Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

►B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 175/2010

av den 2 mars 2010

om tillämpning av rådets direktiv 2006/88/EG när det gäller åtgärder för att bekämpa ökad dödlighet hos ostron av arten *Crassostrea gigas* i samband med påvisat herpesvirus OsHV-1 µvar

(Text av betydelse för EES)

(EUT L 52, 3.3.2010, s. 1)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►M1	Kommissionens förordning (EU) nr 1153/2010 av den 8 december 2010	L 324	39	9.12.2010

▼B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 175/2010

av den 2 mars 2010

om tillämpning av rådets direktiv 2006/88/EG när det gäller åtgärder för att bekämpa ökad dödlighet hos ostron av arten *Crassostrea gigas* i samband med påvisat herpesvirus OsHV-1 µvar

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av rådets direktiv 2006/88/EG av den 24 oktober 2006 om djurhälsokrav för djur och produkter från vattenbruk och om förebyggande och bekämpning av vissa sjukdomar hos vattenlevande djur ([1]), särskilt artiklarna 41.3 och 61.3, och

av följande skäl:

(1) I direktiv 2006/88/EG fastställs de djurhälsokrav som gäller för utsläppande på marknaden av djur och produkter från vattenbruk. Vidare fastställs minimiåtgärder för sjukdomsbekämpning som ska vidtas vid misstanke om förekomst av eller vid utbrott av vissa sjukdomar hos vattenlevande djur.

(2) Enligt artikel 41 ska medlemsstaterna vidta lämpliga åtgärder för att bekämpa nya sjukdomssituationer och hindra sjukdomen från att spridas. Vid en ny sjukdomssituation ska den berörda medlemsstaten snarast underrätta medlemsstaterna, kommissionen och Eftaländerna om dessa upplysningar är av epidemiologisk betydelse för en annan medlemsstat.

(3) Under senvåren och sommaren 2008 påvisades ökad dödlighet hos ostron av arten *Crassostrea gigas* (nedan kallade *Crassostrea gigas*) i ett flertal områden i Frankrike och Irland. Detta tillskevs en kombination av negativa miljöfaktorer och förekomst av vibriobakterier och av herpesvirus OsHV-1, däribland OsHV-1 µvar, som är en nyligen beskriven genotyp av viruset.

(4) De franska myndigheterna informerade kommissionen, medlemsstaterna och Efta-länderna i augusti 2008 om situationen och de åtgärder som vidtagits, och ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa underrättades om saken i september 2008.

(5) Våren 2009 påvisades i Frankrike, Irland och på Kanalöarna återigen ökad dödlighet som tillskrevs samma kombination av faktorer. Orsaken till dödligheten är ännu oklar men epidemiologiska undersökningar i Irland och Förenade kungariket under 2009 tyder på att OsHV-1 µvar spelar en viktig roll.

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

▼B

(6) De behöriga myndigheterna i dessa medlemsstater och på Kanalöarna informerade kommissionen om situationen och de åtgärder som vidtagits, och ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa underrättades om saken flera gånger.

(7) De åtgärder för att motverka spridning som de behöriga myndigheterna i medlemsstaterna och Kanalöarna vidtog för att bekämpa den nya sjukdomssituationen bestod främst i att begränsa förflyttningen av *Crassostrea gigas* ut från de områden som drabbats av ökad dödlighet.

(8) Med tanke på att den nya sjukdomssituationen åter uppstod 2009, och att detta kan ske igen, och risken för att sjukdomen sprids ytterligare under våren och sommaren 2010 och utifrån erfarenheterna är det lämpligt och nödvändigt att utvidga de åtgärder som de drabbade medlemsstaterna redan vidtagit.

(9) Det krävs samordnade åtgärder i fråga om den nya sjukdomssituationen på EU-nivå för att säkerställa att kraven i direktiv 2006/88/EG vad gäller nya sjukdomar genomförs på ett enhetligt sätt och att åtgärderna ger tillräckligt skydd mot ytterligare spridning utan att det skapas några onödiga hinder för förflyttning av *Crassostrea gigas*.

(10) När de behöriga myndigheterna får uppgifter om att ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* har påvisats, bör provtagning och testning ske för att påvisa eller utesluta förekomst av OsHV-1 µvar.

(11) Om förekomst av virusgenotypen OsHV-1 µvar har bekräftats, bör medlemsstaterna tillämpa sjukdomsbekämpningsåtgärder, däribland upprätta ett kontrollområde. Vid fastställandet av kontrollområdet bör hänsyn tas till vissa faktorer som fastställs i denna förordning. Dessa bekämpningsåtgärder bör fortsätta att tillämpas tills kontrollbesök har visat att den ökade dödligheten upphört.

(12) Det bör fastställas restriktioner för förflyttningar av *Crassostrea gigas* ut ur kontrollområdet för att begränsa risken för att sjukdomen sprids. Vissa undantag bör dock medges när risken för att sjukdomen sprids är begränsad. Dessa undantag rör förflyttning av vissa *Crassostrea gigas* som är avsedda för odling eller återutläggningsområden i ett annat kontrollområde eller för användning som livsmedel. För att säkerställa spårbarheten hos sändningar av *Crassostrea gigas* som är avsedda för odling eller återutläggningsområden bör de åtföljas av ett djurhälsointyg. Vid ifyllandet av intyget bör anvisningarna i bilaga V till kommissionens förordning (EG) nr 1251/2008 av den 12 december 2008 om tillämpning av rådets direktiv 2006/88/EG när det gäller villkor och intygskrav för utsläppande på marknaden och import till gemenskapen av djur och produkter från vattenbruk och om fastställande av en förteckning över smittbärande arter ([1]) beaktas.

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

▼B

(13) För att öka kunskapen om statusen för denna nya sjukdomssituation i unionen och särskilt i de medlemsstater och delområden som ännu inte drabbats och för att säkerställa att varje förekomst av OsHV-1 µvar påvisas på ett tidigt stadium, kan det tänkas att medlemsstaterna önskar inrätta program för riktad provtagning och testning för att på ett tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar. *Crassostrea gigas* som härrör från områden som under 2009 omfattades av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning enligt nationella åtgärder eller under 2010 enligt denna förordning, bör omfattas av ytterligare djurhälsokrav vid införsel för odling eller återutläggning till medlemsstater eller delområden som omfattas av ett sådant program så länge som OsHV-1 µvar inte påvisas i den medlemsstaten eller det delområdet.

(14) För att säkerställa att de data som samlats in i olika medlemsstater i samband med program för riktad provtagning och testning för att på ett tidigt stadium påvisa OsHV-1 µvar är jämförbara bör det fastställas vissa krav på innehållet i dessa program.

(15) Tillförlitliga uppgifter i tid om hur situationen i fråga om påvisande av OsHV-1 µvar i medlemsstaterna är centralt för att den nya sjukdomssituationen ska kunna bekämpas. Medlemsstaterna bör därför utan dröjsmål underrätta kommissionen och övriga medlemsstater om den första bekräftade förekomsten av OsHV-1 µvar-virus på sitt territorium under 2010.

(16) Vidare bör man utnyttja de Internetbaserade informationssidor som inrättats i enlighet med artikel 10 i kommissionens beslut 2009/177/EG av den 31 oktober 2008 om genomförande av rådets direktiv 2006/88/EG avseende övervaknings- och utrotningsprogram och sjukdomsfri status i medlemsstater, zoner och delområden ([1]).

(17) För öppenhetens skull och för att det snabbt ska kunna gå att få tillgång till relevant information om den nya sjukdomssituationen bör medlemsstaterna ge Europeiska kommissionen och övriga medlemsstater tillgång till information om kontrollområden, områden som tidigare omfattats av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning, men där det påvisats att OsHV-1 µvar inte förekommer, och program som inrättats för att på tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar.

(18) Eftersom osäkerheten om den nya sjukdomssituationen fortfarande är stor bör åtgärderna i denna förordning gälla till och med slutet av december 2010.

(19) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa.

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

▼B

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Definition

I denna förordning avses med OsHV-1 µvar en genotyp av herpesvirus OsHV-1 som är definierad med hjälp av partiell sekvensering och visar en systematisk deletion av 12 baspar i ORF 4 av genomet vid en jämförelse med OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artikel 2

Provtagning, testning och upprättande av kontrollområden

1. När ökad dödlighet hos ostron av arten *Crassostrea gigas* (nedan kallade *Crassostrea gigas*) påvisas ska den behöriga myndigheten

a) provta i enlighet med del A i bilaga I,

b) testa för förekomst av OsHV-1 µvar i enlighet med de diagnostiska metoderna i del B i bilaga I.

2. Om resultatet av de tester som avses i punkt 1 b visar på att OsHV-1 µvar förekommer ska den behöriga myndigheten upprätta ett kontrollområde. Området ska fastställas utifrån en analys i varje enskilt fall utifrån de faktorer som påverkar risken för att sjukdomen sprids som fastställs i del C i bilaga I.

3. Medlemsstaterna ska utan dröjsmål underrätta kommissionen och övriga medlemsstater om det första kontrollområde som de upprättar på sitt territorium under 2010.

Artikel 3

Krav på utsläppande på marknaden av *Crassostrea gigas* som härrör från ett sådant kontrollområde som avses i artikel 2

1. *Crassostrea gigas* som härrör från kontrollområden som upprättats i enlighet med artikel 2.2 får inte förflyttas från detta område.

2. Genom undantag från punkt 1 får sändningar av *Crassostrea gigas* förflyttas ut från kontrollområdet om de uppfyller följande:

a) De är avsedda för ett annat kontrollområde som upprättats i enlighet med artikel 2.2.

b) De härrör från en del av kontrollområdet, inbegripet kläckerier, som inte drabbats av ökad dödlighet och sändningen har

i) provtagits i enlighet med del A i bilaga I, och

ii) med negativt resultat testats för förekomst av OsHV-1 µvar i enlighet med de diagnostiska metoderna i del B i bilaga I.

▼B

c) De är avsedda för vidarebearbetning, reningsanläggningar, leveransanläggningar eller bearbetningsanläggningar innan de används som livsmedel, som är utrustade med ett system för rening av utloppsvatten som validerats av den behöriga myndigheten och där

i) höljebärande virus inaktiveras, eller

ii) risken för överföring av sjukdomar till naturliga vatten minskas till en godtagbar nivå.

d) De är avsedda att användas som livsmedel och har förpackats och märkts för detta ändamål i enlighet med Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 853/2004 ([1]) och

i) kan inte längre överleva om de återinsätts i den miljö de härrör från, eller

ii) är avsedda för vidarebearbetning utan tillfällig lagring vid platsen för bearbetningen.

e) Sändningarna eller produkterna därav är avsedda att användas som livsmedel utan vidarebearbetning förutsatt att de är förpackade i detaljhandelsförpackningar som uppfyller bestämmelserna för sådana förpackningar i förordning (EG) nr 853/2004.

3. De sändningar som avses i punkt 2 a och b och som är avsedda för odling eller återutläggningsområden ska åtföljas av ett djurhälsointyg som utfärdats i enlighet med förlagan i bilaga II till denna förordning och anvisningarna i bilaga V till förordning (EG) nr 1251/2008.

Artikel 4

Upphävande av åtgärderna i artiklarna 2 och 3

Den behöriga myndigheten får häva bekämpningsåtgärderna för de kontrollområden som upprättats i enlighet med artikel 2.2 och restriktionerna för utsläppande på marknaden i artikel 3 efter det att den har gjort två kontrollbesök med 15 dagars mellanrum som visar att den ökade dödligheten upphört.

Artikel 5

Krav på utsläppande på marknaden av *Crassostrea gigas* som härrör från delområden som tidigare omfattats av bekämpningsåtgärder på grund av ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* i samband med OsHV-1 µvar

1. *Crassostrea gigas* som ska släppas ut på marknaden och som härrör från delområden som antingen under 2009 eller 2010 har omfattats av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning på grund av ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* i samband med OsHV-1 µvar ska

a) åtföljas av ett djurhälsointyg som utfärdats i enlighet med förlagan i bilaga II till denna förordning och anvisningarna i bilaga V till förordning (EG) nr 1251/2008 om djuren

i) är avsedda för medlemsstater eller delområden som inrättat ett program för att på tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar och där OsHV-1 µvar inte har påvisats, och

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

▼B

ii) är avsedda för odling eller återutläggningsområden,

b) härröra från ett delområde där det genom provtagning och testning enligt del A i bilaga I har påvisats att OsHV-1 µvar inte förekommer, och

c) uppfylla djurhälsokraven i den intygsförlaga som avses i a.

2. De program för att på tidigt stadium påvisa OsHV-1 µvar som avses i punkt 1 a i ska uppfylla följande krav:

a) Ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa ska föreläggas en förklaring av programmet.

b) En sådan förklaring ska vara förenlig med punkterna 1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.9, 6 och 7 i förlagan i bilaga II till beslut 2009/177/EG.

c) Programmet ska innehålla följande:

i) Provtagning i enlighet med del A i bilaga I.

ii) Testning för förekomst av OsHV-1 µvar i enlighet med de diagnostiska metoderna i del B i bilaga I.

3. Punkt 1 ska tillämpas en vecka från och med den dag då ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa höll det möte där det program som avses i punkt 1 a i förklarades.

Artikel 6

Internetbaserade informationssidor

1. Medlemsstaterna ska ge kommissionen och övriga medlemsstater tillgång till följande:

a) En förteckning över kontrollområden och de faktorer som beaktats vid fastställandet av dessa områden, inbegripet en geografisk avgränsning av det relevanta området, som upprättats i enlighet med artikel 2.2.

b) En förteckning över delområden, inbegripet en geografisk avgränsning av det relevanta område

i) som under 2009 omfattades av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning på grund av ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* i samband med OsHV-1 µvar,

ii) där det genom testning enligt delarna A och B i bilaga I på prover som tagits i kontrollområdet har påvisats att OsHV-1 µvar inte förekommer.

c) Förklaringar av de program som avses i artikel 5.2, inbegripet en geografisk avgränsning av det relevanta området.

2. Uppgifterna i punkt 1 ska uppdateras och tillhandahållas genom de Internetbaserade informationssidor som inrättats i enlighet med artikel 10 i beslut 2009/177/EG.

▼B

Artikel 7

Rapportering

Senast den 1 oktober 2010 ska medlemsstaterna lämna in en rapport till kommissionen om program som förklarats i enlighet med artikel 5.2.

Rapporten ska sammanställas enligt förlagan i bilaga VI till beslut 2009/177/EG.

Artikel 8

Ikraftträdande och tillämpning

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Den ska tillämpas från och med den 15 mars 2010 till och med den ►M1 30 april 2011 ◄.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

▼B

BILAGA I

DEL A

Provtagning

1. *Provtagning enligt artikel 2*

Prover enligt artikel 2 ska bestå av minst tolv individer av *Crassostrea gigas*. Vid urvalet av djuren ska svaga individer, individer med öppna skal eller nydöda (ej sönderfallande/ruttna) individer provtas och de ska samlas in från det delområde där dödligheten konstaterats.

2. *Provtagning enligt artiklarna 3.2 b, 5.1 b och 5.2*

a) Provtagningen enligt artikel 3.2 b ska omfatta följande:

i) I fråga om larver: fem pooler om minst 50 mg hela djur med skal som samlats in 4–8 dagar efter befruktning per sändning.

ii) I fråga om yngel som är mindre än 6 mm: 30 pooler om 300 mg hela djur med skal per sändning.

iii) I fråga ostron som är större än 6 mm: 150 individer per sändning.

När djuren väljs ut ska sändningens samtliga delar vara proportionellt representerade i provet. Om det förekommer svaga individer, individer med öppna skal eller nydöda (ej sönderfallande/ruttna) individer ska i första hand dessa väljas ut.

b) Provtagningen enligt artikel 5.2 ska omfatta minst 150 individer av *Crassostrea gigas* per provtagningsplats. Samtliga anläggningar eller områden för blötdjursodling i den medlemsstat eller det delområde som programmet omfattar ska provtas.

Provtagningen enligt artikel 5.1 b ska omfatta minst 150 individer av *Crassostrea gigas* per delområde.

När djuren väljs ut ska hänsyn tas till följande kriterier:

— Om det förekommer svaga individer, individer med öppna skal eller nydöda (ej sönderfallande/ruttna) individer ska i första hand dessa väljas ut. Om det inte förekommer några sådana djur ska friska blötdjur som är yngre än 12 månader väljas ut.

— Vid provtagning på anläggningar där mer än en vattentäkt används för produktion, ska djur från samtliga vattentäkter provtas på så sätt att samtliga delar av anläggningen är proportionellt representerade i provet.

— Vid provtagning i områden för blötdjursodling ska djur från ett tillräckligt antal provtagningsplatser, dock minst tre, provtas på så sätt att samtliga delar av området är proportionellt representerade i provet, inbegripet de naturliga fyndplatser som finns inom detta område. Huvudfaktorer att beakta vid urvalet av dessa provtagningsplatser: tidigare påvisande av OsHV-1 µvar i området, beståndstäthet, vattenflöden, vattendjup och odlingsmetoder.

▼B

c) Provtagningen enligt artikel 5.2 ska ske under den period av året då man vet att prevalensen av OsHV-1 µvar i medlemsstaten eller delområdet är som högst. Om det inte finns några sådana data ska provtagningen ske precis efter den period då vattentemperaturen överskrider 16 °C eller den tid på året då vattentemperaturen normalt sett är som högst.

d) Provtagningen enligt artikel 5.1 b ska helst ske under den period av året som anges i c. Om prover samlas in utanför denna period ska de provtagna ostronen innan de testas förvaras under omständigheter som motsvarar dem som beskrivs i c under en period som är lämplig för påvisande av OsHV-1 µvar.

DEL B

Diagnostiska metoder för påvisande av OsHV-1 µvar

1. *Tillämpningsområde*

Förfarandet förklarar standardmetoden för diagnos som ska användas för påvisande av OsHV-1 µvar och PCR-identifiering (polymeraskedjereaktion). Den gör det möjligt att skilja mellan OsHV-1 och OsHV-1 µvar.

För att optimera reaktionsvillkoren får laboratorierna vid behov anpassa de metoder som beskrivs i denna bilaga till utrustningen och villkoren i laboratoriet, förutsatt att det kan visas att känsligheten och specificiteten är lika god.

2. *Definition*

OsHV-1 µvar definieras i artikel 1 i denna förordning.

3. *Utrustning och miljöförhållanden*

Det diagnostiska test som används för påvisande av OsHV-1 µvar och PCR-identifiering kräver utrustning och miljöförhållanden som traditionellt används för PCR-analys enligt följande:

— Ett dragskåp som är utrustat med steriliserande UV-belysning för att eliminera eventuell förorening när PCR-blandningen bereds.

— Två kompletta uppsättningar pipetter (2 µl, 20 µl, 200 µl och 1 000 µl), en för DNA-extraktion och en för beredning av PCR-blandningen.

— Tre olika pipetter: en pipett (2 µl) för att fördela prover i PCR-blandningen, en pipett (20 µl) för prover med etidiumbromid (EtBr) och en pipett (20 µl) för att applicera PCR-produkter i agarosgelen.

— Pipettspetsar med filter (2 µl, 20 µl, 200 µl och 1 000 µl) för DNA-extraktion, beredning av PCR-blandning och fördelning av prover.

— Pipettspetsar (20 µl) för EtBr-prover och för applicering av amplifieringsprodukter i agarosgelen.

— Termocykler för amplifiering.

— Horisontellt elektroforessystem för elektrofores av PCR-produkter.

— UV-bord för observation av PCR-produkter efter elektrofores i agarosgel.

— System för att avbilda gelerna.

▼B

Utföraren måste använda skyddsrock och handskar vid alla de olika stegen som beskrivs nedan. Skyddsrock och handskar ska helst bytas efter varje huvudsteg: DNA-extraktion, beredning av PCR-blandning, fördelning av prover, amplifiering och applicering i gel.

Det rekommenderas att dessa olika steg utförs i olika rum. Särskilt amplifiering och applicering i gel/elektrofores bör utföras i separata rum från DNA-extraktion, beredning av PCR-blandning och fördelning av DNA.

4. *Utförande*

4.1 Beredning av prover

Levande eller nydöda (ej sönderfallande/ruttna) ostron, som tidigare kan ha varit frusna, bereds för DNA-extraktion.

Proverna bereds olika beroende på deras storlek:

a) För larver: pooler om 50 mg hela djur (inklusive skal) tillsätts 200 µl destillerat vatten, krossas och centrifugeras vid 1 000 g i 1 minut.

b) För yngel mindre än eller lika med 6 mm: pooler om 300 mg hela djur (inklusive skal) tillsätts 1 200 µl destillerat vatten, krossas och centrifugeras vid 1 000 g i 1 minut.

c) För yngel 6–15 mm: all den mjuka vävnaden från varje djur krossas individuellt.

d) För djur större än 15 mm: delar av gälar och mantel isoleras.

DNA-extraktionen utförs med QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) och enligt instruktionerna för Tissue Test Protocol.

Den fortsatta provberedningen utförs i följande ordning:

1. Placera 100 µl supernatant från proverna i a och b eller 10–50 mg vävnad från proverna i c och d i ett 1,5 ml mikrocentrifugrör och tillsätt 180 µl Buffer ATL.

2. Tillsätt 20 µl Proteinase K, blanda genom att vortexa och inkubera vid 56 °C tills vävnaden är helt lyserad (över natten). Vortexa emellanåt under inkuberingen för att dispergera provet. Centrifugera kort 1,5 ml mikrocentrifugröret för att avlägsna droppar från locket.

3. Tillsätt 200 µl Buffer AL till provet, vortexa stötvis i 15 sekunder och inkubera vid 70 °C i 10 minuter. Centrifugera kort 1,5 ml mikrocentrifugröret för att avlägsna droppar från locket.

4. Tillsätt 200 µl etanol (96–100 %) till provet och vortexa stötvis i 15 sekunder. Centrifugera kort 1,5 ml mikrocentrifugröret för att avlägsna droppar från locket.

5. Applicera noggrant blandningen från steg 4 till QIAamp Spin Column (i ett 2 ml uppsamlingsrör) utan att blöta ner kanten. Stäng locket och centrifugera vid 10 000 rpm i 1 minut. Placera QIAamp Spin Column i ett rent 2 ml uppsamlingsrör (finns i kitet) och släng röret med filtratet.

▼B

6. Öppna försiktigt QIAamp Spin Column och tillsätt 500 µl Buffer AW1 utan att blöta ner kanten. Stäng locket och centrifugera vid 10 000 rpm i 1 minut. Placera QIAamp Spin Column i ett rent 2 ml uppsamlingsrör (finns i kitet) och släng röret med filtratet.

7. Öppna försiktigt QIAamp Spin Column och tillsätt 500 µl Buffer AW2 utan att blöta ner kanten. Stäng locket och centrifugera på högsta hastighet (14 000 rpm) i 3 minuter.

8. (Valfritt) Placera QIAamp Spin Column i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör (finns inte i kitet) och släng röret med filtratet. Centrifugera på högsta hastighet (14 000 rpm) i 1 minut.

9. Placera QIAamp Spin Column i ett rent 1,5 ml mikrocentrifugrör (finns inte i kitet) och släng uppsamlingsröret med filtratet. Öppna försiktigt QIAamp Spin Column och tillsätt 100 µl destillerat vatten. Inkubera i 5 minuter vid rumstemperatur och centrifugera vid 10 000 rpm i 1 minut.

10. Kontrollera kvaliteten och effektiviteten av extraktionen (till exempel genom att mäta OD [260 nm] med spektrofotometer eller genom elektrofores i agarosgel).

11. Späd ut dina prov så att du har en slutlig DNA-koncentration på 50–100 ng/µl.

12. DNA-lösningar förvaras vid 4 °C tills PCR-analyserna utförts.

Andra kommersiella kit kan användas för DNA-extraktionen förutsatt att de har visat sig ge liknande resultat.

4.2 *Polymeraskedjereaktion (PCR)*

4.2.1 Reagenter

— 10 X Buffer (levereras med Taq DNA polymeras)

— $MgCl_2$ (levereras med DNA polymeras) (25 mM)

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

— dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) måste spädas 10 gånger (till 2 mM) före användning

— dH_2O (destillerat H_2O fritt från DNA och RNA)

4.2.2 Primrar

Följande primrar ([1]) måste användas:

CF (10 µM)

CR (10 µM)

([1]) Dessa primrar eller en beskrivning av dem kan fås från gemenskapens referenslaboratorium för sjukdomar hos musslor (LGP-Ifremer, Av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Frankrike).

▼B

4.2.3 PCR-blandning

PCR-blandningen för varje rör innehåller:

	Volym per rör	Slutlig koncentration
Buffer (10 X)	5 µl	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	5 µl	2,5 mM
dNTP (2 mM)	5 µl	0,2 mM
CF (10 µM)	1 µl	0,2 µM
CR (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Taq polymeras (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U
dH_2O	31,5 µl	

— 49 µl av denna PCR-blandning fördelas i varje PCR-rör.

— 1 µl extraherat DNA (50–100 ng/µl) tillsätts varje rör.

4.2.4 Kontroller

Två typer av kontroller används:

— Negativa kontroller består av dH_2O (1 µl till 49 µl PCR-blandning). Deras uppgift är att detektera potentiella reaktiva föroreningar från omgivningen. En negativ kontroll bör inkluderas för vart 10:e prov eller efter varje batch av prover.

— Positiva kontroller består av plasmid DNA innehållande den genomiska målregionen, CF-CR, för OsHV-1. Deras uppgift är att kontrollera effektiviteten hos PCR-reaktionen. En positiv kontroll bör inkluderas för varje PCR-analys. Positiva kontroller finns att tillgå från gemenskapens referenslaboratorium.

4.2.5 Amplifiering

Amplifieringscyklerna utförs i en termocyklerapparat.

— Initial denaturering: 2 minuter vid 94 °C.

— Amplifiering: 35 cykler (1 minut vid 94 °C, 1 minut vid 50 °C och 1 minut vid 72 °C).

— Slutlig elongering: 5 minuter vid 72 °C.

4.3 *Elektrofores*

4.3.1 Reagenter

— 50 X TAE (kan köpas klar att använda):

Tris-bas (40 mM) 242 g

Isättiksyra (40 mM) 57,1 ml

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

dH_2O för 1 liter

Justera pH till 8.

▼B

— Agarosgel 2,5 % i 1X TAE

Etidiumbromid (0,5 μg/ml) tillsätts efter kylning av gelen.

— Blå laddningsbuffert:

Bromfenolblått 0,25 %

Xylencyanol FF 0,25 %

Sackaros 40 %

Förvaras vid 4 °C.

Används efter 6 gångers utspädning (2 μl laddningsbuffert till 10 μl PCR-produkt).

— Molekylviktsmarkör:

SmartLadder SF (Eurogentec): en molekylviktsmarkör som är klar att använda och inkluderar nio jämt utspridda band från 100 till 1 000 bp.

4.3.2 Beredning av agarosgel

1. Väg upp 2,5 g agaros, tillsätt 100 ml 1X TAE och värm tills blandningen har smält.

2. Efter det att lösningen har svalnat tillsätts etidiumbromid (5 μl till 100 ml agarosgel) och blandningen gjuts i en särskild form utrustad med kammar (för att forma brunnar).

3. När gelen har polymeriserat, ta bort kammarna och placera gelen i ett horisontellt elektroforeskärl innehållande tillräckligt med 1X TAE för att täcka agarosgelen.

4. 10 μl PCR-produkt blandas med 2 μl laddningsbuffert (6X) och appliceras i brunnarna.

5. En brunn ska användas för molekylviktsmarkören (5 μl).

6. Sätt spänningen på 50–150 volt och låt elektroforesen gå mellan 30 minuter och 1 timme beroende på gelstorlek och tjocklek.

7. Gelen observeras under UV-ljus.

4.4 *Tolkning*

Närvaron av OsHV-1 μvar i ett prov indikeras av närvaron av ett band av rätt storlek (157 bp istället för 173 bp för OsHV-1) i en 2,5 % agarosgel där alla negativa kontroller är negativa och alla positiva kontroller positiva.

DEL C

Fastställande av kontrollområde

Hänsyn ska tas till följande faktorer som påverkar risken för att sjukdomen sprids vid fastställandet av kontrollområdet enligt artikel 2.2:

a) Antal, andel och fördelning av blötdjur på den smittade anläggningen eller i det smittade området för blötdjursodling.

b) Avstånd till närliggande anläggningar och områden för blötdjursodling och deras täthet.

c) Närhet till bearbetningsanläggningar, kontaktanläggningar eller kontaktområden för blötdjursodling.

d) Arter på anläggningarna eller i områdena för blötdjursodling.

▼B

e) Odlingsmetoder på den drabbade anläggningen och intilliggande anläggningar eller i det drabbade området för blötdjursodling och intilliggande områden.

f) Hydrodynamiska förhållanden och andra faktorer av epizootiologisk betydelse som identifierats.

▼B

BILAGA II

Förlaga till djurhälsointyg för utsläppande på marknaden av *Crassostrea gigas* som är avsedda för odling och återutläggningsområden

EUROPEISKA UNIONEN — **Djurhälsointyg för handel inom gemenskapen**

Del I: Uppgifter om sändinger

I.1 Avsändare Name Adress Postnr	I.2 Intygets referensnummer — I.2.a Lokalt referensnummer I.3 Central behörig myndighet I.4 Lokal behörig myndighet
I.5 Mottagare Namn Address Postnr	I.6 I.7
I.8 Ursprungsland — ISO-kod — I.9	I.10 Bestämmelseland — ISO-kod — I.11
I.12 Ursprungsort/fiskeplats Godkänd vattenbruksanläggning ☐ Övriga ☐ Namn — Godkännande nr Adress Postnr	I.13 Bestämmelseort Godkänd vattenbruksanläggning ☐ Övriga ☐ Namn — Godkännande nr Address Postnr
I.14 Lastningsort Postnr	I.15 Datum och klockslag för avresa
I.16 Transportmedel Flyg ☐ Fartyg ☐ Järnvägsvagn ☐ Vägtransport ☐ Övriga ☐ Identifikation:	I.17 Transportör Namn — Godkännande nr Adress Postnr — Medlemsstat
I.18 Djurart/produkt	I.19 Varukod (KN) **03.07** I.20 Antal/Kvantitet
I.21	I.22 Antal förpackningar
I.23 Containernummer/förseglingens nummer	I.24 Typ av förpackning
I.25 Djur/produkter som intygas vara avsedda för Avel ☐ Återutläggning ☐	
I.26 Transitering genom tredjeland ☐ Tredjeland — ISO-kod Utförselställe — Kod Införselställe — Gränskontrollstationens nr	I.27 Transitering genom medlemsstaterna ☐ Medlemsstat — ISO-kod Medlemsstat — ISO-kod Medlemsstat — ISO-kod
I.28 Export ☐ Tredjeland — ISO-kod Utförselställe — Kod	I.29
I.30	
I.31 Identifiering av djur Arter (Vetenskapligt namn) — Antal	

▼B

EUROPEISKA UNIONEN

Utsläppande på marknaden av *Crassostrea gigas* som är avsedda för odling och återutläggningsområden

Del II: Intyg

II. **Hälsoinformation**	II.a Intyg nr	II.b

(1)(2)[II.1 **Krav för *Crassostrea gigas* som härrör från ett kontrollområde som upprättats i enlighet med artikel 2 i förordning (EU) nr 175/2010**

I egenskap av officiell inspektör intygar jag att de *Crassostrea gigas* som avses i del I i detta intyg

II.1.1 härrör från ett område som är föremål för bekämpningsåtgärder avseende ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* i samband med OsHV-1 µvar,

(1)[II.1.2 får släppas ut på marknaden enligt artikel 3.2 a i förordning (EU) nr 175/2010.]

(1)[II.1.2 härrör från en del av kontrollområdet som inte drabbats av ökad dödlighet och sändningen av *Crassostrea gigas* har provtagits och testats i enlighet med förordning (EU) nr 175/2010 med negativt resultat.]]

(1)(3)[II.2 **Krav för *Crassostrea gigas* som härrör från en medlemsstat eller ett kontrollområde som tidigare har omfattats av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning på grund av ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas* i samband med OsHV-1 µvar och som är avsedda för medlemsstater eller delområden som inrättat ett program för att på tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar**

I egenskap av officiell inspektör intygar jag att de *Crassostrea gigas* som avses i del I i detta intyg

II.2.1 kommer från en anläggning eller ett område för blötdjursodling där det enligt uppgifter från anläggningen eller området inte finns några indikationer på ökad dödlighet,

II.2.2 härrör från ett delområde där det genom provtagning och testning enligt bilaga I till förordning (EU) nr 175/2010 har påvisats att OsHV-1 µvar inte förekommer hos *Crassostrea gigas*.]

II.3 **Transport- och märkningskrav**

I egenskap av officiell inspektör intygar jag följande:

II.3.1 De *Crassostrea gigas* som avses i del I i detta intyg har transporterats under förhållanden, bland annat vad gäller vattenkvalitet, som inte påverkar deras hälsostatus.

II.3.2 Transportbehållaren hade rengjorts och desinficerats före lastning eller var oanvänd.

II.3.3 Sändningen har identifierats genom en läslig etikett på utsidan av behållaren, eller vid transport med brunnbåt i fartygsmanifestet, med de relevanta uppgifterna i fälten I.8–I.13 i del I i detta intyg och följande text:

antingen (1)["Japanska jätteostron (*Crassostrea gigas*) avsedda för odling/återutläggning i ett område som omfattas av ett program för att på tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar"]

eller (1)["Japanska jätteostron (*Crassostrea gigas*) som är avsedda för odling/återutläggning i ett område som är föremål för sjukdomsbekämpningsåtgärder och som härrör från ett område som är föremål för sjukdomsbekämpningsåtgärder"].

Anmärkningar

Del I:

— Fält I.12: I tillämpliga fall anges godkännandenummer för anläggningen eller området för blötdjursodling.

— Fält I.13: I tillämpliga fall anges godkännandenummer för anläggningen eller området för blötdjursodling.

— Fälten I.20 och I.31: Kvantiteten anges som totalt antal.

— Fält I.25: Kryssa i "Avel" om djuren är avsedda för odling, "Återutläggning" om de är avsedda för återutläggning.

▼B

EUROPEISKA UNIONEN

Utsläppande på marknaden av *Crassostrea gigas* som är avsedda för odling och återutläggningsområden

II. **Hälsoinformation**	II.a Intyg nr	II.b

Del II:

([1]) Stryk det som inte är tillämpligt.

([2]) Del II.1 i detta intyg gäller sändningar av *Crassostrea gigas* som härrör från ett kontrollområde som upprättats i enlighet med artikel 2.2 i förordning (EU) nr 175/2010 och som enligt artikel 3.2 a eller b i den förordningen får lämna området.

([3]) Del II.2 i detta intyg gäller de sändningar av *Crassostrea gigas* som avses i artikel 5.1 i förordning (EU) nr 175/2010 och som är avsedda för medlemsstater eller delområden som omfattas av ett program för att på tidigt stadium kunna påvisa OsHV-1 µvar och härrör från ett område som tidigare har omfattats av åtgärder för att motverka sjukdomsspridning på grund av ökad dödlighet hos *Crassostrea gigas*.

Officiell veterinär eller inspektör

Namn (med versaler):	Titel och befattning:
Lokal veterinärenhet:	Lokal veterinärenhets nr:
Datum:	Underskrift:
Stämpel:	