Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį

►**B**

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 175/2010

2010 m. kovo 2 d.

kuriuo įgyvendinamos Tarybos direktyvos 2006/88/EB nuostatos dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* rūšies austrių mirtingumo, siejamo su virusu *Ostreid herpesvirus* 1 µvar (OsHV-1 µvar), kontrolės priemonių

(Tekstas svarbus EEE)

(OL L 52, 2010 3 3, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
►**M1**	Komisijos reglamentas (ES) Nr. 1153/2010 2010 m. gruodžio 8 d.	L 324	39	2010 12 9

▼B

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 175/2010

2010 m. kovo 2 d.

kuriuo įgyvendinamos Tarybos direktyvos 2006/88/EB nuostatos dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* rūšies austrių mirtingumo, siejamo su virusu *Ostreid herpesvirus* 1 μvar (OsHV-1 μvar), kontrolės priemonių

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. spalio 24 d. Tarybos direktyvą 2006/88/EB dėl gyvūnų sveikatos reikalavimų, taikomų akvakultūros gyvūnams ir jų produktams, ir dėl tam tikrų vandens gyvūnų ligų prevencijos ir kontrolės ([1]), ypač į jos 41 straipsnio 3 dalį ir 61 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

(1) Direktyva 2006/88/EB nustatyti gyvūnų sveikatos reikalavimai, taikomi teikiant rinkai akvakultūros gyvūnus ir jų produktus. Be to, ja nustatytos minimalios kontrolės priemonės, taikomos tam tikrų vandens gyvūnų ligų protrūkių įtarimo arba protrūkių atvejais.

(2) Tos direktyvos 41 straipsnyje nustatyta, kad valstybės narės turi imtis atitinkamų priemonių naujos ligos protrūkiui suvaldyti ir užkirsti kelią tos ligos plitimui. Jei apie atsiradusią naują ligą sukaupti duomenys parodo, kad liga gali būti epidemiologiškai svarbi kitai valstybei narei, atitinkama valstybė narė nedelsdama apie tai informuoja Komisiją, valstybes nares ir ELPA valstybes nares.

(3) Keliose Prancūzijos ir Airijos teritorijose 2008 m. vėlyvą pavasarį ir vasarą buvo nustatytas padidėjęs *Crassostrea gigas* rūšies austrių mirtingumas. Mirtingumo padidėjimas buvo siejamas su neigiamais aplinkos veiksniais ir *Vibrio* genties bakterija bei *Ostreid* herpeso virusu (OsHV-1), įskaitant naujai aprašytą to viruso genotipą OsHV-1 μvar.

(4) Prancūzijos institucijos informavo Komisiją, valstybes nares ir ELPA valstybes nares apie padėtį ir apie 2008 m. rugpjūčio mėn. taikytas priemones, o 2008 m. rugsėjo mėn. klausimas buvo pateiktas svarstyti Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatiniame komitete.

(5) 2009 m. pavasarį padidėjęs mirtingumas, siejamas su tuo pačiu veiksnių deriniu, buvo nustatytas Prancūzijoje, Airijoje ir Normandijos salose. Nors mirtingumo padidėjimo priežastys iki šiol nėra aiškios, iš Airijoje ir Jungtinėje Karalystėje 2009 m. atliktų epidemiologinių tyrimų galima spręsti, kad virusas OsHV-1 μvar yra svarbus mirtingumo padidėjimo veiksnys.

([1]) OL L 328, 2006 11 24, p. 14.

▼B

(6) Šių valstybių narių ir Normandijos salų kompetentingos institucijos informavo Komisiją apie padėtį ir priemones, kurių imtasi, o klausimas kelis kartus buvo pateiktas svarstyti Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatiniame komitete.

(7) Epidemijos sulaikymo priemonės, kurių ėmėsi šių valstybių narių ir Normandijos salų kompetentingos institucijos siekdamos suvaldyti naujai atsiradusios ligos protrūkį, buvo grindžiamos daugiausia *Crassostrea gigas* austrių judėjimo iš teritorijų, kuriose austrių mirtingumas padidėjo, apribojimu.

(8) Atsižvelgiant į pakartotinius naujos ligos protrūkius 2009 metais ir į galimą jų pasikartojimą bei tolesnio ligos plitimo pavojų 2010 m. pavasarį ir vasarą ir remiantis įgyta patirtimi, yra tikslinga ir būtina pratęsti valstybių narių, kuriose buvo ligos protrūkiai, taikomas priemones.

(9) Siekiant užtikrinti vienodas Direktyvos 2006/88/EB reikalavimų dėl naujai atsiradusių ligų įgyvendinimo sąlygas ir užtikrinti, kad priemonės, kurių imtasi, būtų pakankamos neleisti ligai toliau plisti ir kartu būtų išvengta nebūtinų *Crassostrea gigas* austrių judėjimo apribojimų, reikia koordinuoti šios naujai atsiradusios ligos kontrolės priemones Europos Sąjungos lygmeniu.

(10) Kai kompetentingos institucijos yra informuojamos, kad nustatytas *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo padidėjimas, reikėtų paimti mėginius ir atlikti tyrimus, kad būtų galima nustatyti, ar OsHV-1 µvar virusas yra ar jo nėra.

(11) Jeigu OsHV-1 µvar genotipo viruso buvimas patvirtinamas, valstybės narės turėtų įgyvendinti ligos kontrolės priemones, įskaitant užkrėstos teritorijos nustatymą. Nustatant užkrėstą teritoriją reikėtų atsižvelgti į šiame reglamente nurodytus tam tikrus veiksnius. Šios ligos kontrolės priemonės turėtų būti taikomos tol, kol atliekant patikrinimus nebus nustatyta, kad mirtingumas nebedidėja.

(12) Siekiant mažinti ligos plitimo pavojų reikėtų nustatyti *Crassostrea gigas* austrių judėjimo iš užkrėstų teritorijų ribojimus. Tačiau reikėtų numatyti tam tikras nukrypti leidžiančias nuostatas, kai ligos plitimo pavojus sumažės. Šiomis nukrypti leidžiančiomis nuostatomis reglamentuojamas tam tikrų *Crassostrea gigas* austrių, skirtų auginti ūkiuose ar vežti į moliuskų natūralaus išsivalymo vietas kitoje užkrėstoje teritorijoje ar skirtų žmonėms vartoti, judėjimas. Siekiant užtikrinti *Crassostrea gigas* austrių, skirtų auginti ūkiuose ar vežti į moliuskų natūralaus išsivalymo vietas, siuntų atsekamumą, prie siuntų turėtų būti pridedamas gyvūnų sveikatos sertifikatas. Užpildant sertifikatą turėtų būti atsižvelgiama į 2008 m. gruodžio 12 d. Komisijos reglamento (EB) Nr. 1251/2008 kuriuo įgyvendinamos Tarybos direktyvos 2006/88/EB nuostatos dėl akvakultūros gyvūnų ir jų produktų pateikimo rinkai ir importo į Bendriją reikalavimų bei dėl tokiais atvejais taikomų sertifikavimo reikalavimų ir kuriuo patvirtinamas gyvūnų platintojų rūšių sąrašas ([1]), V priedo aiškinamąsias pastabas.

([1]) OL L 337, 2008 12 16, p. 41.

▼B

(13) Siekdamos gauti daugiau žinių apie šios naujai atsiradusios ligos būklę Sąjungoje ir ypač dar neužkrėstose valstybėse narėse bei teritoriniuose vienetuose ir užtikrinti ankstyvą bet kokio OsHV-1 µvar viruso pasireiškimo nustatymą valstybės narės gali norėti patvirtinti tikslinio mėginių ėmimo ir OSHV-1 µvar viruso ankstyvo nustatymo tyrimų programas. *Crassostrea gigas* austrėms iš teritorijų, kuriose 2009 m. pagal nacionalines priemones arba 2010 m. pagal šį reglamentą nebuvo taikomos ribojimo priemonės, turėtų būti taikomi papildomi gyvūnų sveikatos reikalavimai, jeigu jos auginimo ūkiuose ar natūralaus išsivalymo tikslais įvežamos į valstybes nares ar jų teritorinius vienetus, kuriuose taikoma tokia programa, tol, kol nebus nustatyta, kad OsHV-1 µvar viruso toje valstybėje narėje ar tame teritoriniame vienete nebėra.

(14) Siekiant užtikrinti, kad skirtingose valstybėse narėse surinktus duomenis, gautus vykdant ankstyvo OsHV-1 µvar viruso aptikimo mėginių ėmimo ir tyrimų programas, būtų galima palyginti, turėtų būti nustatyti tokių programų turinio tam tikri reikalavimai.

(15) Tiksli ir laiku pateikta informacija apie padėtį, susijusią su OsHV-1 µvar viruso aptikimu valstybėse narėse, yra esminė naujai atsiradusios ligos tinkamos kontrolės priemonė. Todėl valstybės narės turėtų nedelsdamos informuoti Komisiją ir kitas valstybes nares apie 2010 m. pirmą kartą patvirtintą viruso OsHV-1 µvar buvimą jų teritorijoje.

(16) Be to, reikėtų pasinaudoti internetiniais informacijos puslapiais, parengtais pagal 2008 m. spalio 31 d. Komisijos sprendimo 2009/177/EB, kuriuo įgyvendinama Tarybos direktyva 2006/88/EB dėl priežiūros ir likvidavimo programų ir valstybių narių, zonų ar teritorinių vienetų ligos neapimtos teritorijos statuso [1], 10 straipsnį.

(17) Siekdamos užtikrinti skaidrumą ir galimybę laiku pasinaudoti atitinkama informacija apie naujai atsiradusios ligos būklę valstybės narės turėtų pateikti Europos Komisijai ir kitoms valstybėms narėms informaciją apie užkrėstas teritorijas, teritorijas, kuriose anksčiau buvo taikomos ribojimo priemonės, tačiau jose virusas OsHV-1 µvar nebuvo aptiktas ir buvo pradėtos vykdyti šio viruso ankstyvo aptikimo programos.

(18) Kadangi iki šiol padėtis dėl naujai atsiradusios ligos tebėra labai neaiški, šiame reglamente nustatytos priemonės turėtų būti taikomos iki 2010 m. gruodžio mėn. pabaigos.

(19) Šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę,

[1] OL L 63, 2009 3 7, p. 15.

▼B

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Apibrėžtis

Šiame reglamente OsHV-1 µvar yra viruso *Ostreid herpesvirus*-1 (OsHV-1) genotipas, kuris yra nustatytas remiantis dalinio sekvenavimo duomenimis, iš kurių matomas sisteminis 12 bazių porų išnykimas genomo ORF 4 fragmente, palyginti su OsHV-1 (GenBank # AY509253).

2 straipsnis

Mėginių ėmimas, tyrimas ir užkrėstų teritorijų nustatymas

1. Kai nustatomas padidėjęs *Crassostrea gigas* rūšies austrių (toliau – *Crassostrea gigas* austrės) mirtingumas, kompetentinga institucija:

a) ima mėginius pagal I priedo A dalį;

b) tiria mėginius dėl OsHV-1 µvar viruso naudodama I priedo B dalyje nustatytus diagnostinius metodus.

2. Kai 1 dalies b punkte nurodytų tyrimų rezultatai patvirtina, kad mėginiuose yra OsHV-1 µvar virusas, kompetentinga institucija nustato užkrėstą teritoriją. Ta teritorija nustatoma remiantis kiekvieno atvejo analize ir atsižvelgiant į ligos plitimo rizikai įtaką darančius veiksnius, kaip nustatyta I priedo C dalyje.

3. Valstybės narės nedelsdamos informuoja Komisiją ir kitas valstybes nares apie pirmą jų teritorijoje 2010 m. nustatytą užkrėstą teritoriją.

3 straipsnis

***Crassostrea gigas* austrių iš 2 straipsnyje nurodytos užkrėstos teritorijos tiekimo rinkai reikalavimai**

1. *Crassostrea gigas* austrės iš užkrėstų teritorijų, nustatytų pagal 2 straipsnio 2 dalį, negali būti išvežtos iš tos teritorijos.

2. Nukrypstant nuo 1 dalies, *Crassostrea gigas* austrių siuntos gali būti išvežtos iš užkrėstos teritorijos, jeigu:

a) jos skirtos pervežti į kitą užkrėstą teritoriją, nustatytą pagal 2 straipsnio 2 dalį;

b) jos yra iš užkrėstos teritorijos dalies, įskaitant peryklas, kurioje nebuvo padidėjęs mirtingumas ir siunta buvo patikrinta:

i) paėmus mėginius pagal I priedo A dalį; taip pat

ii) ištyrus juos dėl OsHV-1 µvar viruso naudojant I priedo B dalyje nustatytus diagnostinius metodus, o tyrimo rezultatai buvo neigiami;

▼B

c) jos yra skirtos toliau apdoroti, vežti į valymo centrus, išsiuntimo centrus ar perdirbimo prieš pateikiant vartoti žmonėms įmones, kurios yra aprūpintos kompetentingos institucijos patvirtinta nuotekų apdorojimo sistema, kuri:

i) inaktyvuoja apvalkale esančius virusus; arba

ii) sumažina ligų perdavimo per gamtinius vandenis pavojų iki priimtino lygio;

d) jos yra skirtos vartoti žmonėms ir supakuotos bei paženklintos tuo tikslu pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 853/2004 ([1]) ir

i) nebegalės išlikti gyvos, jei bus grąžintos į tą aplinką, iš kurios yra kilusios; arba

ii) yra skirtos toliau perdirbti jų laikinai nelaikant perdirbimo vietoje;

e) siuntos ar jų produktai, skirti vartoti žmonėms jų toliau neperdirbant, jei jie supakuoti į mažmeninei prekybai skirtas pakuotes, atitinkančias Reglamento (EB) Nr. 853/2004 nuostatas dėl tokių pakuočių.

3. Prie 2 dalies a ir b punktuose nurodytų siuntų, skirtų vežti austres, skirtas auginti ūkiuose, ar į natūralaus išsivalymo vietas, pridedamas gyvūnų sveikatos sertifikatas, užpildytas pagal šio reglamento II priede pateiktą pavyzdį ir Reglamento (EB) Nr. 1251/2008 V priede nurodytas aiškinamąsias pastabas.

4 straipsnis

2 ir 3 straipsniuose nustatytų priemonių taikymo nutraukimas

Kompetentinga institucija gali nustoti taikyti kontrolės priemones dėl užkrėstų teritorijų, nustatytų pagal 2 straipsnio 2 dalį, ir tiekimo rinkai apribojimų, numatytų 3 straipsnyje, 15 dienų po to, kai ji atliko du iš eilės patikrinimus, po kurių paaiškėjo, kad mirtingumas nustojo didėti.

5 straipsnis

***Crassostrea gigas* austrių iš teritorinio vieneto, kuriame anksčiau buvo taikomos kontrolės priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo, siejamo su OsHV-1 µvar virusu, tiekimo rinkai reikalavimai**

1. Tiekiamos rinkai *Crassostrea gigas* austrės iš teritorinio vieneto, kuriame 2009 ar 2010 metais buvo taikomos ribojimo priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo, siejamo su OsHV-1 µvar virusu, turi atitikti toliau nurodytus reikalavimus:

a) prie jų pridėtas gyvūnų sveikatos sertifikatas, užpildytas pagal šio reglamento II priede pateiktą pavyzdį ir pagal Reglamento (EB) Nr. 1251/2008 V priedo aiškinamąsias pastabas, jeigu gyvūnai:

i) skirt valstybėms narėms ar jų teritoriniams vienetams, kuriuose vykdoma OsHV-1 µvar viruso ankstyvo aptikimo programa ir tas virusas nėra aptiktas; bei

([1]) OL L 139, 2004 4 30, p. 55.

▼B

ii) skirti auginti ūkiuose ar vežti į natūralaus išsivalymo vietas;

b) yra iš teritorinio vieneto, kur OsHV-1 µvar viruso nebuvimas yra įrodytas paėmus mėginius ir atlikus tyrimus pagal I priedo A dalį; taip pat

c) atitinka gyvūnų sveikatos reikalavimus, nustatytus a punkte nurodyto sertifikato pavyzdyje.

2. Ankstyvo OsHV-1 µvar viruso aptikimo programa, nurodyta 1 dalies a punkto i papunktyje, turi atitikti šiuos reikalavimus:

a) programa turi būti deklaruota Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatiniam komitetui;

b) tokia deklaracija turi atitikti Sprendimo 2009/177/EB II priede nustatyto formos pavyzdžio 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 ir 7 punktus;

c) programoje turi būti numatyta:

i) mėginių ėmimas pagal I priedo A dalį;

ii) tyrimai dėl OsHV-1 µvar viruso naudojant I priedo B dalyje nustatytus diagnostinius metodus.

3. 1 dalis taikoma vieną savaitę nuo Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatinio komiteto posėdžio dienos, kurią buvo deklaruota 1 dalies a punkto i papunktyje nurodyta programa.

6 straipsnis

Internetinis informacinis puslapis

1. Valstybės narės pateikia Komisijai ir kitoms valstybėms narėms:

a) užkrėstų teritorijų ir veiksnių, į kuriuos buvo atsižvelgta nustatant šias teritorijas, sąrašą, įskaitant atitinkamos teritorijos, nustatytos pagal 2 straipsnio 2 dalį, geografinių ribų aprašą;

b) teritorinių vienetų sąrašą, įskaitant atitinkamos teritorijos geografinių ribų aprašą:

i) kuriuose 2009 m. buvo taikytos ribojimo priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo, siejamo su OsHV-1 µvar virusu;

ii) kuriuose OsHV-1 µvar virusas nebuvo aptiktas ir tai įrodyta užkrėstoje teritorijoje paimtų mėginių tyrimais, atliktais pagal I priedo A ir B dalis;

c) 5 straipsnio 2 dalyje nurodytas programų deklaracijas, įskaitant atitinkamos teritorijos geografinių ribų aprašą.

2. 1 dalyje nurodyta informacija turi būti atnaujinama ir pateikiama internetiniuose informaciniuose puslapiuose, parengtuose pagal Sprendimo 2009/177/EB 10 straipsnį.

▼B

7 straipsnis

Ataskaitų teikimas

Valstybės narės pateikia Komisijai pagal 5 straipsnio 2 dalį deklaruotų programų vykdymo ataskaitas ne vėliau kaip iki 2010 m. spalio 1 d.

Ataskaita turi atitikti Sprendimo 2009/177/EB VI priede nustatytą formos pavyzdį.

8 straipsnis

Įsigaliojimas ir taikymas

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Jis taikomas nuo 2010 m. kovo 15 d. iki ►M1 2011 m. balandžio 30 d. ◄

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

▼B

I PRIEDAS

A DALIS

Atranka

1. *2 straipsnyje numatytas mėginių ėmimas*

2 straipsnyje numatytus mėginius sudaro ne mažiau kaip 12 atskirų *Crassostrea gigas* austrių. Atrenkant šiuos gyvūnus imami silpnų, turinčių trūkumų ar neseniai nugaišusių (nesuirusių) atskirų austrių mėginiai ir jie imami tame teritoriniame vienete, kuriame stebimas padidėjęs mirtingumas.

2. *Mėginių ėmimas, numatytas 3 straipsnio 2 dalies b punkte, 5 straipsnio 1 dalies b punkte ir 5 straipsnio 2 dalyje*

a) 3 straipsnio 2 dalies b punkte numatytus mėginius sudaro:

i) jeigu tai lervos, penki ne mažesni kaip 50 mg nesuardytų gyvūnų mėginiai, paimti tarp 4-os ir 8-os dienos po apvaisinimo, įskaitant geldeles, iš kiekvienos siuntos;

ii) jeigu tai austrių ikrai, mažesni nei 6 mm, 30 mėginių – 300 mg nesuardytų gyvūnų, įskaitant geldeles, kiekvienai siuntai;

iii) jeigu tai austrės, didesnės nei 6 mm, 150 atskirų austrių iš kiekvienos siuntos.

Atrenkant šiuos gyvūnus mėginyje jų turi būti paimta proporcingai iš visų siuntos dalių. Jeigu randama silpnų, turinčių trūkumų arba ką tik nugaišusių (nesuirusių) gyvūnų, pirmiausiai turi būti atrinkti šie gyvūnai.

b) 5 straipsnio 2 dalyje numatytą mėginį sudaro ne mažiau kaip 150 *Crassostrea gigas* atskirų austrių iš kiekvienos mėginių ėmimo vietos. Mėginiai imami visuose valstybės narės ar teritorinio vieneto, kuriuos apima programa, ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose.

5 straipsnio 1 dalies b punkte numatytą mėginį sudaro ne mažiau kaip 150 *Crassostrea gigas* atskirų austrių iš kiekvieno teritorinio vieneto.

Atrenkant gyvūnus vadovaujamasi tokiais kriterijais:

— jeigu randama silpnų, turinčių trūkumų arba ką tik nugaišusių (nesuirusių) gyvūnų, pirmiausiai turi būti atrinkti šie gyvūnai. Jeigu tokių gyvūnų nėra, atrinkti gyvūnai turi apimti sveikus mažesnio nei 12 mėnesių amžiaus moliuskus,

— jeigu mėginiai imami ūkiuose, kurie naudoja daugiau nei vieną vandens šaltinį moliuskams auginti, mėginiai turi būti imami iš visų vandens šaltinių taip, kad į mėginį patektų austrės proporcingai iš visų ūkio vietų,

— jeigu mėginiai imami moliuskų auginimo plotuose, mėginiai imami iš pakankamo vietų skaičiaus – bent trijų mėginių ėmimo vietų, jie turi būti iš gyvūnų imami taip, kad mėginyje būtų gyvūnų proporcingai iš visų moliuskų auginimo ploto dalių, įskaitant natūralias moliuskų augimvietes moliuskų auginimo plote. Atrenkant šias mėginių ėmimo vietas vertinami trys pagrindiniai veiksniai: ankstesnis OsHV-1 µvar viruso aptikimas toje teritorijoje, atsargų tankis, vandens srovės, batimetrijos duomenys ir ūkininkavimo praktika.

▼B

c) 5 straipsnio 2 dalyje numatytas mėginių ėmimas atliekamas vienerius metus po to, kai buvo nustatyta, kad OsHV-1 µvar viruso paplitimas valstybėje narėje ar teritoriniame vienete yra maksimalus. Jeigu tokių duomenų nėra, mėginiai imami iš karto po to, kai vandens temperatūra viršija 16 °C arba vienerius metus po to, kai temperatūra padidėja iki įprastos didžiausios metinės temperatūros.

d) 5 straipsnio 1 dalies b punkte numatyti mėginiai imami pirmiausia vienerius metus, kaip nurodyta c punkte. Jeigu mėginiai imami kitu metu nei tas vienerių metų laikotarpis, mėginiams paimtos austrės iki ištyrimo turi būti laikomos sąlygomis, kurios yra lygiavertės c punkte nurodytoms sąlygoms, tiek laiko, kol galima aptikti OsHV-1 µvar virusą.

B DALIS

OsHV-1 µvar viruso aptikimo diagnostiniai metodai

1. *Taikymo sritis*

Šia procedūra paaiškinamas standartinis diagnostinis metodas, kurį reikia naudoti OsHV-1 µvar virusui aptikti ir identifikuoti taikant polimerazės grandininę reakciją (toliau – PGR). Taip galima atskirti OsHV-1 ir OsHV-1 µvar virusus.

Prireikus siekdamos optimizuoti reakcijos sąlygas ir pritaikyti savo įrangą bei sąlygas laboratorijos gali taikyti šiame priede aprašytų metodų modifikacijas, jeigu gali būti parodytas lygiavertis jautris ir specifiškumas.

2. *Apibrėžtis*

OsHV-1 µvar yra apibrėžtas šio reglamento 1 straipsnyje.

3. *Įranga ir aplinkos sąlygos*

Diagnostinis tyrimas, naudojamas OsHV-1 µvar aptikti ir identifikuoti PGR būdu, turi būti atliekamas naudojant įrangą ir aplinkos sąlygomis, kuriomis paprastai atliekami klasikiniai PGR bandymai:

— Uždara traukos spinta, kurioje yra UV skleidimo sistema, kad būtų išvengta potencialaus užteršimo, kai ruošiamas PGR mišinys.

— Du visiškai sukomplektuoti pipečių rinkiniai (2 µl; 20 µl; 200 µl ir 1 000 µl), pirmasis – DNR ekstrakcijai, o kitas – PGR mišiniui paruošti.

— Trys skirtingos pipetės: viena pipetė (2 µl) mėginiams išpilstyti į PGR mišinį, kita pipetė (20 µl) – EB mėginiams paimti ir trečia pipetė (20 µl) – įterpti PGR produktus į agarozės gelius.

— Filtravimo pipečių antgaliai (2 µl; 20 µl; 200 µl ir 1 000 µl) DNR ekstrakcijai, PGR mišiniui paruošti ir mėginiui išpilstyti.

— Pipečių antgaliai (20 µl) EB mėginiams surinkti ir amplifikacijos produktams į agarozės gelį įterpti.

— Ciklinis termostatas amplifikacijoms atlikti.

— Horizontalios elektroforezės sistema PGR produktų elektroforezei atlikti.

— UV stalas PGR produktams po elektroforezės agarozės gelyje stebėti.

— Sistema gelių atvaizdams gauti.

▼B

Tyrimą atliekantis tyrėjas turi būti apsivilkęs laboratorinį chalatą ir pirštines visais toliau aprašytais tyrimo etapais. Laboratorinis chalatas ir pirštinės turi būti keičiami po kiekvieno pagrindinio veiksmo: DNR ekstrakcijos, PGR mišinio ruošimo, mėginio išpilstymo, amplifikacijos ir įterpimo į gelį.

Šiuos skirtingus tyrimo veiksmus rekomenduojama atlikti skirtingose patalpose. Be to, amplifikacija ir įterpimas į gelį (elektroforezė) turėtų būti atliekami kitoje patalpoje nei ta, kur atliekama DNR ekstrakcija, PGR mišinio ruošimas ir DNR išskirstymas.

4. *Procedūra*

4.1. Mėginio paruošimas

Gyvos ar neseniai nugaišusios (nesuirusios) austrės, kurios gali būti užšaldytos iki tyrimo, apdorojamos DNR ekstrakcijai atlikti.

Mėginiai apdorojami skirtingai, priklausomai nuo jų dydžio:

a) jeigu tai lervos – nesuardytų gyvūnų (įskaitant geldeles) 50 mg mėginiai, sumaišyti su 200 µl distiliuoto vandens, sutraiškomi ir centrifuguojami 1 000 g greičiu 1 minutę;

b) jeigu tai mažesni nei 6 mm austrių ikrai – nesuardytų gyvūnų (įskaitant geldeles) 300 mg mėginiai, sumaišyti su 1 200 µl distiliuoto vandens, sutraiškomi ir centrifuguojami 1 000 g greičiu 1 minutę;

c) jeigu tai 6–15 mm dydžio austrių ikrai – kiekvieno gyvūno minkštieji audiniai traiškomi atskirai;

d) jeigu tai didesni nei 15 mm gyvūnai – žiaunų ir mantijos gabalai atskiriami.

DNR ekstrakcija atliekama naudojant QIAamp® DNA mažąjį rinkinį (QIAGEN) ir laikantis audinių tyrimo protokolo.

Tolesnis mėginio paruošimas atliekamas tokia tvarka:

1. Įpilti 100 µl supernatanto (jei tai a ir b punktuose nurodyti mėginiai) arba įdėti 10–50 mg audinių (jei tai c ir d punktuose nurodyti mėginiai) į 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį ir įpilti 180 µl buferinio ATL tirpalo.

2. Įpilti 20 µl proteinazės K, maišyti kratant ir inkubuoti 56 °C temperatūroje, kol audinys visiškai išsileidžia (per naktį). Periodiškai suplakti inkubuojamą mėginį, kad jis išsimaišytų. Trumpai centrifuguoti 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį, kad būtų pašalinti lašai nuo dangtelio.

3. Įpilti į mėginį 200 µl buferinio AL tirpalo, sumaišyti kratant ir apverčiant 15 s ir inkubuoti 70 °C temperatūroje 10 minučių. Trumpai centrifuguoti 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį, kad būtų pašalinti lašai nuo dangtelio.

4. Įpilti į mėginį 200 µl etanolio (90–100 %), sumaišyti kratant ir apverčiant 15 s. Trumpai centrifuguoti 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį, kad būtų pašalinti lašai nuo dangtelio.

5. Atsargiai įpilti 4 etapu gautą mišinį į QIAamp centrifugavimo kolonėlę (2 ml surinkimo vamzdelį) nesudrėkinant krašto. Uždaryti dangtelį ir centrifuguoti 10 000 aps. 1 minutę. Įdėti QIAamp centrifugavimo kolonėlę į švarų 2 ml surinkimo mėgintuvėlį (yra rinkinyje) ir išmesti mėgintuvėlį, kuriame yra filtratas.

▼B

6. Atsargiai atidaryti QIAamp centrifugavimo kolonėlę ir įpilti 500 µl buferinio AW1 tirpalo nesudrėkinant krašto. Uždaryti dangtelį ir centrifuguoti 10 000 aps. 1 minutę. Įdėti QIAamp centrifugavimo kolonėlę į švarų 2 ml surinkimo mėgintuvėlį (yra rinkinyje) ir išmesti surinkimo mėgintuvėlį, kuriame yra filtratas.

7. Atsargiai atidaryti QIAamp centrifugavimo kolonėlę ir įpilti 500 µl buferinio AW2 tirpalo nesudrėkinant krašto. Uždaryti dangtelį ir centrifuguoti visu greičiu (14 000 aps.) 3 minutes.

8. (Alternatyvi galimybė). Įdėti QIAamp centrifugavimo kolonėlę į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį (jo nėra rinkinyje) ir išmesti surinkimo mėgintuvėlį, kuriame yra filtratas. Centrifuguoti visu greičiu (14 000 aps.) 1 minutę.

9. Įdėti QIAamp centrifugavimo kolonėlę į švarų 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį (jo nėra rinkinyje) ir išmesti surinkimo vamzdelį, kuriame yra filtratas. Atsargiai atidaryti QIAamp centrifugavimo kolonėlę ir įpilti 100 µl distiliuoto vandens. Inkubuoti 5 minutes kambario temperatūroje ir centrifuguoti 10 000 aps. 1 min.

10. Kontroliuoti ekstrakcijos kokybę ir efektyvumą (pavyzdžiui, matuojant optinį tankį (260 nm) spektrofotometru arba po elektroforezės agarozės gelyje).

11. Praskiesti mėginius, kad būtų gauta galutinė 50–100 ng/µl DNR koncentracija.

12. Kol atliekama PGR analizė, DNR tirpalai laikomi 4 °C temperatūroje.

DNR ekstrakcijai gali būti naudojami kiti komerciniai rinkiniai, jeigu įrodoma, kad juos naudojant gaunami panašūs rezultatai.

4.2. *Polimerazės grandininė reakcija (PGR)*

4.2.1. Reagentai

— 10 X buferinis tirpalas (kartu su Taq DNR polimeraze)

— $MgCl_2$ (kartu su DNR polimeraze) (25 mM)

— Taq DNR polimerazė (Goldstar, Eurogentec) 5 V/µl

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master mišinys (20 mM) turi būti praskiestas 10 kartų (iki 2 mM) prieš naudojant

— d H_2O (distiliuotas H_2O, kuriame nėra DNR ir RNR)

4.2.2. Pradmenys

Privalo būti naudojami šie pradmenys ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Šie pradmenys ar jų aprašai gali būti gauti iš Bendrijos moliuskų ligų etaloninės laboratorijos (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Prancūzija).

▼B

4.2.3. PGR mišinys

PGR mišinys kiekvienam mėgintuvėliui yra:

	Tūris mėgintuvėlyje	Galutinė koncentracija
Buferinis tirpalas (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 polimerazė (5 V/µl) 1	0,5 µl	2,5 V
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µL šio PGR mišinio įpilama į kiekvieną PGR mėgintuvėlį

— Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 1 µl ekstrahuotos DNR (50-100 ng/µl)

4.2.4. Kontrolė

Naudojami dviejų tipų kontroliniai mėginiai:

— Neigiamas kontrolinis mėginys – dH_2O (1 µl – 49 µl PGR mišinio). Siekiama nustatyti galimą reagentų ar darbo aplinkos užterštumą. Vienas neigiamas kontrolinis bandinys turi būti tiriamas kas 10 mėginių arba po kiekvienos mėginių partijos.

— Teigiamą kontrolinį mėginį sudaro plazmidės DNR, turinti CF-CR srities OsHV-1 tikslinį genomą. Ja siekiama patikrinti PGR reakcijos veiksmingumą. Vienas teigiamas kontrolinis bandinys turi būti tiriamas atliekant kiekvieną PGR tyrimą. Teigiamus kontrolinius mėginius galima gauti iš Bendrijos etaloninės laboratorijos.

4.2.5. Amplifikacija

Amplifikacijos ciklai yra atliekami ciklinio termostato aparatu.

— Pradinė denatūracija: 2 min 94 °C temperatūroje

— Amplifikacija 35 ciklai (1 min 94 °C temperatūroje, 1 min – 50 °C ir 1 min – 72 °C)

— Galutinė elongacija: 5 min 72 °C temperatūroje

4.3. *Elektroforezė*

4.3.1. Reagentai

— 50 X TAE (galima įsigyti jau paruoštus naudoti):

Tribazė (40 mM) 242 g

Ledinė acto rūgštis (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O 1 litrui

pH vertę pakoreguoti iki 8

▼B

— Agarozės gelis 2,5 % 1X TAE

Etidžio bromidas (0,5 μg/ml), įpiltas atvėsinus gelį.

— Mėlynojo dažo paruošimas:

Bromfenolio mėlynasis 0,25 %

Ksileno cianolis FF 0,25 %

Sacharozė 40 %

Laikyti 4 °C temperatūroje.

Naudoti praskiestą 6 kartus (2 μl paruošto mėlynojo dažo 10 μl PGR produktų).

— Molekulinio svorio žymeklis:

SmartLadder SF (Eurogentec) Paruoštas naudoti molekulinio svorio žymeklis, įskaitant 9 nuolat tarpu atskirtas juosteles nuo 100 iki 1 000 bp.

4.3.2. Agarozės gelio paruošimas

1. Pasverti 2,5 g agarozės, įpilti 100 ml 1X TAE ir kaitinti, kol mišinys išsilydys.

2. Atšaldžius tirpalą pridėti etidžio bromido (5 μl 100 ml agarozės gelio) ir tirpalą patalpinti į specialią formą su šukų pavidalo išsikišimais (plyšiams formuoti).

3. Kai gelis polimerizuojamas, šukos pašalinamos ir gelis padedamas į horizontalios elektroforezės sistemą, turinčią pakankamai 1X TAE agarozės geliui padengti.

4. 10 μl PGR produktų maišomi su 2 μl mėlynojo dažo (6X) ir įterpiami į plyšius.

5. Viena skylė skirta molekulinio svorio žymekliui (5 μl).

6. Priklausomai nuo gelio dydžio ir storio naudojama 50–150 voltų įtampa nuo 30 min iki 1 val.

7. Gelis stebimas UV spinduliais.

4.4. *Rezultatų aiškinimas*

OsHV-1 μvar virusas mėginyje nustatomas, jeigu 2,5 % agarozės gelyje atsiranda atitinkamo dydžio juostelė (157 bp vietoje 173 bp nustatant OsHV-1), su visais neigiamais kontroliniais mėginiais gaunant neigiamą rezultatą, o su teigiamais kontroliniais mėginiais – teigiamą.

C DALIS

Užkrėstos teritorijos nustatymas

Nustatant užkrėstą teritoriją pagal 2 straipsnio 2 dalį turi būti atsižvelgta į šiuos ligos plitimo riziką lemiančius veiksnius:

a) moliuskų skaičių, populiacijos dydį ir pasiskirstymą infekuotuose ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose;

b) atstumą iki kaimyninių ūkių ar moliuskų auginimo plotų ir šių ūkių bei plotų tankį;

c) perdirbimo įmonių artumą, kontaktinius ūkius ar kontaktinius moliuskų auginimo plotus;

d) ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose esančias rūšis;

▼B

e) užkrėstuose ir kaimyniniuose ūkiuose ar moliuskų auginimo plotuose taikomą ūkininkavimo praktiką; taip pat

f) hidrodinamines sąlygas ir kitus nustatytus epizootiniu požiūriu svarbius veiksnius.

▼B

II PRIEDAS

Pavyzdinis gyvūnų sveikatos sertifikatas tiekti rinkai *Crassostrea gigas* austres, skirtas auginti ūkiuose arba vežti į natūralias moliuskų išsivalymo vietas

EUROPOS SĄJUNGA — **Prekybos tarp šalių narių sertifikatas**

I Dalis: Duomenys apie siuntą

I.1. Siuntėjas Pavadinimas Adresas Pašto kodas	I.2. Sertifikato numeris — I.2.a. Suteiktas vietinis sertifikato numeris I.3. Centrinė kompetetinga institucija I.4. Vietinė kompetetinga institucija
I.5. Gavėjas Pavadinimas Adresas Pašto kodas	I.6. I.7.
I.8. Kilmės šalis — ISO kodas — I.9.	I.10. Paskirties šalis — ISO kodas — I.11.
I.12. Siuntos kilmės adresas/Surinkimo vieta Patvirtinta vandens gyvūnų laikymo vieta ☐ Kiti ☐ Pavadinimas — Patvirtinimo numeris Adresas Pašto kodas	I.13. Paskirties adresas Patvirtinta vandens gyvūnų laikymo vieta ☐ Kiti ☐ Kiti — Patvirtinimo numeris Adresas Pašto kodas
I.14. Pakrovimo vieta Pašto kodas	I.15. Išvykimo data ir laikas
I.16. Transporto priemonė Lėktuvas ☐ Laivas ☐ Geležinkelio vagonas ☐ Kelio transporto priemonė ☐ Kita ☐ Identifikacija:	I.17. Vežėjas Pavadinimas — Patvirtinimo numeris Adresas Pašto kodas — Šalis narė
I.18. Gyvūnų rūšis/Produktas	I.19. Prekės kodas (KPN) **03.07** I.20. Skaičius/Kiekis
I.21.	I.22. Pakuočių skaičius
I.23. Konteinerio identifikacija/Plombos numeris	I.24. Įpakavimas
I.25. Gyvūnai/Produktai Veislei ☐ Pakaitiniai gyvūnai ☐	
I.26. Tranzitu per trečiąją šalį ☐ Trečioji šalis — ISO kodas Išvažiavimo vieta — Kodas Įvažiavimo vieta — PVP vieneto numeris	I.27. Tranzitu per ES šalis ☐ Šalis narė — ISO kodas Šalis narė — ISO kodas Šalis narė — ISO kodas
I.28. ISO kodas ☐ Trečioji šalis — ISO kodas Išvažiavimo vieta — Kodas	I.29.
I.30.	
I.31. Gyvūnų identifikacija Rūšys (Mokslinis pavadinimas) — Kiekis	

▼B

EUROPOS SĄJUNGA

Tiekti rinkai *Crassostrea gigas* austres, skirtas auginti ūkiuose arba gabenti į natūralias moliuskų išsivalymo vietas

II dalis. Sertifikavimas

II. **Informacija apie sveikatą**	II.a. Sertifikato numeris	II.b.

(1)(2)**[II.1. Reikalavimai dėl *Crassostrea gigas* austrių, kilusių iš užkrėstos teritorijos, nustatytos pagal Reglamento (ES) Nr. 175/2010 2 straipsnį**

Aš, toliau pasirašęs oficialiai paskirtas inspektorius, patvirtinu, kad šio sertifikato I dalyje nurodytos *Crassostrea gigas* austrės:

II.1.1. yra iš teritorijos, kurioje taikomos ligos kontrolės priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo, siejamo su OsHV-1 µvar virusu;

(1)[II.1.2. gali būti tiekiamos rinkai pagal Reglamento (ES) Nr. 175/2010 3 straipsnio 2 dalies a punktą;]

(1)[II.1.2. yra iš užkrėstos teritorijos dalies, kurioje moliuskų mirtingumas nėra padidėjęs, iš siuntos buvo paimti *Crassostrea gigas* austrių mėginiai ir ištirti pagal Reglamento (ES) Nr. 175/2010 I priedą, o tyrimo rezultatai buvo neigiami;]]

(1)(3)**[II.2. Reikalavimai dėl *Crassostrea gigas* austrių iš valstybės narės ar teritorinio vieneto, kuriam anksčiau buvo taikomos ribojimo priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo, siejamo su OsHV-1 µvar virusu, skirtų valstybėms narėms ar teritoriniams vienetams, kuriuose taikoma OsHV-1 µvar viruso aptikimo programa**

Aš, toliau pasirašęs oficialiai paskirtas inspektorius, patvirtinu, kad šio sertifikato I dalyje nurodytos *Crassostrea gigas* austrės:

II.2.1. atvežtos iš ūkio ar moliuskų auginimo ploto, kuriame remiantis ūkio ar moliuskų auginimo ploto dokumentais, nėra padidėjusio mirtingumo;

II.2.2. atvežtos iš teritorinio vieneto, kuriame OsHV-1 µvar viruso nebuvimas įrodytas imant *Crassostrea gigas* austrių mėginius ir juos tiriant pagal Reglamento (ES) Nr. 175/2010 I priedą.]

II.3. Vežimo ir ženklinimo reikalavimai

Aš, toliau pasirašęs oficialiai paskirtas inspektorius, patvirtinu, kad:

II.3.1. Šio sertifikato I dalyje nurodytos *Crassostrea gigas* austrės laikomos sąlygomis, įskaitant vandens kokybę, nekeičiančiomis jų sveikatos būklės,

II.3.2. vežimo talpykla prieš pakrovimą yra švari, išdezinfekuota arba anksčiau nebuvo naudota,

II.3.3. siuntos tapatumas nustatomas iš talpyklos išorėje arba, gabenant mažuoju žvejybos traleriu, laivo manifeste esančios įskaitomos etiketės su atitinkama informacija, nurodyta šio sertifikato I dalies I.8–I.13 langeliuose, ir iš tokio užrašo:

arba (1)[*Crassostrea gigas* austrės skirtos auginti ūkiuose ar gabenti į natūralaus išsivalymo vietas, esančias teritorijoje, kurioje taikoma OsHV-1 µvar viruso ankstyvo aptikimo programa]

arba (1)[„*Crassostrea gigas* austrės skirtos auginti ūkiuose ar gabenti į natūralaus išsivalymo vietas, esančias teritorijoje, kurioje taikomos ligos kontrolės priemonės, ir atvežtos iš teritorijos, kurioje taikomos ligos kontrolės priemonės“].

Pastabos

I dalis.

— I.12 langelis. Prireikus, naudojamas leidimo numeris, skirtas atitinkamam ūkiui ar moliuskų auginimo plotui.

— I.13 langelis. Prireikus, naudojamas leidimo numeris, skirtas atitinkamam ūkiui ar moliuskų auginimo plotui.

— I.20 ir I.31 langeliai. 31: Kiekis: nurodyti bendrą skaičių.

— I. 25 langelis. Įrašyti „Veislininkystė“, jei skirtos auginti ūkiuose, „Natūralus išsivalymas“, jei gabenamos natūraliai išsivalyti.

▼B

EUROPOS SĄJUNGA

Tiekti rinkai *Crassostrea gigas* austres, skirtas auginti ūkiuose arba gabenti į natūralias moliuskų išsivalymo vietas

II. **Informacija apie sveikatą**	II.a. Sertifikato numeris	II.b.

II dalis.

([1]) Palikti tinkamą variantą.

([2]) Šio sertifikato II.1 dalis taikoma *Crassostrea gigas* austrių siuntoms iš užkrėstos teritorijos, nustatytos pagal Reglamento (ES) Nr. 175/2010 2 straipsnio 2 dalį, ir kurias pagal to reglamento 3 straipsnio 2 dalies a ar b punktą leidžiama išvežti iš tos teritorijos.

([3]) Šio sertifikato II.2 dalis taikoma Reglamento (ES) Nr. 175/2010 5 straipsnio 1 dalyje nurodytoms *Crassostrea gigas* austrių siuntoms, kurios skirtos valstybėms narėms ar teritoriniams vienetams, kuriuose taikoma OsHV-1 µvar viruso ankstyvo aptikimo programa ir kurios atvežtos iš teritorijos, kurioje buvo taikomos ribojimo priemonės dėl padidėjusio *Crassostrea gigas* austrių mirtingumo.

Oficialiai paskirtas veterinarijos gydytojas arba oficialiai paskirtas inspektorius

Vardas ir pavardė (didžiosiomis raidėmis):

Kvalifikacija ir pareigos:

Vietinis veterinarijos vienetas (tarnyba):

LVU Nr.:

Data:

Parašas:

Antspaudas: