Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationsquelle, für deren Richtigkeit die Organe der Gemeinschaften keine Gewähr übernehmen

►**B**

VERORDNUNG (EU) Nr. 175/2010 DER KOMMISSION

vom 2. März 2010

zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates hinsichtlich Maßnahmen zur Überwachung der erhöhten Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* im Zusammenhang mit der Entdeckung des Ostreiden Herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(ABl. L 52 vom 3.3.2010, S. 1)

Geändert durch:

		Amtsblatt		
		Nr.	Seite	Datum
►**M1**	Verordnung (EU) Nr. 1153/2010 der Kommission vom 8. Dezember 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

VERORDNUNG (EU) Nr. 175/2010 DER KOMMISSION

vom 2. März 2010

zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates hinsichtlich Maßnahmen zur Überwachung der erhöhten Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* im Zusammenhang mit der Entdeckung des Ostreiden Herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Richtlinie 2006/88/EG des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten ([1]), insbesondere auf Artikel 41 Absatz 3 und Artikel 61 Absatz 3,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) In der Richtlinie 2006/88/EG sind Tiergesundheitsvorschriften für das Inverkehrbringen von Tieren aus Aquakultur und ihrer Erzeugnisse festgelegt. Ferner umfasst sie Mindestpräventivmaßnahmen für den Fall des Verdachts auf bestimmte Wassertierkrankheiten oder des Ausbruchs einer Seuche.

(2) Nach Artikel 41 der Richtlinie müssen die Mitgliedstaaten alle erforderlichen Vorkehrungen treffen, um neu auftretende Krankheiten unter Kontrolle zu bringen und die Übertragung von Erregern zu verhindern. Im Falle einer neu auftretenden Krankheit unterrichtet der betreffende Mitgliedstaat die Kommission, die anderen Mitgliedstaaten und die EFTA-Staaten unverzüglich davon, wenn die Untersuchungsergebnisse für andere Mitgliedstaaten von epidemiologischer Bedeutung sind.

(3) In mehreren Gebieten in Frankreich und Irland wurde im Spätfrühling und Sommer 2008 eine erhöhte Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* („Pazifische Auster“) festgestellt. Sie konnte auf eine Kombination von negativen Umweltfaktoren und dem Vorkommen von Bakterien der Gattung Vibrio und des Ostreiden Herpesvirus 1 (OsHV-1) einschließlich eines neu beschriebenen Genotyps dieses Virus, OsHV-1 µvar, zurückgeführt werden.

(4) Die französischen Behörden informierten die Kommission, die Mitgliedstaaten und die EFTA-Staaten über diese Situation und über die im August 2008 getroffenen Maßnahmen. Im September 2008 wurde der Ständige Ausschuss für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit mit dieser Angelegenheit befasst.

(5) Im Frühjahr 2009 wurde in Frankreich, Irland und auf den Kanalinseln erneut eine erhöhte Mortalität festgestellt, die auf dieselbe Kombination von Faktoren zurückzuführen war. Die Ursache dieser Mortalität ist zwar nach wie vor ungeklärt, doch legen die 2009 in Irland und im Vereinigten Königreich durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen nahe, dass das Virus OsHV-1 µvar dabei eine maßgebliche Rolle spielt.

([1]) ABl. L 328 vom 24.11.2006, S. 14.

▼B

(6) Die zuständigen Behörden dieser Mitgliedstaaten und der Kanalinseln unterrichteten die Kommission über die Situation und die entsprechenden Maßnahmen und der Ständige Ausschuss für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit wurde mehrmals mit dieser Angelegenheit befasst.

(7) Die Sperrmaßnahmen, die die zuständigen Behörden dieser Mitgliedstaaten und der Kanalinseln zur Bekämpfung dieser neu auftretenden Krankheit getroffen haben, umfassten in erster Linie die Beschränkung der Verbringung Pazifischer Austern aus den Gebieten mit erhöhter Mortalität.

(8) Da die neu auftretende Krankheit 2009 wieder auftrat und möglicherweise auch im Frühjahr und Sommer 2010 auftreten wird und eine weitere Ausbreitung drohen könnte, müssen aufgrund der Erfahrung die Maßnahmen der betroffenen Mitgliedstaaten verlängert werden.

(9) Um einheitliche Bedingungen für die Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG hinsichtlich neu auftretender Krankheiten zu gewährleisten und sicherzustellen, dass die Maßnahmen ausreichend Schutz vor einer weiteren Ausbreitung bieten, gleichzeitig jedoch der Verbringung Pazifischer Austern keine unnötigen Beschränkungen aufzuerlegen, sind die Maßnahmen in Bezug auf diese neu auftretende Krankheit auf Ebene der Europäischen Union zu koordinieren.

(10) Werden die zuständigen Behörden über eine erhöhte Mortalität bei Pazifischen Austern unterrichtet, so sollten Proben genommen und Untersuchungen durchgeführt werden, um das Vorkommen von OsHV-1 µvar zu bestätigen oder auszuschließen.

(11) Wird das Vorkommen des Genotyps OsHV-1 µvar des Virus bestätigt, so sollten die Mitgliedstaaten Seuchenbekämpfungsmaßnahmen einschließlich der Einrichtung eines Sperrgebiets treffen. Bei der Festlegung des Sperrgebiets sind bestimmte in dieser Verordnung festgelegte Faktoren zu berücksichtigen. Die Seuchenbekämpfungsmaßnahmen sollten aufrechterhalten werden, bis bei Kontrollen keine erhöhte Mortalität mehr festgestellt wird.

