Käesolev dokument on vaid dokumenteerimisvahend ja institutsioonid ei vastuta selle sisu eest

►**B** **KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 175/2010,**

2. märts 2010,

millega rakendatakse nõukogu direktiivi 2006/88/EÜ seoses suurte hiidaustrite (*Crassostrea gigas*) suurenenud suremuse tõrjeks võetavate meetmetega ja austrite herpesviiruse 1 µvar (OsHV-1 µvar) avastamisega

(EMPs kohaldatav tekst)

(ELT L 52, 3.3.2010, lk 1)

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
►**M1**	Komisjoni määrus (EL) nr 1153/2010, 8. detsember 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 175/2010,

2. märts 2010,

millega rakendatakse nõukogu direktiivi 2006/88/EÜ seoses suurte hiidaustrite (*Crassostrea gigas*) suurenenud suremuse tõrjeks võetavate meetmetega ja austrite herpesviiruse 1 µvar (OsHV-1 µvar) avastamisega

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse nõukogu 24. oktoobri 2006. aasta direktiivi 2006/88/EÜ vesiviljelusloomade ja vesiviljelustoodete loomatervishoiunõuete ning teatavate veeloomadel esinevate taudide ennetamise ja tõrje kohta, [1] eriti selle artikli 41 lõiget 3 ja artikli 61 lõiget 3,

ning arvestades järgmist:

(1) Direktiivis 2006/88/EÜ on sätestatud loomatervishoiunõuded, mida tuleb kohaldada vesiviljelusloomade ja vesiviljelustoodete turuleviimise suhtes. Lisaks on direktiivis sätestatud minimaalsed tõkestusmeetmed, mida kohaldatakse teatavate veeloomadel esinevate taudide kahtluse või puhangu korral.

(2) Kõnealuse direktiivi artiklis 41 on sätestatud, et liikmesriigid võtavad asjakohased meetmed uute taudide tõrjeks ja taudi leviku tõkestamiseks. Uue taudi korral teavitab asjaomane liikmesriik sellest viivitamata komisjoni, liikmesriike ja EFTA liikmesriike, kui leiud on mõne teise liikmesriigi jaoks epidemioloogilise tähtsusega.

(3) 2008. aasta hiliskevadel ja suvel täheldati Prantsusmaa ja Iirimaa mitmes piirkonnas suurte hiidaustrite (*Crassostrea gigas*) (edaspidi „suured hiidaustrid”) suremuse suurenemist. Selle põhjustajaks peeti mitme ebasoodsa loodustingimuse koosmõju *Vibrio* perekonda kuuluva bakteri ja austrite herpesviirusega-1 (OsHV-1), sh selle viiruse hiljuti kirjeldatud genotüübiga OsHV-1 µvar.

(4) Prantsuse ametiasutused teatasid komisjonile, liikmesriikidele ja EFTA liikmesriikidele olukorrast ja võetud meetmetest 2008. aasta augustis ning toiduahela ja loomatervishoiu alaline komitee arutas küsimust 2008. aasta septembris.

(5) 2009. aasta kevadel täheldati Prantsusmaal, Iirimaal ja Kanalisaartel taas suremuse suurenemist, mida põhjendati samade faktorite koosmõjuga. Kuigi suremuse põhjused on endiselt ebaselged, osutavad Iirimaal ja Ühendkuningriigis 2009. aastal tehtud epidemioloogilised uuringud, et enamasti on suremuse põhjustaja viirus OsHV-1 µvar.

[1] ELT L 328, 24.11.2006, lk 14.

▼B

(6) Kõnealuste liikmesriikide ja Kanalisaarte pädevad ametiasutused teatasid komisjonile olukorrast ja võetud meetmetest ning küsimust arutati mitu korda toiduahela ja loomatervishoiu alalises komitees.

(7) Kõnealuste liikmesriikide ja Kanalisaarte pädevate ametiasutuste võetud ohutusmeetmed uute taudide tõrjeks hõlmasid enamasti suurte hiidaustrite liikumise piiramist väljapoole suurenenud suremusega piirkondi.

(8) Võttes arvesse uue taudi taasesinemist 2009. aastal, taudi võimalikku kordumist ja ohtu edasiseks levikuks 2010. aasta kevadel ja suvel ning omandatud kogemusi, on asjakohane ja vajalik laiendada mõjutatud liikmesriikide poolt juba võetud meetmeid.

(9) Selleks et tagada ühtsed tingimused direktiivi 2006/88/EÜ nõuete rakendamisel seoses uute taudidega ning selle, et võetud meetmed loovad piisava kaitse taudi edasise leviku vastu, kehtestamata seejuures mittevajalikke piiranguid suurte hiidaustrite liikumise suhtes, on vaja uute taudide tõrjeks võetavaid meetmeid kooskõlastada Euroopa Liidu tasandil.

(10) Kui pädevaid asutusi teavitatakse suurte hiidaustrite suremuse suurenemisest, tuleks võtta proovid ja teha analüüsid viiruse OsHV-1 µvar esinemise kinnitamiseks või välistamiseks.

(11) Kui viiruse genotüübi OsHV-1 µvar esinemine on kinnitatud, peaks liikmesriik kohaldama tauditõrjemeetmeid, sealhulgas kehtestama isoleeritud ala. Isoleeritud ala määratlemisel tuleks arvesse võtta teatavaid käesolevas määruses sätestatud tegureid. Tauditõrjemeetmeid tuleks kohaldada niikaua, kuni kontrolli käigus on selgunud, et suremuse suurenemine on peatunud.

(12) Taudi leviku ohu vähendamiseks tuleks kehtestada piirangud suurte hiidaustrite liikumisele isoleeritud aladelt väljapoole. Kui taudi leviku oht väheneb, tuleks siiski lubada teatavaid erandeid. Asjaomased erandid mõjutavad selliste suurte hiidaustrite saadetiste liikumist, mis on ette nähtud kas kasvatamiseks või ülekandekeskuste jaoks muudel isoleeritud aladel, või mis on ette nähtud inimtoiduks. Selleks et tagada kasvatamiseks või ülekandekeskuste jaoks ette nähtud suurte hiidaustrite saadetiste jälgitavus, tuleks saadetistele lisada veterinaarsertifikaat. Veterinaarsertifikaadi täitmisel tuleks arvesse võtta komisjoni 12. detsembri 2008. aasta määruse (EÜ) nr 1251/2008 (millega rakendatakse nõukogu direktiivi 2006/88/EÜ seoses vesiviljelusloomade ja vesiviljelustoodete turuleviimise tingimuste ja sertifitseerimisnõuetega ja ühendusse importimisega ning millega sätestatakse vektorliikide loetelu) ([1]) V lisas esitatud selgitusi.

([1]) ELT L 337, 16.12.2008, lk 41.

▼B

(13) Selleks et koguda rohkem teavet uute taudide tõrje kohta Euroopa Liidus ning eelkõige liikmesriikides ja piirkondades, kus taud ei ole veel levinud, ning tagada viiruse OsHV-1 µvar esinemise varajane avastamine, võivad liikmesriigid koostada plaaniliste proovide võtmise ja testimise kava viiruse OsHV-1 µvar varajaseks avastamiseks. Kui suured hiidaustrid on pärit piirkonnast, mille suhtes on 2009. aastal siseriiklike meetmete kohaselt või 2010. aastal käesoleva määruse kohaselt võetud ohutusmeetmeid, ning kui austrid on ette nähtud kasvatamiseks või haudejaamade tarbeks liikmesriikides või piirkondades, mida kõnealune kava hõlmab, tuleks austrite suhtes kohaldada täiendavaid loomatervishoiunõudeid, kuni asjaomases liikmesriigis või piirkonnas ei ole viirust OsHV-1 µvar avastatud.

(14) Selleks et tagada liikmesriikides ning viiruse OsHV-1 µvar varajaseks avastamiseks plaaniliste proovide võtmise ja testide kava kohaselt kogutud andmete võrreldavus, tuleks kehtestada teatavad nõuded asjaomaste programmide sisu kohta.

(15) Täpse ja õigeaegse teabe olemasolu viiruse OsHV-1 µvar avastamise kohta liikmesriikides on olulise tähtsusega, et tagada uute taudide nõuetekohane tõrje. Seepärast peaksid liikmesriigid viivitamata teatama komisjonile ja teistele liikmesriikidele viiruse OsHV-1 µvar esimesest kinnitatud esinemisest nende territooriumil 2010. aastal.

(16) Lisaks tuleks kasutada Interneti-põhiseid teabelehti, mis on koostatud kooskõlas komisjoni 31. oktoobri 2008. aasta otsuse 2009/177/EÜ (millega rakendatakse nõukogu direktiivi 2006/88/EÜ seoses seire- ja likvideerimisprogrammide ning liikmesriikide, tsoonide ja piirkondade taudivaba staatusega) [1] artikliga 10.

(17) Selleks et tagada läbipaistvus ja kiire juurdepääs asjakohasele uusi taude käsitlevale teabele, peaksid liikmesriigid edastama Euroopa Komisjonile ja teistele liikmesriikidele teabe isoleeritud alade kohta, varem ohutusmeetmetega hõlmatud alade kohta, kus viiruse OsHV-1 µvar puudumine on tõendatud, ning viiruse OsHV-1 µvar varajaseks avastamiseks koostatud kavade kohta.

(18) Kuna uute taudidega seotud küsimustes on endiselt väga palju ebamäärast, tuleks käesolevas määruses sätestatud meetmeid kohaldada kuni 2010. aasta detsembri lõpuni.

(19) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas toiduahela ja loomatervishoiu alalise komitee arvamusega,

[1] ELT L 63, 7.3.2009, lk 15.

▼B

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Mõisted

Käesoleva määruse kohaldamisel tähendab viirus OsHV-1 µvar austrite herpesviiruse-1 (OsHV-1) genotüüpi, milles osalise nukleotiidijärjestuse andmete põhjal deletsiooni tagajärjel süstemaatiliselt puuduvad 12 aluspaari genoomi osas ORF 4, võrreldes viirusega OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artikkel 2

Proovide võtmine, testimine ja isoleeritud alade loomine

1. Kui täheldatakse suurte hiidaustrite (*Crassostrea gigas*) (edaspidi „suured hiidaustrid") suurenenud suremust, on pädev asutus kohustatud:

a) võtma proove vastavalt I lisa A osale;

b) testima viiruse OsHV-1 µvar esinemist vastavalt I lisa B osas sätestatud diagnoosimeetodile.

2. Kui lõike 1 punkti b kohaste testide tulemused kinnitavad viiruse OsHV-1 µvar esinemist, peab pädev asutus kehtestama isoleeritud ala. Kõnealuse ala loomisel analüüsitakse iga juhtumit eraldi, võttes arvesse I lisa C osas loetletud tegureid, mis võivad mõjutada taudi leviku ohtu.

3. Liikmesriigid teatavad komisjonile ja teistele liikmesriikidele viivitamata esimese isoleeritud ala kehtestamisest oma territooriumil 2010. aastal.

Artikkel 3

Artiklis 2 osutatud isoleeritud aladelt pärit suurte hiidaustrite turuleviimise nõuded

1. Artikli 2 lõike 2 kohaselt kehtestatud isoleeritud aladelt pärit suuri hiidaustreid ei tohi nimetatud alalt välja viia.

2. Erandina lõikest 1 võib suurte hiidaustrite saadetisi isoleeritud alalt välja viia järgmistel juhtudel:

a) kui saadetised on ette nähtud mõne teise isoleeritud ala jaoks, mis on kehtestatud artikli 2 lõike 2 kohaselt;

b) kui need on pärit isoleeritud ala sellisest piirkonnast (sh kasvatustest), kus ei ole täheldatud suremuse suurenemist, ning kui isoleeritud alal

   i) on võetud proove vastavalt I lisa A osale ja

   ii) tehtud teste viiruse OsHV-1 µvar esinemise tuvastamiseks vastavalt I lisa B osas sätestatud diagnoosimeetoditele, ning kõik tulemused on osutunud negatiivseks;

▼B

c) kui on ette nähtud, et enne inimtoiduks kasutamist tuleb austreid täiendavalt töödelda puhastuskeskustes, väljastuskeskustes või töötlevates ettevõtetes, mis on varustatud heitveekäitlussüsteemiga, mille kohta pädev asutus on kinnitanud, et süsteem

i) inaktiveerib ümbrisega viirused või

ii) vähendab haiguste looduslikesse vetesse leviku ohtu vastuvõetava tasemeni;

d) kui austrid on ette nähtud inimtoiduks ning seega pakitud ja märgistatud Euroopa Parlamendi ja nõukogu määruse (EÜ) nr 853/2004 ([1]) kohaselt ning

i) ei ole enam võimelised elama, kui nad viiakse tagasi keskkonda, kust nad on võetud, või

ii) on ette nähtud täiendavaks töötlemiseks ilma ajutise ladustamiseta töötlemiskohas;

e) kui täiendava töötlemiseta inimtoiduks ette nähtud austrid on pakendatud jaemüügipakenditesse, mis vastavad määruse (EÜ) nr 853/2004 selliseid pakendeid käsitlevatele sätetele.

3. Lõike 2 punktides a ja b osutatud saadetistele, mis on ette nähtud kasvanduste või ülekandekeskuste jaoks, peab olema lisatud veterinaarsertifikaat, mis on täidetud vastavalt käesoleva määruse II lisas esitatud näidisele ning määruse (EÜ) nr 1251/2008 V lisa selgitustele.

Artikkel 4

Artiklites 2 ja 3 sätestatud meetmete tühistamine

Pädev asutus võib tühistada isoleeritud alade suhtes artikli 2 lõike 2 kohaselt võetud kontrollimeetmed ja austrite turuleviimise suhtes artikli 3 kohaselt seatud piirangud pärast seda, kui 15päevase intervalliga tehtud kaks järjestikust kontrolli kinnitavad, et suremus enam ei suurene.

Artikkel 5

Selliste suurte hiidaustrite turuleviimise nõuded, mis on pärit piirkondadest, mille suhtes on kehtestatud kontrollimeetmed viirusest OsHV-1 µvar põhjustatud suurte hiidaustrite suremuse suurenemise tõttu

1. Turule viidavad suured hiidaustrid, mis on pärit piirkondadest, kus kas 2009. või 2010. aastal kohaldati ohutusmeetmeid seoses suurte hiidaustrite suurenenud suremusega, mida põhjustas viirus OsHV-1 µvar, peavad vastama järgmistele tingimustele:

a) neil peab kaasas olema veterinaarsertifikaat, mis on täidetud vastavalt käesoleva määruse II lisas esitatud näidisele ning määruse (EÜ) nr 1251/2008 V lisa selgitustele, kui austrid

i) on ette nähtud liikmesriikide või piirkondade jaoks, mis on hõlmatud viiruse OsHV-1 µvar varajase avastamise kavaga ja kus viirust OsHV-1 µvar ei ole avastatud, ning

([1]) ELT L 139, 30.4.2004, lk 55.

▼B

ii) on ette nähtud kas kasvatamiseks või ülekandekeskuste jaoks;

b) nad on pärit piirkondadest, kus viiruse OsHV-1 µvar puudumine on tõendatud I lisa A osa kohaselt võetud proovide ja tehtud testidega ning

c) nad vastavad sertifikaadi näidises sätestatud ja punktis a osutatud loomatervishoiunõuetele.

2. Lõike 1 punkti a alapunktis I osutatud kava viiruse OsHV-1 µvar varajaseks avastamiseks peab vastama järgmistele nõuetele:

a) kavast tuleb teatada toiduahela ja loomatervishoiu alalisele komiteele;

b) asjaomane teatis peab vastama otsuse 2009/177/EÜ II lisas esitatud vormi punktidele 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 ja 7;

c) kava peab hõlmama järgmist:

i) proovide võtmist vastavalt I lisa A osale;

ii) testimist viiruse OsHV-1 µvar diagnoosimiseks vastavalt I lisa B osas sätestatud diagnoosimeetoditele.

3. Lõiget 1 hakatakse kohaldama üks nädal pärast toiduahela ja loomatervishoiu alalise komitee koosolekut, mille käigus teatati lõike 1 punkti a alapunktis i osutatud kavast.

Artikkel 6

Interneti-põhine teabeleht

1. Liikmesriigid teevad komisjonile ja teistele liikmesriikidele kättesaadavaks:

a) isoleeritud alade loetelu ja asjaolud, mida võeti arvesse nende alade määratlemisel, sealhulgas teabe artikli 2 lõike 2 kohaselt kehtestatud alade geograafiliste piiride kohta;

b) selliste piirkondade loetelu, sealhulgas teabe asjaomaste alade geograafiliste piiride kohta,

i) mille suhtes 2009. aastal kohaldati ohutusmeetmeid seoses suurte hiidaustrite suurenenud suremusega, mida põhjustas viirus OsHV-1 µvar;

ii) kus viiruse OsHV-1 µvar puudumist on tõendatud isoleeritud alalt võetud proovidega, mida on testitud vastavalt I lisa A ja B osale;

c) teatise artikli 5 lõikes 2 osutatud kavade kohta, sealhulgas teabe asjaomaste alade geograafiliste piiride kohta.

2. Lõike 1 kohane teave peab olema ajakohastatud ja tehtud kättesaadavaks Interneti-põhistel teabelehtedel, mis on loodud kooskõlas komisjoni otsuse 2009/177/EÜ artikliga 10.

▼B

Artikkel 7

Aruanded

Liikmesriigid peavad esitama komisjonile aruande artikli 5 lõike 2 kohaselt teatatud kavade kohta hiljemalt 1. oktoobriks 2010.

Aruanne tuleb esitada vastavalt otsuse 2009/177/EÜ VI lisas esitatud vormile.

Artikkel 8

Jõustumine ja kohaldamine

Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Seda kohaldatakse alates 15. märtsist 2010 kuni ►**M1** 30. aprillini 2011 ◄.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

▼B

I LISA

A OSA

Proovide võtmine

1. *Artikliga 2 ette nähtud proovide võtmine*

Artiklis 2 osutatud proovid peavad sisaldama vähemalt 12 suure hiidaustri isendit. Loomade valikul võetakse prooviks nõrku, avanenud poolmetega või äsja surnud (mitte veel lagunenud) isendeid ning neid kogutakse piirkondadest, kus on täheldatud suremust.

2. *Artikli 3 lõike 2 punktiga b, artikli 5 lõike 1 punktiga b ja artikli 5 lõikega 2 ettenähtud proovide võtmine*

a) Artikli 3 lõike 2 punktis b osutatud proovid peavad sisaldama järgmist:

i) vastsete puhul: viis vähemalt 50 mg koondproovi, mis sisaldavad terviklikke loomi 4–8 päeva pärast viljastamist, iga saadetis peab sisaldama ka austrikarpi;

ii) vastsete puhul, mille pikkus on alla 6 mm: 30 proovi *à* 300 mg terviklikest loomadest, iga saadetis peab sisaldama ka austrikarpi;

iii) austrite puhul, mis on pikemad kui 6 mm: 150 isendit saadetise kohta.

Loomade valikul peavad kõik saadetise osad olema proovis esindatud proportsionaalselt. Kui leitakse nõrku, avanenud poolmetega või äsja surnud (mitte veel lagunenud) loomi, võetakse valimisse eelkõige selliseid loomi.

b) Artikli 5 lõike 2 kohaselt võetud proovid peavad sisaldama vähemalt 150 suurt hiidaustrit iga proovivõtu koha kohta. Proovid tuleb võtta kõikidest liikmesriigis või piirkonnas asuvatest kasvandustest või asjaomase kavaga hõlmatud kasvatuspiirkondadest.

Artikli 5 lõike 1 punkti b kohaselt võetud proovid peavad sisaldama vähemalt 150 suurt hiidaustrit iga piirkonna kohta.

Loomade valikul tuleb arvesse võtta järgmist:

— kui leitakse nõrku, avanenud poolmetega või äsja surnud (mitte veel lagunenud) loomi, võetakse valimisse eelkõige neid. Kui selliseid loomi ei esine, peab valim sisaldama alla aasta vanuseid terviklikke molluskeid;

— kui proove võetakse kasvandustest, kus tootmisprotsessis kasutatakse mitut veeallikat, peavad proovid sisaldama kõikidest veeallikatest pärit loomi, nii et kasvanduse kõik osad oleksid proovides esindatud proportsionaalselt;

— kui proove võetakse molluskikasvatuspiirkonnast, peavad need sisaldama loomi piisavast arvust (vähemalt kolm) proovivõtukohtadest, nii et molluskikasvatuspiirkonna kõik osad, sealhulgas molluskikasvatuspiirkonna looduslikud jõesängid, oleksid proovides esindatud proportsionaalselt. Proovivõtukohtade valikul tuleb arvesse võtta järgmisi olulisi tegureid: viiruse OsHV-1 µvar varasem esinemine piirkonnas, austrite tihedus, veevool, põhjareljeef ja tootmistavad.

▼B

c) Artikli 5 lõike 2 kohased proovid tuleb võtta sellel aastaajal, millal viiruse OsHV-1 µvar esinemissagedus liikmesriikides või piirkondades on teadaolevalt kõige suurem. Juhul kui sellised andmed puuduvad, tuleb proovid võtta kohe pärast seda, kui veetemperatuur tõuseb üle 16 °C, või aastaajal, millal veetemperatuur saavutab tavaliselt iga-aastase maksimumi.

d) Artikli 5 lõike 1 punkti b kohased proovid tuleb soovitavalt võtta punktis c kirjeldatud aastaajal. Kui proove ei võeta nimetatud aastaajal, tuleb austreid enne testimist hoida tingimustes, mis on sarnased punktis c kirjeldatud aastaaja tingimustega ning sobilikud viiruse OsHV-1 µvar diagnoosimiseks.

B OSA

Viiruse OsHV-1 µvar avastamise diagnoosimeetodid

1. *Kohaldamisala*

Käesolev menetlus hõlmab standardsete diagnoosimeetodite kirjeldust viiruse OsHV-1 µvar avastamiseks ja kindlaksmääramiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil. Kõnealune meetod võimaldab eristada viirust OsHV-1 viirusest OsHV-1 µvar.

Selleks et optimeerida reaktsiooni tingimusi ning sobitada labori seadmeid ja tingimusi, võivad laborid vajaduse korral kohandada käesolevas lisas kirjeldatud meetodeid, tingimusel et saab tõendada samaväärset tundlikkust ja spetsiifilisust.

2. *Mõisted*

Viiruse OsHV-1 µvar määratlus on esitatud käesoleva määruse artiklis 1.

3. *Seadmed ja keskkonnatingimused*

Diagnostilisteks uuringuteks viiruse OsHV-1 µvar tuvastamiseks ja kindlaksmääramiseks polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil on vaja järgmisi keskkonnatingimusi ja vahendeid, mida kasutatakse tavaliselt PCR-katsete puhul:

— suletud kate, mis on varustatud UV-kiirgust tootva süsteemiga, et vältida võimalikku saastumist PCR-segu valmistamisel;

— kaks täiskomplekti pipette (2 µl; 20 µl; 200 µl ja 1 000 µl), esimene DNA ekstraheerimiseks ja teine PCR-segu ettevalmistamiseks;

— kolm pipetti: esimene (2 µl) PCR-segu doseerimiseks, teine (20 µl) EB-proovide võtmiseks ja kolmas (20 µl) PCR-saaduste ülekandmiseks agaroosgeelile;

— filtriga pipetiotsikud (2 µl; 20 µl; 200 µl ja 1 000 µl) DNA ekstraheerimiseks, PCR-segu ettevalmistamiseks ja proovide võtmiseks;

— pipetiotsikud (20 µl) EB-proovide võtmiseks ja amplifikatsioonisaaduste ülekandmiseks agaroosgeelile;

— termotsükler amplifitseerimiseks;

— horisontaalne elektroforeesisüsteem PCR-saaduste elektroforeesimiseks;

— UV-lambi alusplaat, et jälgida PCR-saadusi pärast agaroosgeeli elektroforeesimist;

— geelil tekkinud kujutiste visualiseerimise süsteem.

▼B

Kõikide eespool kirjeldatud toimingute ajal peab laborant kandma kitlit ja kindaid. Kitlit ja kindaid on soovitav vahetada pärast iga olulisemat toimingut – DNA ekstraheerimist, PCR-segu valmistamist, proovide võtmist, amplifitseerimist ja saaduste ülekandmist geelile.

Nimetatud toimingud on soovitav teha eri ruumides. Eelkõige peaksid eri ruumides toimuma amplifitseerimine ja geelile ülekandmine/elektroforees ning DNA ekstraheerimine, PCR-segu valmistamine ja DNA määramine.

4. *Menetlus*

4.1. Proovi ettevalmistamine

Elusalt või äsja surnud (mitte veel lagunenud) külmutatud austrilt ekstraheeritakse DNA.

Proove käsitletakse vastavalt nende suurusele:

a) vastsete puhul: terviklikke loomi (sh austrikarpi) sisaldavatele 50 mg proovidele lisatakse 200 µl destilleeritud vett, segu purustatakse ja tsentrifuugitakse 1 000 g juures 1 minuti jooksul;

b) vastsete puhul, mille pikkus on kuni 6 mm: terviklikke loomi (sh austrikarpi) sisaldavatele 300 mg proovidele lisatakse 1 200 µl destilleeritud vett, segu purustatakse ja tsentrifuugitakse 1 000 g juures 1 minuti jooksul;

c) vastsete puhul, mille pikkus on 6–15 mm, purustatakse eraldi iga isend koos kõikide pehmete kudedega;

d) üle 15 mm pikkuste loomade puhul eraldatakse lõpused ja mantel.

DNA ekstraheerimisel kasutatakse komplekti QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) ja järgitakse kudede testimise eeskirja.

Seejärel valmistatakse proovid ette järgmises järjekorras.

1. Punktides a ja b kirjeldatud näidiste puhul asetatakse 100 µl supernatanti ning punktides c ja d kirjeldatud näidiste puhul 10–50 mg kudesid mikrotsentrifuugi 1,5 ml katsutisse ning lisatakse 180 µl puhvrit ATL.

2. Lisatakse 20 µl proteinaasi K, segatakse pöörissegajas ja inkubeeritakse temperatuuril 56 °C, kuni koed on täielikult lüüsunud (üleöö). Vajaduse korral, kui proovi on vaja ühtlustada, segatakse seda inkubeerimise ajal pöörissegajas. Mikrotsentrifuugi 1,5 ml katsutit tsentrifuugitakse lühidalt, et eraldada korgilt tilgad.

3. Proovile lisatakse 200 µl puhvrit AL, segatakse pulseerivas pöörissegajas 15 sekundit ja inkubeeritakse 10 minuti jooksul temperatuuril 70 °C. Mikrotsentrifuugi 1,5 ml katsutit tsentrifuugitakse lühidalt, et eraldada korgilt tilgad.

4. Proovile lisatakse 200 µl etanooli (96–100 %) ja segatakse pulseerivas pöörissegajas 15 sekundit. Mikrotsentrifuugi 1,5 ml katsutit tsentrifuugitakse lühidalt, et eraldada korgilt tilgad.

5. Pärast 4. etappi saadud segu asetatakse ettevaatlikult komplekti QIAamp tsentrifuugitavasse kolonni (asub 2 ml katsutis) ilma kolonni servi niisutamata. Kork suletakse ja proovi tsentrifuugitakse 10 000 p/min 1 minuti jooksul. QIAamp tsentrifuugitav kolonn asetatakse puhtasse 2 ml katsutisse (komplektis) ja filtraati sisaldav katsuti visatakse ära.

▼B

6. QIAamp tsentrifuugitav kolonn avatakse ettevaatlikult ja lisatakse 500 µl puhvrit AW1 ilma kolonni servi niisutamata. Kork suletakse ja proovi tsentrifuugitakse 10 000 p/min 1 minuti jooksul. QIAamp tsentrifuugitav kolonn asetatakse puhtasse 2 ml katsutisse (komplektis) ja filtraati sisaldav katsuti visatakse ära.

7. QIAamp tsentrifuugitav kolonn avatakse ettevaatlikult ja lisatakse 500 µl puhvrit AW2 ilma tsentrifuugikatsuti servi niisutamata. Kork suletakse ja proovi tsentrifuugitakse täiskiirusel 14 000 p/min 3 minuti jooksul.

8. (Vajaduse korral) QIAamp tsentrifuugitav kolonn asetatakse puhtasse 2 ml katsutisse (ei ole komplektis) ja filtraati sisaldav katsuti visatakse ära. Proovi tsentrifuugitakse täiskiirusel 14 000 p/min 1 minuti jooksul.

9. QIAamp tsentrifuugitav kolonn asetatakse mikrotsentrifuugi puhtasse 1,5 ml katsutisse (komplektis) ja filtraati sisaldav katsuti visatakse ära. QIAamp tsentrifuugitav kolonn avatakse ettevaatlikult ja lisatakse 100 µl destilleeritud vett. Proovi inkubeeritakse 5 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugitakse seejärel 10 000 p/min 1 minuti jooksul.

10. Kontrollitakse ekstraheerimise kvaliteeti ja tõhusust (näiteks mõõdetakse OD [260 nm] spektrofotomeetriga või pärast elektroforeesi agaroosgeelil).

11. Proovi lahjendatakse, et DNA lõppkontsentratsioon oleks 50–100 ng/µl.

12. Kuni PCR-analüüsi tulemuste saamiseni hoitakse DNA lahust temperatuuril 4 °C.

DNA ekstraheerimiseks võib kasutada ka teisi müügil olevaid komplekte, kui on tõendatud, et need annavad samasuguse tulemuse.

4.2. *Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)*

4.2.1. Reaktiivid:

— 10 X reaktsioonipuhver (Taq DNA polümeraasi komplektis);

— $MgCl_2$ (DNA polümeraasi komplektis) (25 mM);

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) tuleb lahjendada 10 korda (2 mM) enne kasutamist;

— d H_2O (DNA- ja RNA-vaba destilleeritud vesi).

4.2.2. Praimerid

Kasutada tuleb järgmisi praimereid ([1]):

CF (10 µM);

CR (10 µM).

([1]) Kõnealuseid praimereid või nende kirjeldusi saab molluskihaiguste tuvastamise ühenduse referentlaborist (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Prantsusmaa).

▼B

4.2.3. PCR-segu

PCR-segu kõikide katsutite jaoks on järgmine:

	Katsuti maht	Lõppkontsentratsioon
Reaktsioonipuhver (10 X)	5 µl	1 X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq-polümeraas (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— Igasse katsutisse lisatakse 49 µl kõnealust PCR-segu.

— Igasse katsutisse lisatakse 1 µl ekstraheeritud DNAd (50–100 ng/µl).

4.2.4. Kontrollimine

Kasutatakse kaht tüüpi kontrollimist.

— Negatiivne kontroll sisaldab dH_2O (1 µl dH_2O; 49 µl PCR-segu). Negatiivse kontrolli eesmärk on tuvastada töökeskkonna võimalikku saastatust reaktiividega. Negatiivne kontroll tuleb teha iga 10 proovi järel või iga proovide partii järel.

— Positiivne kontroll sisaldab plasmiidset DNAd, mis sisaldab viiruse OsHV-1 teatavat järjestust CF-CR. Kontrolli eesmärk on kontrollida PCR-reaktsiooni tõhusust. Iga PCR-analüüsi kohta tuleb teha üks positiivne kontroll. Positiivseid kontrolle saab ühenduse referentlaboritest.

4.2.5. Amplifitseerimine

Amplifitseerimiseks kasutatakse termotsüklerit.

— Esialgne denaturatsioon: 2 minutit temperatuuril 94 °C.

— Amplifitseerimine: 35 tsüklit (1 minut 94 °C, 1 minut 50 °C ja 1 minut 72 °C).

— Lõplik elongatsioon: 5 minutit temperatuuril 72 °C.

4.3. *Elektroforees*

4.3.1. Reaktiivid:

— 50 X TAE (selle võib osta kasutusvalmina):

Tris-alus (40 mM) 242 g;

Jää-äädikhape (40 mM) 57,1 ml;

$Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ (1 mM) 18,61 g;

d H_2O 1 liitri lahuse valmistamiseks;

Lahuse pH viiakse väärtuseni 8.

▼B

— Agaroosgeel 2,5 % 1 X TAE:

Etiidiumbromiid (0,5 μg/ml), lisatakse pärast geeli jahutamist.

— Sinine puhver:

Bromofenoolsinine 0,25 %;

Ksüleen-tsüanool FF 0,25 %;

Sahharoos 40 %.

Säilitatakse temperatuuril 4 °C.

Kasutatakse kuuekordselt lahustatuna (2 μl sinist proovipuhvrit 10 μl PCR-saaduse kohta).

— Molekulmassi marker:

SmartLadder SF (Eurogentec): kasutusvalmis molekulmassi marker, mis koosneb 9 korrapäraste vahedega rajast pikkusega 100 – 1 000 aluspaari.

4.3.2. Agaroosgeeli valmistamine

1. Kaalutakse 2,5 g agaroosi, lisatakse 100 ml 1 X TAE ja kuumutatakse kuni segu sulamiseni.

2. Pärast lahuse jahutamist lisatakse 5 μl etiidiumbromiidi 100 ml agaroosgeeli kohta, seejärel valatakse lahus kammidega varustatud alusplaadile (taskute vormimiseks).

3. Kui geel on tardunud, eemaldatakse kammid ja geel asetatakse horisontaalsesse elektroforeesisüsteemi, milles on piisavalt reaktsioonipuhvrit 1 X TAE, et see kataks agaroosgeeli täielikult.

4. 10 μl PCR-saadust segatakse 2 μl sinise puhvriga (6 X), mis on varem taskutesse pipeteeritud.

5. Üks tasku on ette nähtud molekulmassi markeri jaoks (5 μl).

6. Sõltuvalt geeliplaadi suurusest ja paksusest kasutatakse foreesimisel pinget 50–150 volti ning forees kestab 30 minutit kuni 1 tund.

7. Geeli vaadeldakse UV-lambi all.

4.4. *Tõlgendamine*

Viiruse OsHV-1 μvar olemasolule proovis osutab vastava pikkusega riba (kui 157 aluspaari asemel on 173 aluspaari, osutab see viiruse OsHV-1 esinemisele) 2,5 % agaroosgeelil, kui kõikide negatiivsete kontrollide vastused on negatiivsed ja kõikide positiivsete kontrollide vastused on positiivsed.

C OSA

Isoleeritud ala kindlaksmääramine

Artikli 2 lõikes 2 osutatud isoleeritud ala kindlaksmääramisel tuleb arvesse võtta järgmisi tegureid, mis mõjutavad taudi leviku ohtu:

a) nakatunud molluskite arv, osatähtsus ja jaotus kasvandustes või molluskikasvatuspiirkondades;

b) lähima kasvanduse või kasvatuspiirkonna kaugus ja kasvanduste tihedus;

c) kaugus töötlevatest ettevõtetest; kokkupuude muude kasvanduste või kasvatuspiirkondadega;

d) kasvandustes või kasvatuspiirkondades kasvatatavad liigid;

▼B

e) nakatunud ja lähedal asuvates kasvandustes ja kasvatuspiirkondades kohaldatavad tootmisviisid ning

f) hüdrodünaamilised tingimused ja muud identifitseeritud epidemioloogilise tähtsusega faktorid.

▼B

II LISA

Kasvanduste ja ülekandekeskuste jaoks ette nähtud suurte hiidaustrite turuleviimise veterinaarsertifikaadi näidis

EUROOPA LIIT — **Ühendusesisese kaubanduse sertifikaat**

I osa: andmed saadetise kohta

I.1. Kauba saatja
Nimi
Aadress
Postiindeks

I.2. Sertifikaadi viitenumber | I.2.a. Kohalik viitenumber

I.3. Pädev keskasutus

I.4. Pädev kohalik asutus

I.5. Kauba saaja
Nimi
Aadress
Postiindeks

I.6.

I.7.

I.8. Päritoluriik | ISO kood | I.9.

I.10. Sihtriik | ISO kood | I.11.

I.12. Päritolukoht/kogumiskoht
Akvakultuuride kasvatamiseks nõusoleku saanud ettevõte ☐
Muu ☐
Nimi | Tunnustamise number
Aadress
Postiindeks

I.13. Sihtkoht
Akvakultuuride kasvatamiseks nõusoleku saanud ettevõte ☐
Muu ☐
Nimi | Tunnustamise number
Aadress
Postiindeks

I.14. Laadimiskoht
Postiindeks

I.15. Väljumiskuupäev ja -koht

I.16. Transpordivahend
Lennuk ☐ Laev ☐ Raudteevagun ☐
Mootorsõiduk ☐ Muu ☐
Identifitseerimistunnused:

I.17. Vedaja
Nimi | Tunnustamise number
Aadress
Postiindeks | Liikmesriik

I.18. Loomaliik/toode

I.19. Kauba kood (CN kood)
03.07

I.20. Arv/hulk

I.21.

I.22. Pakendite arv

I.23. Konteineri identifitseermistunnus / plommi number

I.24. Pakendiliik

I.25. Loomad on sertifitseeritud kui / kaup sertifitseeritud
Aretusloomad ☐ Ümberasustamine ☐

I.26. Transiit läbi kolmanda riigi ☐
Kolmas riik | ISO kood
Väljumise koht | Kood
Sisenemise koht | Piiripunkti kood

I.27. Transiit läbi liikmesriikide ☐
Liikmesriik | ISO kood
Liikmesriik | ISO kood
Liikmesriik | ISO kood

I.28. Väljavedu ☐
Kolmas riik | ISO kood
Väljumise koht | Kood

I.29.

I.30.

I.31. Loomade identifitseerimistunnused
Liigid (Teaduslik nimetus) | Kogus

▼B

EUROOPA LIIT **Kasvanduste ja ülekandekeskuste jaoks ette nähtud suurte hiidaustrite turuleviimiseks**

II osa: sertifitseerimine

II. **Terviseteave**	II.a. Sertifikaadi viitenumber	II.b.

([1])([2])[II.1 **Määruse (EL) nr 175/2010 artikli 2 kohaselt kindlaks määratud isoleeritud alalt pärit suurte hiidaustrite suhtes kohaldatavad nõuded**

Mina, allakirjutanud ametlik inspektor, tõendan, et käesoleva sertifikaadi I osas osutatud suured hiidaustrid:

II.1.1 on pärit piirkonnast, mille suhtes kohaldatakse tauditõrjemeetmeid seoses suurte hiidaustrite suurenenud suremusega, mida põhjustas viirus OsHV-1 µvar;

([1])[II.1.2 lubatakse turule viia vastavalt (EL) nr 175/2010 artikli 3 lõike 2 punktile a;]

([1])[II.1.2 on pärit isoleeritud ala piirkonnast, kus ei ole täheldatud suurenenud suremust, ning saadetisse kuuluvatest suurtest hiidaustritest on võetud proovid ja neid on testitud vastavalt määruse (EL) nr 175/2010 I lisale;]]

([1])([3])[II.2 **Nõuded, mida kohaldatakse viirusest OsHV-1 µvar põhjustatud suurte hiidaustrite suurenenud suremuse tõttu kehtestatud ohutusmeetmete kohaldamise piirkondadest pärit suurte hiidaustrite suhtes, mis on ette nähtud liikmesriikidele või piirkondadele, mis on hõlmatud viiruse OsHV-1 µvar varajase avastamise kavaga**

Mina, allakirjutanud ametlik inspektor, tõendan, et käesoleva sertifikaadi I osas osutatud suured hiidaustrid:

II.2.1 on pärit kasvandusest või kasvatusalalt, kus vastavalt kasvanduse või kasvatusala andmetele ei ole täheldatud suremuse suurenemist;

II.2.2 on pärit piirkonnast, kus viiruse OsHV-1 µvar puudumine suurtel hiidaustritel on tõendatud määruse (EL) nr 175/2010 I lisa kohaste proovide võtmise ja testidega.]

II.3 **Transpordi- ja märgistamisnõuded**

Mina, allakirjutanud ametlik inspektor, tõendan, et:

II.3.1 käesoleva sertifikaadi I osas osutatud suured hiidaustrid viibivad tingimustes, sealhulgas vee kvaliteet, mis ei muuda nende tervislikku seisundit;

II.3.2 transpordimahuti on enne laadimist puhas ja desinfitseeritud või varem kasutamata ning

II.3.3 saadetis on identifitseerimiseks tähistatud loetava märgistusega konteineri välisküljel või eluskalade transpordiks ette nähtud laeva puhul kantud lasti manifesti koos käesoleva sertifikaadi I osa lahtrites I.8–I.13 esitatud asjakohase teabe ja järgmise märkusega:

kas ([1])[„Suured hiidaustrid, mis on ette nähtud kas kasvatamiseks või ülekandekeskuste tarbeks sellistes piirkondades, mis on hõlmatud viiruse OsHV-1 µvar varajase avastamise kavaga"]

või ([1])[„Piirkonnast, mille suhtes kohaldatakse tauditõrjemeetmeid, pärit suured hiidaustrid, mis on ette nähtud kas kasvatamiseks või ülekandekeskuste tarbeks sellistes piirkondades, mille suhtes kohaldatakse tauditõrjemeetmeid"].

Märkused

I osa

— Lahter I.12: vajaduse korral kasutada kõnealuse kasvanduse või molluskikasvatuspiirkonna loanumbrit.

— Lahter I.13: vajaduse korral kasutada kõnealuse kasvanduse või molluskikasvatuspiirkonna loanumbrit.

— Lahtrid I.20 ja 1.31: koguse puhul esitada koguarv.

— Lahter I.25: kasvanduste jaoks ette nähtud loomade puhul kasutada varianti „aretuseks", ülekandealade jaoks ette nähtud loomade puhul „ülekandealade jaoks".

▼B

EUROOPA LIIT **Kasvanduste ja ülekandekeskuste jaoks ette nähtud suurte hiidaustrite turuleviimiseks**

II. **Terviseteave**	II.a. Sertifikaadi viitenumber	II.b.

II osa

(1) Mittevajalik maha tõmmata.

(2) Lahter II.1 täidetakse suurte hiidaustrite saadetiste puhul, mis on pärit määruse (EL) nr 175/2010 artikli 2 lõike 2 kohaselt kindlaks määratud isoleeritud alalt ning mis lubatakse sellest piirkonnast välja kõnealuse määruse artikli 3 lõike 2 punkti a või b kohaselt.

(3) Lahter II.2 täidetakse suurte hiidaustrite saadetiste puhul, mis vastavad määruse (EL) nr 175/2010 artikli 5 lõikele 1, on ette nähtud liikmesriikidele või piirkondadele, mis on hõlmatud viiruse OsHV-1 µvar varajase avastamise kavaga, ning on pärit piirkonnast, kus kohaldati ohutusmeetmeid seoses suurte hiidaustrite suurenenud suremusega.

Ametlik veterinaararst või ametlik inspektor

Nimi (trükitähtedega): Kvalifikatsioon ja ametinimetus:

Kohalik veterinaarüksus: LVU Nº:

Kuupäev: Allkiri:

Tempel: