Acest document reprezintă un instrument de documentare, iar instituțiile nu își asumă responsabilitatea pentru conținutul său.

►**B**

REGULAMENTUL (UE) NR. 175/2010 AL COMISIEI

din 2 martie 2010

de punere în aplicare a Directivei 2006/88/CE a Consiliului în ceea ce privește măsurile pentru controlul creșterii mortalității stridiilor din specia *Crassostrea gigas* în legătură cu detectarea Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text cu relevanță pentru SEE)

(JO L 52, 3.3.2010, p. 1)

Astfel cum a fost modificat prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
►**M1**	Regulamentul (UE) nr. 1153/2010 al Comisiei din 8 decembrie 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

REGULAMENTUL (UE) NR. 175/2010 AL COMISIEI

din 2 martie 2010

de punere în aplicare a Directivei 2006/88/CE a Consiliului în ceea ce privește măsurile pentru controlul creșterii mortalității stridiilor din specia *Crassostrea gigas* în legătură cu detectarea Ostreid herpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Directiva 2006/88/CE a Consiliului din 24 octombrie 2006 privind cerințele de sănătate animală pentru animale și produse de acvacultură și privind prevenirea și controlul anumitor boli la animalele de acvacultură ([1]), în special articolul 41 alineatul (3) și articolul 61 alineatul (3),

întrucât:

(1) Directiva 2006/88/CE stabilește cerințele de sănătate animală care trebuie aplicate în cazul introducerii pe piață a animalelor și produselor de acvacultură. În plus, directiva stabilește măsurile preventive minime care urmează să fie puse în aplicare în cazul suspectării sau dovedirii prezenței unui focar al uneia dintre bolile animalelor de acvacultură.

(2) Articolul 41 din directiva menționată prevede că statele membre trebuie să ia măsuri corespunzătoare pentru controlul oricărei situații în legătură cu o boală emergentă și pentru a preveni răspândirea bolii în cauză. În cazul unei situații în legătură cu o boală emergentă, statul membru respectiv trebuie să informeze fără întârziere Comisia, statele membre și statele membre ale AELS, în cazul în care constatările efectuate atestă existența unei situații epizootice de natură să afecteze un alt stat membru.

(3) Creșterea mortalității stridiilor din specia *Crassostrea gigas* (denumite în continuare „stridii *Crassostrea gigas*”) a fost detectată în mai multe zone din Franța și din Irlanda în ultima parte a primăverii și în vara anului 2008. Acest fenomen a fost atribuit unei combinații de factori adverși de mediu, coroborată cu prezența bacteriilor din genul *Vibrio* și prezența Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1), incluzând un genotip nou descris al acestui virus, denumit OsHV-1 µvar.

(4) Autoritățile franceze au informat Comisia, statele membre și statele membre AELS cu privire la situație și la măsurile luate în august 2008, aspectul fiind adus și în atenția Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală în septembrie 2008.

(5) În primăvara anului 2009, o creștere a mortalității atribuită aceleiași combinații de factori a fost din nou detectată în Franța, Irlanda și Insulele Anglo-Normande. Deși cauzele mortalității rămân încă incerte, investigațiile epidemiologice efectuate în Irlanda și Regatul Unit în 2009 sugerează că OsHV-1 µvar are un rol important în cazul acestei mortalități.

([1]) JO L 328, 24.11.2006, p. 14.

▼B

(6) Autoritățile competente din statele membre respective și din Insulele Anglo-Normande au informat Comisia cu privire la situație și cu privire la măsurile luate, aspectul fiind adus și în atenția Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală, în mai multe rânduri.

(7) Măsurile de protecție luate de către autoritățile competente din statele membre respective și din Insulele Anglo-Normande în vederea controlării situației în legătură cu boala emergentă au avut în principal la bază restricționarea circulației stridiilor *Crassostrea gigas* către exteriorul zonelor afectate de creșterea mortalității.

(8) Având în vedere reapariția situației în legătură cu boala emergentă în anul 2009 și posibila repetare a acesteia și riscul de răspândire pe o arie mai mare în primăvara și vara anului 2010, precum și pe baza experienței dobândite, este necesară și adecvată extinderea măsurilor deja luate de către statele membre afectate.

(9) Pentru a asigura condiții uniforme de punere în aplicare a cerințelor Directivei 2006/88/CE în ceea ce privește bolile emergente și pentru a asigura faptul că măsurile luate oferă o protecție suficientă împotriva continuării răspândirii, fără a impune în același timp restricții inutile asupra circulației stridiilor *Crassostrea gigas*, este necesară coordonarea la nivelul Uniunii Europene a măsurilor privind această situație în legătură cu boala emergentă.

(10) Atunci când autoritățile competente sunt informate cu privire la detectarea unei creșteri a mortalității în rândul stridiilor *Crassostrea gigas*, ar trebui să se efectueze o eșantionare și testarea în vederea detectării sau excluderii prezenței OsHV-1 µvar.

(11) Atunci când prezența genotipului de virus OsHV-1 µvar este confirmată, ar trebui puse în aplicare măsuri pentru controlul bolii, inclusiv crearea unei zone de izolare. Pentru delimitarea zonei de izolare, ar trebui să se țină seama de anumiți factori prevăzuți în prezentul regulament. Aceste măsuri de control al bolii ar trebui să rămână în vigoare până în momentul în care inspecțiile demonstrează încetarea creșterii mortalității.

(12) Ar trebui prevăzute restricții asupra circulației stridiilor *Crassostrea gigas* către exteriorul zonelor de izolare, pentru a se limita riscul de răspândire a bolii. Totuși, ar trebui prevăzute anumite derogări pentru cazurile în care riscul de răspândire a bolii este redus. Aceste derogări se referă la circulația anumitor stridii *Crassostrea gigas* destinate zonelor de cultură sau de relocare situate în altă zonă de izolare sau destinate consumului uman. Pentru a asigura trasabilitatea loturilor de stridii *Crassostrea gigas* destinate zonelor de cultură sau de relocare, acestea ar trebui să fie însoțite de un certificat de sănătate animală. La completarea certificatului, ar trebui să se aibă în vedere notele explicative prevăzute în anexa V la Regulamentul (CE) nr. 1251/2008 al Comisiei din 12 decembrie 2008 de punere în aplicare a Directivei 2006/88/CE a Consiliului în ceea ce privește condițiile și cerințele de certificare pentru introducerea pe piață și importul în Comunitate de animale de acvacultură și produse obținute din aceste animale și de stabilire a unei liste a speciilor-vectori ([1]).

([1]) JO L 337, 16.12.2008, p. 41.

▼B

(13) În scopul cunoașterii mai amănunțite a situației în legătură cu boala emergentă în Uniune și în mod specific în statele membre și compartimentele încă neafectate și pentru a asigura detectarea rapidă a oricărei apariții a OsHV-1 µvar, statele membre ar putea crea programe de eșantionare și testare specifică pentru detectarea rapidă a OsHV-1 µvar. Stridiile *Crassostrea gigas* care provin din zone care au făcut obiectul măsurilor de protecție în 2009, în temeiul măsurilor naționale, sau în 2010, în conformitate cu prezentul regulament, ar trebui să facă obiectul unor cerințe suplimentare de sănătate animală dacă sunt introduse în scopul culturii sau relocării în statele membre sau compartimentele care intră sub incidența unui astfel de program, în măsura în care OsHV-1 µvar nu a fost detectat în acel stat membru sau compartiment.

(14) Pentru a asigura comparabilitatea datelor colectate în diferite state membre în contextul programelor de eșantionare și testare specifică în vederea detectării rapide a OsHV-1 µvar, ar trebui stabilite anumite cerințe privind conținutul acestor programe.

(15) Disponibilitatea unor informații exacte și prompte privind situația în ceea ce privește detectarea OsHV-1 µvar în statele membre reprezintă un element esențial pentru asigurarea unui control adecvat al situației în legătură cu boala emergentă. În acest scop, statele membre ar trebui să informeze fără întârziere Comisia și celelalte state membre cu privire la prima prezență confirmată a virusului OsHV-1 µvar pe teritoriul lor în 2010.

(16) În plus, ar trebui să se utilizeze paginile de internet informative elaborate în conformitate cu articolul 10 din Decizia 2009/177/CE a Comisiei din 31 octombrie 2008 de punere în aplicare a Directivei 2006/88/CE a Consiliului în ceea ce privește programele de supraveghere și eradicare și statutul „indemn de boală” al statelor membre, al zonelor sau al compartimentelor ([1]).

(17) Pentru a asigura transparența și promptitudinea informațiilor relevante privind situația în legătură cu boala emergentă, statele membre ar trebui să pună la dispoziția Comisiei Europene și celorlalte state membre informații privind zonele de izolare, zonele care au făcut anterior obiectul măsurilor de protecție, dar unde s-a demonstrat absența OsHV-1 µvar, și programele instituite pentru detectarea rapidă a OsHV-1 µvar.

(18) Deoarece există încă mari incertitudini în ceea ce privește situația în legătură cu boala emergentă, măsurile prevăzute în prezentul regulament ar trebui să se aplice până la sfârșitul lunii decembrie 2010.

(19) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală,

([1]) JO L 63, 7.3.2009, p. 15.

▼B

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Definiție

În sensul prezentului regulament, OsHV-1 µvar înseamnă un genotip al virusului Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) care este definit pe baza datelor secvențiale parțiale care prezintă o eliminare sistematică a 12 perechi de baze în secvența ORF 4 a genomului, comparativ cu OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Articolul 2

Eșantionare, testare și crearea zonelor de izolare

(1) În momentul detectării creșterii mortalității stridiilor din specia *Crassostrea gigas* („stridii *Crassostrea gigas*"), autoritatea competentă procedează la următoarele:

(a) prelevarea eșantioanelor în conformitate cu partea A din anexa I;

(b) testarea în vederea detectării prezenței OsHV-1 µvar în conformitate cu metodele de diagnosticare prevăzute în partea B din anexa I.

(2) În cazul în care rezultatele testelor menționate la alineatul 1 litera (b) indică prezența OsHV-1 µvar, autoritatea competentă creează o zonă de izolare. Acea zonă este definită pe baza unei analize de la caz la caz, luând în considerare factorii care influențează riscul de răspândire a bolii prevăzuți în partea C din anexa I.

(3) Statele membre informează fără întârziere Comisia și alte state membre cu privire la prima zonă de izolare creată pe teritoriul lor în anul 2010.

Articolul 3

Cerințe privind introducerea pe piață a stridiilor *Crassostrea gigas* care provin dintr-o zonă de izolare menționată la articolul 2

(1) Stridiile *Crassostrea gigas* care provin din zone de izolare create în conformitate cu articolul 2 alineatul (2) nu sunt transportate către exteriorul zonei respective.

(2) Prin derogare de la alineatul (1), loturile de stridii *Crassostrea gigas* pot circula către exteriorul zonei de izolare, dacă:

(a) sunt destinate unei alte zone de izolare create în conformitate cu articolul 2 alineatul (2);

(b) provin dintr-o parte a zonei de izolare, incluzând incubatoarele, care nu este afectată de creșterea mortalității, iar lotul a fost supus următoarelor măsuri:

(i) eșantionarea în conformitate cu partea A din anexa I; și

(ii) testarea în vederea detectării prezenței OsHV-1 µvar în conformitate cu metodele de diagnosticare prevăzute în partea B din anexa I, toate rezultatele fiind negative;

▼B

(c) sunt destinate, înainte de consumul uman, prelucrării suplimentare, centrelor de purificare, centrelor de expediere sau unităților de prelucrare dotate cu un sistem de tratare a reziduurilor validat de către autoritatea competentă care:

(i) neutralizează virusurile cu anvelopă; sau

(ii) reduc la un nivel acceptabil riscul de răspândire a bolilor la sistemul hidrografic natural;

(d) sunt destinate consumului uman și sunt ambalate și etichetate în acest scop, în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 853/2004 al Parlamentului European și al Consiliului [1], și:

(i) nu mai pot supraviețui ca animale vii dacă se întorc în mediul din care provin; sau

(ii) sunt destinate prelucrării suplimentare fără depozitare temporară la locul în care se efectuează prelucrarea;

(e) loturile sau produsele aferente sunt destinate consumului uman fără prelucrare suplimentară, cu condiția ca acestea să fie ambalate în ambalaje pentru comerțul cu amănuntul care sunt conforme cu dispozițiile referitoare la astfel de ambalaje din Regulamentul (CE) nr. 853/2004.

(3) Loturile menționate la alineatul (2) literele (a) și (b) și destinate zonelor de cultură sau de relocare sunt însoțite de un certificat de sănătate animală completat în conformitate cu modelul prevăzut în anexa II la prezentul regulament și notele explicative prevăzute în anexa V la Regulamentul (CE) nr. 1251/2008.

Articolul 4

Ridicarea măsurilor prevăzute la articolele 2 și 3

Autoritatea competentă poate ridica măsurile de control în ceea ce privește zonele de izolare create în conformitate cu articolul 2 alineatul (2) și restricțiile privind introducerea pe piață prevăzute la articolul 3 după efectuarea a două inspecții consecutive la un interval de 15 zile care indică încetarea creșterii mortalității.

Articolul 5

Cerințe privind introducerea pe piață a stridiilor *Crassostrea gigas* care provin dintr-un compartiment care anterior a făcut obiectul măsurilor de control din cauza creșterii mortalității stridiilor *Crassostrea gigas* în legătură cu OsHV-1 µvar

(1) Stridiile *Crassostrea gigas* introduse pe piață și provenind dintr-un compartiment care anterior a făcut obiectul măsurilor de protecție fie în 2009, fie în 2010 din cauza creșterii mortalității stridiilor *Crassostrea gigas* în legătură cu OsHV-1 µvar:

(a) sunt însoțite de un certificat de sănătate animală completat în conformitate cu modelul prevăzut în anexa II la prezentul regulament și notele explicative prevăzute în anexa V la Regulamentul (CE) nr. 1251/2008, dacă animalele:

(i) sunt destinate statelor membre sau compartimentelor care au creat un program pentru detectarea rapidă a OsHV-1 µvar și în care OsHV-1 µvar nu este detectat; și

[1] JO L 139, 30.4.2004, p. 55.

▼B

(ii) sunt destinate zonelor de cultură sau de relocare;

(b) provin dintr-un compartiment în care s-a demonstrat absența OsHV-1 µvar prin efectuarea eșantionării și testării în conformitate cu partea A din anexa I; și

(c) respectă cerințele de sănătate animală prevăzute în modelul de certificat menționat la litera (a).

(2) Un program pentru detectarea rapidă a OsHV-1 µvar menționat la alineatul 1 litera (a) punctul (i) respectă următoarele cerințe:

(a) programul trebuie să fie declarat Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală;

(b) această declarație trebuie să fie conformă cu punctul 1, punctele 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, și 5.9 și cu punctele 6 și 7 din modelul de formular prevăzut în anexa II la Decizia 2009/177/CE;

(c) programul trebuie să includă:

(i) eșantionarea în conformitate cu partea A din anexa I;

(ii) testarea în vederea detectării prezenței OsHV-1 µvar în conformitate cu metodele de diagnosticare prevăzute în partea B din anexa I.

(3) Alineatul (1) devine aplicabil la o săptămână de la data reuniunii Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală în cadrul căreia a fost declarat programul menționat la alineatul 1 litera (a) punctul (i).

Articolul 6

Pagina de internet informativă

(1) Statele membre pun la dispoziția Comisiei și celorlalte state membre următoarele:

(a) o listă a zonelor de izolare și a factorilor care au fost luați în considerare pentru definirea acestor zone, inclusiv o descriere a limitelor geografice ale zonei relevante, stabilite în conformitate cu articolul 2 alineatul (2);

(b) o listă a compartimentelor, inclusiv o descriere a limitelor geografice ale zonei relevante:

(i) care au făcut obiectul măsurilor de protecție în 2009 din cauza creșterii mortalității în cazul stridiilor *Crassostrea gigas* în legătură cu OsHV-1 µvar;

(ii) în cazul cărora s-a demonstrat absența OsHV-1 µvar printr-o testare efectuată în conformitate cu părțile A și B din anexa I asupra eșantioanelor prelevate din zonele de izolare;

(c) declarațiile privind programele menționate la articolul 5 alineatul (2), inclusiv o descriere a limitelor geografice ale zonei relevante.

(2) Informațiile prevăzute la alineatul (1) sunt actualizate și puse la dispoziție prin intermediul paginilor de internet informative create în conformitate cu articolul 10 din Decizia 2009/177/CE.

▼B

Articolul 7

Raportare

Până la 1 octombrie 2010 cel târziu, statele membre prezintă Comisiei un raport privind programele declarate în conformitate cu articolul 5 alineatul (2).

Raportul este conform cu modelul de formular prevăzut în anexa VI la Decizia 2009/177/CE.

Articolul 8

Intrarea în vigoare și aplicarea

Prezentul regulament intră în vigoare în a treia zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la 15 martie 2010 până la ►M1 30 aprilie 2011 ◄.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

▼B

ANEXA I

PARTEA A

Eșantionarea

1. *Eșantionare în scopul articolului 2*

Eșantioanele prevăzute la articolul 2 constau în cel puțin 12 exemplare de stridii *Crassostrea gigas*. La selectarea acestor animale, sunt eșantionate exemplarele slăbite, cu cochilia deschisă sau care au murit recent (încă nedescompuse), acestea fiind colectate din compartimentul în care se observă mortalitatea.

2. *Eșantionarea în sensul articolului 3 alineatul (2) litera (b), a articolului 5 alineatul (1) litera (b) și a articolului 5 alineatul (2)*

(a) Eșantionarea în sensul articolului 3 alineatul (2) litera (b) constă:

(i) în cazul larvelor, în cinci probe conținând cel puțin 50 mg de animale întregi colectate între 4 și 8 zile de la fecundare, inclusiv cochilii, per lot;

(ii) în cazul stridiilor tinere cu dimensiuni mai mici de 6 mm, în 30 de probe de 300 mg de animale întregi, inclusiv cochilii, per lot;

(iii) în cazul stridiilor mai mari de 6 mm, în 150 de exemplare per lot.

La selectarea acestor animale, toate părțile lotului trebuie să fie reprezentate în mod proporțional în eșantion. Dacă sunt prezente animale slăbite, cu cochilia deschisă sau care au murit recent (încă nedescompuse), trebuie selectate cu prioritate aceste animale.

(b) Eșantionarea în sensul articolului 5 alineatul (2) constă în cel puțin 150 de exemplare de *Crassostrea gigas* per punct de eșantionare. Eșantionarea se efectuează la toate fermele sau zonele de cultură a moluștelor din statul membru sau compartimentul care face obiectul programului.

Eșantionarea în sensul articolului 5 alineatul (1) litera (b) constă în cel puțin 150 de exemplare de stridii *Crassostrea gigas* per compartiment.

La selectarea acestor animale, se ține seama de următoarele criterii:

— dacă sunt prezente animale slăbite, cu cochilia deschisă sau care au murit recent (încă nedescompuse), aceste animale sunt selectate cu prioritate. Dacă nu sunt prezente astfel de animale, animalele selectate includ moluște sănătoase în vârstă de mai puțin de 12 luni;

— atunci când se efectuează eșantionarea în cadrul fermelor în care se utilizează mai mult de o sursă de apă pentru producție, trebuie incluse pentru eșantionare animale reprezentând toate sursele de apă, în așa fel încât toate părțile fermei să fie reprezentate proporțional în eșantion;

— atunci când se efectuează eșantionarea în zone de cultură a moluștelor, se includ în eșantion animale dintr-un număr suficient de puncte de eșantionare, cel puțin trei, în așa fel încât toate părțile zonei de cultură a moluștelor să fie reprezentate proporțional în eșantion, inclusiv bancurile naturale prezente în zona de cultură a moluștelor. Principalii factori care trebuie avuți în vedere pentru selectarea acestor puncte de eșantionare sunt: detectarea prealabilă a OsHV-1 µvar în zonă, densitatea stocurilor, debitele de apă, batimetria și practicile de gestionare.

▼B

(c) Eșantionarea prevăzută la articolul 5 alineatul (2) se efectuează în perioada din an în care prevalența OsHV-1 µvar în statul membru sau în compartiment este cunoscută a fi maximă. Atunci când astfel de date nu sunt disponibile, eșantionarea se efectuează imediat după perioada în care temperatura apei depășește 16 °C sau în perioada din an în care temperatura atinge în mod normal valoarea maximă anuală.

(d) Eșantionarea prevăzută la articolul 5 alineatul (1) litera (b) se efectuează de preferat în perioada din an descrisă la litera (c). Dacă eșantioanele sunt colectate în afara acestei perioade din an, stridiile eșantionate trebuie să fie păstrate în condiții echivalente celor descrise la litera (c) pe o perioadă adecvată pentru detectarea OsHV-1 µvar, înainte de a fi testate.

PARTEA B

Metode de diagnosticare pentru detectarea OsHV-1 µvar

1. *Domeniul de aplicare*

Această procedură explică o metodă standard de diagnosticare care trebuie utilizată pentru detectarea și identificarea OsHV-1 µvar prin reacția în lanț a polimerazei (denumită în continuare „PCR”). Aceasta permite realizarea unei distincții între OsHV-1 și OsHV-1 µvar.

După caz, pentru optimizarea condițiilor de reacție și pentru adaptarea la echipamentele și condițiile proprii de laborator, laboratoarele pot aplica modificări la metodele descrise în prezenta anexă, cu condiția să se demonstreze aceeași sensibilitate și specificitate.

2. *Definiție*

OsHV-1 µvar este definit în articolul 1 din prezentul regulament.

3. *Echipamentele și condițiile de mediu*

Pentru testul de diagnosticare utilizat pentru detectarea și identificarea OsHV-1 µvar prin PCR sunt necesare echipamentele și condițiile de mediu utilizate în mod obișnuit pentru testele PCR, după cum urmează:

— O hotă închisă dotată cu un sistem de lămpi UV pentru eliminarea eventualelor contaminări în timpul preparării amestecului PCR.

— Două seturi complete de pipete (2 µl, 20 µl, 200 µl și 1 000 µl), primul pentru extracția ADN-ului și al doilea pentru prepararea amestecului PCR.

— Trei pipete diferite: o pipetă (2 µl) pentru dozarea eșantioanelor în amestecul PCR, o pipetă (20 µl) pentru eșantionarea bromurii de etidiu și o altă pipetă (20 µl) pentru încărcarea produselor PCR în gelul de agaroză.

— Vârfuri de pipete cu filtre (2 µl, 20 µl, 200 µl și 1 000 µl) pentru extracția ADN-ului, prepararea amestecului PCR și dozarea eșantioanelor.

— Vârfuri de pipetă (20 µl) pentru recoltarea bromurii de etidiu și pentru încărcarea produselor amplificate în gelul de agaroză.

— Un ciclor termic pentru efectuarea amplificărilor.

— Un sistem de electroforeză orizontală pentru electroforeza produselor PCR.

— O masă UV pentru observarea produselor PCR după electroforeza în gelul de agaroză.

— Un sistem de obținere a imaginilor gelului.

▼B

Operatorul trebuie să poarte un halat de laborator și mănuși în timpul tuturor diferitelor etape descrise mai jos. Halatul de laborator și mănușile trebuie schimbate, de preferat, după fiecare etapă principală: extracția ADN-ului, prepararea amestecului PCR, dozarea eșantioanelor, amplificarea și încărcarea în gel.

Se recomandă ca aceste etape diferite să fie efectuate în încăperi diferite. În special, amplificarea și încărcarea în gel/electroforeza ar trebui să aibă loc într-o altă încăpere decât extracția ADN-ului, prepararea amestecului PCR și dozarea ADN-ului.

4. *Procedura*

4.1. Pregătirea eșantionului

Stridii vii sau care au murit recent (încă nedescompuse), care pot fi congelate anterior, sunt prelucrate pentru extracția ADN-ului.

Eșantioanele sunt prelucrate în mod diferit, în funcție de dimensiunea acestora:

(a) în cazul larvelor, probe de 50 mg de animale întregi (inclusiv cochilii) completate cu 200 µl de apă distilată sunt zdrobite și centrifugate la 1 000 g timp de 1 minut;

(b) în cazul stridiilor tinere cu dimensiuni de cel mult 6 mm, probe de 300 mg de animale întregi (inclusiv cochilii) completate cu 1 200 µl de apă distilată sunt zdrobite și centrifugate la 1 000 g timp de 1 minut;

(c) în cazul stridiilor tinere cu dimensiuni între 6 și 15 mm, toate țesuturile moi ale fiecărui animal sunt zdrobite individual;

(d) în cazul animalelor cu dimensiuni mai mari de 15 mm, sunt izolate porțiuni de branhii și de manta.

Extracția ADN-ului se efectuează utilizând QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) și respectând instrucțiunile pentru protocolul de testare a țesuturilor.

Prepararea în continuare a eșantionului se efectuează în următoarea ordine:

1. Se așază 100 µl de supernatant pentru eșantioanele menționate la literele (a) și (b) sau 10 până la 50 mg de țesut pentru eșantioanele menționate la literele (c) și (d) într-o eprubetă de 1,5 ml pentru microcentrifugă și se adaugă 180 µl de soluție-tampon ATL.

2. Se adaugă 20 µl de proteinază K, se amestecă intensiv și se incubează la 56 °C până când țesutul este complet lizat (până a doua zi). Ocazional, se amestecă intensiv în timpul incubației pentru dispersarea eșantionului. Se centrifughează rapid eprubeta de 1,5 ml pentru microcentrifugă pentru îndepărtarea picăturilor de pe capac.

3. Se adaugă 200 µl de soluție-tampon AL la eșantion, se amestecă intensiv prin pulsații timp de 15 s și se incubează la 70 °C timp de 10 minute. Se centrifughează ușor eprubeta de 1,5 ml pentru microcentrifugă pentru îndepărtarea picăturilor de pe capac.

4. Se adaugă 200 µl de etanol (96-100 %) la eșantion și se amestecă intensiv prin pulsații timp de 15 s. Se centrifughează rapid eprubeta de 1,5 ml pentru microcentrigfugă pentru îndepărtarea picăturilor de pe capac.

5. Cu atenție, se aplică amestecul obținut la etapa 4 la coloana de centrifugare QIAamp (într-o eprubetă de recoltare de 2 ml) fără a uda marginea. Se închide capacul și se centrifughează la 10 000 rpm timp de 1 minut. Se așază coloana de centrifugare QIAamp într-o eprubetă de recoltare de 2 ml curată (prevăzută în trusă) și se aruncă eprubeta care conține filtratul.

▼B

6. Se deschide cu atenție coloana de centrifugare QIAamp și se adaugă 500 µl de soluție-tampon AW1 fără a se uda marginea. Se închide capacul și se centrifughează la 10 000 rpm timp de 1 minut. Se așază coloana de centrifugare QIAamp Spin într-o eprubetă de recoltare de 2 ml curată (prevăzută în trusă) și se aruncă eprubeta de recoltare care conține filtratul.

7. Se deschide atent coloana de centrifugare QIAamp și se adaugă 500 µl de soluție-tampon AW2 fără a se uda marginea. Se închide capacul și se centrifughează la viteză maximă (14 000 rpm) timp de 3 minute.

8. (Opțional) Se așază coloana de centrifugare QIAamp într-o eprubetă de recoltare de 2 ml nouă (nu este prevăzută în trusă) și se aruncă eprubeta de recoltare care conține filtratul. Se centrifughează la viteza maximă (14 000 rpm) timp de 1 minut.

9. Se așază coloana de centrifugare QIAamp într-o eprubetă curată de 1,5 ml pentru microcentrifugă (nu este prevăzută în trusă) și se aruncă eprubeta de recoltare care conține filtratul. Se deschide cu atenție coloana de centrifugare QIAamp și se adaugă 100 µl de apă distilată. Se incubează timp de 5 minute la temperatura camerei și se centrifughează la 10 000 rpm timp de 1 minut.

10. Se controlează calitatea și eficacitatea extracției [de exemplu, măsurând DO (260 nm) la spectrofotometru sau după electroforeză în gel de agaroză].

11. Se prepară diluarea eșantioanelor pentru a avea o concentrație finală de ADN de 50-100 ng/µl.

12. Soluțiile de ADN se păstrează la o temperatură de 4 °C până când se efectuează analizele PCR.

Pentru extracțiile ADN-ului pot fi utilizate alte truse comerciale, cu condiția să se fi demonstrat că acestea oferă rezultate similare.

4.2. *Reacția în lanț a polimerazei (PCR)*

4.2.1. Reactivi

— 10 X soluție-tampon (furnizată cu ADN polimerază Taq)

— $MgCl_2$ (furnizată cu ADN polimerază) (25 mM)

— ADN polimerază Taq (Goldstar, Eurogentec) 5 U/µl

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Amestecul principal (20 mM) trebuie diluat de 10 ori (la 2 mM) înainte de utilizare

— d H_2O (H_2O distilată fără ADN și ARN)

4.2.2. Primeri

Trebuie utilizați următorii primeri ([1]):

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Acești primeri sau descrierile acestora pot fi obținute de la laboratorul comunitar de referință pentru bolile moluștelor (LGP-Ifremer, av de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Franța).

▼B

4.2.3. Amestecul PCR

Amestecul PCR pentru fiecare eprubetă este:

	Volum per eprubetă	Concentrație finală
Soluție-tampon (10 X)	5 µl	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Polimerază Taq (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl din acest amestec PCR se dozează în fiecare eprubetă PCR

— 1 µl din ADN-ul extras (50-100 ng/µl) se adaugă în fiecare eprubetă.

4.2.4. Controale

Se utilizează două tipuri de controale:

— Controalele negative constau în dH_2O (1 µl pentru 49 µl de amestec PCR). Acestea au ca scop detectarea unei eventuale contaminări reactive a mediului de lucru. Un control negativ ar trebui să fie inclus în unul din 10 eșantioane sau după fiecare lot de eșantioane.

— Controalele pozitive constau în ADN plasmidic conținând segmentul țintă CF-CR al genomului OsHV-1. Acestea au ca scop verificarea eficacității reacției PCR. Un control pozitiv ar trebui inclus pentru fiecare analiză PCR. Controalele pozitive sunt disponibile la laboratorul comunitar de referință.

4.2.5. Amplificare

Ciclurile de amplificare se efectuează într-un ciclor termic.

— Denaturare inițială: 2 min la 94 °C

— Amplificare: 35 de cicluri (1 min la 94 °C, 1 min la 50 °C și 1 min la 72 °C)

— Elongație finală: 5 min la 72 °C

4.3. *Electroforeză*

4.3.1. Reactivi

— 50 X TAE (poate fi cumpărat gata de utilizare):

Bază tris (40 mM) 242 g

Acid acetic glacial (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O pentru 1 litru

Se reglează la pH 8

▼B

— Gel de agaroză 2,5 % în 1X TAE

Bromură de etidiu (0,5 μg/ml) adăugată după răcirea gelului.

— Încărcarea colorantului albastru:

Bromofenol albastru 0,25 %

Xilen cianol FF 0,25 %

Zaharoză 40 %

Se păstrează la 4 °C.

Se utilizează diluat de 6 ori (2 μl de tampon albastru de încărcare pentru 10 μl de produse PCR).

— Marcatorul masei moleculare:

SmartLadder SF (Eurogentec): un marcator al masei moleculare gata de utilizare incluzând 9 benzi distanțate regulat, de la 100 la 1 000 bp.

4.3.2. Prepararea gelului de agaroză

1. Se cântăresc 2,5 g de agaroză, se adaugă 100 ml de 1X TAE și se încălzește până la topirea amestecului.

2. După răcirea soluției, se adaugă bromură de etidiu (5 μl pentru 100 ml de gel de agaroză), iar soluția se așază într-un mulaj specific dotat cu dinți de pieptene (pentru formarea cavităților).

3. Atunci când gelul se polimerizează, dinții de pieptene sunt îndepărtați și gelul se așază într-un sistem de electroforeză orizontală conținând suficientă 1 X TAE pentru acoperirea gelului de agaroză.

4. 10 μl de produse PCR se amestecă cu 2 μl de colorant albastru (6 X) și se introduc în cavități

5. O cavitate este destinată marcatorului masei moleculare (5 μl)

6. Se aplică o tensiune de 50-150 volți timp de 30 de minute până la 1 oră, în funcție de dimensiunea și densitatea gelului

7. Gelul se examinează la lampa UV.

4.4. *Interpretare*

Prezența OsHV-1 μVar într-un eșantion este indicată de prezența unei benzi de dimensiune corespunzătoare (157 bp, în loc de 173 bp pentru OsHV-1) pe gel de agaroză 2,5 %, cu toate controalele negative având rezultate negative și toate controalele pozitive având rezultate pozitive.

PARTEA C

Definiția zonei de izolare

Următorii factori care influențează riscurile de răspândire a bolii sunt luați în considerare la definirea zonei de izolare în conformitate cu articolul 2 alineatul (2):

(a) numărul, rata și distribuția moluștelor la ferma sau zona de cultură a moluștelor infectată;

(b) distanța și densitatea fermelor sau a zonelor de cultură a moluștelor din vecinătate;

(c) proximitatea față de unitățile de prelucrare, fermele cu care se intră în contact sau zonele de cultură a moluștelor cu care se intră în contact;

(d) speciile prezente la ferme sau în zonele de cultură a moluștelor;

▼B

(e) practicile de acvacultură aplicate la ferma afectată sau în fermele sau zonele de cultură a moluștelor învecinate; și

(f) condițiile hidrodinamice și alți factori cu potențiale efecte epizootologice identificate.

▼B

ANEXA II

Model de certificat de sănătate animală pentru introducerea pe piață a stridiilor *Crassostrea gigas* destinate zonelor de cultură sau de relocare

UNIUNEA EUROPEANĂ **Certificat intracomunitar**

Partea I: Detalii ale prezentului transport

I.1. Expeditorul Nume Adresa Codul poștal	I.2. Numărul de referință al certificatului / I.2.a. Număr local de referință I.3. Autoritatea Competentă Centrală I.4. Autoritatea Competentă Locală
I.5. Destinatarul Nume Adresa Codul poștal	I.6. I.7.
I.8. Țara de origine / Codul ISO / I.9.	I.10. Țara de destinație / Codul ISO / I.11.
I.12. Locul de origine/Locul de prelevare Exploatația de acvacultură aprobată ☐ Altele ☐ Nume / Numărul de aprobare Adresa Codul poștal	I.13. Locul de destinație Exploatația de acvacultură aprobată ☐ Altele ☐ Nume / Numărul de aprobare Adresa Codul poștal
I.14. Locul de încărcare Codul poștal	I.15. Data și locul de plecare
I.16. Mijloacele de transport Avion ☐ Vas ☐ Vagon de tren ☐ Vehicul rutier ☐ Altele ☐ Identificare:	I.17. Transportator Nume / Numărul de aprobare Adresa Codul poștal / Stat membru
I.18. Specii de animale/Produse	I.19. Codul produsului (cod CN) **03.07** I.20. Număr/Cantitate
I.21.	I.22. Număr de pachete
I.23. Identificarea containerului/Numărul sigiliului	I.24. Tip de ambalaje
I.25. Animale certificate ca/produse certificate pentru: Reproducție ☐ Retransmitere ☐	
I.26. Tranzit prin țări terțe ☐ Țara terță / Codul ISO Punct de ieșire / Cod Punct de intrare / Nr. PIF	I.27. Tranzit prin statele membre ☐ Stat membru / Codul ISO Stat membru / Codul ISO Stat membru / Codul ISO
I.28. Export ☐ Țara terță / Codul ISO Punct de ieșire / Cod	I.29.
I.30.	
I.31. Identificarea animalelor Specii (nume științific) / Cantitate	

▼B

UNIUNEA EUROPEANĂ

Pentru introducerea pe piață a stridiilor *Crassostrea gigas* destinate zonelor de cultură sau de relocare

Partea II: Certificare

II. **Informații privind sănătatea**	II.a. Numărul de referință al certificatului	II.b.

(1)(2)**[II.1 Cerințe pentru stridiile *Crassostrea gigas* care provin dintr-o zonă de izolare creată în conformitate cu articolul 2 din Regulamentul (UE) nr. 175/2010**

Subsemnatul, inspector oficial, certific prin prezenta că stridiile *Crassostrea gigas* menționate în partea I a prezentului certificat:

II.1.1 provin dintr-o zonă care face obiectul măsurilor de control al bolilor în ceea ce privește creșterea mortalității stridiilor *Crassostrea gigas* în legătură cu OsHV-1 µvar;

(1)[II.1.2 pot fi introduse pe piață în conformitate cu articolul 3 alineatul (2) litera (a) din Regulamentul (UE) nr. 175/2010;]

(1)[II.1.2 provin dintr-o parte a zonei de izolare care nu este afectată de creșterea mortalității, iar lotul a făcut obiectul eșantionării și testării în conformitate cu anexa I la Regulamentul (UE) nr. 175/2010 cu privire la stridiile *Crassostrea gigas*, rezultatul fiind negativ;]]

(1)(3)**[II.2 Cerințe pentru stridiile *Crassostrea gigas* care provin dintr-un stat membru sau dintr-un compartiment care a făcut anterior obiectul măsurilor de protecție în ceea ce privește creșterea mortalității stridiilor *Crassostrea gigas* în legătură cu OsHV-1 µvar și care sunt destinate statelor membre sau compartimentelor care fac obiectul unui program pentru detectarea rapidă a OsHV-1 µvar**

Subsemnatul, inspector oficial, certific prin prezenta că stridiile *Crassostrea gigas* menționate în partea I a prezentului certificat:

II.2.1 provin de la o fermă sau zonă de cultură a moluștelor unde, potrivit evidențelor fermei sau zonei de cultură a moluștelor, nu există nicio indicație privind creșterea mortalității;

II.2.2 provin dintr-un compartiment unde absența OsHV-1 µvar este demonstrată prin eșantionarea și testarea efectuată în conformitate cu anexa I la Regulamentul (UE) nr. 175/2010 cu privire la stridiile *Crassostrea gigas*.]

II.3 Cerințe privind transportul și etichetarea

Subsemnatul, inspector oficial, certific prin prezenta că:

II.3.1 stridiile *Crassostrea gigas* menționate în partea I a prezentului certificat sunt ținute în condiții, inclusiv o anumită calitate a apei, care nu le afectează starea de sănătate;

II.3.2 containerul de transport este curat și dezinfectat înainte de încărcare sau nu a fost utilizat anterior;

II.3.3 lotul este identificat printr-o etichetă lizibilă pe exteriorul containerului sau, în cazul în care este transportat cu o navă cu vivieră, în manifestul navei, cu informațiile relevante menționate în casetele I.8-I.13 din partea I a prezentului certificat și următoarea declarație:

fie (1)[„stridii *Crassostrea gigas* destinate culturii/relocării într-o zonă care face obiectul unui program de detectare rapidă a OsHV-1 µvar"]

fie (1)[„stridii *Crassostrea gigas* destinate culturii/relocării într-o zonă care face obiectul măsurilor de control al bolilor și care provin dintr-o zonă care face obiectul măsurilor de control al bolilor"].

Note

Partea I:

— Caseta I.12: După caz, se utilizează numărul autorizației pentru ferma sau zona de cultură a moluștelor în cauză.

— Caseta I.13: După caz, se utilizează numărul autorizației pentru ferma sau zona de cultură a moluștelor în cauză.

— Casetele I.20 și 1.31: În ceea ce privește cantitatea, se furnizează numărul total.

— Caseta I.25: Se utilizează opțiunea „Reproducere" dacă sunt destinate culturii, „Relocare" dacă sunt destinate relocării.

▼B

UNIUNEA EUROPEANĂ

Pentru introducerea pe piață a stridiilor *Crassostrea gigas* destinate zonelor de cultură sau de relocare

II. **Informații privind sănătatea**	II.a. Numărul de referință al certificatului	II.b.

Partea a II-a:

([1]) Se păstrează, după caz.

([2]) Partea II.1 a prezentului certificat se aplică loturilor de stridii *Crassostrea gigas* care provin dintr-o zonă de izolare creată în conformitate cu articolul 2 alineatul (2) din Regulamentul (UE) nr. 175/2010 și care, în conformitate cu articolul 3 alineatul (2) litera (a) sau (b) din regulamentul menționat, pot părăsi zona.

([3]) Partea II.2 a prezentului certificat se aplică loturilor de stridii *Crassostrea gigas* menționate la articolul 5 alineatul (1) din Regulamentul (UE) nr. 175/2010, destinate statelor membre sau compartimentelor care fac obiectul unui program de detectare rapidă a OsHV-1 µvar și care provin dintr-o zonă care a făcut anterior obiectul măsurilor de protecție în legătură cu creșterea mortalității stridiilor *Crassostrea gigas*.

Medicul veterinar oficial sau inspectorul oficial

Numele (cu majuscule): Funcția și titlul:

Unitatea veterinară locală: Nr. UVL:

Data: Semnătura:

Ștampila: