 41.

▼B

(13) For at opnå mere viden om status for denne nye sygdomssituation i EU og navnlig i medlemsstater og segmenter, der endnu ikke er berørt, og for at sikre tidlig påvisning af enhver forekomst af OsHV-1 µvar ønsker nogle medlemsstater måske at indføre programmer med målrettet prøveudtagning og undersøgelse med henblik på tidlig påvisning af OsHV-1 µvar. *Crassostrea gigas* med oprindelse i områder, som har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom i 2009 i overensstemmelse med nationale foranstaltninger eller i 2010 i overensstemmelse med denne forordning, bør omfattes af yderligere dyresundhedskrav, hvis de tilføres medlemsstater eller segmenter med henblik på opdræt eller genudlægning, der er omfattet af et sådant program, så længe OsHV-1 µvar ikke er påvist i den pågældende medlemsstat eller i det pågældende segment.

(14) For at kunne sammenligne de data, der indsamles i forskellige medlemsstater i forbindelse med programmer for målrettet prøveudtagning og testning med henblik på tidlig påvisning af OsHV-1 µvar, bør der fastsættes visse krav til indholdet af sådanne programmer.

(15) Nøjagtige og rettidige oplysninger om situationen med hensyn til påvisning af OsHV-1 µvar i medlemsstaterne er væsentligt for sikringen af effektiv kontrol med den nye sygdomssituation. Derfor bør medlemsstaterne hurtigst muligt underrette Kommissionen og de øvrige medlemsstater om det første bekræftede tilfælde af OsHV-1 µvar virus på deres område i 2010.

(16) Endvidere bør man udnytte de internetbaserede informationssider, der er udarbejdet i overensstemmelse med artikel 10 i Kommissionens beslutning 2009/177/EF af 31. oktober 2008 om gennemførelse af Rådets direktiv 2006/88/EF for så vidt angår overvågnings- og udryddelsesprogrammer og status som sygdomsfri for medlemsstater, zoner og segmenter ([1]).

(17) For at sikre gennemsigtighed og rettidig adgang til relevante oplysninger om den nye sygdomssituation bør medlemsstaterne give Europa-Kommissionen og de øvrige medlemsstater adgang til oplysninger om afspærringszoner, områder, som tidligere har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom, men hvor det er påvist, at OsHV-1 µvar ikke forekommer, og programmer, der er indført med henblik på tidlig påvisning af OsHV-1 µvar.

(18) Da der stadig hersker stor usikkerhed med hensyn til den nye sygdomssituation, bør foranstaltningerne i denne forordning finde anvendelse indtil udgangen af december 2010.

(19) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

([1]) EUT L 63 af 7.3.2009, s. 15.

▼B

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Definition

I denne forordning forstås ved OsHV-1 µvar en genotype af virusset Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), som defineres på basis af partielle sekventeringsdata, der viser en systematisk deletion af 12 basepar i ORF 4 i genomet sammenlignet med OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artikel 2

Prøveudtagning, undersøgelse og oprettelse af afspærringszoner

1. Påvises der øget dødelighed hos østers af arten *Crassostrea gigas*, skal den kompetente myndighed:

a) udtage prøver i overensstemmelse med del A i bilag I

b) teste for forekomst af OsHV-1 µvar i overensstemmelse med diagnosemetoderne i del B i bilag I.

2. Hvis resultaterne af testene som omhandlet i stk. 1, litra b), viser forekomst af OsHV-1 µvar, opretter den kompetente myndighed en afspærringszone. Denne zone defineres på grundlag af en analyse af de enkelte tilfælde under hensyntagen til de faktorer, der påvirker risikoen for spredning af sygdommen, jf. del C i bilag I.

3. Medlemsstaterne underretter hurtigst muligt Kommissionen og de øvrige medlemsstater om den første afspærringszone, der oprettes på deres område i 2010.

Artikel 3

Bestemmelser vedrørende markedsføring af *Crassostrea gigas* med oprindelse i en afspærringszone, jf. artikel 2

1. *Crassostrea gigas* med oprindelse i afspærringszoner, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2, må ikke flyttes ud af disse zoner.

2. Uanset stk. 1 kan sendinger af *Crassostrea gigas* flyttes ud af afspærringszonen, hvis:

a) de er bestemt til en anden afspærringszone, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2

b) de har oprindelse i en del af afspærringszonen, herunder klækkerier, som ikke er berørt af øget dødelighed, og sendingen

i) har været underkastet prøveudtagning i overensstemmelse med del A i bilag I, og

ii) er blevet testet for forekomst af OsHV-1 µvar i overensstemmelse med diagnosemetoderne i del B i bilag I med negativt resultat

▼B

c) de er bestemt til videreforarbejdning, renseanlæg, ekspeditionscentre eller forarbejdningsvirksomheder før konsum, som er udstyret med et system til spildevandsrensning, der er valideret af den kompetente myndighed, og som

i) inaktiverer kappebærende vira, eller

ii) nedbringer risikoen for sygdomsoverførsel til naturlige vandområder til et acceptabelt niveau

d) de er bestemt til konsum og emballeret og mærket til dette formål i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 853/2004 ([1]), og

i) ikke vil kunne overleve, hvis de genudsættes i det miljø, de blev taget fra, eller

ii) er bestemt til videreforarbejdning uden midlertidig oplagring på forarbejdningsstedet

e) sendingerne eller produkter heraf er bestemt til konsum uden videreforarbejdning, forudsat at de er emballeret i detailsalgsemballage, der opfylder kravene til sådan emballage i forordning (EF) nr. 853/2004.

3. De i stk. 2, litra a) og b), omhandlede sendinger, som er bestemt til opdræt eller genudlægningsområder, skal ledsages af et dyresundhedscertifikat i overensstemmelse med modellen i bilag II til denne forordning og de forklarende bemærkninger i bilag V til Kommissionens forordning (EF) nr. 1251/2008.

Artikel 4

Ophævelse af foranstaltningerne i artikel 2 og 3

Den kompetente myndighed kan ophæve bekæmpelsesforanstaltningerne hvad angår de afspærringszoner, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2, og de restriktioner for markedsføring, der er fastsat i artikel 3, efter at den har foretaget to på hinanden følgende inspektioner med 15 dages mellemrum, der viser, at den øgede dødelighed er ophørt.

Artikel 5

Bestemmelser vedrørende markedsføring af *Crassostrea gigas* med oprindelse i et segment, der tidligere har været omfattet af bekæmpelsesforanstaltninger på grund af øget dødelighed hos *Crassostrea gigas* i forbindelse med OsHV-1 µvar

1. *Crassostrea gigas*, der markedsføres, og som har oprindelse i et segment, der har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom i 2009 eller 2010 på grund af øget dødelighed hos *Crassostrea gigas* i forbindelse med OsHV-1 µvar skal:

a) ledsages af et dyresundhedscertifikat, der er udfærdiget i overensstemmelse med modellen i bilag II til denne forordning og de forklarende bemærkninger i bilag V til forordning (EF) nr. 1251/2008, hvis dyrene:

i) er bestemt til medlemsstater eller segmenter, som har indført et program for tidlig påvisning af OsHV-1 µvar, og hvor OsHV-1 µvar ikke er påvist, og

([1]) EUT L 139 af 30.4.2004, s. 55.

▼B

ii) er bestemt til opdræt eller genudlægningsområder

b) have oprindelse i et segment, hvor det ved prøveudtagning og testning, der er foretaget i overensstemmelse med del A i bilag I, er påvist, at OsHV-1 µVar ikke forekommer, og

c) opfylde de dyresundhedsmæssige krav i henhold til standardcertifikatet, jf. litra a).

2. Et program for tidlig påvisning af OsHV-1 µvar, jf. stk. 1, litra a), nr. i), skal opfylde følgende krav:

a) Der skal forelægges en erklæring vedrørende programmet for Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed.

b) Denne erklæring skal være i overensstemmelse med punkt 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 og 7 i blanketten i bilag II til beslutning 2009/177/EF.

c) Programmet skal omfatte:

i) prøveudtagning i overensstemmelse med del A i bilag I

ii) testning for forekomst af OsHV-1 µvar i overensstemmelse med diagnosemetoderne i del B i bilag I.

3. Stk. 1 finder anvendelse en uge fra datoen for det møde i Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed, hvor erklæringen vedrørende det i stk. 1, litra a), nr. i), omhandlede program blev forelagt.

Artikel 6

Den internetbaserede informationsside

1. Medlemsstaterne giver Kommissionen og de øvrige medlemsstater adgang til:

a) en liste over afspærringszoner og de faktorer, der er taget hensyn til ved fastlæggelsen af sådanne områder, med en beskrivelse af den geografiske afgrænsning af det relevante område, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2

b) en liste over segmenter med en beskrivelse af den geografiske afgrænsning af det relevante område

i) som har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom på grund af øget dødelighed hos *Crassostrea gigas* i forbindelse med OsHV-1 µvar

ii) hvor der ved testning foretaget i overensstemmelse med del A og B i bilag I af prøver, der er udtaget i afspærringszonen, ikke er påvist OsHV-1 µvar

c) erklæringer vedrørende programmer, som er omhandlet i artikel 5, stk. 2, med en beskrivelse af det relevante områdes geografiske afgrænsning.

2. Oplysningerne omhandlet i stk. 1 skal ajourføres og gøres tilgængelige på de internetbaserede informationssider, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 10 i beslutning 2009/177/EF.

▼B

Artikel 7

Rapportering

Medlemsstaterne forelægger senest den 1. oktober 2010 Kommissionen en rapport om de programmer, der er forelagt erklæringer for, jf. artikel 5, stk. 2.

Rapporten skal være udformet i overensstemmelse med blanketten i bilag VI til beslutning 2009/177/EF.

Artikel 8

Ikrafttræden og anvendelse

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Den anvendes fra den 15. marts 2010 til den ►**M1** 30. april 2011 ◄.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

▼B

BILAG I

DEL A

Prøveudtagning

1. *Prøveudtagning med henblik på anvendelsen af artikel 2*

Prøveudtagning som omhandlet i artikel 2 omfatter mindst 12 *Crassostrea gigas*. Til prøverne udvælges svage dyr, dyr med åbne skaller eller nyligt døde dyr (som ikke er gået i opløsning), og de indsamles fra det segment, hvor dødeligheden er konstateret.

2. *Prøveudtagning med henblik på anvendelsen af artikel 3, stk. 2, litra b), artikel 5, stk. 1, litra b), og artikel 5, stk. 2*

a) Prøveudtagning med henblik på artikel 3, stk. 2, litra b), omfatter:

i) for så vidt angår larver, fem samleprøver på mindst 50 mg hele dyr indsamlet mellem 4 og 8 dage efter befrugtning, inklusive skaller, pr. sending

ii) for så vidt angår yngel under 6 mm, 30 samleprøver på 300 mg hele dyr, inklusive skaller, pr. sending

iii) for så vidt angår østers over 6 mm, 150 dyr pr. sending.

Ved udvælgelsen af disse dyr skal alle dele af sendingen være forholdsmæssigt repræsenteret i prøven. Hvis der forekommer svage dyr, dyr med åbne skaller eller nyligt døde dyr, udvælges først og fremmest disse dyr.

b) Prøveudtagning med henblik på anvendelsen af artikel 5, stk. 2, omfatter mindst 150 individer af *Crassostrea gigas* pr. prøveudtagningssted. Der udtages prøver fra alle akvakulturbrug eller områder med opdræt af bløddyr i medlemsstater eller segmenter, der er omfattet af programmet.

Prøveudtagning med henblik på anvendelsen af artikel 5, stk. 1, litra b, omfatter mindst 150 individer af *Crassostrea gigas* pr. segment.

Der tages ved udvælgelsen af disse dyr hensyn til følgende kriterier:

— Hvis der forekommer svage dyr, dyr med åbne skaller eller nyligt døde dyr, udvælges først og fremmest disse dyr. Forekommer der ikke sådanne dyr, udvælges sunde bløddyr under 12 måneder.

— Ved udtagning af prøver i akvakulturbrug, hvor der anvendes mere end én vandkilde til produktion, skal der indgå dyr fra alle vandkilder i prøven, således at alle dele af bruget er forholdsmæssigt repræsenteret i prøven.

— Ved udtagning af prøver fra områder med opdræt af bløddyr skal prøven omfatte dyr fra et tilstrækkeligt antal prøveudtagningssteder, mindst tre prøveudtagningssteder, således at alle dele af området med opdræt af bløddyr er repræsenteret i prøven, herunder naturlige voksesteder i området med opdræt af bløddyr. De vigtigste faktorer, der skal tages i betragtning ved udvælgelsen af disse prøveudtagningssteder, er: tidligere påvisning af OsHV-1 µvar i området, populationstæthed, vandstrømme, vanddybde og driftspraksis.

▼B

c) Den i artikel 5, stk. 2, omhandlede prøveudtagning skal foretages i den periode af året, hvor forekomsten af OsHV-1 µvar i medlemsstaterne eller segmenterne vides at være størst. Foreligger der ingen sådanne data, skal prøveudtagningen foretages lige efter den periode, hvor vandtemperaturen overstiger 16 °C, eller på det tidspunkt af året, hvor temperaturen normalt når det årlige maksimum.

d) Den i artikel 5, stk. 1, litra b), omhandlede prøveudtagning skal helst foretages på den tid af året, der er beskrevet i litra c). Hvis prøver samles uden for denne periode af året, skal de indsamlede østers opbevares på betingelser, der svarer til dem, der er beskrevet i litra c), i en for påvisning af OsHV-1 µvar hensigtsmæssig periode, før de undersøges.

DEL B

Diagnosemetoder til påvisning af OsHV-1 µvar

1. *Anvendelsesområde*

Denne procedure er en diagnostisk standardmetode, der anvendes til påvisning og identifikation af OsHV-1 µvar ved polymerasekædereaktion (i det følgende benævnt »PCR«). Den gør det muligt at skelne mellem OsHV-1 og OsHV-1 µvar.

Laboratorierne kan for at optimere reaktionsbetingelserne og tage hensyn til laboratoriets udstyr og de vilkår, der gør sig gældende dér, eventuelt tilpasse de metoder, der er beskrevet i dette bilag, forudsat at samme sensitivitet og specificitet kan påvises.

2. *Definition*

OsHV-1 µvar er defineret i artikel 1 i denne forordning.

3. *Udstyr og miljøbetingelser*

Den diagnostiske test, der anvendes til påvisning og identifikation af OsHV-1 ved PCR, kræver samme udstyr og miljøbetingelser, som normalt anvendes til PCR-analyser, dvs.:

— et lukket aftræksskab, der er udstyret med et system til udsending af uv-stråler for at eliminere eventuel kontamination ved tilberedning af PCR-blanding

— to komplette pipettesæt (2 µl, 20 µl, 200 µl og 1 000 µl), det første sæt er til dna-ekstraktion og det andet til tilberedning af PCR-blanding

— tre forskellige pipetter: en pipette (2 µl) til overførsel af prøver til PCR-blandingen, en pipette (20 µl) til EB-prøveudtagning og en pipette (20 µl) til loading af PCR-produkter på agarosegel

— pipettespidser med filter (2 µl, 20 µl, 200 µl og 1 000 µl) til dna-ekstraktion, tilberedning af PCR-blanding og overførsel af prøver

— pipettespidser (20 µl) til indsamling af EB og loading af amplifikationsprodukterne på agarosegel

— en termocykler til amplifikation

— et horisontalt elektroforesesystem til elektroforese af PCR-produkter

— et uv-bord til observation af PCR-produkter efter agarosegelelektroforese

— et system til billedtagning af gelen.

▼B

Personen, der udfører testen, skal bære en laboratoriekittel og handsker under alle de nedenfor beskrevne trin. Kittel og handsker skal helst skiftes efter hvert hovedtrin: dna-ekstraktion, tilberedning af PCR-blanding, overførsel af prøver, amplifikation og loading på gelen.

Det anbefales at gennemføre disse forskellige trin i forskellige rum. Navnlig bør gel-loading/elektroforese finde sted i et andet rum end dna-ekstraktion, tilberedning af PCR-blanding og overførsel af dna.

4. *Procedure*

4.1. Forberedelse af prøven

Levende eller nyligt døde østers (som ikke er gået i opløsning), som eventuelt tidligere har været nedfrosset, klargøres med henblik på dna-ekstraktion.

Prøver behandles forskelligt afhængigt af størrelsen:

a) for larver knuses samleprøver på 50 mg hele dyr (inklusive skal) med 200 µl destilleret vand og centrifugeres ved 1 000 g i 1 minut

b) for yngel på højst 6 mm knuses samleprøver på 300 mg hele dyr (inklusive skal) med 1 200 µl destilleret vand og centrifugeres ved 1 000 g i 1 minut

c) for yngel mellem 6 og 15 mm knuses alt blødt væv fra hvert enkelt dyr individuelt

d) for dyr over 15 mm isoleres dele af gæller og kappe

Dna-ekstraktion foretages ved hjælp af QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) og ifølge instruktionerne for Tissue Test Protocol.

Den videre klargøring af prøverne foretages i følgende rækkefølge:

1. 100 µl supernatant for prøver som omhandlet i litra a) og b) eller 10 til 50 mg væv for prøver som omhandlet i litra c) og d) kommes i et 1,5 ml mikrocentrifugerør, og 180 µl buffer ATL tilsættes.

2. Der tilsættes 20 µl proteinase K, der vortexes og inkuberes ved 56 ° C, indtil vævet er fuldstændigt lyseret (natten over). Der vortexes af og til under inkuberingen for at dispergere prøven. 1,5 ml mikrocentrifugerøret centrifugeres kort for at fjerne dråber fra låget.

3. 200 µl buffer AL tilsættes prøven, som pulsvortexes i 15 s. og inkuberes ved 70 °C i 10 minutter. 1,5 ml mikrocentrifugerøret centrifugeres kort for at fjerne dråber fra låget.

4. 200 µl ethanol (96-100 %) tilsættes prøven, og der pulsvortexes i 15 s. 1,5 ml mikrocentrifugerøret centrifugeres kort for at fjerne dråber fra låget.

5. Blandingen fra trin 4 overføres til QIAamp-spinkolonnen (i et 2 ml opsamlingsrør) uden at gøre kanten våd. Låget lukkes, og der centrifugeres ved 10 000 rpm i 1 min. QIAamp-spinkolonnen placeres i et rent 2 ml opsamlingsrør (følger med kittet), og røret med filtratet kasseres.

▼B

6. QIAamp-spinkolonnen åbnes forsigtigt, og 500 µl buffer AW1 tilsættes uden at gøre kanten våd. Låget lukkes, og der centrifugeres ved 10 000 rpm i 1 min. QIAamp-spinkolonnen placeres i et rent 2 ml opsamlingsrør (følger med kittet), og opsamlingsrøret med filtratet kasseres.

7. QIAamp-spinkolonnen åbnes forsigtigt, og 500 µl buffer AW2 tilsættes uden at gøre kanten våd. Låget lukkes, og der centrifugeres ved maksimal hastighed (14 000 rpm) i 3 min.

8. (Valgfrit) QIAamp-spinkolonnen placeres i et nyt 2 ml opsamlingsrør (følger ikke med kittet), og opsamlingsrøret med filtratet kasseres. Der centrifugeres ved maksimal hastighed (14 000 rpm) i 1 min.

9. QIAamp-spinkolonnen placeres i et rent 1,5 ml mikrocentrifugerør (følger ikke med kittet), og opsamlingsrøret med filtratet kasseres. QIAamp-spinkolonnen åbnes forsigtigt, og 100 µl destilleret vand tilsættes. Der inkuberes i 5 minutter ved rumtemperatur, og der centrifugeres ved 10 000 rpm i 1 min.

10. Ekstraktionens kvalitet og effektivitet kontrolleres (f.eks. ved at måle OD (260 nm) med spektrofotometer eller efter elektroforese i agarosegel).

11. Prøverne fortyndes for at få en endelig dna-koncentration på 50-100 ng/µl.

12. Dna-opløsninger opbevares ved 4 °C, indtil PCR-analyserne gennemføres.

Der kan anvendes andre kommercielle kit til dna-ekstraktion, forudsat at det er godtgjort, at de giver tilsvarende resultater.

4.2. *Polymerasekædereaktion (PCR)*

4.2.1. Reagenser

— 10 X buffer (leveres med Taq dna-polymerasen)

— $MgCl_2$ (leveres med dna-polymerasen) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) skal fortyndes 10 gange (til 2 mM) før brug

— d H_2O (destilleret H_2O frit for dna og rna)

4.2.2. Primere

Følgende primere ([1]) skal anvendes:

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Disse primere eller beskrivelserne heraf fås hos EF-referencelaboratoriet for sygdomme hos bløddyr (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Frankrig).

▼B

4.2.3. PCR-blanding

PCR-blandingen til hvert rør indeholder:

	Volumen pr. rør	Slutkoncentration
Buffer (10 X)	5 µl	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq-polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl af denne PCR-blanding fordeles i hvert PCR-rør

— 1 µl af ekstraheret dna (50-100 ng/µl) tilsættes hvert rør.

4.2.4. Kontrol

Der anvendes to typer kontroller:

— Negative kontroller består af dH_2O (1 µl til 49 µl PCR-blanding). De har til formål at påvise potentiel reaktiv forurening i arbejdsmiljøet. Efter hver 10. prøve eller efter hvert batch af prøver medtages én negativ kontrol.

— Positive kontroller består af plasmid-dna, som indeholder OsHV-1-målgenomområdet CF-CR. De har til formål at kontrollere, hvor effektiv PCR-reaktionen er. For hver PCR-analyse medtages en positiv kontrol. Positive kontroller fås hos EF-referencelaboratoriet.

4.2.5. Amplifikation

Amplifikationscykler gennemføres i en termocykler

— initial denaturering: 2 min. ved 94 °C

— amplifikation: 35 cykler (1 min. ved 94 °C, 1 min. ved 50 °C og 1 min. ved 72 °C)

— final elongering: 5 min. ved 72 °C

4.3. *Elektroforese*

4.3.1. Reagenser

— 50 X TAE (kan købes brugsklart):

Tris-base (40 mM) 242 g

Iseddike (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O til 1 liter

Ph justeres til 8

▼B

— Agarosegel 2,5 % i 1X TAE

Ethidiumbromid (EB) (0,5 µg/ml) tilsættes efter afkøling af gelen.

— Blå loadingbuffer:

Bromphenolblåt 0,25 %

Xylen cyanol FF 0,25 %

Saccharose 40 %

Opbevares ved 4 °C.

Fortyndes 6 gange før anvendelse (2 µl blå loadingbuffer til 10 µl PCR-produkter).

— Molekylevægtmarkør:

SmartLadder SF (Eurogentec): en brugsklar molekylevægtmarkør med 9 jævnt fordelte bånd fra 100 til 1 000 bp.

4.3.2. Fremstilling af agarosegel

1. 2,5 g agarose afvejes, 100 ml 1X TAE tilsættes, og der opvarmes, indtil blandingen er smeltet.

2. Efter afkøling tilsættes ethidiumbromid (5 µl til 100 ml agarosegel), og opløsningen hældes i en særlig form, der er udstyret med kamme (for at danne brønde).

3. Når gelen er polymeriseret, fjernes kammene, og gelen anbringes i et vandret elektroforesekar, der indeholder tilstrækkeligt 1X TAE til at dække agarosegelen.

4. 10 µl PCR-produkter blandes med 2 µl blå loadingbuffer (6X) og fyldes i brøndene.

5. En brønd er bestemt til molekylevægtmarkøren (5 µl).

6. Der køres ved 50 til 150 volt i 30 til 60 min. afhængigt af gelstørrelse og -tykkelse.

7. Gelen betragtes under uv.

4.4. *Fortolkning*

Forekomst af OsHV-1 µvar i en prøve påvises ved tilstedeværelse af et bånd i den rigtige størrelse (for OsHV-157 bp i stedet for 173 bp) på 2,5 % agarosegel, hvor alle negative kontroller er negative, og alle positive kontroller er positive.

DEL C

Fastlæggelse af afspærringszonen

Der skal tages hensyn til følgende faktorer, der påvirker risikoen for spredning af sygdommen, ved fastlæggelsen af afspærringszonen i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2:

a) antal, procentdel og fordeling af bløddyr på det brug eller område med opdræt af bløddyr, der er inficeret

b) afstand til og tæthed af de nærmest liggende brug eller områder med opdræt af bløddyr

c) nærhed til forarbejdningsvirksomheder, kontaktbrug eller kontaktområder med opdræt af bløddyr

d) arter på brugene eller områderne med opdræt af bløddyr

▼B

e) opdrætspraksis i de berørte og i de nærmest liggende brug eller områder med opdræt af bløddyr

f) hydrodynamiske betingelser og andre faktorer af epizootiologisk signifikans.

▼B

BILAG II

Standarddyresundhedscertifikat for markedsføring af *Crassostrea gigas* bestemt til opdræt og genudlægningsområder

DEN EUROPÆISKE UNION — **Certifikat til brug ved samhandel inden for Fællesskabet**

Del I: Oplysninger om sendingen

I.1. Afsender Navn Adresse Postnr.	I.2. Certifikatets referencenr. / I.2.a. Lokalt referencenummer I.3. Central kompetent myndighed I.4. Lokal kompetent myndighed
I.5. Modtager Navn Adresse Postnr.	I.6. I.7.
I.8. Oprindelsesland ISO-kode / I.9.	I.10. Bestemmelsesland ISO-kode / I.11.
I.12. Oprindelsessted/fangstplads Akvakulturbrug ☐ Andet ☐ Navn Godkendelsesnr. Adresse Postnr.	I.13. Bestemmelsessted Akvakulturbrug ☐ Andet ☐ Navn Godkendelsesnr. Adresse Postnr.
I.14. Indladningssted Postnr.	I.15. Dato og klokkeslæt for afgang
I.16. Transportmidler Fly ☐ Skib ☐ Togvogn ☐ Køretøj ☐ Andet ☐ Identifikation	I.17. Transportør Navn Godkendelsesnr. Adresse Postnr. Medlemsstat
I.18. Dyreart/produkter	I.19. Varekode (KN-kode) **03.07** I.20. Antal/bruttovægt
I.21.	I.22. Antal kolli
I.23. Plombe nr. og container nr.	I.24. Kollitype
I.25. Dyr attesteret som/ produkter attesteret til Avl ☐ Udsætning ☐	
I.26. Transit gennem tredjeland ☐ Tredjeland ISO-kode Udgangssted Kode Indgangssted Grænsekontrolsted nr.	I.27. Transit gennem medlemsstater ☐ Medlemsstat ISO-kode Medlemsstat ISO-kode Medlemsstat ISO-kode
I.28. Eksport ☐ Tredjeland ISO-kode Udgangssted Kode	I.29.
I.30.	
I.31. Identifikation af dyr Art (videnskabeligt navn) Mængde	

▼B

DEN EUROPÆISKE UNION

Til markedsføring af *Crassostrea gigas* bestemt til opdræt og genudlægningsområder

Del II: Attest

II.	**Sundhedsoplysninger**	II.a. Certifikatets referencenummer	II.b.

([1])([2])[II.1 **Bestemmelser for *Crassostrea gigas*, som har oprindelse i en afspærringszone, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2 i forordning (EU) nr. 175/2010**

Undertegnede officielle inspektør bekræfter, at de *Crassostrea gigas*, der er nævnt i del I i dette certifikat:

II.1.1 har oprindelse i et område, der er omfattet af sygdomsbekæmpelsesforanstaltninger vedrørende øget dødelighed hos *Crassostrea gigass* i forbindelse med OsHV-1 µvar

([1])[II.1.2 kan markedsføres i henhold til artikel 3, stk. 2, litra a), i forordning (EU) nr. 175/2010

([1])[II.1.2 har oprindelse i en del af afspærringszonen, der ikke er berørt af den øgede dødelighed, og at der er udtaget prøver af sendingen, som er testet i overensstemmelse med bilag I til forordning (EU) nr. 175/2010 med negativt resultat]]

([1])([3])[II.2 **Bestemmelser for *Crassostrea gigas*, som har oprindelse i en medlemsstat eller et segment, som tidligere har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom på grund af øget dødelighed hos *Crassostrea gigas* i forbindelse med OsHV-1 µvar, og som er bestemt til medlemsstater eller segmenter, som har indført et program for tidlig påvisning af OsHV-1 µvar**

Undertegnede officielle inspektør bekræfter, at de *Crassostrea gigas*, der er nævnt i del I i dette certifikat:

II.2.1 kommer fra et akvakulturbrug eller et område med opdræt af bløddyr, hvor der i henhold til fortegnelserne for det pågældende brug eller område ikke er tegn på øget dødelighed

II.2.2 har oprindelse i et segment, hvor det ved prøveudtagning og testning, der er foretaget i overensstemmelse med bilag I til forordning (EU) nr. 175/2010 er påvist, at OsHV-1 µvar ikke forekommer i *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Transportbetingelser og mærkningskrav**

Undertegnede officielle inspektør bekræfter følgende:

II.3.1 De *Crassostrea gigas*, der er nævnt i del I i dette certifikat, er anbragt under forhold, herunder med hensyn til vandkvalitet, der ikke ændrer deres sundhedsstatus.

II.3.2 Transportbeholderen er ved pålæsningen ren og desinficeret eller anvendes for første gang.

II.3.3 Sendingen er identificeret med en læselig etiket, som er anbragt på ydersiden af beholderen eller, hvis sendingen transporteres med brøndbåd, i ladningsmanifestet, med de relevante oplysninger som angivet i rubrik I.8-I.13 i del I i nærværende certifikat samt følgende påtegning:

enten ([1])[»*Crassostrea gigas* bestemt til opdræt/genudlægning i et område, der er omfattet af et program for tidlig påvisning af OsHV-1 µvar«]

eller (1)[»*Crassostrea gigas*, som er bestemt til opdræt/genudlægning i et område, der er omfattet af sygdomsbekæmpelsesforanstaltninger, og som har oprindelse i et område, der er omfattet af sygdomsbekæmpelsesforanstaltninger«].

Bemærkninger

Del I:

— Rubrik I.12: Hvis et sådant findes, angives autorisationsnummeret for det pågældende akvakulturbrug/område med opdræt af bløddyr.

— Rubrik I.13: Hvis et sådant findes, angives autorisationsnummeret for det pågældende akvakulturbrug/område med opdræt af bløddyr.

— Rubrik I.20 og I.31: Mængden angives som det samlede antal.

— Rubrik I.25: Sæt kryds i »Avl«, hvis dyrene er bestemt til opdræt, »Udsætning«, hvis de er bestemt til genudlægning.

▼B

DEN EUROPÆISKE UNION

Til markedsføring af *Crassostrea gigas* bestemt til opdræt og genudlægningsområder

II. **Sundhedsoplysninger**	II.a. Certifikatets referencenummer	II.b.

Del II:

(1) Det ikke relevante overstreges.

(2) Del II.1 i dette certifikat er relevant for sendinger af *Crassostrea gigas*, der har oprindelse i en afspærringszoner, der er oprettet i overensstemmelse med artikel 2, stk. 2, i forordning (EU) nr. 175/2010, og som i henhold til artikel 3, stk. 2, litra a) eller b), i forordningen kan forlade området.

(3) Del II.2 i dette certifikat er relevant for sendinger af *Crassostrea gigas*, jf. artikel 5, stk. 1, i forordning (EU) nr. 175/2010, der er bestemt til medlemsstater eller segmenter, der er omfattet af et program for tidlig påvisning af OsHV-1 µvar, og har oprindelse i et område, som ikke tidligere har været omfattet af foranstaltninger mod spredning af sygdom på grund af øget dødelighed i *Crassostrea gigas*.

Embedsdyrlæge eller officiel inspektør

Navn (med blokbogstaver):	Stilling og titel:
Lokal veterinærenhed:	Den lokale veterinærenheds kodenr.:
Dato:	Underskrift:
Stempel:	