(12) Die Verbringung Pazifischer Austern aus den Sperrgebieten sollte eingeschränkt werden, um die Gefahr der Ausbreitung der Krankheit zu mindern. Wo die Gefahr einer Verbreitung der Krankheit gering ist, sollten jedoch Ausnahmen vorgesehen werden. Diese Ausnahmen betreffen die Verbringung Pazifischer Austern, die für Zucht- oder Umsetzungsgebiete in einem anderen Sperrgebiet oder für den menschlichen Verzehr bestimmt sind. Um die Rückverfolgbarkeit von Sendungen von für Zucht- oder Umsetzungsgebiete bestimmten Pazifischen Austern sicherzustellen, sollten sie von einer Tiergesundheitsbescheinigung begleitet werden. Beim Ausfüllen der Bescheinigung sind die Erläuterungen in Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 1251/2008 der Kommission vom 12. Dezember 2008 zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates hinsichtlich der Bedingungen und Bescheinigungsvorschriften für das Inverkehrbringen und die Einfuhr in die Gemeinschaft von Tieren in Aquakultur und Aquakulturerzeugnissen sowie zur Festlegung einer Liste von Überträgerarten ([1]) zu berücksichtigen.

([1]) ABl. L 337 vom 16.12.2008, S. 41.

▼B

(13) Um weitere Erkenntnisse zur Verbreitung dieser neu auftretenden Krankheit in der Union und insbesondere in noch nicht betroffenen Mitgliedstaaten und Kompartimenten zu gewinnen und um zu gewährleisten, dass das Vorkommen von OsHV-1 µvar möglichst frühzeitig erkannt wird, können die Mitgliedstaaten Programme zur gezielten Probenahme und Untersuchung im Hinblick auf die frühzeitige Entdeckung von OsHV-1 µvar einrichten. Für Pazifische Austern, die aus Gebieten stammen, die im Jahr 2009 gemäß nationalen Vorschriften oder im Jahr 2010 gemäß dieser Verordnung Gegenstand von Sperrmaßnahmen waren, sollten zusätzliche Gesundheitsvorschriften gelten, sofern sie zur Zucht oder Umsetzung in Mitgliedstaaten oder Kompartimente eingeführt werden, für die ein solches Programm gilt, solange OsHV-1 µvar in diesem Mitgliedstaat oder Kompartiment nicht vorkommt.

(14) Damit gewährleistet ist, dass die in verschiedenen Mitgliedstaaten im Rahmen von Programmen mit gezielter Probenahme und Untersuchung zur frühzeitigen Entdeckung von OsHV-1 µvar gesammelten Daten vergleichbar sind, sollten bestimmte Anforderungen im Hinblick auf den Inhalt dieser Programme festgelegt werden.

(15) Die frühzeitige Verfügbarkeit zuverlässiger Informationen über die Lage im Hinblick auf die Entdeckung von OsHV-1 µvar in den Mitgliedstaaten ist ein wesentliches Element für die Gewährleistung einer angemessenen Bekämpfung der neu auftretenden Krankheit. Zu diesem Zweck sollten die Mitgliedstaaten die Kommission und die anderen Mitgliedstaaten unverzüglich über das erste bestätigte Auftreten des Virus OsHV-1 µvar in ihrem Hoheitsgebiet im Jahr 2010 informieren.

(16) Ferner sind die gemäß Artikel 10 der Entscheidung 2009/177/EG der Kommission vom 31. Oktober 2008 zur Durchführung der Richtlinie 2006/88/EG des Rates in Bezug auf Überwachungs- und Tilgungsprogramme sowie auf den Seuchenfreiheitsstatus von Mitgliedstaaten, Zonen und Kompartimenten [1] erstellten Informations-Websites zu nutzen.

(17) Um die Transparenz der einschlägigen Informationen über die neu auftretende Krankheit und den raschen Zugang zu diesen Informationen zu gewährleisten, sollten die Mitgliedstaaten der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten Angaben zu Sperrgebieten, zu Gebieten, die früher Gegenstand von Sperrmaßnahmen waren, in denen OsHV-1 µvar jedoch nachweislich nicht vorkommt, sowie zu ihren Programmen zur frühzeitigen Entdeckung von OsHV-1 µvar bereitstellen.

(18) Da noch immer große Unsicherheit im Hinblick auf die neu auftretende Krankheit besteht, sollten die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen bis Ende Dezember 2010 gelten.

(19) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

[1] ABl. L 63 vom 7.3.2009, S. 15.

▼B

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Begriffsbestimmung

Für die Zwecke dieser Verordnung bezeichnet OsHV-1 µvar einen Genotyp des Virus Ostreides Herpesvirus 1 (OsHV-1), der auf der Grundlage der Daten einer Teilsequenz definiert ist, die eine systematische Löschung von 12 Basenpaaren im ORF 4 des Genoms im Vergleich zu OsHV-1 zeigen (GenBank # AY509253).

Artikel 2

Probenahme, Durchführung von Untersuchungen und Einrichtung von Sperrgebieten

(1) Wird eine erhöhte Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* („Pazifische Auster“) festgestellt, so geht die zuständige Behörde wie folgt vor:

a) Sie nimmt Proben gemäß Anhang I Teil A;

b) sie führt Untersuchungen gemäß den diagnostischen Methoden in Anhang I Teil B im Hinblick auf das Vorkommen von OsHV-1 µvar durch.

(2) Bestätigen die in Absatz 1 Buchstabe b genannten Untersuchungen das Vorkommen von OsHV-1 µvar, so richtet die zuständige Behörde ein Sperrgebiet ein. Das Gebiet wird nach einer Einzelfallprüfung festgelegt, bei der die in Anhang I Teil C aufgeführten Faktoren berücksichtigt werden, die das Risiko einer Ausbreitung der Krankheit beeinflussen.

(3) Die Mitgliedstaaten unterrichten die Kommission und die anderen Mitgliedstaaten unverzüglich über die Einrichtung des ersten Sperrgebiets in ihrem Hoheitsgebiet im Jahr 2010.

Artikel 3

Bedingungen für das Inverkehrbringen von Austern der Art *Crassostrea gigas* aus den in Artikel 2 genannten Sperrgebieten

(1) Pazifische Austern, die aus gemäß Artikel 2 Absatz 2 eingerichteten Sperrgebieten stammen, werden nicht aus diesen Gebieten verbracht.

(2) Abweichend von Absatz 1 dürfen Sendungen von Pazifischen Austern aus einem Sperrgebiet verbracht werden, wenn

a) sie für ein anderes Sperrgebiet gemäß Artikel 2 Absatz 2 bestimmt sind;

b) sie aus einem Teil des Sperrgebiets einschließlich Zuchtbetrieben stammen, in dem/denen die Mortalität nicht erhöht ist und

   i) der jeweiligen Sendung Proben gemäß Anhang I Teil A entnommen wurden und

   ii) die Sendung Untersuchungen gemäß den diagnostischen Methoden in Anhang I Teil B im Hinblick auf das Vorkommen von OsHV-1 µvar unterzogen wurde und alle Ergebnisse negativ waren;

▼B

c) sie vor dem Verzehr durch Menschen zur weiteren Verarbeitung in Reinigungszentren, Versandzentren oder Verarbeitungsbetrieben bestimmt sind, die über eine von der zuständigen Behörde validierte Abwasseraufbereitungsanlage verfügen, die

   i) umhüllte Viren inaktiviert oder

   ii) das Risiko einer Übertragung von Krankheiten auf natürliche Gewässer auf ein angemessenes Niveau senkt;

d) sie für den menschlichen Verzehr bestimmt sind und zu diesem Zweck gemäß der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates [1] verpackt und gekennzeichnet wurden und wenn sie

   i) in ihrer ursprünglichen Umgebung nicht mehr überleben können oder

   ii) zur weiteren Verarbeitung ohne Zwischenlagerung am Ort der Verarbeitung bestimmt sind;

e) diese Sendungen oder die darin enthaltenen Erzeugnisse für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, sofern sie in Einzelhandelspackungen verpackt sind, die den einschlägigen Vorschriften der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 entsprechen.

(3) Die in Absatz 2 Buchstaben a und b genannten für Zucht- oder Umsetzungsgebiete bestimmten Sendungen werden von einer Tiergesundheitsbescheinigung gemäß dem Muster in Anhang II dieser Verordnung und den Erläuterungen in Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 1251/2008 begleitet.

Artikel 4

Aufhebung der in den Artikeln 2 und 3 vorgesehenen Maßnahmen

Die zuständige Behörde kann die Seuchenbekämpfungsmaßnahmen im Zusammenhang mit den gemäß Artikel 2 Absatz 2 eingerichteten Sperrgebieten und den in Artikel 3 vorgesehenen Beschränkungen des Inverkehrbringens im Anschluss an zwei innerhalb von 15 Tagen aufeinanderfolgende Inspektionen aufheben, wenn diese Inspektionen beweisen, dass die Mortalität nicht mehr erhöht ist.

Artikel 5

Bedingungen für das Inverkehrbringen von Austern der Art *Crassostrea gigas* aus einem Kompartiment, das bereits Gegenstand von Seuchenbekämpfungsmaßnahmen aufgrund einer erhöhten Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* im Zusammenhang mit OsHV-1 µvar war

(1) Pazifische Austern aus einem Kompartiment, das entweder 2009 oder 2010 bereits Gegenstand von Sperrmaßnahmen aufgrund einer erhöhten Mortalität bei Pazifischen Austern im Zusammenhang mit OsHV-1 µvar war,

a) werden von einer Tiergesundheitsbescheinigung gemäß dem Muster in Anhang II dieser Verordnung und den Erläuterungen in Anhang V der Verordnung (EG) der Kommission Nr. 1251/2008 begleitet, sofern die Tiere

   i) für Mitgliedstaaten oder Kompartimente bestimmt sind, die ein Programm zur frühzeitigen Feststellung des Auftretens von OsHV-1 µvar eingerichtet haben und in denen OsHV-1 µvar noch nicht festgestellt wurde, und

[1] ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 55.

▼B

ii) für Zucht- oder Umsetzungsgebiete bestimmt sind;

b) müssen aus einem Kompartiment stammen, in dem durch Probenahmen und Untersuchungen gemäß Anhang I Teil A nachgewiesen wurde, dass OsHV-1 µvar nicht vorkommt; und

c) müssen den Tiergesundheitsvorschriften gemäß der unter Buchstabe a genannten Musterbescheinigung entsprechen.

(2) Das in Absatz 1 Buchstabe a Ziffer i genannte Programm zur frühzeitigen Feststellung von OsHV-1 µvar erfüllt folgende Anforderungen:

a) Das Programm wird dem Ständigen Ausschuss für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit gemeldet.

b) Diese Meldung erfolgt in Übereinstimmung mit den Ziffern 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 und 7 des Musterformulars in Anhang II der Entscheidung 2009/177/EG.

c) Das Programm muss Folgendes umfassen:

i) Probenahme gemäß Anhang I Teil A,

ii) Untersuchungen gemäß den diagnostischen Methoden in Anhang I Teil B im Hinblick auf das Vorkommen von OsHV-1 µvar.

(3) Absatz 1 gilt eine Woche nach dem Datum der Sitzung des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit, in der das in Absatz 1 Buchstabe a Ziffer i genannte Programm gemeldet wurde.

Artikel 6

Informations-Website

(1) Die Mitgliedstaaten legen der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten Folgendes vor:

a) eine Liste der Sperrgebiete und der Faktoren, die bei der Einrichtung dieser Gebiete berücksichtigt wurden, einschließlich einer Beschreibung der geografischen Grenzen des jeweiligen gemäß Artikel 2 Absatz 2 festgelegten Gebietes;

b) eine Liste der Kompartimente (einschließlich einer Beschreibung der geografischen Grenzen des jeweiligen Gebietes),

i) die 2009 Gegenstand von Sperrmaßnahmen aufgrund einer erhöhten Mortalität bei Pazifischen Austern im Zusammenhang mit OsHV-1 µvar waren,

ii) für die durch Untersuchungen gemäß Anhang I Teile A und B in Proben, die im Sperrgebiet entnommen wurden, nachgewiesen wurde, dass OsHV-1 µvar nicht vorkommt;

c) die Meldungen der in Artikel 5 Absatz 2 genannten Programme einschließlich einer Beschreibung der geografischen Grenzen des jeweiligen Gebietes.

(2) Die in Absatz 1 genannten Angaben werden laufend aktualisiert und auf der gemäß Artikel 10 der Entscheidung 2009/177/EG eingerichteten Informations-Website bereitgestellt.

▼B

Artikel 7

Berichterstattung

Die Mitgliedstaaten legen der Kommission bis spätestens 1. Oktober 2010 einen Bericht über die gemäß Artikel 5 Absatz 2 gemeldeten Programme vor.

Für den Bericht ist das Musterformular in Anhang VI der Entscheidung 2009/177/EG zu verwenden.

Artikel 8

Inkrafttreten und Geltungsdauer

Diese Verordnung tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Sie gilt vom 15. März 2010 bis zum ►M1 30. April 2011 ◄.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

▼B

ANHANG I

TEIL A

Probenahme

1. *Probenahme gemäß Artikel 2*

Die in Artikel 2 vorgesehenen Proben bestehen aus mindestens 12 einzelnen Austern der Art *Crassostrea gigas*. Für die Proben sind geschwächte, offenstehende oder soeben verendete Tiere (ohne Anzeichen der Zersetzung) aus dem Kompartiment mit erhöhter Mortalität auszuwählen.

2. *Probenahme gemäß Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe b und Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b und Absatz 2*

a) Probenahmen gemäß Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe b umfassen

i) bei Larven pro Sendung fünf Sammelproben von mindestens 50 mg ganzen Tieren, die zwischen vier und acht Tagen nach der Befruchtung gesammelt wurden, inklusive Schalen;

ii) bei Jungmuscheln, die kleiner als 6 mm sind, pro Sendung 30 Sammelproben von 300 mg ganzen Tieren inklusive Schalen;

iii) bei Austern, die größer als 6 mm sind, pro Sendung 150 Einzeltiere.

Es sind anteilmäßig Proben von allen Teilen der Sendung auszuwählen. Sind geschwächte, offenstehende oder soeben verendete Tiere (ohne Anzeichen der Zersetzung) vorhanden, so sind hauptsächlich solche Tiere auszuwählen.

b) Probenahmen gemäß Artikel 5 Absatz 2 umfassen mindestens 150 Einzeltiere der Art *Crassostrea gigas* pro Entnahmestelle. Es sind Proben aus allen Zuchtbetrieben oder Weichtierzuchtgebieten in dem Mitgliedstaat oder Kompartiment zu nehmen, das Gegenstand des Programms ist.

Probenahmen gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b umfassen mindestens 150 Einzeltiere der Art *Crassostrea gigas* pro Kompartiment.

Bei der Auswahl dieser Tiere werden folgende Kriterien berücksichtigt:

— Sind geschwächte, offenstehende oder soeben verendete Tiere (ohne Anzeichen der Zersetzung) vorhanden, so sind hauptsächlich solche Tiere auszuwählen. Sind keine solchen Tiere vorhanden, dann werden gesunde Austern ausgewählt, die weniger als 12 Monate alt sind.

— Bei Probenahmen in Zuchtbetrieben, in denen mehr als eine Wasserquelle zur Produktion verwendet wird, müssen Proben von Tieren aus allen Wasserquellen genommen werden, so dass alle Teile des Zuchtbetriebs anteilmäßig vertreten sind.

— Bei Probenahmen in Weichtierzuchtgebieten müssen Proben von Tieren an ausreichend vielen (mindestens drei) Entnahmestellen genommen werden, so dass alle Teile des Weichtierzuchtgebietes anteilmäßig vertreten sind, einschließlich natürlicher Muschelbänke im jeweiligen Weichtierzuchtgebiet. Die bei der Auswahl dieser Entnahmestellen zu berücksichtigenden Hauptfaktoren sind: frühere Feststellung von OsHV-1 µvar in dem Gebiet, Bestandsdichte, Wasserströmung, Meerestiefe und Bewirtschaftungspraxis.

▼B

c) Die Proben gemäß Artikel 5 Absatz 2 werden in der Jahreszeit entnommen, in der das Vorkommen von OsHV-1 µvar im jeweiligen Mitgliedstaat oder Kompartiment bekanntermaßen seinen Höhepunkt erreicht. Liegen keine derartigen Angaben vor, so werden die Proben unmittelbar nach dem Zeitraum entnommen, in dem die Wassertemperatur 16 °C übersteigt, bzw. zu der Jahreszeit, in der die Temperatur normalerweise ihren jährlichen Höchststand erreicht.

d) Die Proben gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b werden vorzugsweise in der in Buchstabe c genannten Jahreszeit entnommen. Werden Proben außerhalb dieser Jahreszeit entnommen, so müssen die entnommenen Austern während eines für die Feststellung von OsHV-1 µvar ausreichenden Zeitraums unter Bedingungen gehalten werden, die den in Buchstabe c beschriebenen entsprechen, bevor Untersuchungen durchgeführt werden.

TEIL B

Diagnostische Methoden zur Feststellung von OsHV-1 µvar

1. *Anwendungsbereich*

Nachstehend ist eine diagnostische Standardmethode beschrieben, die zur Feststellung von OsHV-1 µvar und zum Nachweis einer Polymerase-Kettenreaktion (im Folgenden „PCR“) anzuwenden ist. Sie ermöglicht eine Unterscheidung zwischen OsHV-1 und OsHV-1 µvar.

Um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen und Anpassungen an die Ausrüstung und die Bedingungen in ihren eigenen Einrichtungen vorzunehmen, dürfen die Laboratorien die in diesem Anhang beschriebenen Methoden gegebenenfalls ändern, sofern eine entsprechende Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden kann.

2. *Begriffsbestimmung*

OsHV-1 µvar ist in Artikel 1 dieser Verordnung definiert.

3. *Ausrüstung und Umgebungsbedingungen*

Für die Diagnose von OsHV-1 µvar und den Nachweis einer PCR ist die für den PCR-Nachweis übliche Ausrüstung unter denselben Umgebungsbedingungen zu verwenden, also:

— ein geschlossener Abzug mit einem System zur Erzeugung von UV-Strahlen zur Beseitigung möglicher Kontaminationen bei der Zubereitung des PCR-Gemisches;

— zwei vollständige Pipettensets (2 µl, 20 µl, 200 µl und 1 000 µl), eines für die DNA-Extraktion und eines für die Zubereitung des PCR-Gemisches;

— drei verschiedene Pipetten: eine Pipette (2 µl) für die Einbringung der Proben in das PCR-Gemisch, eine Pipette (20 µl) für die EtBr-Aufnahme und eine Pipette (20 µl) für die Beladung des Agarose-Gels mit PCR-Produkten;

— Filterpipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl und 1 000 µl) für die DNA-Extraktion, die Zubereitung des PCR-Gemisches und die Einbringung der Proben;

— Pipettenspitzen (20 µl) für die Aufnahme von EtBr und für die Beladung des Agarose-Gels mit Amplifikationsprodukten;

— ein Thermocycler für die Amplifikation;

— ein horizontales Elektrophoresesystem für die Elektrophorese von PCR-Produkten;

— ein UV-Tisch zur Beobachtung der PCR-Produkte nach der Agarose-Gel-Elektrophorese;

— ein System, das Bilder des Gels liefert.

▼B

Der Manipulator muss während aller unten beschriebenen Schritte einen Laborkittel und Handschuhe tragen. Der Laborkittel und die Handschuhe sind vorzugsweise nach jedem Hauptschritt (DNA-Extraktion, Zubereitung des PCR-Gemisches, Einbringung der Probe, Amplifikation und Beladung des Gels) zu wechseln.

Es wird empfohlen, die einzelnen Schritte in unterschiedlichen Räumen durchzuführen. Insbesondere sollten die Amplifikation und die Beladung des Gels/Elektrophorese in einem anderen Raum stattfinden als die DNA-Extraktion, die Zubereitung des PCR-Gemisches und die Verteilung der DNA.

4. *Verfahren*

4.1 Zubereitung der Proben

Lebende oder soeben verendete Austern (ohne Anzeichen der Zersetzung), die zuvor eingefroren werden können, werden für die DNA-Extraktion aufbereitet.

Die Proben werden je nach ihrer Größe unterschiedlich behandelt:

a) Bei Larven werden Sammelproben von 50 mg ganzer Tiere (einschließlich Schalen) mit 200 µl destilliertem Wasser zermahlen und bei 1 000 g 1 Minute lang zentrifugiert.

b) Bei Jungmuscheln, die kleiner als 6 mm sind, werden Sammelproben von 300 mg ganzer Tiere (einschließlich Schalen) mit 1 200 µl destilliertem Wasser zermahlen und bei 1 000 g 1 Minute lang zentrifugiert.

c) Bei Jungmuscheln, die zwischen 6 und 15 mm groß sind, werden alle Weichteile jedes Tieres einzeln zermahlen.

d) Bei Tieren, die größer als 15 mm sind, werden Teile der Kiemen und des Mantels isoliert.

Die DNA-Extraktion erfolgt mithilfe des QIAamp® DNA Mini Kits (QIAGEN) nach dem Protokoll für Gewebeproben.

Die weitere Zubereitung der Probe erfolgt in der folgenden Reihenfolge:

1. 100 µl der in den Buchstaben a und b genannten Aufschwemmungsproben oder 10 bis 50 mg der in den Buchstaben c und d genannten Gewebeproben in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß geben und 180 µl Gewebelysepuffer hinzufügen.

2. 20 µl Proteinase-K hinzufügen, (auf einem Vortex) kräftig mischen und bei 56 °C inkubieren, bis das Gewebe vollständig lysiert ist (über Nacht). Während der Inkubation die Probe mehrmals gründlich (auf einem Vortex) mischen, um die Probe zu dispergieren. Das 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß kurz zentrifugieren, um Tropfen vom Deckelinneren zu entfernen.

3. 200 µl Lysepuffer zu der Probe geben, 15 Sekunden lang auf einem Vortex kräftig mischen und die Probe 10 Minuten lang bei 70 °C inkubieren. Das 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß kurz zentrifugieren, um Tropfen vom Deckelinneren zu entfernen.

4. 200 µl Ethanol (96–100 %) zur Probe geben und 15 Sekunden lang auf einem Vortex mischen. Das 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß kurz zentrifugieren, um Tropfen vom Deckelinneren zu entfernen.

5. Die Mischung aus Schritt 4 vorsichtig — ohne den oberen Rand zu benetzen — auf die QIAamp-Spinsäule (in einem 2-ml-Collection-Tube) geben. Das Gefäß verschließen und 1 Minute lang bei 10 000 min^{-1} zentrifugieren. Anschließend die QIAamp-Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Collection-Tube (im Kit enthalten) setzen und das benutzte Gefäß mitsamt Filtrat entsorgen.

▼B

6. Die QIAamp-Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl Waschpuffer 1 hinzugeben, ohne den oberen Rand zu benetzen. Das Gefäß verschließen und 1 Minute lang bei 10 000 min^{-1} zentrifugieren. Anschließend die QIAamp-Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Collection-Tube (im Kit enthalten) setzen und das benutzte Collection Tube mitsamt Filtrat entsorgen.

7. Die QIAamp-Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl Waschpuffer 2 hinzugeben, ohne den oberen Rand zu benetzen. Das Gefäß verschließen und 3 Minuten lang bei maximaler Drehzahl (14 000 min^{-1}) zentrifugieren.

8. (Optional:) Anschließend die QIAamp-Spinsäule in ein neues 2-ml-Collection-Tube (nicht im Kit enthalten) setzen und das benutzte Collection Tube mitsamt Filtrat entsorgen. 1 Minute lang bei maximaler Geschwindigkeit (14 000 min^{-1}) zentrifugieren.

9. Anschließend die QIAamp-Spinsäule in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugengefäß (nicht im Kit enthalten) setzen und das Collection Tube mitsamt Filtrat entsorgen. Die QIAamp-Spinsäule vorsichtig öffnen und 100 µl destilliertes Wasser auf die Säule geben. 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren und die Spinsäule anschließend 1 Minute lang bei 10 000 min^{-1} zentrifugieren.

10. Qualität und Effizienz der Extraktion prüfen (beispielsweise durch OD-Messung (260 nm) mit einem Spektrophotometer oder nach der Elektrophorese in Agarose-Gel).

11. Proben soweit verdünnen, dass die endgültige DNA-Konzentration 50-100 ng/µl beträgt.

12. DNA-Lösungen bis zur Durchführung von PCR-Analysen bei 4 °C aufbewahren.

Für die DNA-Extraktion können auch andere im Handel erhältliche Kits verwendet werden, sofern sie nachweislich ähnliche Ergebnisse erzielen.

4.2 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

4.2.1 Reagenzien

— 10x-Puffer (mit Taq-DNA-Polymerase geliefert),

— $MgCl_2$ (DNA-Polymerase) (25 mM),

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM), vor Verwendung zehnfach verdünnen (auf 2 mM),

— dH_2O (destilliertes H_2O ohne DNA und RNA).

4.2.2 Primer

Die nachstehenden Primer [1] sind zu verwenden:

CF (10 µM),

CR (10 µM).

[1] Diese Primer oder deren Beschreibungen können beim Gemeinschaftlichen Referenzlaboratorium für Muschelkrankheiten (LGP-Ifremer, av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Frankreich) angefordert werden.

▼B

4.2.3 PCR-Gemisch

Das PCR-Gemisch für jedes Gefäß besteht aus:

	Volumen je Gefäß	Endgültige Konzentration
Puffer (10x)	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 dieses PCR-Gemisches in jedes PCR-Gefäß füllen;

— jedem Gefäß 1 µl extrahierter DNA (50-100 ng/µl) hinzufügen.

4.2.4 Kontrollen

Es werden zwei Arten von Kontrollen verwendet:

— Negativkontrollen bestehen aus dH_2O (1 µl auf 49 µl PCR-Gemisch). Sie sollen potenzielle reaktive Kontaminationen des Arbeitsumfelds aufzeigen. Eine Negativkontrolle sollte nach jeweils zehn Proben oder nach jeder Probenserie durchgeführt werden.

— Positivkontrollen bestehen aus Plasmid-DNA, die die Zielgenomregion CF-CR von OsHV-1 enthält. Sie sollen die Effizienz der PCR-Reaktion prüfen. Eine Positivkontrolle sollte nach jeder PCR-Analyse durchgeführt werden. Positivkontrollen sind beim Gemeinschaftlichen Referenzlaboratorium verfügbar.

4.2.5 Amplifikation

Amplifikationszyklen werden in einem Thermocycler durchgeführt.

— Anfängliche Denaturierung: 2 Minuten bei 94 °C,

— Amplifikation: 35 Zyklen (1 Minute bei 94 °C, 1 Minute bei 50 °C und 1 Minute bei 72 °C),

— abschließende Elongation: 5 Minuten bei 72 °C.

4.3 *Elektrophorese*

4.3.1 Reagenzien

— 50x-TAE-Puffer (kann direkt gebrauchsfertig gekauft werden):

Trisbase (40 mM) 242 g,

Eisessig (40 mM) 57,1 ml,

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

dH_2O für 1 Liter,

pH 8 einstellen;

▼B

— Agarose-Gel 2,5 % in 1x-TAE-Puffer

Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), nach Abkühlen des Gels hinzugefügt;

— Beladung mit blauem Farbstoff:

Bromophenolblau 0,25 %,

Xylen-Zyanol FF 0,25 %,

Saccharose 40 %,

bei 4 °C aufbewahren;

sechsfach verdünnt verwenden (2 µl blauer Beladungspuffer für 10 µl PCR-Produkte).

— Molekulargewichtsmarker:

SmartLadder SF (Eurogentec): ein gebrauchsfertiger Molekulargewichtsmarker mit neun regelmäßigen Banden von 100 bis 1 000 bp.

4.3.2 Herstellung von Agarose-Gel

1. 2,5 g Agarose abwiegen, 100 ml 1x-TAE-Puffer hinzufügen und erhitzen, bis die Mischung schmilzt.

2. Nach Abkühlen der Lösung Ethidiumbromid hinzufügen (5 µl für 100 ml Agarose-Gel) und die Lösung in eine spezifische Form mit Kämmen füllen (um Probetaschen zu bilden).

3. Wenn das Gel polymerisiert ist, werden die Kämme entfernt; das Gel wird in ein horizontales Elektrophoresesystem gefüllt, das so viel 1x-TAE-Puffer enthält, dass das Agarose-Gel vollständig bedeckt ist.

4. 10 µl PCR-Produkte werden mit 2 µl blauem Farbstoff (6x) vermischt und in die Probetaschen gefüllt.

5. Eine Probetasche ist für den Molekulargewichtsmarker bestimmt (5 µl).

6. Je nach Menge und Konzentration des Gels wird eine elektrische Spannung zwischen 50 und 150 Volt zwischen 30 Minuten und 1 Stunde angelegt.

7. Das Gel wird unter UV-Licht beobachtet.

4.4 *Auswertung*

Kommt in einer Probe OsHV-1 µvar vor, so ist das daran zu erkennen, dass sich auf 2,5 %igem Agarose-Gel eine Bande der entsprechenden Größe (157 bp anstatt 173 bp bei OsHV-1) bildet und alle Negativkontrollen negativ sowie alle Positivkontrollen positiv sind.

TEIL C

Festlegung des Sperrgebiets

Folgende Faktoren, die die Risiken der Ausbreitung der Krankheit beeinflussen, sind bei der Festlegung eines Sperrgebiets gemäß Artikel 2 Absatz 2 zu berücksichtigen:

a) Anzahl, Rate und Verteilung der Mollusken im befallenen Zuchtbetrieb oder Weichtierzuchtgebiet,

b) Abstand und Dichte benachbarter Zuchtbetriebe oder Weichtierzuchtgebiete,

c) Nähe zu Verarbeitungsbetrieben, Kontaktbetrieben oder Kontakt-Weichtierzuchtgebieten,

d) Arten im Zuchtbetrieb oder Weichtierzuchtgebiet,

▼B

e) Bewirtschaftungsmethoden im betroffenen Zuchtbetrieb oder Weichtierzuchtgebiet und in den benachbarten Zuchtbetrieben oder Weichtierzuchtgebieten und

f) hydrodynamische Bedingungen und andere epizootiologisch bedeutsame Faktoren.

▼B

ANHANG II

Muster einer Tiergesundheitsbescheinigung für das Inverkehrbringen von für Zucht- und Umsetzungsgebiete bestimmten Austern der Art *Crassostrea gigas*

EUROPÄISCHE UNION — **Bescheinigung für den innergemeinschaftlichen Handel**

Teil I: Angaben zur Sendung

I.1. Absender Name Anschrift Postleitzahl	I.2. Bezugs-Nr. der Bescheinigung — I.2.a. Lokale Bezugsnummer I.3. Zuständige oberste Behörde I.4. Zuständige örtliche Behörde
I.5. Empfänger Name Anschrift Postleitzahl	I.6. I.7.
I.8. Herkunftsland — ISO-Code — I.9.	I.10. Bestimmungsland — ISO-Code — I.11.
I.12. Herkunftsort/Fangort Zugelassener Fischzuchtbetrieb ☐ Andere ☐ Name — Zulassungsnummer Anschrift Postleitzahl	I.13. Bestimmungsort Zugelassener Fischzuchtbetrieb ☐ Andere ☐ Name — Zulassungsnummer Anschrift Postleitzahl
I.14. Verladeort Postleitzahl	I.15. Datum und Uhrzeit des Abtransports
I.16. Transportmittel Flugzeug ☐ Schiff ☐ Eisenbahnwaggon ☐ Straßenfahrzeug ☐ Andere ☐ Kennzeichnung:	I.17. Transportunternehmen Name — Zulassungsnummer Anschrift Postleitzahl — Mitgliedstaat
I.18. Tierart/Erzeugnis	I.19. Erzeugnis-Code (KN-Code) **03.07** I.20. Anzahl/Menge
I.21.	I.22. Anzahl Packstücke
I.23. Plomben- und Containernummer	I.24. Art der Verpackung
I.25. Tiere/Erzeugnisse zertifiziert für folgenden Zweck Zucht ☐ Umsetzung ☐	
I.26. Durchfuhr durch ein Drittland ☐ Drittland — ISO-Code Ausgangsstelle — Code Eingangsstelle — Nr. der Grenzkontrollstelle	I.27. Durchfuhr durch Mitgliedstaaten ☐ Mitgliedstaat — ISO-Code Mitgliedstaat — ISO-Code Mitgliedstaat — ISO-Code
I.28. Ausfuhr ☐ Drittland — ISO-Code Ausgangsstelle — Code	I.29.
I.30.	
I.31. Identifizierung der Tiere Art (wissenschaftliche Bezeichnung) — Menge	

▼B

EUROPÄISCHE UNION

für das Inverkehrbringen von für Zucht- und Umsetzungsgebiete bestimmten Austern der Art *Crassostrea gigas*

Teil II: Bescheinigung

II. **Gesundheitsbescheinigung**	II.a. Nr. der Bescheinigung	II.b.

([1])([2])[II.1. **Anforderungen für Austern der Art *Crassostrea gigas* aus einem gemäß Artikel 2 der Verordnung (EU) Nr. 175/2010 eingerichteten Sperrgebiet**

Der unterzeichnete amtliche Kontrolleur bestätigt, dass die Austern der Art *Crassostrea gigas* gemäß Teil I dieser Bescheinigung

II.1.1. aus einem Gebiet stammen, in dem Seuchenbekämpfungsmaßnahmen im Hinblick auf die erhöhte Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* im Zusammenhang mit OsHV—1 µvar gelten;

([1])[II.1.2. gemäß Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe a der Verordnung (EU) Nr. 175/2010 in Verkehr gebracht werden dürfen;

([1])[II.1.2. aus einem Teil des Sperrgebiets stammen, der nicht von der erhöhten Mortalität betroffen ist, und dass gemäß Anhang I der Verordnung Nr. 175/2010 Proben von Austern der Art *Crassostrea gigas* aus der Sendung entnommen und mit negativem Ergebnis getestet wurden;]]

([1])([3])[II.2. **Anforderungen für Austern der Art *Crassostrea gigas* aus einem Mitgliedstaat oder Kompartiment, in dem bereits Sperrmaßnahmen aufgrund einer erhöhten Mortalität bei Austern der Art Crassostrea gigas im Zusammenhang mit OsHV-1 µvar galten, die für Mitgliedstaaten oder Kompartimente bestimmt sind, in denen ein Programm für die frühzeitige Entdeckung von OsHV-1 µvar gilt**

Der unterzeichnete amtliche Kontrolleur bestätigt, dass die Austern der Art *Crassostrea gigas* gemäß Teil I dieser Bescheinigung

II.2.1. aus einem Zuchtbetrieb oder einem Weichtierzuchtgebiet stammen, in dem es den Aufzeichnungen des Zuchtbetriebs oder des Weichtierzuchtgebiets zufolge keine Anzeichen einer erhöhten Mortalität gibt;

II.2.2. aus einem Kompartiment stammen, in dem durch Probenahmen und Untersuchungen gemäß Anhang I der Verordnung (EU) Nr. 175/2010 nachgewiesen wurde, dass OsHV—1 µvar bei Austern der Art *Crassostrea gigas* nicht vorkommt.]

II.3. **Transport- und Kennzeichnungsvorschriften**

Der unterzeichnete amtliche Kontrolleur bestätigt, dass

II.3.1. die Austern der Art *Crassostrea gigas* gemäß Teil I dieser Bescheinigung unter Bedingungen und bei einer Wasserqualität befördert werden, die ihren Gesundheitsstatus nicht beeinträchtigen;

II.3.2. der Transportbehälter vor dem Verladen gereinigt und desinfiziert wurde oder neu ist;

II.3.3. die Sendung mit einem lesbaren Etikett auf der Außenseite des Behälters gekennzeichnet oder, bei Transport auf einem Schiff, im Schiffsmanifest verzeichnet ist, wobei die einschlägigen Informationen gemäß Teil I Felder I.8 bis I.13 dieser Bescheinigung sowie der nachstehende Vermerk angegeben sind:

entweder ([1])[„Austern der Art *Crassostrea gigas*, für die Zucht/Umsetzung in einem Gebiet bestimmt, in dem ein Programm zur frühzeitigen Entdeckung von OsHV-1 µvar gilt"]

oder (1)[„Austern der Art *Crassostrea gigas*, aus einem Gebiet, in dem Seuchenbekämpfungsmaßnahmen gelten, für die Zucht/Umsetzung in einem Gebiet bestimmt, in dem Seuchenbekämpfungsmaßnahmen gelten"].

Anmerkungen

Teil I:

— Feld I.12: Gegebenenfalls Zulassungsnummer des betreffenden Zuchtbetriebs oder Weichtierzuchtgebiets angeben

— Feld I.13: Gegebenenfalls Zulassungsnummer des betreffenden Zuchtbetriebs oder Weichtierzuchtgebiets angeben

— Felder I.20 und I.31: Bei der Menge die Gesamtzahl angeben.

— Feld I.25: „Zucht" ankreuzen, wenn die Tiere zur Zucht bestimmt sind, „Umsetzung", wenn sie zur Umsetzung bestimmt sind.

▼B

EUROPÄISCHE UNION

für das Inverkehrbringen von für Zucht- und Umsetzungsgebiete bestimmten Austern der Art *Crassostrea gigas*

II. **Gesundheitsbescheinigung**	II.a. Nr. der Bescheinigung	II.b.

Teil II:

(1) Nichtzutreffendes streichen.

(2) Teil II.1 dieser Bescheinigung gilt für Sendungen von Austern der Art *Crassostrea gigas* aus einem gemäß Artikel 2 Absatz 2 der Verordnung (EU) Nr. 175/2010 eingerichteten Sperrgebiet, die gemäß Artikel 3 Absatz 2 Buchstabe a dieser Verordnung dieses Gebiet verlassen dürfen.

(3) Teil II.2 dieser Bescheinigung gilt für die in Artikel 5 Absatz 1 der Verordnung (EU) Nr. 175/2010 genannten Sendungen von Austern der Art *Crassostrea gigas* aus einem Gebiet, in dem bereits Sperrmaßnahmen aufgrund einer erhöhten Mortalität bei Austern der Art *Crassostrea gigas* galten, die für Mitgliedstaaten oder Kompartimente bestimmt sind, in denen ein Programm für die frühzeitige Entdeckung von OsHV-1 µvar gilt.

Amtlicher Tierarzt/Amtliche Tierärztin bzw. Amtlicher Kontrolleur/Amtliche Kontrolleurin

Name (in Druckbuchstaben):	Qualifikation und Amtsbezeichnung:
Lokale Veterinäreinheit:	LVU Nr.:
Datum:	Unterschrift:
Stempel:	