

KOMMISJONSFORORDNING (EU) nr. 175/2010

2015/EØS/76/54

av 2. mars 2010

om gjennomføring av rådsdirektiv 2006/88/EF med hensyn til tiltak for å bekjempe økt dødelighet hos østers av arten *Crassostrea gigas* i forbindelse med påvisning av østersherpesvirus 1 µvar (OsHV-1 µvar)(*)

EUROPAKOMMISJONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den europeiske unions virkemåte,

under henvisning til rådsdirektiv 2006/88/EF av 24. oktober 2006 om krav til dyrehelse for akvakulturdyr og produkter av disse, og om forebygging og bekjempelse av visse sykdommer hos vanndyr⁽¹⁾, særlig artikkel 41 nr. 3 og artikkel 61 nr. 3, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) Direktiv 2006/88/EF fastsetter de kravene til dyrehelse som gjelder omsetning av akvakulturdyr og produkter av disse. Direktivet fastsetter i tillegg minimumstiltak for forebygging av sykdom, som skal anvendes ved mistanke om eller utbrudd av visse sykdommer hos akvakulturdyr.
- 2) Artikkel 41 i nevnte direktiv fastsetter at medlemsstatene skal treffe egnede tiltak for å bekjempe utbrudd av en ny sykdom og hindre denne sykdommen i å spre seg. Dersom en ny sykdom bryter ut, skal den berørte medlemsstaten omgående underrette Kommisjonen, medlemsstatene og EFTA-medlemsstatene dersom funnene har epidemiologisk betydning for en annen medlemsstat.
- 3) Sent på våren og sommeren 2008 ble det påvist økt dødelighet hos østers av arten *Crassostrea gigas* (*Crassostrea gigas*-østers) i flere områder i Frankrike og i Irland. Dette ble tilskrevet en kombinasjon av negative miljøfaktorer samt forekomsten av bakterier av slekten *Vibrio* og forekomsten av østersherpesvirus-1 (OsHV-1), herunder OsHV-1 µvar, som er en nylig beskrevet genotype av dette viruset.

- 4) De franske myndighetene underrettet i august 2008 Kommisjonen, medlemsstatene og EFTA-medlemsstatene om situasjonen og om tiltakene som ble truffet, og Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen ble underrettet om saken i september 2008.
- 5) Våren 2009 ble økt dødelighet tilskrevet samme kombinasjon av faktorer, igjen påvist i Frankrike, Irland og på Kanaløyene. Selv om årsakene til dødeligheten fortsatt er usikker, tyder de epidemiologiske undersøkelsene som ble foretatt i Irland og Det forente kongerike i 2009 på at OsHV-1 µvar spiller en viktig rolle.
- 6) Vedkommende myndigheter i disse medlemsstatene og på Kanaløyene har underrettet Kommisjonen om situasjonen og om de tiltakene som er truffet, og Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen er flere ganger underrettet om saken.
- 7) De inneslutningstiltakene som vedkommende myndigheter i disse medlemsstatene og på Kanaløyene traff for å bekjempe utbrudd av den nye sykdommen, gikk først og fremst ut på å begrense forflytning av *Crassostrea gigas*-østers ut av de områdene som var berørt av økt dødelighet.
- 8) På bakgrunn av at den nye sykdommen forekom på nytt i 2009, og at dette kan gjenta seg med risiko for ytterligere spredning våren og sommeren 2010, samt på grunnlag av de erfaringene som er høstet, er det hensiktsmessig og nødvendig å utvide de tiltakene som de berørte medlemsstatene allerede har truffet.
- 9) For å sikre like vilkår for gjennomføringen av kravene i direktiv 2006/88/EF om nye sykdommer, og for å sikre at de tiltakene som er truffet, gir tilstrekkelig vern mot ytterligere spredning, samtidig som de ikke legger unødvendige begrensninger på forflytning av *Crassostrea gigas*-østers, er det nødvendig å samordne tiltakene med hensyn til disse utbruddene av denne nye sykdommen på EU-plan.

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EUT L 52 av 3.3.2010, s. 1, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 61/2011 av 1. juli 2011 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), se EØS-tillegget til *Den europeiske unions tidende* nr. 54 av 6.10.2011, s. 13.

(¹) EUT L 328 av 24.11.2006, s. 14.

- 10) Når vedkommende myndigheter blir underrettet om at det er påvist økt dødelighet hos *Crassostrea gigas*-østers, bør det foretas prøvetaking og prøving for å påvise eller utelukke forekomst av OsHV-1 µvar.
- 11) Når det er bekreftet forekomst av virusgenotype OsHV-1 µvar, bør medlemsstatene iverksette tiltak for sykdomsbekjempelse, herunder å opprette et kontrollområde. Ved avgrensning av kontrollområdet bør det tas hensyn til visse faktorer angitt i denne forordning. Disse tiltakene for sykdomsbekjempelse bør vare inntil det ved inspeksjoner er påvist at den økte dødeligheten har opphørt.
- 12) Det bør fastsettes begrensninger på forflytning av *Crassostrea gigas*-østers ut av kontrollområdene for å begrense risikoen for spredning av sykdommen. Det bør imidlertid fastsettes visse unntak for de tilfellene der risikoen for spredning av sykdommen er redusert. Disse unntakene berører forflytning av visse *Crassostrea gigas*-østers som er beregnet på oppdretts- eller gjenutleggingsområder i et annet kontrollområde, eller som er beregnet på konsum. For å sikre sporbarhet for forsendelser av *Crassostrea gigas*-østers som er beregnet på oppdretts- eller gjenutleggingsområder, bør de ledsages av et helsesertifikat. Ved utfylling av sertifikatet skal det tas hensyn til de forklarende merknadene i vedlegg V til kommisjonsforordning (EF) nr. 1251/2008 av 12. desember 2008 om gjennomføring av rådsdirektiv 2006/88/EF med hensyn til vilkår og krav til utstedelse av sertifikater for akvakulturdyr og produkter av disse som bringes i omsetning og importeres til Fellesskapet, og om utarbeiding av en liste over smittebærende arter⁽¹⁾.
- 13) Med det som mål å innhente ytterligere kunnskap om statusen for denne nye sykdommen i Unionen, særlig i de medlemsstatene og segmentene som ennå ikke er berørt, og for å sikre tidlig påvisning av forekomst av OsHV-1 µvar, kan enkelte medlemsstater ønske å opprette programmer med målrettet prøvetaking og prøving for tidlig påvisning av OsHV-1 µvar. *Crassostrea gigas*-østers med opprinnelse i områder som har vært underlagt inneslutningstiltak i 2009 i samsvar med nasjonale tiltak, eller i 2010 i samsvar med denne forordning, bør omfattes av ytterligere krav til dyrehelse dersom de innføres med sikte på oppdrett eller gjenutlegging i medlemsstater eller segmenter som er omfattet av et slikt program, så lenge OsHV-1 µvar ikke er påvist i den aktuelle medlemsstaten eller det aktuelle segmentet.
- 14) For å sikre at data som er samlet inn i forskjellige medlemsstater i forbindelse med programmer for målrettet prøvetaking og prøving for tidlig påvisning av OsHV-1 µvar, er sammenlignbare, bør det fastsettes visse krav om hva slike programmer skal inneholde.
- 15) For å kunne bekjempe utbrudd av den nye sykdommen effektivt er det viktig at det foreligger nøyaktige og rettidige opplysninger om situasjonen med hensyn til påvisning av OsHV-1 µvar i medlemsstatene. For dette formål bør medlemsstatene umiddelbart underrette Kommisjonen og de andre medlemsstatene om den første bekreftede forekomsten av OsHV-1 µvar-viruset på sine territorier i 2010.
- 16) I tillegg bør det dras fordel av de Internett-baserte informasjonssidene som er utarbeidet i samsvar med artikkel 10 i kommisjonsvedtak 2009/177/EF av 31. oktober 2008 om gjennomføring av rådsdirektiv 2006/88/EF med hensyn til programmer for overvåking og utryddelse samt sykdomsfri status for medlemsstater, soner og segmenter⁽²⁾.
- 17) For å sikre innsyn i og rettidig tilgang til relevante opplysninger om utbrudd av den nye sykdommen bør medlemsstatene gi Europakommisjonen og de andre medlemsstatene tilgang til opplysninger om kontrollområdene, områder som tidligere har vært omfattet av inneslutningstiltak, men der det er påvist at OsHV-1 µvar ikke forekommer, og programmer som er innført med sikte på tidlig påvisning av OsHV-1 µvar.
- 18) Siden det fortsatt er stor usikkerhet med hensyn til utbrudd av den nye sykdommen, bør tiltakene fastsatt i denne forordning få anvendelse fram til utgangen av desember 2010.
- 19) Tiltakene fastsatt i denne forordning er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen —

VEDTATT DENNE FORORDNING:

Artikkel 1

Definisjon

I denne forordning menes med OsHV-1 µvar en genotype av viruset østersherpesvirus-1 (OsHV-1), som defineres på grunnlag av delsekvensdata som viser en systematisk sletting av tolv basepar i ORF 4 i genomet sammenlignet med OsHV-1 (GenBank # AY509253).

Artikkel 2

Prøvetaking, prøving og opprettelse av kontrollområder

1. Når det påvises økt dødelighet hos østers av arten *Crassostrea gigas* (*Crassostrea gigas*-østers), skal vedkommende myndighet
 - a) ta prøver i samsvar med del A i vedlegg I,
 - b) gjennomføre prøving for forekomst av OsHV-1 µvar i samsvar med den diagnostiske metoden angitt i del B i vedlegg I.

⁽¹⁾ EUT L 337 av 16.12.2008, s. 41.

⁽²⁾ EUT L 63 av 7.3.2009, s. 15.

2. Dersom resultatene av prøvingene nevnt i nr. 1 bokstav b) påviser forekomst av OsHV-1 μ var, skal vedkommende myndighet opprette et kontrollområde. Dette området skal avgrensnes på grunnlag av en analyse av hvert enkelt tilfelle, idet det tas hensyn til de faktorene som påvirker risikoen for spredning av sykdommen angitt i del C i vedlegg I.

3. Medlemsstatene skal umiddelbart underrette Kommisjonen og de andre medlemsstatene om det første kontrollområdet som opprettes på deres territorium i 2010.

Artikkel 3

Krav med hensyn til omsetning av *Crassostrea gigas*-østers med opprinnelse i et kontrollområde nevnt i artikkel 2

1. *Crassostrea gigas*-østers med opprinnelse i et kontrollområde opprettet i samsvar med artikkel 2 nr. 2, skal ikke flyttes ut av dette området.

2. Som unntak fra nr. 1 kan forsendelser av *Crassostrea gigas*-østers flyttes ut av kontrollområdet dersom

a) de er beregnet på et annet kontrollområde opprettet i samsvar med artikkel 2 nr. 2,

b) de har sin opprinnelse i en del av kontrollområdet, herunder klekkerier, som ikke er berørt av den økte dødeligheten, og forsendelsen har gjennomgått

i) prøvetaking i samsvar med del A i vedlegg I, og

ii) prøving for forekomst av OsHV-1 μ var i samsvar med den diagnostiske metoden angitt i del B i vedlegg I, med negativt resultat,

c) de er beregnet på videreforedling, resensentraler, ekspedisjonssentraler eller foredlingsvirksomheter for konsum som er utstyrt med et system for rensing av avløpsvann som er godkjent av vedkommende myndighet, og der

i) kappevirus inaktiveres, eller

ii) risikoen for å overføre sykdommer til de naturlige vannmassene reduseres til et akseptabelt nivå,

d) de er beregnet på konsum og emballert og merket for dette formål i samsvar med europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 853/2004⁽¹⁾, og

i) ikke lenger vil kunne overleve dersom de gjenutsettes i det miljøet de har sin opprinnelse i, eller

ii) er beregnet på videreforedling uten midlertidig lagring på foredlingsstedet,

e) forsendelsene eller produkter av disse er beregnet på konsum uten videreforedling, forutsatt at de er emballert

i salgsemballasje som oppfyller bestemmelsene om slik emballasje i forordning (EF) nr. 853/2004.

3. Forsendelsene nevnt i nr. 2 bokstav a) og b) som er beregnet på oppdretts- eller gjenutleggingsområder, skal ledsages av et helsesertifikat som er utfyllt i samsvar med modellen angitt i vedlegg II til denne forordning, og de forklarende merknadene angitt i vedlegg V til forordning (EF) nr. 1251/2008.

Artikkel 4

Oppheving av tiltak fastsatt i artikkel 2 og 3

Vedkommende myndighet kan oppheve bekjempelsestiltakene for kontrollområdene opprettet i samsvar med artikkel 2 nr. 2 og begrensningene med hensyn til omsetning som er fastsatt i artikkel 3, etter at den har utført to sammenhengende inspeksjoner med 15 dagers mellomrom, som viser at den økte dødeligheten har opphørt.

Artikkel 5

Krav med hensyn til omsetning av *Crassostrea gigas*-østers med opprinnelse i et segment som tidligere har vært omfattet av bekjempelsestiltak på grunn av økt dødelighet hos *Crassostrea gigas*-østers i forbindelse med OsHV-1 μ var

1. *Crassostrea gigas*-østers som bringes i omsetning og har opprinnelse i et segment som har vært omfattet av inneslutningstiltak enten i 2009 eller 2010 på grunn av økt dødelighet hos *Crassostrea gigas*-østers i forbindelse med OsHV-1 μ var, skal

a) ledsages av et helsesertifikat utfyllt i samsvar med modellen i vedlegg II til denne forordning og de forklarende merknadene i vedlegg V til forordning (EF) nr. 1251/2008 dersom dyrene

i) er beregnet på medlemsstater eller segmenter som har opprettet et program for tidlig påvisning av OsHV-1 μ var, og der OsHV-1 μ var ikke er påvist, og

ii) er beregnet på oppdretts- eller gjenutleggingsområder,

b) ha opprinnelse i et segment der det ved prøvetaking og prøving utført i samsvar med del A i vedlegg I, er dokumentert at OsHV-1 μ var ikke forekommer, og

c) oppfylle kravene til dyrehelse fastsatt i modellen for sertifikatet nevnt i bokstav a).

2. Et program for tidlig påvisning av OsHV-1 μ var nevnt i nr. 1 bokstav a) i) skal oppfylle følgende krav:

a) Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen skal forelegges en erklæring om programmet.

⁽¹⁾ EUT L 139 av 30.4.2004, s. 55.

- b) En slik erklæring skal være i samsvar med nr. 1, nr. 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 og 5.9, samt nr. 6 og 7 i skjemamodellen angitt i vedlegg II til vedtak 2009/177/EF.
- c) Programmet skal omfatte
- i) prøvetaking i samsvar med del A i vedlegg I,
 - ii) prøving for forekomst av OsHV-1 µvar i samsvar med den diagnostiske metoden angitt i del B i vedlegg I.
3. Nr. 1 får anvendelse fra og med én uke fra datoen da Den faste komité for næringsmiddelkjeden og dyrehelsen avholdt møtet der programmet nevnt i nr. 1 bokstav a) i) ble erklært.

Artikkel 6

Internett-basert informasjonsside

1. Medlemsstatene skal gjøre tilgjengelig for Kommisjonen og de andre medlemsstatene
- a) en liste over kontrollområder og de faktorene som er tatt i betraktning for å avgrense slike områder, herunder en beskrivelse av de geografiske grensene for det relevante området, opprettet i samsvar med artikkel 2 nr. 2,
 - b) en liste over segmenter, herunder en beskrivelse av de geografiske grensene for det relevante området
 - i) som har vært omfattet av inneslutningstiltak i 2009 på grunn av økt dødelighet hos *Crassostrea gigas*-østers i forbindelse med OsHV-1 µvar,

- ii) der det ved prøving utført i samsvar med del A og B i vedlegg I, er dokumentert at det ikke forekommer OsHV-1 µvar i prøver tatt i kontrollområdet,
- c) erklæringer vedrørende programmer nevnt i artikkel 5 nr. 2, herunder en beskrivelse av de geografiske grensene for det relevante området.
2. Opplysningene fastsatt i nr. 1 skal ajourføres og gjøres tilgjengelig gjennom de Internett-baserte informasjonssidene som er opprettet i samsvar med artikkel 10 i vedtak 2009/177/EF.

Artikkel 7

Rapportering

Medlemsstatene skal innen 1. oktober 2010 framlegge for Kommisjonen en rapport om programmer som er erklært i samsvar med artikkel 5 nr. 2.

Rapporten skal være utformet i samsvar med skjemamodellen fastsatt i vedlegg VI til vedtak 2009/177/EF.

Artikkel 8

Ikrafttredelse og anvendelse

Denne forordning trer i kraft den tredje dag etter at den er kunngjort i *Den europeiske unions tidende*.

Den får anvendelse fra 15. mars 2010 til 31. desember 2010.

Denne forordning er bindende i alle deler og kommer direkte til anvendelse i alle medlemsstater.

Utferdiget i Brussel, 2. mars 2010.

For Kommisjonen

José Manuel BARROSO

President

VEDLEGG I

DEL A

Prøvetaking1. *Prøvetaking med hensyn til artikkel 2*

Prøver som er fastsatt i artikkel 2, skal bestå av minst tolv individer av *Crassostrea gigas*-østers. Til prøvene velges svake dyr, dyr med åpne skall eller nylig døde dyr (som ikke er gått i oppløsning), og de skal samles inn fra det segmentet der det er konstatert dødelighet.

2. *Prøvetaking med hensyn til artikkel 3 nr. 2 bokstav b), artikkel 5 nr. 1 bokstav b) og artikkel 5 nr. 2*

a) Prøvetaking med hensyn til artikkel 3 nr. 2 bokstav b) skal omfatte

- i) når det gjelder larver, fem samleprøver på minst 50 mg hele dyr med skall samlet inn mellom fire og åtte dager etter befruktning per forsendelse,
- ii) når det gjelder larver som er mindre enn 6 mm, 30 samleprøver på 300 mg hele dyr med skall per forsendelse,
- iii) når det gjelder østers som er større enn 6 mm, 150 individer per forsendelse.

Når disse dyrene velges, skal alle deler av forsendelsen være proporsjonalt representert i prøven. Dersom det forekommer svake dyr, dyr med åpne skall eller nylig døde dyr (som ikke er gått i oppløsning), skal i første rekke disse velges ut.

b) Prøvetaking med hensyn til artikkel 5 nr. 2 skal bestå av minst 150 individer av *Crassostrea gigas* per prøvetakingspunkt. Det skal tas prøver fra alle akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr i den medlemsstaten eller det segmentet som er omfattet av programmet.

Prøvetaking med hensyn til artikkel 5 nr. 1 bokstav b) skal bestå av minst 150 individer av *Crassostrea gigas*-østers per segment.

Når disse dyrene velges ut, skal det tas hensyn til følgende kriterier:

- Dersom det forekommer svake dyr, dyr med åpne skall eller nylig døde dyr (som ikke er gått i oppløsning), skal i første rekke disse velges ut. Dersom det ikke forekommer slike dyr, skal de valgte dyrene inneholde friske bløtdyr som er under 12 måneder gamle.
- Ved prøvetaking i akvakulturanlegg der det benyttes mer enn én vannkilde i produksjonen, skal dyr som representerer alle vannkildene være med i prøvetakingen på en slik måte at alle deler av akvakulturanlegget er proporsjonalt representert i prøven.
- Ved prøvetaking i akvakulturområder for bløtdyr skal dyr fra et tilstrekkelig antall prøvetakingspunkter, det vil si minst tre, være med i prøven på en slik måte at alle deler av akvakulturområdet for bløtdyr er proporsjonalt representert i prøven, herunder områder med naturlig forekomst i akvakulturområdet for bløtdyr. De viktigste faktorene å ta hensyn til ved utvelging av disse prøvetakingspunktene er tidligere påvisning av OsHV-1 μ var i området, dyretetthet, vannstrømmer, batymetri og driftsrutiner.

c) Prøvetakingen fastsatt i artikkel 5 nr. 2 skal utføres på den tiden av året da forekomsten av OsHV-1 μ var i medlemsstaten eller segmentet er kjent for å være på det høyeste. Når slike data ikke er tilgjengelig, skal prøvetaking utføres rett etter det tidspunktet da vanntemperaturen overstiger 16 °C, eller på den tiden av året da vanntemperaturen normalt er høyest.d) Prøvetakingen fastsatt i artikkel 5 nr. 1 bokstav b) skal helst utføres på den tiden av året som er beskrevet i bokstav c). Dersom prøvene samles inn utenom denne tiden av året, skal de innsamlede østersene holdes under forhold som tilsvarer dem som er beskrevet i bokstav c), i et tidsrom som egner seg for påvisning av OsHV-1 μ var, før prøving foretas.

DEL B

Diagnostiske metoder for påvisning av OsHV-1 μvar1. *Virkeområde*

Denne framgangsmåten beskriver en standard diagnostisk metode som skal brukes til påvisning av OsHV-1 μvar og identifisering ved polymerasekjedereaksjon (heretter kalt PCR). Den gjør det mulig å skille mellom OsHV-1 og OsHV-1 μvar.

Laboratoriene kan for å optimalisere reaksjonsvilkårene og ta hensyn til utstyret og vilkårene i det aktuelle laboratoriet, eventuelt endre de metodene som er beskrevet i dette vedlegg, forutsatt at samme følsomhet og spesifisitet kan påvises.

2. *Definisjon*

OsHV-1 μvar er definert i artikkel 1 i denne forordning.

3. *Utstyr og miljøforhold*

Den diagnostiske prøvingen som brukes til påvisning av OsHV-1 μvar og identifisering ved PCR, krever samme utstyr og miljøforhold som tradisjonelt benyttes til PCR-analyser, det vil si

- et lukket avtrekksskap utstyrt med en innretning som sender ut UV-stråler for å fjerne eventuelle forurensninger ved tilberedning av PCR-blanding,
- to komplette sett med pipetter (2 μl, 20 μl, 200 μl og 1 000 μl); det første for DNA-ekstraksjon, det andre for tilberedning av PCR-blanding,
- tre forskjellige pipetter: én pipette (2 μl) til å overføre prøver til PCR-blanding, én pipette (20 μl) til EB-prøvetaking og én pipette (20 μl) til å anbringe PCR-produkter i agarosegel,
- pipettespisser med filter (2 μl, 20 μl, 200 μl og 1 000 μl) for DNA-ekstraksjon, tilberedning av PCR-blanding og overføring av prøver,
- pipettespisser (20 μl) til å samle inn EB og anbringe amplifikasjonsprodukter i agarosegel,
- en termosyklus til å utføre amplifikasjoner,
- en horisontal elektroforeseinretning til elektroforese av PCR-produkter,
- et UV-bord til observasjon av PCR-produkter etter elektroforese i agarosegel,
- et system for å ta bilde av gelene.

Vedkommende som utfører prøvingen, skal ha på seg laboratoriefrakk og hansker under alle de forskjellige trinnene som er beskrevet nedenfor. Laboratoriefrakk og hansker skal helst skiftes etter hvert hovedtrinn: DNA-ekstraksjon, tilberedning av PCR-blanding, overføring av prøver, amplifikasjon og anbringelse av gel.

Det anbefales at disse forskjellige trinnene utføres i forskjellige rom. Mer bestemt bør amplifikasjon og anbringelse av gel / elektroforese skje i et annet rom enn der DNA-ekstraksjon, tilberedning av PCR-blanding og DNA-overføring skjer.

4. *Framgangsmåte*4.1. *Tillaging av prøven*

Levende eller nylig døde østers (som ikke er gått i oppløsning), som eventuelt tidligere har vært fryst, klargjøres med henblikk på DNA-ekstraksjon.

Prøver tillages forskjellig avhengig av størrelse:

- a) Når det gjelder larver, knuses samleprøver på 50 mg hele dyr med skall og 200 µl destillert vann og sentrifugeres ved 1 000 g i 1 minutt.
- b) Når det gjelder larver på høyst 6 mm, knuses samleprøver på 300 mg hele dyr med skall og 1 200 µl destillert vann og sentrifugeres ved 1 000 g i 1 minutt.
- c) Når det gjelder larver med en størrelse på mellom 6 og 15 mm, knuses alt bløtvev fra hvert enkelt dyr for seg.
- d) Når det gjelder dyr som er større enn 15 mm, isoleres deler av gjeller og kappe.

DNA-ekstraksjon utføres ved hjelp av QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) og ifølge instruksjonene for Tissue Test Protocol.

Videre tillages prøven slik:

1. Plasser 100 µl supernatant fra prøver nevnt i bokstav a) og b) eller 10–50 mg vev fra prøver nevnt i bokstav c) og d) i et 1,5 ml mikrosentrifugerør og tilsett 180 µl Buffer ATL.
2. Tilsett 20 µl proteinase K, bland i et blandeapparat og inkuber ved 56 °C til vevet er fullstendig lysert (natten over). Bland i blandeapparat av og til under inkubering for å dispergere prøven. Sentrifuger kort 1,5 ml-mikrosentrifugerøret for å fjerne dråper fra lokket.
3. Tilsett 200 µl Buffer AL i prøven, bland ved å blande støtvis i blandeapparatet i 15 sekunder og inkuber ved 70 °C i 10 minutter. Sentrifuger kort 1,5 ml-mikrosentrifugerøret for å fjerne dråper fra lokket.
4. Tilsett 200 µl etanol (96–100 %) i prøven og bland ved å blande støtvis i blandeapparatet i 15 sekunder. Sentrifuger kort 1,5 ml-mikrosentrifugerøret for å fjerne dråper fra lokket.
5. Overfør forsiktig blandingen fra trinn 4 til QIAamp Spin-kolonnen (i et 2 ml oppsamlingsrør) uten å gjøre kanten våt. Lukk lokket og sentrifuger ved 10 000 o/min i 1 min. Sett QIAamp Spin-kolonnen i et rent 2 ml oppsamlingsrør (følger med settet) og kast røret med filtratet.
6. Åpne forsiktig QIAamp Spin-kolonnen og tilsett 500 µl Buffer AW1 uten å gjøre kanten våt. Lukk lokket og sentrifuger ved 10 000 o/min i 1 min. Sett QIAamp Spin-kolonnen i et rent 2 ml oppsamlingsrør (følger med settet) og kast oppsamlingsrøret med filtratet.
7. Åpne forsiktig QIAamp Spin-kolonnen og tilsett 500 µl Buffer AW2 uten å gjøre kanten våt. Lukk lokket og sentrifuger ved full hastighet (14 000 o/min) i 3 min.
8. (Valgfritt) Sett QIAamp Spin-kolonnen i et nytt 2 ml oppsamlingsrør (følger ikke med settet) og kast oppsamlingsrøret med filtratet. Sentrifuger ved full hastighet (14 000 o/min) i 1 min.
9. Sett QIAamp Spin-kolonnen i et rent 1,5 ml mikrosentrifugerør (følger ikke med settet) og kast oppsamlingsrøret med filtratet. Åpne forsiktig QIAamp Spin-kolonnen og tilsett 100 µl destillert vann. Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur og sentrifuger ved 10 000 o/min i 1 min.
10. Kontroller ekstraksjonens kvalitet og effektivitet (for eksempel ved å måle OD (260 nm) under spektrofotometer eller etter elektroforese i agarosegel).
11. Fortynn prøvene for å få en endelig DNA-konsentrasjon på 50–100 ng/µl.
12. DNA-løsninger oppbevares ved 4 °C til PCR-analysene er gjennomført.

Andre sett som er tilgjengelige i handelen, kan benyttes til DNA-ekstraksjon forutsatt at det er dokumentert at de gir tilsvarende resultater.

4.2. Polymerasekjedereaksjon (PCR)

4.2.1. Reagenser

- 10 X Buffer (leveres med Taq DNA-polymerase)
- MgCl₂ (leveres med DNA-polymerase) (25 mM)
- Taq DNA-polymerase (Goldstar, Eurogentec) 5 U/μl
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT) Master Mix (20 mM) skal fortynnes 10 ganger (til 2 mM) før bruk
- d H₂O (destillert H₂O fritt for DNA og RNA)

4.2.2. Primere

Følgende primere⁽¹⁾ skal brukes:

CF (10 μM)

CR (10 μM)

4.2.3. PCR-blanding

PCR-blandingen for hvert rør inneholder:

	Volum per rør	Endelig konsentrasjon
Buffer (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-polymerase (5U/μl)	0,5 μl	2,5 U
dH ₂ O	31,5 μl	

- 49 μl av denne PCR-blandingen fordeles i hvert PCR-rør
- 1 μl av ekstrahert DNA (50–100 ng/μl) tilsettes hvert rør

4.2.4. Kontroller

Det benyttes to typer kontroller:

- Negative kontroller består av dH₂O (1 μl til 49 μl PCR-blanding). Deres oppgave er å påvise mulig reaktiv forurensning fra omgivelsene. En negativ kontroll bør tas med for hver 10. prøve eller etter hvert parti med prøver.

⁽¹⁾ Disse primerne eller beskrivelsene av dem kan fås fra fellesskapsreferanselaboratoriet for sykdommer hos bløtdyr (LGP-Ifremer, av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Frankrike).

- Positive kontroller består av plasmid-DNA som inneholder OshV-1-målgenområdet CF-CR. Deres oppgave er å kontrollere hvor effektiv PCR-reaksjonen er. En positiv kontroll bør tas med for hver PCR-analyse. Positive kontroller kan fås fra Fellesskapets referanselaboratorium.

4.2.5. Amplifikasjon

Amplifikasjonssyklus utføres i en termosyklus.

- Innledende denaturering: 2 min ved 94 °C
- Amplifikasjon: 35 syklus (1 min ved 94 °C, 1 min ved 50 °C og 1 min ved 72 °C)
- Endelig elongering: 5 min ved 72 °C

4.3. Elektroforese

4.3.1. Reagenser

- 50 X TAE (kan kjøpes bruksklart):

Tris-base (40 mM) 242 g

Iseddik (40 mM) 57,1 ml

Na₂EDTA.2H₂O (1 mM) 18,61 g

dH₂O til 1 liter

Juster pH til 8

- Agarosegel 2,5 % i 1 X TAE

Etidiumbromid (0,5 µg/ml) tilsatt etter kjøling av gelen.

- Blå lastebuffer:

Bromfenolblått 0,25 %

Xylencyanol FF 0,25 %

Sukrose 40 %

Oppbevares ved 4 °C.

Fortynnes seks ganger før bruk (2 µl blå lastebuffer til 10 µl PCR-produkt).

- Molekylvektmarkør:

SmartLadder SF (Eurogentec): en bruksklar molekylvektmarkør med ni jevnt fordelte bånd fra 100–1 000 bp.

4.3.2. Tilberedning av agarosegel

1. Vei opp 2,5 g agarose, tilsett 100 ml 1 X TAE og varm opp til blandingen er smeltet.

2. Etter kjøling av løsningen tilsettes etidumbromid (5 µl til 100 ml agarosegel) og løsningen helles i en spesiell form som er utstyrt med kammer (for å danne brønner).
3. Når gelen er polymerisert, fjernes kammene og gelen plasseres i en horisontal elektroforeseinretning som inneholder nok 1 X TAE til å dekke agarosegelen.
4. 10 µl PCR-produkt blandes med 2 µl blå lastebuffer (6 X) og fylles i brønnene.
5. En brønn er reservert for molekylvektmarkøren (5 µl).
6. Det tilføres en spenning på 50–150 volt i 30–60 minutter, avhengig av gelens størrelse og tykkelse.
7. Gel observeres under UV.

4.4. *Tolking*

Forekomst av OsHV-1 µvar i en prøve påvises ved forekomst av et bånd i riktig størrelse (157 bp i stedet for 173 bp for OsHV-1) på 2,5 % agarosegel, der alle negative kontroller er negative og alle positive kontroller er positive.

DEL C

Avgrensning av kontrollområdet

Følgende faktorer som påvirker risikoene for spredning av sykdommen, skal tas hensyn til ved avgrensning av kontrollområdet i samsvar med artikkel 2 nr. 2:

- a) antall, prosentdel og fordeling av bløtdyr på det infiserte akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr,
 - b) avstand til og tetthet av nærliggende akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr,
 - c) nærhet til foredlingsvirksomheter, kontaknanlegg eller kontaktområder for bløtdyr,
 - d) arter som forekommer på akvakulturanleggene eller akvakulturområdene for bløtdyr,
 - e) oppdrettsmetoder som anvendes i berørte og nærliggende akvakulturanlegg eller akvakulturområder for bløtdyr, og
 - f) hydrodynamiske forhold og andre faktorer av epizootologisk betydning.
-

VEDLEGG II

Modell for helsesertifikat for omsetning av *Crassostrea gigas*-østers beregnet på oppdretts- og gjenutleggingsområder

DEN EUROPEISKE UNION

Sertifikat for handel innenfor Unionen

Del I: Opplysninger om forsendelsen	I.1. Avsender Navn Adresse Postnr.		I.2. Sertifikatets referansnr.	I.2.a. Lokalt referansnr.		
			I.3. Vedkommende sentrale myndighet			
			I.4. Vedkommende lokale myndighet			
	I.5. Mottaker Navn Adresse Postnr.		I.6.			
			I.7.			
	I.8. Opprinnelsesland	ISO-kode	I.9.	I.10. Bestemmelsesland	ISO-kode	I.11.
	I.12. Opprinnelsessted/fangststed Godkjent akvakulturvirksomhet <input type="checkbox"/> Annet <input type="checkbox"/> Navn Adresse Postnr.		I.13. Bestemmelsessted Godkjent akvakulturvirksomhet <input type="checkbox"/> Annet <input type="checkbox"/> Navn Adresse Postnr.			
	I.14. Lastested Postnr.		I.15. Dato og klokkeslett for avgang			
	I.16. Transportmiddel Fly <input type="checkbox"/> Skip <input type="checkbox"/> Jernbanevogn <input type="checkbox"/> Veigående kjøretøy <input type="checkbox"/> Annet <input type="checkbox"/> Identifikasjon		I.17. Transportør Navn Adresse Postnr. Godkjenningssnr. Medlemsstat			
	I.18. Dyreart/produkt			I.19. Varekode (KN-kode) 03.07		
				I.20. Antall/mengde		
				I.22. Antall kolli		
	I.23. Plombe- og containernr.			I.24. Type forpakning		
I.25. Dyr sertifisert til / produkter sertifisert for: Oppdrett <input type="checkbox"/> Gjenutlegging <input type="checkbox"/>						
I.26. Transitt gjennom et tredjeland <input type="checkbox"/> Tredjeland Utførselssted Innførselssted		ISO-kode Kode Grensekontrollstasjon nr.:	I.27. Transitt gjennom medlemsstater <input type="checkbox"/> Medlemsstat Medlemsstat Medlemsstat			ISO-kode ISO-kode ISO-kode
I.28. Eksport <input type="checkbox"/> Tredjeland Utførselssted		ISO-kode Kode	I.29.			
I.30.						
I.31. Identifikasjon av dyrene Art (vitenskapelig navn) Menge						

DEN EUROPEISKE UNION

For omsetning av *Crassostrea gigas*-østers beregnet på oppdretts- og gjenutleggingsområder

Del II: Sertifisering	II. Helseopplysninger	II.a Sertifikatets referansnr.	II.b.
	<p>(¹)(²)[II.1 Krav som gjelder <i>Crassostrea gigas</i>-østers med opprinnelse i et kontrollområde opprettet i samsvar med artikkel 2 i forordning (EU) nr. 175/2010</p> <p>Undertegnede offentlige inspektør attesterer at <i>Crassostrea gigas</i>-østers nevnt i del I av dette sertifikatet</p> <p>II.1.1. har opprinnelse i et område som har vært omfattet av tiltak for sykdomsbekjempelse for å redusere dødeligheten hos <i>Crassostrea gigas</i>-østers i forbindelse med OsHV-1 µvar,</p> <p>(¹)[II.1.2 kan bringes i omsetning i samsvar med artikkel 3 nr. 2 bokstav a) i forordning (EU) nr. 175/2010,]</p> <p>(¹)[II.1.2 har opprinnelse i en del av kontrollområdet som ikke er berørt av den økte dødeligheten hos <i>Crassostrea gigas</i>-østers, og forsendelsen har gjennomgått prøvetaking og prøving i samsvar med vedlegg I til forordning (EU) nr. 175/2010 med negativt resultat.]]</p> <p>(¹)(³)[II.2 Krav som gjelder <i>Crassostrea gigas</i>-østers med opprinnelse i en medlemsstat eller et segment som tidligere er omfattet av inneslutningstiltak med hensyn til økt dødelighet hos <i>Crassostrea gigas</i>-østers i forbindelse med OsHV-1 µvar, som er beregnet på medlemsstater eller segmenter omfattet av et program for tidlig påvisning av OsHV-1 µvar</p> <p>Undertegnede offentlige inspektør attesterer at <i>Crassostrea gigas</i>-østers nevnt i del I av dette sertifikatet</p> <p>II.2.1 kommer fra et akvakulturanlegg eller et akvakulturområde for bløtdyr der det i henhold til registrene for akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr ikke er noen tegn på økt dødelighet,</p> <p>II.2.2 har opprinnelse i et segment der det ved prøvetaking og prøving utført i samsvar med vedlegg I til forordning (EU) nr. 175/2010, er dokumentert at OsHV-1 µvar ikke forekommer hos <i>Crassostrea gigas</i>-østers.]</p> <p>II.3 Krav til transport og merking</p> <p>Undertegnede offentlige inspektør attesterer at</p> <p>II.3.1. de <i>Crassostrea gigas</i>-østers som er nevnt i del I av dette sertifikatet, plasseres under forhold, herunder med en vannkvalitet, som ikke endrer deres helsetilstand,</p> <p>II.3.2. transportcontaineren er før lasting ren og desinfisert eller tidligere ubrukt,</p> <p>II.3.3. forsendelsen er identifisert ved hjelp av en leselig etikett plassert utenpå containeren, eller ved transport med brønnbåt, i skipsmanifestet, med de aktuelle opplysningene nevnt i felt I.8–I.13 i del I av dette sertifikatet, samt følgende erklæring:</p> <p>enten (¹)[«<i>Crassostrea gigas</i>-østers beregnet på oppdrett/gjenutlegging i et område som er omfattet av et program for tidlig påvisning av OsHV-1 µvar»]</p> <p>eller (¹)[«<i>Crassostrea gigas</i>-østers beregnet på oppdrett/gjenutlegging i et område som er omfattet av sykdomsbekjempelsestiltak og med opprinnelse i et område som er omfattet av tiltak for sykdomsbekjempelse»].</p> <p>Merknader</p> <p>Del I:</p> <p>— Felt I.12: Dersom det er relevant, bruk godkjeningsnummeret for det berørte akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr.</p> <p>— Felt I.13: Dersom det er relevant, bruk godkjeningsnummeret for det berørte akvakulturanlegget eller akvakulturområdet for bløtdyr.</p> <p>— Felt I.20 og I.31: Mengden angis som samlet antall.</p> <p>— Felt I.25: Sett kryss for «Oppdrett» dersom dyrene er beregnet på oppdrett eller «Gjenutlegging» dersom dyrene er beregnet på gjenutlegging.</p>		

DEN EUROPEISKE UNION

For omsetning av *Crassostrea gigas*-østers beregnet på oppdretts- og gjenutleggingsområder

II. Helseopplysninger	II.a Sertifikatets referansenr.	II.b.
<p>Del II:</p> <p>(¹) Stryk det som ikke passer.</p> <p>(²) Del II.1 av dette sertifikatet gjelder forsendelser av <i>Crassostrea gigas</i>-østers med opprinnelse i et kontrollområde opprettet i samsvar med artikkel 2 nr. 2 i forordning (EU) nr. 175/2010 og som i henhold til artikkel 3 nr. 2 bokstav a) eller b) i nevnte forordning har tillatelse til å forlate dette området.</p> <p>(³) Del II.2 av dette sertifikatet gjelder for forsendelser av <i>Crassostrea gigas</i>-østers nevnt i artikkel 5 nr. 1 i forordning (EU) nr. 175/2010, beregnet på medlemsstater eller segmenter som er omfattet av et program for tidlig påvisning av OsHV-1 μvar og med opprinnelse i et område som tidligere har vært omfattet av inneslutningstiltak med hensyn til økt dødelighet hos <i>Crassostrea gigas</i>-østers.</p>		
<p>Offentlig inspektør</p> <p>Navn (med blokkbokstaver):</p> <p>Lokal veterinærenhet:</p> <p>Dato:</p> <p>Stempel:</p> <p>Kvalifikasjon og tittel:</p> <p>Lokal veterinærenhets nr.:</p> <p>Underskrift:</p>		